

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΦΥΤΙΚΗΣ & ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΤΙΣ ΓΟΝΑΔΕΣ ΨΑΡΙΩΝ ΤΟΥ
ΠΑΓΑΣΗΤΙΚΟΥ ΚΟΛΠΟΥ**

**ΝΤΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ – ΥΓΙΕΙΟΝΟΛΟΓΟΣ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΚΟΥΡΕΤΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΝΕΟΦΥΤΟΥ ΧΡΗΣΤΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
ΛΟΛΑΣ ΠΕΤΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

ΒΟΛΟΣ , ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2001



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

Αριθ. Εισ.: 1549/1
Ημερ. Εισ.: 01-07-2003
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
597.015
NTA

Στην γυναίκα μου Τζένη
(για την αμέριστη συμπαράστασή της)
στα παιδιά μου Κάλια , Νικόλ
στους γονείς μου



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

.....2

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.....4

1.2 Φυσιολογία της αναπαραγωγής των ψαριών.....16

1.3 Η μέθοδος Differential Display - PCR των mRNAs.....24
(Διαφορική ανίχνευση των mRNAs).

1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR)29

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.A. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.A.1 ΥΛΙΚΑ

2.A.1.1 Συσσκευές..... 31

2.A.1.2 Αναλώσιμα.....32

2.A.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

2.A.2.1 Συλλογή και διατήρηση Αυγών..... 34

2.A.2.2 Απομόνωση ολικού RNA με Trk lysis Buffer 35

2.A.2.3 Απομόνωση ολικού RNA με Trizol ® Reagent.....37

2.A.2.4 Εφαρμογή της μεθόδου Differential Display – PCR των m RNA s...39

2.A.2.5 Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης PCR 46

2.A.2.6 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή
πολυακρυλαμιδίου..... 48

2.A.2.7	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.....	50
2.A.2.7.1	Απομόνωση πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες από τις γονάδες των ψαριών.....	50
2.A.2.7.2	Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα – πυρήνες στις γονάδες των ψαριών.....	52
2.A.2.7.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε αναγωγικές συνθήκες μετουσίωσης σε πήκτωμα ολυακρυλαμιδίου.....	53
2 . B	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
2.B.1	Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης.....	58
2.B.2	Επιλογή των εκκινητών (primers) και συνδυασμοί μεταξύ αυτών.....	60
2.B.2.1	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊνικών οξέων.....	63
2.B.3	Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε αναγωγικές συνθήκες.....	65
2.B.3.1	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος στις γονάδες θηλυκών ατόμων Γόπας , Μπακαλιάρου και Κολιού.....	65
2.B.3.2	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος στις γονάδες αρσενικών ατόμων Γόπας , Μπακαλιάρου και Κολιού.....	66
2.B.3.3	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων στις γονάδες θηλυκών ατόμων Γόπας ,Μπακαλιάρου και Κολιού.....	67
2.B.3.4	Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων στις γονάδες αρσενικών ατόμων Γόπας , Μπακαλιάρου και Κολιού.....	68

3.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	69
	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	76
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε από τον Απρίλιο του 2000 έως τον Ιούνιο του 2001 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής και Ζωϊκής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας , σε συνεργασία με το Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του ίδιου Τμήματος.

Κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής , είχα την τιμή να συνεργαστώ με αξιόλογους επιστήμονες , οι οποίοι με στήριξαν στην προσπάθειά μου , δίνοντας τις κατάλληλες συμβουλές τους προκειμένου να την αποπερατώσω.

Ιδιαίτερα όμως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Δ.Κουρέτα , για την καθοριστική συμβολή του στη διαμόρφωση αυτής της διατριβής , δίνοντας τις πολύτιμες συμβουλές του και διαθέτοντας τον χρόνο του στη διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τον Καθηγητή κ. Χ.. Νεοφύτου , μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής , για τις πολύτιμες συμβουλές του , την παραχώρηση του εργαστηρίου του , καθώς και για τη διόρθωση των χειρογράφων.

Τον Καθηγητή κ. Π. Λόλα , μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής , για τις υποδείξεις και την ηθική συμπαράσταση , καθώς και για τη διόρθωση των χειρογράφων.

Τον Καθηγητή κ. Ι. Τσιτσιπή , για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στους χώρους του εργαστηρίου του κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας.

Τον Διδάκτορα κ. Ι . Μαργαριτόπουλο , Γεωπόνο , για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε , όποτε του ζητούσα .

Τον Επίκουρο Καθηγητή κ Ζ . Μαμούρη και τους συνεργάτες του , για την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφεραν όταν την ζητούσα.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους γονείς μου , για όλα όσα μου πρόσφεραν μέχρι σήμερα στη σταδιοδρομία μου .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το DNA ενός οργανισμού κωδικοποιεί όλα τα μόρια του RNA και των πρωτεϊνών που απαιτούνται για τη συγκρότηση των κυττάρων του. Η πλήρης περιγραφή της αλληλουχίας του DNA ενός οργανισμού , είτε πρόκειται για τα εκατομμύρια νουκλεοτίδια ενός οργανισμού , είτε πρόκειται για τα δισεκατομμύρια νουκλεοτίδια ενός ανθρώπινου κυττάρου , δεν επαρκεί για την ανασυγκρότηση του οργανισμού.

Είναι επιπλέον απαραίτητο να γνωρίζουμε πως χρησιμοποιούνται τα στοιχεία της αλληλουχίας του DNA , δηλαδή τα γονίδια . Η έκφραση των γονιδίων από το απλούστερο μονοκύτταρο βακτήριο , έως τα πολυκύτταρα φυτά και ζώα ελέγχεται από μία περίτεχνη διαδικασία , έτσι ώστε οι οργανισμοί να χρησιμοποιούν τα γονιδιά τους με εκλεκτικό τρόπο , ενεργοποιώντας ή απενεργοποιώντας τα γονίδια ανάλογα με τις διαθέσιμες πηγές της τροφής.

Επίσης είναι γνωστό ότι όλα σχεδόν τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού περιέχουν το ίδιο γονιδίωμα. Η κυτταρική διαφοροποίηση όμως επιτυγχάνεται με αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων .

Ο βαθμός των διαφορών ως προς την έκφραση των γονιδίων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη κυττάρων, μπορεί κατά κάποιο τρόπο να μετρηθεί από τη σύγκριση της σύστασης των πρωτεϊνών των κυττάρων διαφορετικών οργάνων , χρησιμοποιώντας την τεχνική της δυσδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή. Τέτοιου είδους μελέτες αποκαλύπτουν ότι πολλές πρωτεΐνες είναι κοινές για όλα τα κύτταρα ενός πολυκύτταρου οργανισμού. (Alberts Bray et al . 2000).

Σκοπός της παρούσας εργασίας , είναι η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης , σε συγκεκριμένα είδη ψαριών όπως της Γόπας (*Boops boops*), του Μπακαλιάρου (*Merlangius merlangius*), και του Κολιού(*Scomber japonicus*), τα οποία αλιεύθηκαν από την περιοχή του Παγασητικού Κόλπου.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η βασική ιδέα της μεθόδου ,Differential Display – Polymerase Chain Reaction (DD – PCR) ,για την ανίχνευση μόνο των εκφρασμένων γονιδίων , που αποτελούν το 10 – 15 % του συνολικού αριθμού των γονιδίων στο γονιδίωμα , αξιοποιώντας την ουρά poly (A) που φέρει κάθε m RNA . Συγκεκριμένα απομονώθηκε το ολικό RNA από τις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων των παραπάνω ειδών των ψαριών .

Μετά εφαρμόστηκε η τροποποιημένη μέθοδος DD – PCR , η οποία διαφοροποιείται στην χρήση απλού oligo (d T) εκκινητή στην αντίστροφη μεταγραφή (RT) , στους τυχαίους εικοσιπενταμερείς και εικοσιεξαμερείς εκκινητές, σε συνδυασμό με τριαντακονταμερείς εκκινητές στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) , στην αύξηση των κύκλων της PCR , και τέλος στην χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο .

Η παραπάνω μέθοδος χρησιμοποιείται στην ταυτοποίηση και κλωνοποίηση όλων των διαφορεικά εκφρασμένων m RNAs , και μάλιστα όταν η διαφορική γονιδιακή έκφραση παρατηρείται , τόσο σε φυσιολογικές λειτουργίες των μονοκυτταρικών και των πολυκυτταρικών οργανισμών , όπως η ανάπτυξη και η απάντηση σε περιβαλλοντικό στρες .

Η ύλη της παρούσας εργασίας έχει χωρισθεί σε δύο μέρη στο Γενικό μέρος όπου περιγράφονται η Ρύθμιση της Γονιδιακής Έκφρασης και η Φυσιολογία Αναπαραγωγής των Ψαριών , και το Ειδικό μέρος όπου αναλύονται οι Μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και τα αποτελέσματα αυτού.

1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Είναι γνωστό ότι τα διάφορα είδη κυττάρων ενός πολυκύτταρου οργανισμού, όπως τα μυϊκά , τα νευρικά κύτταρα και τα κύτταρα του αίματος , καθώς αναπτύσσεται διαφοροποιούνται μεταξύ τους ,με αποτέλεσμα να δημιουργείται η μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων που χαρακτηρίζει τον ενήλικο οργανισμό. Αυτή η διαφοροποίηση προκύπτει επειδή τα κύτταρα παράγουν και συσσωρεύουν διαφορετικές ομάδες μορίων RNA και πρωτεϊνών , δηλαδή εκφράζουν διαφορετικά γονίδια.

Από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν τόσο σε φυτά όσο και σε ζώα , αποδείχθηκε ότι τα κύτταρα ενός οργανισμού δε διαφέρουν επειδή περιέχουν διαφορετικά γονίδια , αλλά επειδή εκφράζουν τα γονίδια τους με διαφορετικό τρόπο. Παράδειγμα , απομονωμένα κύτταρα καρότου μπορεί να αναγεννήσουν ολόκληρο το ενήλικο φυτό , πράγμα που αποδεικνύει ότι το DNA των εξειδικευμένων κυττάρων εξακολουθεί να περιέχει το πλήρες σύνολο των οδηγιών που απαιτούνται για τη δημιουργία ενός ολόκληρου οργανισμού.

Ο βαθμός των διαφορών , ανάμεσα σε διαφορετικά είδη κυττάρων μπορεί να μετρηθεί από την σύγκριση της σύστασης των πρωτεϊνών των κυττάρων των διαφορετικών οργάνων (εγκέφαλος , ήπαρ , καρδιά κ.ά.) χρησιμοποιώντας την τεχνική της δυσδιάστατης ηλεκτροφόρησης σε πηκτή.

Τέτοιου είδους πειράματα αποκαλύπτουν ότι πολλές πρωτεΐνες είναι κοινές για όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού.

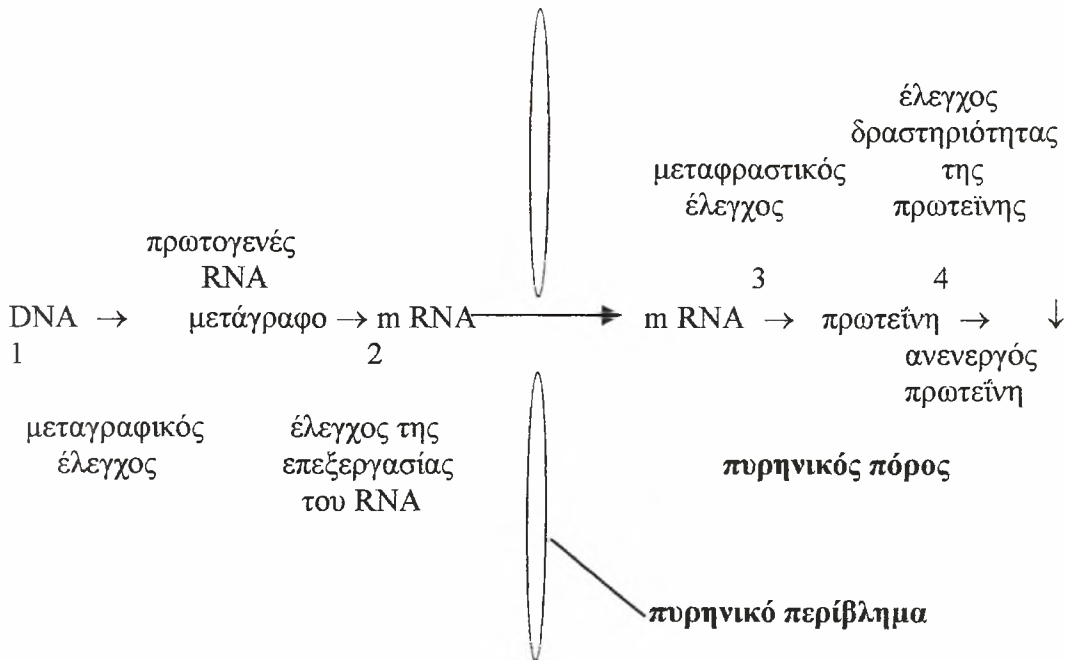
Σ' αυτές περιλαμβάνονται οι κύριες δομικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού και των χρωμοσωμάτων , οι πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για το ενδοπλασματικό δίκτυο και τις μεμβράνες Golgi , οι ριβοσωματικές πρωτεΐνες και τα ένζυμα που διεκπεραιώνουν τη γλυκόλυση και άλλες βασικές μεταβολικές διεργασίες.

Αυτές οι πρωτεΐνες αποκαλούνται **διαχειρίστριες (housekeeping proteins)** , όρος που χρησιμοποιείται και για τα γονίδια που τις κωδικοποιούν . Κάθε διαφορετικό είδος κυττάρων παράγει επίσης εξειδικευμένες πρωτεΐνες οι οποίες είναι υπεύθυνες για τις χαρακτηριστικές ιδιότητες του κυττάρου.

Ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων , δηλαδή η οδός που οδηγεί από το DNA στην πρωτεΐνη περνάει από πολλά στάδια στα οποία θεωρητικά ένα κύτταρο είναι δυνατόν να ελέγχει τις πρωτεΐνες που παράγει.

Στο παρακάτω Σχήμα 1 φαίνονται τα βήματα στα οποία μπορεί να ελεγχθεί η έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων.

ΠΥΡΗΝΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ



Σχήμα 1 Τέσσερα βήματα στα οποία μπορεί να ελεγχθεί η έκφραση των ευκαρυωτικών γονιδίων (Alberts Bray et al . 2000).

Επομένως ένα κύτταρο μπορεί να ελέγχει τις πρωτεΐνες που παράγει σε ένα από τα παραπάνω στάδια :

1. Έλεγχο του χρόνου και της συχνότητας της μεταγραφής ενός δεδομένου γονιδίου
2. Έλεγχος του τρόπου συρραφής(και άλλης επεξεργασίας) του πρωτογενούς μεταγράφου.
3. Επιλογή των μορίων mRNA που θα μεταφραστούν από τα ριβοσώματα.
4. Επιλεκτική ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση πρωτεϊνών μετά την σύνθεσή τους.

Για τα περισσότερα γονίδια τη μεγαλύτερη σημασία έχει ο έλεγχος της μεταγραφής και αυτό είναι λογικό επειδή μόνο ο μεταγραφικός έλεγχος εξασφαλίζει ότι δεν θα παραχθούν περιττά ενδιάμεσα.

Είναι γνωστό ότι η περιοχή του **υποκινητή** ενός γονιδίου προσελκύει την RNA πολυμεράση σωστά έτσι ώστε να αρχίσει να συνθέτει σωστά ένα RNA αντίγραφο του γονιδίου. Οι υποκινητές , τόσο στα βακτηριακά όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα περιλαμβάνουν και τη **θέση έναρξης** της μεταγραφής (**initiation site**) από όπου αρχίζει η μεταγραφή , και μια αλληλουχία 50 νουκλεοτιδίων η οποία εκτείνεται “ ανοδικά” από τη θέση έναρξης . Η περιοχή αυτή περιέχει θέσεις απαραίτητες για την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή.

Σχεδόν όλα τα γονίδια , διαθέτουν επιπλέον και **ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA (DNA regulatory sequences)** που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των γονιδίων. Ορισμένες ρυθμιστικές αλληλουχίες του DNA έχουν μήκος 10.000 ζεύγη νουκλεοτιδίων και δρουν σαν απλοί διακόπτες σ ένα ορισμένο σήμα. Η **έκφραση ενός γονιδίου εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες , στους οποίους περιλαμβάνονται ο τύπος του κυττάρου , το περιβάλλον του , η ηλικία του , καθώς επίσης και τα εξωκυττάρια σήματα.**

Οι παραπάνω ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA δεν δρουν αυτοδύναμα αλλά αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες γνωστές σαν **ρυθμιστικές πρωτεΐνες των γονιδίων (gene regulatory proteins)**, οι οποίες προσδένονται στο DNA. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί εκατοντάδες ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA, καθεμιά από τις οποίες αναγνωρίζεται από μια ή περισσότερες ρυθμιστικές πρωτεΐνες γονιδίων.

Η αναγνώριση μιας ειδικής αλληλουχίας DNA, από ορισμένες ρυθμιστικές πρωτεΐνες βασίζεται στο καλό ταίριασμα της επιφάνειας της πρωτεΐνης με την επιφάνεια της διπλής έλικας στην συγκεκριμένη περιοχή του DNA.

Η πρωτεΐνη σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου, ιοντικούς δεσμούς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις με τα ζεύγη των βάσεων, χωρίς να διαταράσσει τους δεσμούς υδρογόνου που συγκρατούν τα ζεύγη των βάσεων.

Οι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA προσδένονται με την έλικα του DNA κατά ζεύγη (ως διμερή). Ο διαμερισμός διπλασιάζει την περιοχή της επαφής με το DNA και έτσι επαυξάνει την ισχύ και την εξειδίκευση της αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης – DNA.

Επειδή τα πιο κατανοητά παραδείγματα γονιδιακής ρύθμισης συναντώνται στα βακτήρια και τους ιούς τους, (όπως π.χ στο E. Coli που ρυθμίζει την έκφραση πολλών γονιδίων του σύμφωνα με τις διαθέσιμες πηγές τροφών στο περιβάλλον), βρέθηκε ότι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες δρουν επιλεκτικά ανάλογα με τις ανάγκες του βακτηρίου. **Άλλοτε σαν καταστολείς – πρωτεΐνες (repressors proteins) αδρανοποιώντας τα γονίδια, άλλοτε σαν ενεργοποιητικές – πρωτεΐνες (activators proteins) ενεργοποιώντας τα αντίστοιχα γονίδια.**

Όσοι στους ευκαρυώτες, τα γονίδια πρέπει να ρυθμίζονται ανεξάρτητα, γι' αυτό και δεν απαντούν σαν συσσωματώματα γονιδίων, τα λεγόμενα **οπερόνια (operons)**, οπότε να μεταγράφονται σ'ένα ενιαίο μόριο mRNA, όπως συμβαίνει στα βακτήρια.

Η έναρξη της μεταγραφής στους ευκαρυώτες εμφανίζει τέσσερις σημαντικές διαφορές από την αντίστοιχη διεργασία στα βακτήρια.

1. Η πρώτη διαφορά έγκειται στις ίδιες τις RNA πολυμεράσες. Τα ευκαρυωτικά κύτταρα περιέχουν τρία είδη τα γνωστά **RNA πολυμεράσες I , II , III**. Αυτές είναι υπεύθυνες για τη μεταγραφή διαφορετικών τύπων γονιδίων. Όπως οι I και III μεταγράφουν τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μόρια του μεταφορικού RNA , του ριβοσωμικού RNA και τα μικρά μόρια RNA που παίζουν ένα δομικό ρόλο στο κύτταρο, έτσι εκεί η RNA πολυμεράση II μεταγράφει την μεγάλη πλειονότητα των ευκαρυωτικών γονιδίων , συμπεριλαμβανομένων και όλων εκείνων των γονιδίων που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες.

2. Οι ευκαρυωτικές RNA πολυμεράσες απαιτούν την βοήθεια μιας μεγάλης ομάδας πρωτεϊνών , που αναφέρονται σαν **γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες (general transcription factors)** οι οποίοι προηγουμένως πρέπει να συγκεντρωθούν στον υποκινητή , για να μπορέσει η πολυμεράση να αρχίσει την μεταγραφή.

3. Η έναρξη της μεταγραφής μπορεί να επηρεαστεί από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες (ενεργοποιητές και καταστολείς) **ακόμη και όταν είναι συνδεδεμένες στο DNA σε απόσταση χιλιάδων ζευγών νουκλεοτιδίων από τον υποκινητή** . Αυτό επιτρέπει σ' έναν υποκινητή να ελέγχεται από σχεδόν απεριόριστο αριθμό διάσπαρτων ρυθμιστικών αλληλουχιών , κατά μήκος του DNA αντίθετα με τα βακτήρια όπου η ρυθμιστική αλληλουχία εντοπίζεται αρκετά κοντά στον υποκινητή.

4. Τέλος , στους ευκαρυώτες, η έναρξη της μεταγραφής περιπλέκεται ακόμη περισσότερο από την συσκευασία του DNA σε νουκλεοσωμάτια και την πιο συμπαγή δομή της χρωματίνης.

Όπως ανάφερα παραπάνω οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες πιστεύεται ότι τοποθετούν σωστά την RNA πολυμεράση στον υποκινητή , συμβάλλουν στην διάνοιξη της διπλής έλικας του DNA και έτσι επιτρέπουν ν' αρχίσει η μεταγραφή . Επίσης συμβάλλουν στην απελευθέρωση της RNA πολυμεράσης από τον υποκινητή μόλις αρχίσει η μεταγραφή. Ο όρος γενικοί αναφέρεται στο ότι οι πρωτεΐνες αυτές συγκεντρώνονται πάνω σε όλους τους υποκινητές που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II.

Έτσι διαφέρουν από τους καταστολείς ή ενεργοποιητές των βακτηρίων που δρουν μόνο σε συγκεκριμένα γονίδια ή συσσωματώματα γονιδίων , όπως και από τις ρυθμιστικές πρωτεΐνες των ευκαρυωτικών γονιδίων , οι οποίες , όπως θα δούμε στην συνέχεια , επίσης δρουν μόνο σε συγκεκριμένα γονίδια.

Η συσκευασία του DNA του υποκινητή σε νουκλεοσωμάτια , καθιστά την έναρξη της μεταγραφής στα ευκαρυωτικά κύτταρα ακόμη πιο περίπλοκη . Επειδή τα νουκλεοσωμάτια είναι τοποθετημένα στο DNA ανά τακτές αποστάσεις, χωρίς κάποια προφανή ειδική σχέση με την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων , είναι πιθανό να βρίσκονται και σε περιοχές υποκινητών , όπως επίσης σε ρυθμιστικές αλληλουχίες DNA . Έτσι είναι δυνατόν να αναστείλουν την έναρξη της μεταγραφής ή να εμποδίσουν την πρόσδεση των ρυθμιστικών πρωτεϊνών όχι όμως πάντα .

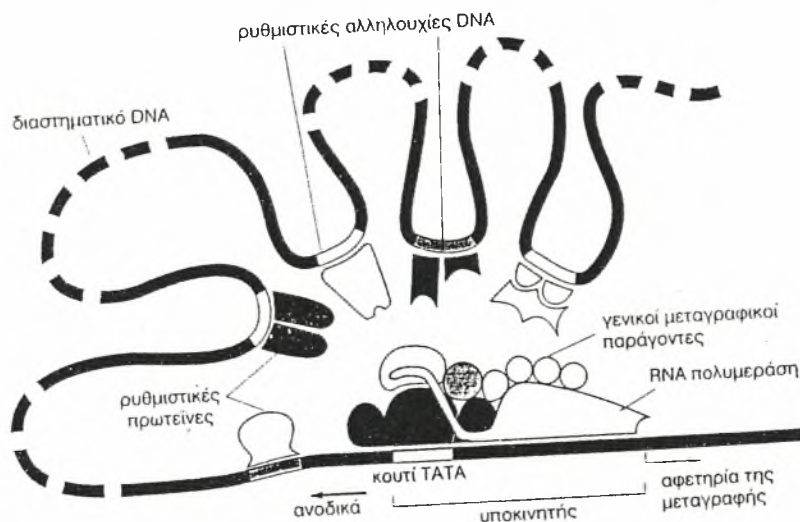
Ο λόγος ίσως να οφείλεται στην παρεμπόδιση πρόσδεσης των γενικών μεταγραφικών παραγόντων ή της RNA πολυμεράσης στο DNA. Χαρακτηριστικό είναι ότι τα νουκλεοσωμάτια που βρίσκονται σ' αυτές τις περιοχές εκτοπίζονται μόλις ενεργοποιηθεί η μεταγραφή του γονιδίου , με αδιευκρίνιστο έως τώρα μηχανισμό.

Ενδεχομένως το κύτταρο να διαθέτει εξειδικευμένες πρωτεΐνες , οι οποίες εκτοπίζουν τα νουκλεοσωμάτια και ανοίγουν το δρόμο στην πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων. Ωστόσο , οι πιο συμπαγείς μορφές της χρωματίνης (στα μιτωτικά χρωμοσώματα , τα αδρανή χρωμοσώματα X και άλλες ετεροχρωματικές περιοχές των μεσοφασικών χρωμοσωμάτων) ανθίστανται στην έναρξη της μεταγραφής .

Ίσως γιατί το DNA είναι τόσο σφικτά διπλωμένο , που οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες , οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση δεν μπορούν να το προσπελάσουν. Οι πρωτεΐνες που είναι υπεύθυνες για το αυξημένο πακετάρισμα του DNA μόλις άρχισαν να ανακαλύπτονται.

Στα ζώα και τα φυτά οι ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός γονιδίου συχνά βρίσκονται διάσπαρτες μέσα σ' ένα τμήμα DNA μέχρι και 50.000 ζευγών νουκλεοτιδίων , αν και μεγάλο μέρος από το DNA λειτουργεί σαν **διαστηματική αλληλουχία (spacer sequence)** και δεν αναγνωρίζεται από ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Αντίθετα με τα βακτηριακά κύτταρα , όπου οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες (καταστολείς – ενεργοποιητές) δρουν ανεξάρτητα η μία από την άλλη , στα ευκαρυωτικά κύτταρα οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες δρουν **συνδυαστικά (combinatorial control)** ελέγχοντας την συνολική έκφραση ενός γονιδίου.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2, στους ευκαρυώτες πολλές διαφορετικές πρωτεΐνες προσδένονται σε ρυθμιστικές αλληλουχίες και επηρεάζουν την έναρξη της μεταγραφής.



Σχήμα 2 .Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες ενός τυπικού ευκαρυωτικού γονιδίου (Alberts Bray et al . 2000).

Ο υποκινητής είναι η αλληλουχία του DNA στην οποία συναρμολογούνται οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες και η RNA πολυμεράση. Το πιο σημαντικό γνώρισμα στους υποκινητές των γονιδίων που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II είναι το « **κουτί TATA** » που είναι μια αλληλουχία η οποία λειτουργεί σαν αφετηρία για τη **συναρμολόγηση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων**. Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες λειτουργούν σαν θέσεις πρόσδεσης για ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Οι ρυθμιστικές αλληλουχίες μπορεί να εντοπίζονται δίπλα στον υποκινητή , πολύ πριν από αυτόν ή ακόμα και μετά το γονίδιο. Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες που προσδένονται μακριά από τον υποκινητή αποκτούν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες που προσδένονται στον υποκινητή χάρη στην πτύχωση του DNA.

Οι γενικοί μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι συναρμολογούνται στον υποκινητή είναι οι ίδιοι για όλα τα γονίδια που μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Οι επιδράσεις πολλών ρυθμιστικών πρωτεϊνών συνδυάζονται για να καθορίσουν την ταχύτητα έναρξης της μεταγραφής. Ωστόσο ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο συνδυάζονται οι επιδράσεις αυτές δεν έχει διαλευκανθεί για κανένα γονίδιο.

Έτσι ένα ευκαρυωτικό κύτταρο χρησιμοποιεί μια « **επιτροπή** » **ρυθμιστικών πρωτεϊνών** για να ελέγξει το καθένα από τα γονίδιά του σε αντίθεση με τα βακτήρια τα οποία για να συντονίσουν την έκφραση μιας ομάδας διαφορετικών γονιδίων , διαθέτουν μηχανισμό να τα ομαδοποιούν σ' ένα συσσωμάτωμα κάτω από τον έλεγχο του ίδιου υποκινητή. Αποτέλεσμα του συνδυαστικού ελέγχου στους ευκαρυώτες , είναι ότι ακόμη και μια μόνη ρυθμιστική πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει αποφασιστικά την έκφραση ενός συγκεκριμένου γονιδίου , απλώς επειδή ολοκληρώνει το συνδυασμό που είναι απαραίτητος για την ενεργοποίηση ή την καταστολή αυτού του γονιδίου.

Η ίδια πρωτεΐνη μπορεί να συμπληρώνει τον συνδιασμό για αρκετά διαφορετικά γονίδια. Αυτό μοιάζει σαν να πληκτρολογούμε τον τελευταίο αριθμό στον συνδιασμό μιας κλειδαριάς .

Αν αρκετά διαφορετικά γονίδια περιέχουν τη ρυθμιστική θέση για την ίδια ρυθμιστική πρωτεΐνη , τότε η συγκεκριμένη πρωτεΐνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ρύθμιση της έκφρασης όλων αυτών των γονιδίων.

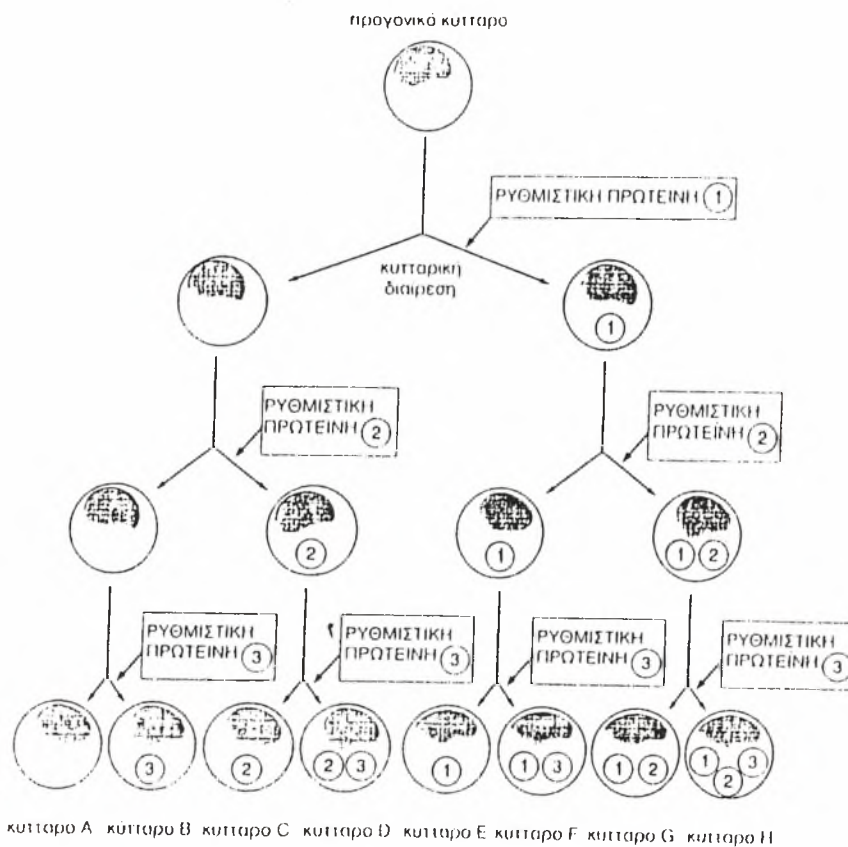
Η ικανότητα ενεργοποίησης και καταστολής πολλών διαφορετικών γονιδίων με την χρησιμοποίηση μιας μόνο πρωτεΐνης , **αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς με τους οποίους τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε συγκεκριμένους τύπους κυττάρων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.**

Τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα των θηλαστικών είναι ένα πολύ χαρακτηριστικό είδος κυττάρων . Από μελέτες των μυϊκών κυττάρων σε καλλιέργεια κατά την διάρκεια της διαφοροποίησής τους ταυτοποιήθηκαν ρυθμιστικές πρωτεΐνες « κλειδιά » οι οποίες εκφράζονται μόνο σε κύτταρα που προορίζονται να γίνουν μυϊκά , συντονίζουν την έκφραση των γονιδίων και επομένως έχουν αποφασιστική σημασία για την διαφοροποίηση των μυϊκών κυττάρων .

Αυτές οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ενεργοποιούν τη μεταγραφή των γονιδίων που κωδικοποιούν τις ειδικές για τα μυϊκά κύτταρα πρωτεΐνες , προσδεδεμένες σε θέσεις που βρίσκονται σε όλες τις ρυθμιστικές περιοχές.

Η σημασία του συνδυαστικού ελέγχου των γονιδίων για την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυττάρων φαίνεται στο παρακάτω υποθετικό σχεδιάγραμμα, όπου από τον συνδιασμό λίγων γονιδιακών ρυθμιστικών πρωτεϊνών προκύπτουν πολλά διαφορετικά είδη κυττάρων κατά την ανάπτυξη.

Στο Σχήμα 3 , φαίνεται η σημασία του συνδυαστικού ελέγχου των γονιδίων για την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυττάρων.



Σχήμα 3. Η σημασία του συνδυαστικού ελέγχου των γονιδίων για την ανάπτυξη διαφορετικών τύπων κυττάρων. (Alberts Bray et al . 2000).

Οι πολυκύτταροι οργανισμοί απαιτούν ειδικούς μηχανισμούς ενεργοποίησης και απενεργοποίησης των γονιδίων τους για να δημιουργούν και να συντηρούν τα διάφορα είδη των κυττάρων τους. Μόλις ένα κύτταρο ενός πολυκύτταρου οργανισμού διαφοροποιηθεί σ' ένα συγκεκριμένο είδος κυττάρου, γενικά θα παραμείνει διαφοροποιημένο, και μάλιστα αν το κύτταρο αυτό είναι σε θέση να διαιρείται, όλοι οι απόγονοί του θα ανήκουν στο ίδιο είδος κυττάρων. Μόνο μερικά πολύ εξειδικευμένα κύτταρα, όπως τα σκελετικά μυϊκά κύτταρα και οι νευρώνες, μόλις διαφοροποιηθούν παύουν να διαιρούνται.

Το χαρακτηριστικό της υπόθεσης αυτής είναι ότι όλα τα είδη κυττάρων, όταν διαιρούνται, αποκτούν μόνο ομοειδείς απογόνους, π.χ από τα λεία μυϊκά κύτταρα δεν προκύπτουν ηπατοκύτταρα, όπως επίσης και από τα ηπατοκύτταρα δεν προκύπτουν ινοβλάστες.

Αυτό σημαίνει ότι οι μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων που οδηγούν στη δημιουργία ενός διαφοροποιημένου κυττάρου πρέπει να διατηρούνται στη « μνήμη » του κυττάρου και να μεταβιβάζονται στους απογόνους από γενιά σε γενιά, αντίθετα από τις πρόσκαιρες αλλαγές της έκφρασης των γονιδίων που μπορεί να συμβούν τόσο στα βακτηριακά όσο και στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Τα κύτταρα διαθέτουν αρκετούς μηχανισμούς για να εξασφαλίσουν ότι τα θυγατρικά κύτταρα « θυμούνται » το είδος των κυττάρων στο οποίο υποτίθεται ότι ανήκουν. Ένας από τους πιο απλούς μηχανισμούς είναι ο **μηχανισμός της θετικής ανατροφοδότησης (positive feedback loop)**, στον οποίο μια καίρια γονιδιακή ρυθμιστική πρωτεΐνη ενεργοποιεί τη μεταγραφή διάφορων γονιδίων, ειδικών για το συγκεκριμένο είδος κυττάρων, όπως επίσης, και τη μεταγραφή του ίδιου του γονιδίου.

Ένας άλλος τρόπος διατήρησης της κυτταρικής ταυτότητας, περιλαμβάνει την αξιόπιστη μεταβίβαση μιας δομής συμπαγούς χρωματίνης από το προγονικό στο θυγατρικό κύτταρο, έστω και αν στο μεταξύ έχει μεσολαβήσει αντιγραφή του DNA. Ο μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου ελέγχεται σε ποια κατάσταση θα μεταβιβαστεί η χρωματίνη δεν είναι γνωστός στις λεπτομέρειές του.

Συνοψίζοντας τα παραπάνω είδαμε ότι μια μόνη γονιδιακή ρυθμιστική πρωτεΐνη μπορεί να επηρεάσει αποφασιστικά την έκφραση μιας ολόκληρης ομάδας γονιδίων αν η προσθήκη της συμπληρώνει τον κατάλληλο συνδιασμό. Είδαμε επίσης πως μια μόνη πρωτεΐνη μπορεί να μετατρέψει έναν τύπο κυττάρου σ' έναν άλλο τύπο.

Ωστόσο, είναι πιθανόν ότι η ρυθμιστική πρωτεΐνη ελέγχει άμεσα την έκφραση πολλών άλλων γονιδίων μέσω της πρόσδεσής της στις ρυθμιστικές περιοχές τους.

Έτσι η δράση μιας μόνο ρυθμιστικής πρωτεΐνης μπορεί να ενεργοποιήσει μια ακολουθία άλλων ρυθμιστικών πρωτεϊνών, οι οποίες οδηγούν στη δημιουργία μιας οργανωμένης ομάδας από πολλά διαφορετικά είδη κυττάρων. Έτσι μπορεί να φανταστεί κανείς ότι με την επαναλαμβανόμενη εφαρμογή αυτής της αρχής, σταδιακά συγκροτείται ένας σύνθετος οργανισμός.

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΩΝ ΨΑΡΙΩΝ

Ο αναπαραγωγικός κύκλος των ψαριών στην εύκρατη ζώνη είναι ετήσιος. Η αναπαραγωγική δραστηριότητα παρουσιάζει μια εποχιακότητα κατά τρόπο ώστε η αναπαραγωγή να συμβαίνει την ίδια χρονική περίοδο, και τα επιμέρους στάδια της γαμετογένεσης να εμφανίζουν παρόμοια χρονολογική τοποθέτηση από χρόνο σε χρόνο.

Οι γονάδες υφίστανται σημαντικές δομικές και λειτουργικές μεταβολές, κατά την γαμετογένεση και η δραστηριότητά τους παρουσιάζει μια έντονη εποχιακότητα. Αυτές οι μεταβολές αντανακλούν στην αύξηση του βάρους των γονάδων. Η γαμετογένεση πραγματοποιείται κατά διακριτές φάσεις όπως (προλεκιθογένεση, ενδογενή – εξωγενή λεκιθογένεση, τελική ωρίμανση - ωοτοκία). Στα θηλυκά άτομα τα παραπάνω στάδια βοηθούν να συγκεντρωθεί το λεκιθικό υλικό στο αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η συγκέντρωση του λεκιθικού υλικού πετυχαίνεται σε δύο φάσεις:

1. Με την **πρωτογενή αύξηση**, κατά την οποία το μέγεθος του ωοκυττάρου αυξάνεται εξαιτίας της δημιουργίας υποκυτταρικών οργανιδίων για την παραγωγή του ενδογενούς λεκιθικού υλικού (**ενδογενής προέλευση**).

2. Με την **δευτερογενή αύξηση**, όπου εισέρχεται στο ωοκύτταρο εξωγενές λεκιθικό υλικό από το αίμα με την μορφή λεκιθογενίνης (**εξωγενής προέλευση**).

Στα αρσενικά άτομα, η αύξηση του βάρους των όρχεων, οφείλεται στην αύξηση του μεγέθους και του αριθμού των **σπερματικών λοβών**, μέσα στους οποίους πραγματοποιείται η **σπερματογένεση**. Το μέγιστο της αύξησης περατηρείται στο **στάδιο της σπερμίας** όπου οι **σπερματίδες διαφοροποιούνται σε σπερματοζωάρια**, αλλά και κατά την **ενυδάτωση του σπέρματος**.

Κατά την γαμετογένεση και άλλα όργανα παρουσιάζουν μια εποχιακή δραστηριότητα ή μεταβολή στο βάρος τους . Τα ήπαρ αποτελεί πηγή λιπιδίων για τη λεκιθογένεση , όπως επίσης το όργανο σύνθεσης της λεκιθογενίνης. Η τελευταία είναι μια λιπογλυκοφωσφοπρωτεΐνη , η οποία απελευθερώνεται στο αίμα και με την κυκλοφορία ενσωματώνεται στο ωκύτταρο με μικροπνοκύτωση με τη μορφή λεκιθικών κοκκίων.

Επίσης κατά την ίδια περίοδο της γαμετογένεσης , μεταβολές παρουσιάζουν το σωματικό και περισπλαχνικό λίπος , καθώς αυξάνονται στο μέγιστο πριν την έναρξη της λεκιθογένεσης.

Οι συγκεντρώσεις των **στεροειδών ορμονών** στο πλάσμα παρουσιάζουν έντονες εποχιακές μεταβολές. Οι παραπάνω ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην γαμετογένεση , στην αναπαραγωγική συμπεριφορά και στην ανάπτυξη των δευτερογενών φυλετικών γνωρισμάτων.

Οι γονάδες είναι το κύριο όργανο παραγωγής στεροειδών ορμονών , αλλά και άλλα όργανα συμμετέχουν στην σύνθεσή τους όπως ο εγκέφαλος , ο μεσενεφρός , τα σωματίδια του Stannius και το ήπαρ. Η ρύθμιση της γαμετογένεσης από τα στεροειδή παρουσιάζει διαφορές μεταξύ των ειδών.

Στη γαμετογένεση ο ρόλος τους είναι άμεσος ελέγχοντας τα διάφορα στάδια της στις γονάδες , καθώς και έμμεσος με την έννοια ότι ρυθμίζουν την έκκριση της **γοναδοτροπίνης**, επηρεάζοντας έτσι τον χρονισμό και τη διάρκεια του κύκλου.

Όσο αφορά την αναπαραγωγή στους τελεόστεους διακρίνονται δύο τύποι:

1. Ο **γονοχωριστικός τύπος**, στον οποίο ανήκει η συντριπτική πλειοψηφία των ιχθύων , που με την σειρά του διακρίνεται σε δύο κατηγορίες:

α) Τα κατά αρχήν αδιαφοροποίητα και στη συνέχεια διαφοροποιημένα άτομα (50 % αρσενικά , 50% θηλυκά)

β) Τα εξ' αρχής διαφοροποιημένα άτομα.

2. Ο ερμαφρόδιτος τύπος , ο οποίος με τη σειρά του διακρίνεται σε επίσης δύο κατηγορίες:

α) Τα σύγχρονα είδη , όπου αυγά και σπέρμα ωριμάζουν σχεδόν ταυτόχρονα . Οι γονάδες τους χαρακτηρίζονται από ταυτόχρονη ωρίμανση του θηλυκού και αρσενικού τμήματος.

β) Τα ασύγχρονα είδη όπου παρατηρείται ωρίμανση μόνο στο ένα εκ των δύο τμημάτων της γονάδας (διφυλετική γονάδα). Όταν αρχικά ωριμάζει το αρσενικό τμήμα της γονάδας , τότε όλα ή τα περισσότερα άτομα του πληθυσμού και κατ' επέκταση του είδους είναι αρσενικά για κάποιο διάστημα της ζωής τους, ενώ στην συνέχεια αλλάζουν φύλο και μετατρέπονται όλα σε θηλυκά (**πρώτανδρα είδη**) . Στην αντίθετη περίπτωση λέγονται **πρωτόγυνα είδη**.

Στα πρώτανδρα είδη ανήκουν η τσιπούρα (*Sparus aurata*), ο σαργός (*Diplodus sargus*), το λιθρίνι του πελάγους (*Pangellus erythrinus*), η μουρμούρα (*Lithognathus mormyrus*) κ.ά. Τα είδη σπάρος (*Diplodus annularis*), μυτάκι (*Dendex gibbosus*) , γόπα (*Boops boops*) και μελανούρι (*Oblada melanura*) αλλά και ο σαργός (*Diplodus sargus*), συμπεριφέρονται στοιχειωδώς σαν πρώτανδρα (άτυπα) ερμαφρόδιτα..

Στα πρωτόγυνα είδη μεταξύ άλλων αναφέρονται το λιθρίνι (*Pangellus erythrinus*) , το σκαθάρι (*Sporodyliosoma cantharus*), η μαρίδα (*Spicara smaris*) , η τσέρουλα (*Spicara flexuosa*) , η μένουλα (*Spicara maena*) , ο γύλος (*Coris gulis*). Ωστόσο το φαινόμενο αυτό μπορεί να μην παρουσιάζει στο σύνολο του πληθυσμού την πλήρη τυπική μορφή του. Για παράδειγμα στα άτυπα πρωτόγυνα , στις χειλούδες , εκτιμάται ότι μόνο το 50 % των ατόμων μιας γενιάς αλλάζουν φύλο (από θηλυκά σε αρσενικά) , ενώ το υπόλοιπο 50 % παραμένουν θηλυκά σε όλη τη ζωή τους.



Τα αρσενικά που δεν προκύπτουν από αλλαγή του φύλου ονομάζονται **πρωτεύοντα ή πρωτογενή αρσενικά** , ενώ εκείνα που αλλάζουν λέγονται **δευτερεύοντα ή δευτερογενή αρσενικά**. Αντίστοιχα συμβαίνει και στα θηλυκά.

3. Τέλος στις σπάνιες περιπτώσεις των **μομοφυλετικών ειδών** , πρόκειται για ολοθηλυκούς πληθυσμούς , ορισμένων ειδών οι οποίοι προκύπτουν μέσω γυνογένεσης ή υβριδισμού. Στην γυνογένεση , η ανάπτυξη του ζυγωτού προκαλείται ύστερα από ενεργοποίηση του πυρήνα του αβγού από σπερματοζωάριο του οποίου όμως ο πυρήνας δεν συζευγνύεται. Η παραγωγή μονοφυλετικών ατόμων μέσω υβριδισμού θεωρείται σπανιότερο φαινόμενο και έχει περιγραφεί σε είδη των γενών *Poeciliopsis* και *Carassius*.

Ρύθμιση του αναπαραγωγικού κύκλου.

Ο αναπαραγωγικός κύκλος στα περισσότερα είδη ψαριών είναι ετήσιος. Οι οξύρυγχοι και το *Salvelinus malma* αναπαράγονται με διαλείμματα 2 ή 3 ετών , ενώ ο Σολομός του Ειρηνικού και μερικά μικρά ψάρια αναπαράγονται μόνο μια φορά κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Σε είδη που ζούν σε περιβάλλοντα με παρατεταμένες περιόδους κλιματικών μεταβολών , όπως για παράδειγμα τα είδη της εύκρατης και πολικής ζώνης , η αναπαραγωγική περίοδος αντιστοιχεί συνήθως σε μια συγκεκριμένη και σύντομη περίοδο του έτους.

Ακόμη και σε περιβάλλον όπου το κλίμα και η διαθεσιμότητα της τροφής δεν έχουν εποχιακό χαρακτήρα , η εποχιακή αναπαραγωγή παρουσιάζει πλεονεκτήματα.

Οι ενδείξεις για την επίδραση του περιβάλλοντος στη ρύθμιση του αναπαραγωγικού κύκλου είναι πολλές. Στους τελεόστεους της εύκρατης και της υποτροπικής ζώνης , ο χρονισμός της αναπαραγωγής ελέγχεται από την φωτοπερίοδο και τη θερμοκρασία..

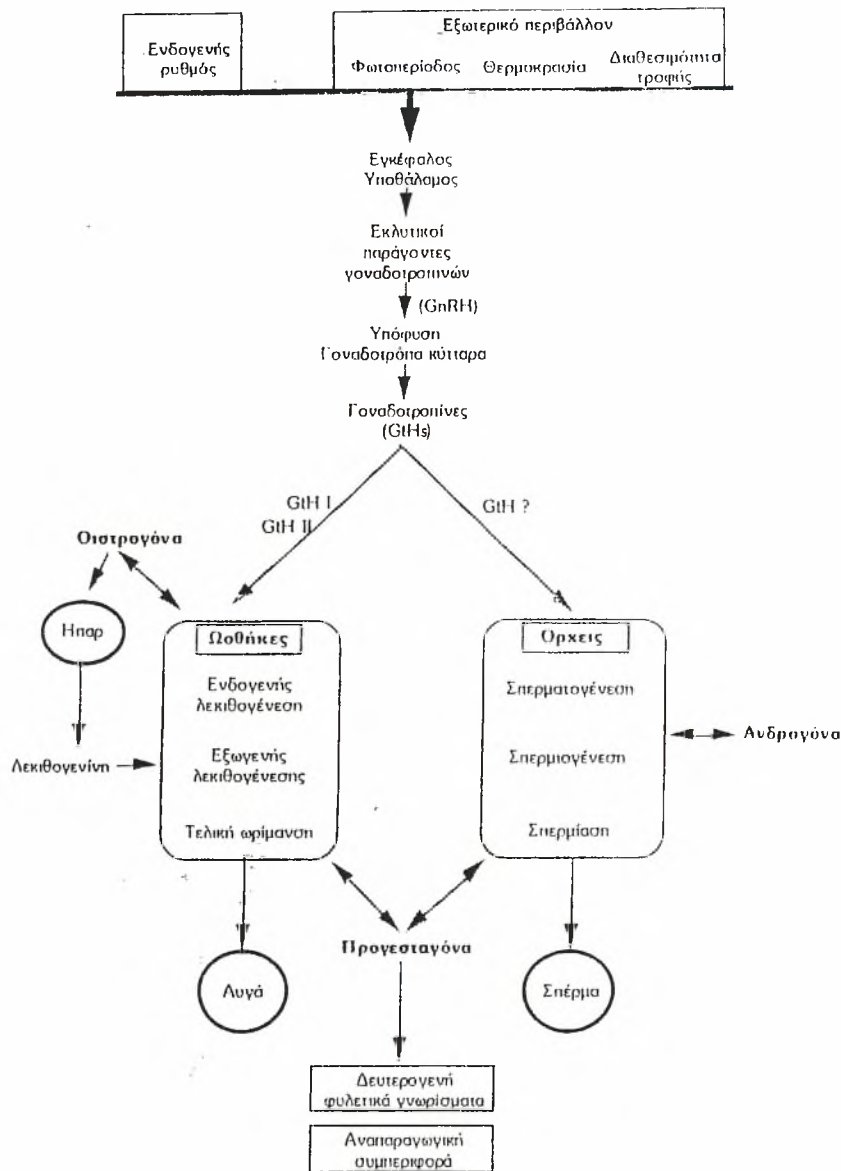
Η φωτοπερίοδος και η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάζουν από κοινού το χρονισμό του κύκλου (ταυτόχρονη ωρίμανση) , ασκώντας μια συνεργητική επίδραση.

Φυσικά τα τελικά στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου (τελική ωρίμανση , σπερμιάση) επηρεάζονται από τη δράση και άλλων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων. Τέτοιοι είναι τα ρεύματα, το pH , η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου , η αλατότητα , η πληθυσμιακή πυκνότητα , οι φεροορμόνες , η καταπόνηση , η ρύπανση , η παρουσία της βλάστησης ή άλλου υποστρώματος κ.λ.π.

Ο έλεγχος του αναπαραγωγικού κύκλου από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να διαφέρει στα δύο φύλα . Επίσης υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι όπως στα ανώτερα σπονδυλωτά και στα ψάρια ο αναπαραγωγικός κύκλος ρυθμίζεται και ενδογενώς .

Σε λίγα είδη υπάρχει ασφαλής ένδειξη για ενδογενή αναπαραγωγικό κύκλο στα ψάρια

Συνοψίζοντας τα παραπάνω στο παρακάτω σχήμα φαίνεται καθαρά η γενετική ρύθμιση της αναπαραγωγής στους τελεόστεους.



Σχήμα 4 . Γενετική ρύθμιση της αναπαραγωγής στους τελεόστεους. (Κοκοκύρης 2001. Φυσιολογία Αναπαραγωγής Ζωικών Οργανισμών) .

Ενδοκρινής ρύθμιση του αναπαραγωγικού κύκλου.

Τον διαμεσολαβητικό ρόλο μεταξύ του περιβάλλοντος και των αναπαραγωγικών οργάνων τον παίζει το σύστημα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδες , τόσο στους τελεόστεους όσο και στα ανώτερα σπονδυλωτά .(ενδοκρινής ρύθμιση) . Η ωογένεση και η σπερματογένεση ελέγχονται από την δράση των **γοναδοτροπινών (GtHs)** οι οποίες παράγονται στην υπόφυση και δρουν στις γονάδες διεγείροντας την παραγωγή των **στεροειδών ορμονών**. Οι γοναδοτροπίνες με τη σειρά τους ελέγχονται από τις **εκλυτικές ορμόνες (GnRT)** που παράγονται στον υποθάλαμο .

Στα θηλυκά άτομα (κυρίως στα Σαλμονοειδή) έχουν αναφερθεί οι γοναδοτροπίνες (GtH I & GtH II). Παρόλο που οι δύο γοναδοτροπίνες είναι ισοδύναμες κατά τη λεκιθογένεση ,όσον αφορά την παραγωγή των στεροειδών ορμονών , κατά την τελική ωρίμανση η GtH II έχει μεγαλύτερη στεροειδογενετική ικανότητα από την GtH I .

Στα αρσενικά άτομα η γοναδοτροπίνη GtH στην οποία αναφέρονται οι περισσότεροι ερευνητές, είναι αντίστοιχη της GtH II των θηλυκών ατόμων με βιολογική δράση στο στάδιο της σπερμίας. Η ύπαρξη της GtH I δεν έχει ακόμη επιβεβαιωθεί. Η δράση και δεύτερης υποφυσιακής ορμόνης είναι δυνατόν να εμπλέκεται στην αύξηση των όρχεων περισσότερο και όχι τόσο άμεσα στην παραγωγή ανδρογόνων στους όρχεις σύμφωνα με τους Billard (1986), και Cohran (1987).

Γενετική ωρίμανση.

Οι παράγοντες από τους οποίους καθορίζεται η ηλικία της γενετικής ωρίμανσης είναι η ηλικία , το μέγεθος , η φυσιολογική κατάσταση του ατόμου , η κληρονομικότητα και το περιβάλλον.

Η ηλικία της γενετικής ωρίμανσης στα είδη των μεγάλων γεωγραφικών πλατών σαφώς και είναι μεγαλύτερη από εκείνα των τροπικών περιοχών. Επίσης είδη μικρού τελικού μεγέθους και μικρής διάρκειας ζωής ωριμάζουν σε μικρότερη ηλικία από εκείνα που χαρακτηρίζονται από μεγάλο μέγεθος και μεγάλη διάρκεια ζωής. Οι ηθολογικές διαφοροποιήσεις που αναφέρονται στην αναπαραγωγική διαδικασία , αφορούν κυρίως την περιοχή και την εποχή της αναπαραγωγής , την πραγματοποίηση ή μη μεταναστεύσεων , την εκδήλωση ή μη σεξουαλικού ανταγωνισμού και ερωτοτροπίας , την ύπαρξη ή μη εμφανών δευτερογενών φυλετικών γνωρισμάτων καθώς επίσης την εκδήλωση της γονικής συμπεριφοράς η οποία περιλαμβάνει τρεις τύπους.

1^{ος}) . Το γεννητικό υλικό (αβγό και σπέρμα) δεν προστατεύεται από τους γεννήτορες και είτε αποβάλλεται σε ανοιχτές υδάτινες επιφάνειες ή περιοχές του πυθμένα , είτε σε διάφορου είδους κρησφύγετα **(αδιάφορη συμπεριφορά)**.

2^{ος}). Το γεννητικό υλικό προστατεύεται από τους γεννήτορες είτε σε φυσικές κατασκευές , είτε σε κατασκευασμένες από τους γεννήτορες φωλιές.

3^{ος}) . Το γεννητικό υλικό μεταφέρεται από τους γεννήτορες είτε σε τμήματα της εξωτερικής επιφάνειας του σώματός τους (πτερύγια , θύλακες , βραγχιακά επικαλύμματα , στόμα) , είτε μέσα στην κοιλιακή κοιλότητα του σώματός τους.

Στα περισσότερα είδη η αναπαραγωγή πραγματοποιείται με εξωσωματική γονιμοποίηση (αληθή ωτόκα) . Σε άλλα είδη (όπως οι ελασματοβράγχιοι και μερικά είδη τελεόστεων) η γονιμοποίηση είναι εσωσωματική και ακολουθείται είτε από κύηση και τοκετό (ζωτόκα είδη) , είτε από την παραγωγή αβγών με έμβρυα ποικίλου επιπέδου ανάπτυξης (ωτόκα είδη , εσωσωματικής γονιμοποίησης) .

1.3 Η μέθοδος Differential Display - PCR των mRNAs (Διαφορική ανίχνευση των mRNAs)

Η μέθοδος Differential Display PCR περιγράφηκε πρώτα από τους Liang & Pardee (1992) , προκειμένου να αναγνωρισθούν τα διαφορικά εκφρασμένα γονίδια. Η βασική ιδέα της μεθόδου είναι η ανίχνευση μόνον των εκφρασμένων γονιδίων , που αποτελούν το 10 - 15 % του συνολικού αριθμού των γονιδίων στο γονιδίωμα , αξιοποιώντας την ουρά poly (A) που φέρει κάθε mRNA . Στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) που επιτρέπει την παράθεση σε πηκτώμα όλων των mRNAs ενός κυττάρου σαν κλάσματα cDNAs μήκους 200 – 1000 bp , τα οποία αντιστοιχούν στο 3' - άκρο του μεταγραφήματος. Τα mRNAs δύο ή περισσότερων κυτταρικών πληθυσμών μπορούν να παρατεθούν δίπλα – δίπλα για να συγκριθούν και να ταυτοποιηθούν τα διαφορικά εκφρασμένα cDNAs.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η γρήγορη ταυτοποίηση των διαφορικά εκφρασμένων γονιδίων στα κύτταρα ή οργανισμούς τα οποία έχουν το ίδιο ή παρόμοιο γενετικό προφίλ. Η μέθοδος DD συνοψίζεται στα ακόλουθα στάδια :

1) Μετά από αντίδραση με DNase , το ολικό RNA μεταγράφεται αντίστροφα σε τέσσερες παράλληλες αντιδράσεις με εκκινητές oligo dT (T₁₂MA , T₁₂MC , T₁₂MG , T₁₂MT , όπου M ένα εκφυλισμένο μείγμα dA , dC , dG) , που ανασυνδέονται στο 3' - άκρο των mRNAs και μοιράζουν τα 10.000 – 15.000 μοναδικά mRNAs σε τέσσερις ομάδες.

2) Τα cDNAs που προκύπτουν ενισχύονται με PCR [³⁵S]d ATP , με τους ίδιους εκκινητές oligo dT εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή και , για το 5' - άκρο , 10 – μερείς εκκινητές με τυχαία αλληλουχία..

3) Τα cDNAs αντιγράφονται πολλαπλώς σε 40 κύκλους PCR παρουσία [³⁵S]d ATP .

4) Τα προϊόντα PCR αναλύονται σε πήκτωμα προσδιορισμού αλληλουχίας DNA και παρατηρούνται με αυτοραδιογραφία .

Τα διαφορετικά εκφρασμένα cDNAs μπορούν να ανακτηθούν από το πήκτωμα , να χρησιμοποιηθούν για ανάλυση Northern , ώστε να επιβεβαιωθεί η διαφορεική έκφραση στα ίδια , και σε άλλα κύτταρα , και στη συνέχεια να κλωνοποιηθούν και να προσδιορισθεί η αλληλουχία τους.

Το ολικό c DNA αγνώστων γονιδίων μπορεί να απομονωθεί από βιβλιοθήκες c DNA , να προβλεφθεί η πρωτοταγής αλληλουχία της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης , και να ταυτοποιηθούν πιθανά λειτουργικά μοτίβα. Επίσης μπορεί να παραχθεί η πρωτεΐνη και αντισώματα έναντι αυτής , τα οποία να χρησιμοποιηθούν για τον υποκυτταρικό εντοπισμό , την απομόνωση και λειτουργική μελέτη της πρωτεΐνης . Ακόμη μπορεί να απομονωθεί γενωμικό DNA για την χρωμοσωμική χαρτογράφηση του γονιδίου. Πρακτικά Ημερίδας (1997).

Πρόσφατα έχουν περιγραφεί τεχνικές βελτίωσης της αρχικής μεθόδου DD , οι οποίες εισήγαγαν την χρήση μεγαλύτερων εκκινητών και αντίδραση PCR σε υψηλότερες θερμοκρασίες , για την επιτυχή μείωση των ψευδοθετικών , που αποτελούσαν σχετικό μειονέκτημα της αρχικής μεθόδου.

Εκκινητές oligo dT με μία βάση δίπλα στην ουρά των Ts , έδωσαν μεγαλύτερη εξειδίκευση . Η εισαγωγή αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού στους εκκινητές , διευκολύνει την κλωνοποίηση των cDNAs . Τέλος , μεγαλύτερη ευκρίνεια επιτεύχθηκε με τη χρήση μακρύτερων πηκτωμάτων .

Μια διαφορετική στρατηγική χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές (nested primers) για τη δημιουργία ομοιογενών μερικών cDNAs (gene tags) από τα προϊόντα DD , και απ'ευθείας προσδιορισμό της αλληλουχίας τους στο μείγμα αντίδρασης PCR , χωρίς προηγούμενη κλωνοποίηση.

Επιπρόσθετα , εκατοντάδες διαφορετικά cDNAs μπορούν να τοποθετηθούν σε μεμβράνες και να υβριδοποιηθούν με ολικά RNAs από

Όσο αφορά τη βιβλιογραφία , η τεχνική της DD – PCR εφαρμόστηκε σε πολλές περιπτώσεις ταυτοποίησης γονιδίων τα οποία μπορεί να συνεισφέρουν στη μεταστατική πορεία , των νεοπλασματικών κυττάρων. Συγκεκριμένα η μέθοδος DD – PCR χρησιμοποιήθηκε στην ταυτοποίηση γονιδίων που τα προϊόντα τους πιθανώς να ενέχονται στην μετάσταση πρωτοπαθούς καρκίνου του μαστού. Ταυτοποιήθηκαν δύο πρωτότυπα γονίδια , η συστατίνη M και η πρωτεάση M. Οι παραπάνω πρωτεΐνες είναι πολύ πιθανόν να παίζουν ρόλο στην διαδικασία της διήθησης και μετάστασης κακοηθών όγκων , εξαιτίας της εκτροπής ρύθμισης της έκφρασής τους στα καρκινικά κύτταρα , λόγω της ενζυμικής τους δράσης και λόγω της συγγένειάς τους με μόρια τα οποία έχουν ενοχοποιηθεί στη μετάσταση. (Sotiropoulou et al . , 1997) .

Επίσης η DD – PCR χρησιμοποιήθηκε , στην αναγνώριση γονιδίων τα οποία εκφράζονται διαφορετικά σε όρχεις μεταλλαγμένου ποντικού. Από ένα σύνολο γονιδίων τα οποία έδειξαν να παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στους μεταλλαγμένους όρχεις ένα υποψήφιο φαίνεται να παρουσιάζει ομοιότητα με εκείνα της οικογένειας των στεροειδογενών SCAD (Short chain alcohol dehydrogenase). Αυτό το αντίγραφο αρχικά έδειξε πλήρη ομοιότητα με το ένζυμο 20 β – (Hydroxysteroid dehydrogenase) στους κατώτερους οργανισμούς και μάλιστα να παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην διαφοροποίηση των σπερματικών κυττάρων στους μεταλλαγμένους όρχεις ποντικού. Αργότερα το ίδιο συνδέθηκε με το ERAB – πρωτεΐνη (Endoplasmic – reticulum – associated – binding protein) , στον ανθρώπινο εγκέφαλο , το οποίο εμπλέκεται στην παθογένεση της ασθένειας Alzheimer . (Hansis et al. , 1998).

Η DD – PCR εφαρμόστηκε στην αναγνώριση γονιδίων τα οποία μπορεί να συνεισφέρουν στη μεταστατική πορεία κυτταρικών σειρών του γνωστού δερματικού μελανώματος , μια από τις πιο επιθετικές μορφές καρκίνου . Συγκρίθηκε η έκφραση του m RNA δύο πολύ κοντινών κυτταρικών σειρών ανθρώπινου μελανώματος των 1F6 και της μεταστατικής παραλλαγής 1F6m και βρέθηκε ότι το CTp11 γονίδιο αποτελεί ένα νέο μέλος της αναπτυσσόμενης οικογένειας των καρκινικών

αντιγόνων(Humman Cancer / Testis Antigens) . (Albert et all . , 1999) .

Στη διευκρίνιση των μοριακών μηχανισμών ρύθμισης της θερμοκρασίας στην σπερματογένεση , χρησιμοποιώντας τη μονόπλευρη κρυπτορχιδία στους όρχεις ποντικού και την τεχνική της DD- PCR όπως επίσης και την *in situ* ανάλυση του DNA – τεμαχισμού στα κύτταρα των όρχεων , βρέθηκαν τρία γονίδια τα οποία εξαρτώνται από τη θερμοκρασία . Επομένως η μονόπλευρη κρυπτορχιδία αποτελεί ένα χρήσιμο μοντέλο για μελέτη της ρύθμισης της θερμοκρασίας στην απόπτωση των σπερματικών κυττάρων. (Guo et all . , 1999) .

Η τεχνική της DD – PCR χρησιμοποιήθηκε στην αναγνώριση της επίδρασης της FSH – ορμόνης πάνω σε καλλιεργημένα κύτταρα Sertoli ποντικού. Τα κύτταρα Sertoli , αποτελούν τα θρεπτικά και το μέσον υποστήριξης των διαφοροποιημένων -σπερματικών κυττάρων στον ποντικό. Η διαφοροποίησή των παραπάνω , αποτελεί το πρώτο κλειδί στη διαφοροποίηση των γονάδων (όρχεις) . Η ενδοκρινική ρύθμιση επιτρέπει τα παραπάνω κύτταρα να αναπτυχθούν , βοηθώντας έτσι στην αναδιοργάνωση και γένεση της αιμοσπερμίας μέσω της διαφοροποίησής τους και προμηθεύοντας με θρεπτικά και ρυθμιστικούς παράγοντες τα σπερματοζώα.(Heliani et all . , 2000) .

Η ειδική έκφραση μερικών γονιδίων για τις Zing finger –πρωτεΐνες, σε ειδικά στάδια κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης , παραμένει αδιευκρίνιστη .Η διαφορετική έκφραση αυτών μελετήθηκε με τη βοήθεια θεμελιωδών τεχνικών υβριδισμού μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνεται και η DD – PCR . Σε μια σειρά μελετών για τις επιδράσεις της Ενδοθηλίνης -1 , ενός ισχυρού ρυθμιστή του αγγειακού τόνου πάνω στο μεταβολισμό των οστών , αναγνωρίσθηκε το γονίδιο για τη Zing finger – πρωτεΐνη στους ποντικούς . Με τη βοήθεια της DD μεθόδου βρέθηκε ότι το παραπάνω γονίδιο εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στα σπερματογενετικά κύτταρα , στους σπερμοφόρους σωλήνες των όρχεων ποντικού , περισσότερο από ότι στα οστεοβλαστικά κύτταρα. (Atsuto et all . , 2000) .

1.4 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) .

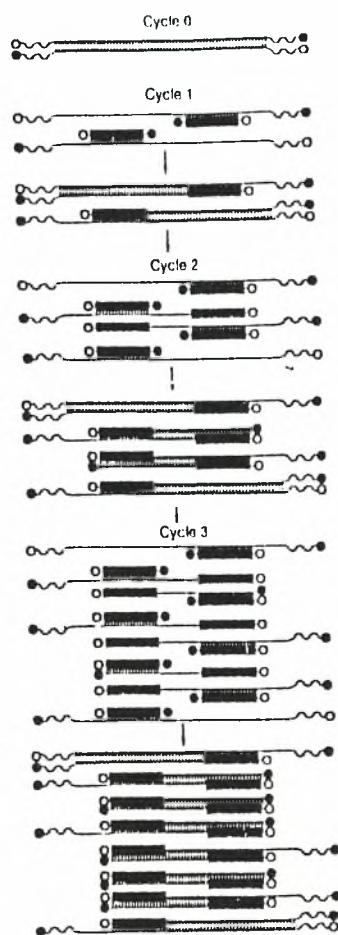
Είναι μια μέθοδος με την οποία μπορεί να γίνει πολλαπλασιασμός ενός DNA έως και αρκετά εκατομμύρια φορές σε 1 – 2 ώρες . Η αρχή λειτουργίας είναι η παρακάτω αλλά φαίνεται και στην αντίστοιχη εικόνα που ακολουθεί . Σε μια ειδική συσκευή σε ένα μικρό σωληνάκι από θερμοάντοχο πλαστικό θερμαίνεται για 1 λεπτό στους 95° C ένα μίγμα : DNA , μιας ειδικής θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης απομονωμένης από το μικροοργανισμό *Thermus aquaticus* , ειδικών ολιγονουκλεοτιδίων συμπληρωματικών προς τα δύο άκρα του τμήματος DNA που επιθυμούμε να πολλαπλασιαστεί , και χλωριούχου μαγνησίου .

Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης , το DNA υφίσταται αποδιάταξη της δίκλωνης δομής του και μετατρέπεται σε μονόκλωνο , λόγω της υψηλής θερμοκρασίας . Μετά η θερμοκρασία μειώνεται στους 55 – 65 ° C για 30 δευτερόλεπτα , όπου οι δύο κλώνοι τείνουν να επανασυγκολληθούν .

Όμως επειδή τα ολιγονουκλεοτίδια είναι σε περίσσεια κολλούν αυτά στις αντίστοιχες συμπληρωματικές αλληλουχίες όπως φαίνεται στο σχήμα.. Στην συνέχεια η θερμοκρασία ανεβαίνει έως 70 ° C για ένα λεπτό , όπου η ανθεκτική στην θερμοκρασία πολυμεράση δουλεύει και αντιγράφει το DNA (επιμήκυνση του DNA) , δημιουργώντας άλλους δύο κλώνους με την προσθήκη νουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των εκκινητών . Εάν αυτός ο κύκλος (95 ° C για ένα λεπτό , 55 ° - 65 ° C για 30 δευτερόλεπτα , 70 ° C για ένα λεπτό) επαναληφθεί 25 – 30 φορές έχουμε ένα εκλεκτικό πολλαπλασιασμό του τμήματος του DNA που μας ενδιαφέρει , έως και αρκετά εκατομμύρια φορές .

Η μεγάλη χρησιμότητα της μεθόδου βρίσκεται στο γεγονός ότι μπορεί γίνει πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA που βρίσκεται ίσως μια φορά μέσα στο γένωμα , με τρόπο ώστε να γίνει το συγκεκριμένο τμήμα ορατό στην ηλεκτροφόρηση . Οι εφαρμογές της μεθόδου PCR είναι , εκτός της τυποποίησης των διαγενετικών ατόμων , η τυποποίηση των HLA αντιγόνων για τις μεταμοσχεύσεις οργάνων , η ανίχνευση πρακτικά όλων των γενετικών ανωμαλιών ή διαφορών ανάμεσα σε πολλά άτομα ή ζώα ,

μεταλλάξεων σε όγκους και πολλά άλλα.



Σχήμα 6 . Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) .

(Κουρέτας 1998 . Σημειώσεις)

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.A. ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

2.A.1 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την περάτωση της πειραματικής διαδικασίας διαχωρίζονται σε συσκευές και αναλώσιμα :

2.A.1.1. Συσκευές

1. Ζυγός ακριβείας – ηλεκτρονικός της εταιρίας ADAM EQUIPMENT
2. Ομογενοποιητής της εταιρίας IKA LABORTECHNIC .
3. Συσκευή φυγοκέντρησης UNIVERSAL 16 R της εταιρίας HETTICH .
4. Συσκευή ρυθμικής ανακίνησης δειγμάτων τύπου VORTEX .
5. Υδατόλουτρο της εταιρίας MEMMERT.
6. Φασματοφωτόμετρο U – 1500 της εταιρίας HITACHI.
7. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης νουκλεϊνικών οξέων της εταιρίας MAJOR SCIENCE .
8. Συσκευή PCR Mastercycler της εταιρίας BIOMETRA

2.A.1.2. Αναλώσιμα .

- 1.Αυγά - σπέρμα ψαριών (γόπας , μπακαλιάρου , κολιού)
- 2.Απεσταγμένο νερό
- 3.Trk – lysis buffer της εταιρίας Omega Biotec Inc .
- 4.Μερκαπτοαιθανόλη της εταιρίας SIGMA.
5. Αιθανόλη 95 % pro – analysis .
- 6.RNA Wash buffer I της εταιρίας Omega Biotec Inc .
- 7.RNA Wash buffer II της εταιρίας Omega Biotec Inc.
- 8.DEPC – treated water της εταιρίας Omega Biotec Inc.
- 9.Trizol Reagent της εταιρίας CIBCO BRL .
- 10.CHLOROFORM της εταιρίας MERCK .
11. 2 – Propanol της εταιρίας MERCK .
12. Χλωριούχο μαγνήσιο ($Mg Cl_2 \cdot 6 H_2O$) της εταιρίας MERCK .
13. Tris της εταιρίας MERCK.
14. Υδροχλωρικό οξύ της εταιρίας MERCK .
15. Phenol της εταιρίας MERCK .
16. EDTA της εταιρίας SIGMA .
- 17.Dnase I (1 unit / λ) της εταιρίας CLONTECH .
18. Oligo (dT) c DNA Primer (1 μM) της εταιρίας CLONTCH .
19. MMLV Reverse Transcriptase(200units/λ) της εταιρίας CLONTECH.
20. 5X First –Strand Buffer της εταιρίας CLONTECH .
21. d NTP mix (5 mM each of d ATP , d CTP , d GTP & d TTP) της εταιρίας CLONTECH.
22. Arbitrary PCR Primers (P1 – P 10 ; 20 μM each) της εταιρίας CLONTECH .
23. Oligo (d T) PCR Primers (T1 – T9 ; 20 μM each) της εταιρίας CLONTECH.
24. Tag DNA πολυμεράση της εταιρίας Minotech .
25. Ακρυλαμίδη της εταιρίας SIGMA .
26. Bis – ακρυλαμίδη της εταιρίας SIGMA.
27. Ουρία της εταιρίας Riedel de Haen.

28. TEMED (τετραμεθυλαιθυλαιεδιαμίνη N,N,N,N) της εταιρίας MERCK.
29. Υπερθειικό αμμώνιο (APS) της εταιρίας SIGMA.
30. Οξικό οξύ της εταιρίας Riedel de Haen .
31. Νιτρικός άργυρος της εταιρίας SIGMA.
32. Βρωμιούχο αιθίδιο της εταιρίας MERCK .
33. Φορμαλδεΰδη της εταιρίας MERCK .
34. Μάρτυρας (1300 db) της εταιρίας Biolab .
35. Αλβουμίνη
36. Κυανούν της βρωμοφαινόλης της εταιρίας SIGMA.
37. Γλυκίνη (Aminoacetic acid) της εταιρίας SIGMA.
38. Γλυκερίνη της εταιρίας MERCK .
39. Γλουταραλδεΰδη της εταιρίας MERCK.
40. Ανθρακικό ασβέστιο της εταιρίας Riedel de Haen.
41. Νατριούχο άλας του θειικού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate SDS) της εταιρίας MERCK.
42. Χλωριούχο Νάτριο της εταιρίας Riedel de Haen .

2.A.2. Μέθοδοι

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι εξής:

2.A.2.1. Συλλογή και διατήρηση αυγών

α) Αυγά και σπέρμα μπακαλιάρου. (*Merlangius merlangus*)

Τα αυγά και το σπέρμα του μπακακαλιάρου προήλθαν από ώριμα θηλυκά και αρσενικά άτομα του είδους, τα οποία αλιεύθηκαν στην περιοχή του Παγασητικού κόλπου την 9^η Φεβρουαρίου 2000 και αγοράστηκαν από την ιχθυαγορά του Βόλου. Από τα ψάρια αφαιρέθηκαν οι ώριμοι γονάδες και αφού τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 3 έως 5 gr, συσκευάστηκαν σε αλουμινόχαρτο και διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την χρήση τους.

β) Αυγά και σπέρμα γόπας (*Boops boops*)

Τα αυγά και το σπέρμα της γόπας προήλθαν από ώριμα άτομα του είδους, τα οποία, είχαν αλιευθεί στην περιοχή του Παγασητικού Κόλπου την 10η Φεβρουαρίου 2000 και αγοράστηκαν από την ιχθυαγορά του Βόλου. Αφαιρέθηκαν οι ώριμοι γονάδες και τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 2 έως 3 gr και συσκευάστηκαν σε αλουμινόχαρτο. Κατόπιν διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την χρήση τους.

γ) Αυγά και σπέρμα κολιού (*Scomber japonicus*)

Τα αυγά και το σπέρμα του κολιού προήλθαν από ώριμα άτομα του είδους, τα οποία φαρεύτηκαν στον Παγασητικό Κόλπο την 14^η Φεβρουαρίου 2000 και αγοράστηκαν από την ιχθυαγορά του Βόλου. Αφαιρέθηκαν οι γονάδες και τεμαχίστηκαν σε τμήματα των 2 έως 3 gr και αφού συσκευάστηκαν σε αλουμινόχαρτο, διατηρήθηκαν στους -20°C μέχρι την χρήση τους.

2 A.2.2 . Απομόνωση ολικού RNA με E. Z .N .A .®

Η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA με την συγκεκριμένη μέθοδο από τους γονάδες των ψαριών , ήταν η ίδια και για τα τρία είδη. Χρησιμοποιήθηκε το kit της E. Z. N .A ® το οποίο περιείχε το TRK Lysis Buffer , RNA Wash Buffer I , RNA Wash Buffer II , DEPC – treated water .

Πρωτόκολλο.

- Ζυγίζεται 0,04 gr ώριμης γονάδας και προστείνεται 400 μl Trk lysis buffer μαζί με 2 –mercaptoethanol και σε αναλογία 2 μl μερκαπτοαιθανόλης για κάθε 1 μl Trk lysis buffer δηλαδή σύνολο 8 μl , σε ειδικό ποτήρι ομογενοποίησης .
- Ομογενοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού(10 περίπου φορές).
- Προστείνεται ίσος όγκος (400 μl) 70 % αιθανόλη 95⁰ και αναμειγνύεται με ισχυρή ανάδευση (vortex) το μίγμα .
- Τοποθετείται το δείγμα σε σωληνάκι Hibind RNA spin column . Φυγοκεντρείται για 15 μίσηστις 10.000 στροφές σε θερμοκρασία περιβάλλοντος . Πετιέται το σωληνάκι συλλογής .
- Ξεπλένεται η στήλη με 750 μl Wash Buffer I ρίχνοντας το απευθείας μέσα στην στήλη με την πιπέτα. Φυγοκεντρείται όπως και παραπάνω και πετιέται το σωληνάκι συλλογής.
- Τοποθετείται η στήλη σε καθαρό σωληνάκι συλλογής και προστείνονται 500 μl RNA Wash Buffer II . Φυγοκεντρείται κατά τον ίδιο τρόπο και πετιέται το σωληνάκι συλλογής.
- Ξεπλένεται η στήλη για δεύτερη φορά με 500 μl Wash Buffer II όπως προηγουμένως. Φυγοκεντρείται και πετιέται το σωληνάκι συλλογής.
- Καθαρισμός RNA. Μεταφέρεται η στήλη σε καθαρό σωληνάκι ependoff 1,5 μl και προστείνονται 50 μl DEPC – treated water απευθείας πάνω στην στήλη .

- Φυγοκεντρείται για 1 min σε 13.000 στροφές . Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία μια ακόμη φορά προσθέτοντας 50 μl DEPC – treated water (νερό που έχει προστεθεί διαιθυλοπυροκαρβονικό) και φυγοκεντρείται για 1 min στις ίδιες στροφές .
- Τοποθετείται ξεχωριστά το σωληνάκι (μήτρα) και το σωληνάκι συλλογής στο ψυγείο στους -20°C .

2.A.2.3 Απομόνωση ολικού RNA με TRIzol ® Reagent

- Η διαδικασία απομόνωσης του ολικού RNA με τη συγκεκριμένη μέθοδο από τους γονάδες των ψαριών, ήταν η ίδια και για τα τρία είδη. Πρωτόκολλο.
- Ομογενοποιούνται 0,05 gr ώριμης γονάδας προσθέτοντας 1 ml TRIzol reagent σε ειδικό ποτήρι και με την βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού περίπου (10 φορές), φροντίζοντας να σπάσουν τελείως τα κύτταρα .
- Τοποθετείται το μίγμα σε καθαρό σωληνάκι (ependorff 1,5) και φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 10 min στους $2 - 8^{\circ} C$.
- Το υπερκείμενο στρώμα είναι εκείνο που περιέχει το RNA.
- Τοποθετείται το μίγμα για 5 min στους $15^{\circ} - 30^{\circ} C$ για να επιτραπεί ο πλήρης διαχωρισμός των νουκλεοπρωτεϊνικών συνθετικών.
- Προσθέτονται 0,2 ml χλωροφόρμιου για κάθε 1 ml από το TRIzol reagent .
- Κλείνεται καλά το σωληνάκι και το ανακινείται για 15 sec και στην συνέχεια το επωάζεται στους $15^{\circ} - 30^{\circ} C$ για 2 – 3 min .
- Κατόπιν φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 15 min στους $2^{\circ} - 8^{\circ} C$. Κατ' αυτό τον τρόπο διαχωρίζεται η υπερκείμενη υδάτινη ζώνη που περιέχει το RNA.
- Μεταφέρεται η υδάτινη φάση σε νέο σωληνάκι (ependorff 1,5) και κρατείται η οργανική φάση αν απαιτείται .
- Κατακρυσνίζεται το RNA από την υδάτινη φάση προσθέτοντας 0,5 ml ισοπροπυλικής αλκοόλης (2 – propanol) για κάθε 1 ml TRIzol reagent .
- Επωάζεται το δείγμα μας στους $15^{\circ} - 30^{\circ} C$ για 10 min . Φυγοκεντρείται στις 12.000 στροφές για 10 min στους $2^{\circ} - 8^{\circ} C$. Το RNA κατακρυσνίζεται σχηματίζοντας ένα σφαιρίδιο (gel) στον πυθμένα του δοχείου.

- Μετακινείται το υπερκείμενο . Πλένεται το σφαιρίδιο - RNA με 75 % αιθανόλη προσθέτοντας το λιγότερο 1 ml αιθανόλης για κάθε 1 ml TRIzol reagent.
- Αναμιγνύεται το δείγμα στο vortex , και φυγοκεντρείται σε όχι πάνω από 7.500 στροφές για 5 min στους $2^{\circ} - 8^{\circ} C$.
- Στεγνώνεται το RNA – σφαιρίδιο στον αέρα (με ανοιχτό καπάκι) για 5 – 10 min.
- Διαλύεται το RNA – σφαιρίδιο σε ελεύθερο από RNA ση νερό προσθέτοντας 100 μl dd H₂O ή 0,5 % SDS διάλυμα περνώντας το μέσα από την πιπέτα. .
- Επωάζεται το δείγμα για 10 min στους $55^{\circ} - 60^{\circ}$.
- Διατηρείται το δείγμα στους $- 20^{\circ}$ για κάθε χρήση.

2.A.2.4 . Η εφαρμογή της μέθοδου Differential Display - PCR των mRNAs

Η μέθοδος DD – PCR δίνει τη δυνατότητα στους ερευνητές να αναγνωρίσουν RNA s τα οποία εκφράζονται σε ένα πληθυσμό RNA, αλλά λείπουν σε έναν άλλο (Diachenko et al. 1996) Η αναγνώριση τέτοιων “ διαφορετικά εκφρασμένων ” RNA s αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης , του κυτταρικού κύκλου , της καρκινογένεσης , των επαγωγικών συμβάντων και άλλων βιολογικών φαινομένων τα οποία εμπλέκουν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων.

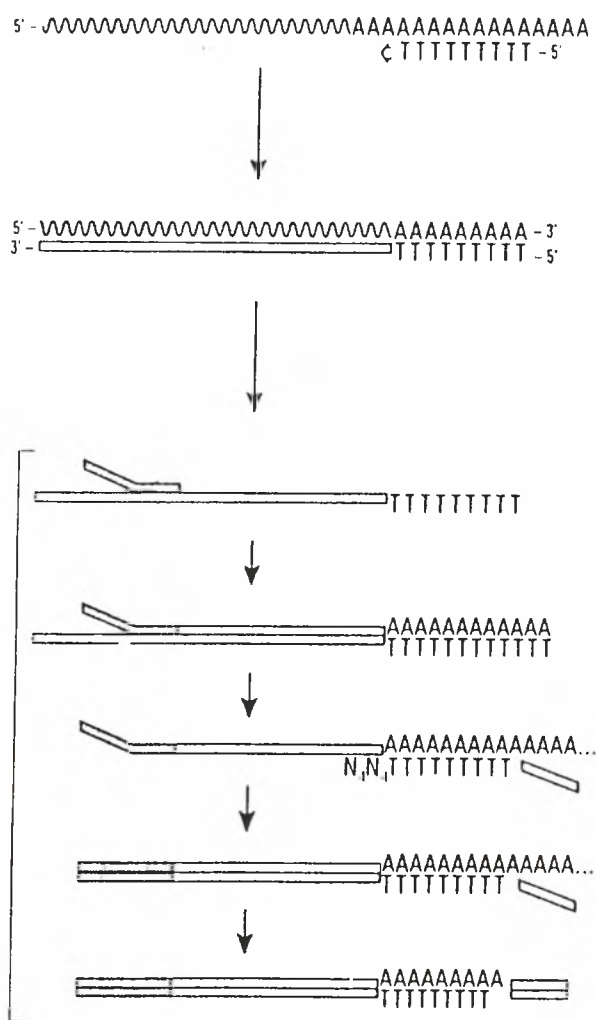
Στην εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το Delta Kit το οποίο είναι βασισμένο σε βελτιώσεις πάνω στις μεθόδους που περιγράφηκαν από τους Mc Clelland et al . (1993) . Αποτελείται από δύο στάδια :

- 1) την c DNA σύνθεση
- 2) και τη διαφορική ανίχνευση με PCR.

Το πρωτόκολλο απαιτεί μια απλή αντίδραση σύνθεσης cDNA για κάθε διαφορετικό RNA δείγμα σε αντίθεση με τις πολλαπλές αντιδράσεις σύνθεσης cDNA που απαιτούνται σε παρόμοια πρωτόκολλα . Επίσης το Delta πρωτόκολλο έχει μικρότερο κόστος διότι σε κάθε αντίδραση σύνθεσης c DNA χρησιμοποιεί μόνο 2 μg από το ολικό RNA . Τέλος , οι μεγαλύτεροι στην δομή εκκινητές του Delta Kit επιτρέπουν την αντίδραση της PCR σε υψηλότερες θερμοκρασίες , για την επιτυχή μείωση των ψευδοθετικών , που αποτελούσαν σχετικό μειονέκτημα της αρχικής μεθόδου.

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν ζεύγη εκκινητών, αποτελούμενα , από έναν εικοσιπενταμερή ή εικοσιεξαμερή εκκινητή (25 – mers , 26 – mers P primer) και από έναν τριανταμερή εκκινητή (30 –mers T primer) με γενική μορφή 5´ - anchor – (d T₉) N₁N₁ – 3´ όπου N₁ = A , G, ή C ικανοί να παράγουν μεγάλο αριθμό αντιγράφων c DNA λόγω της 5´ουράς τους .

Στο Σχήμα 7 δίνεται η βασική εικόνα της μεθόδου.



Σχήμα 7. Μέθοδος της “διαφορικής έκφρασης των m RNAs - PCR” χρησιμοποιώντας ένα P και έναν T εκκινητή.

Επώαση του ολικού RNA με DNάση

- Για κάθε ένα ολικό RNA – δείγμα ετοιμάζεται ένας ίσος όγκος από διάλυμα DNάσης.

Διάλυμα DNάσης	
Ποσότητα	Συστατικά
1 μl	0,5 M Tris – HCL (pH 7,5)
1 μl	0,5 M MgCL ₂
22 μl	Στείρο H ₂ O
1 μl	Rnase –free Dnase I (1 unit / μl)

25 μl total

- Επωάζονται τα σωληνάκια στους 37 °C για 30 λεπτά.
- Σε κάθε δείγμα προστείνονται 2,5 μl 0,2 M EDTA και 2 μl 3 M NaOAc
- Σε κάθε δείγμα προστείνεται ίσος όγκος με Φαινόλη : χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (25 : 24 : 1).
- Αναδεύεται καλά το δείγμα .
- Φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές για 10 min μέχρι να διαχωρισθούν οι φάσεις.
- Από το δείγμα αφαιρείται το επιφανειακό υδαρές στρώμα και μετά τοποθετείται σε καθαρό σωληνάκι (ependorff 1,5 ml).
- Στο δείγμα προστείνεται ίσος όγκος χλωροφόρμιο : ισοαμυλική αλκοόλη (24 :1) με τον όγκο του υδαρούς στρώματος.
- Αναδεύεται το δείγμα καλά.
- Φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές για 10 min για να διαχωρισθούν οι φάσεις.
- Αποσπάται το επιφανειακό στρώμα τοποθετώντας το σε καθαρό σωληνάκι (ependorff 1,5).
- Στο δείγμα προστείνεται 1/10 3 M NaOAc και 2,5 φορές του τελικού όγκου από 95 % αιθανόλη .
- Αναδεύεται καλά το δείγμα .
- Φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές για 20 min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

- Προσεκτικά πετιέται το υπερκείμενο αφήνοντας το ίζημα .
- Πολύ προσεκτικά επικαλύπτεται το ίζημα με 200 μl 80% αιθανόλης .
- Φυγοκεντρείται στις 14.000 στροφές για 5 min.
- Προσεκτικά πετιέται το υπερκείμενο , αφήνοντας το ίζημα .
- Αφήνονται 5 –10 min να στεγνώσει το δείγμα ανοίγοντας το καπάκι.
- Διαλύεται το ίζημα μέσα σε 1,5 μl H₂O για κάθε 2 μg αρχικού RNA .
- Τοποθετείται το δείγμα στους – 20⁰ C .

Σύνθεση c DNA .

- Για κάθε δείγμα λαμβάνεται ένα καθαρό σωληνάκι τύπου ependorff των 0,5 ml .
- Συμπληρώνεται το κάθε σωληνάκι με :

2 μl	Total RNA δείγμα
1 μl	c DNA synthesis primer (1 μM)

- Προστίθεται στείρο H₂O μέχρι όγκου 5 μl.
- Φυγοκεντρείται σε 14.000 στροφές / min για μερικά δευτερόλεπτα.
- Επωάζεται στους 70 ° C για 3 min.
- Κρυώνεται το δείγμα στον πάγο για 2 min.
- Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 14.000 στροφές / min για μερικά δευτερόλεπτα .
- Παρασκευάζεται αρκετό Master mix διάλυμα για όλες τις αντιδράσεις σύνθεσης c DNA σύν μιάς επιπλέον.

2 μl	5x first – strand buffer
2 μl	d NTP mix (5 mM)
1 μl	MMLV reverse transcriptase (200 units / μl)

- Προστίθενται 5 μl από το Master mix διάλυμα σε κάθε ένα σωληνάκι - δείγμα. .
- Προσεκτικά αναδεύεται το δείγμα με την πιπέτα .
- Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 14.000 στροφές /min για μερικά δευτερόλεπτα .

- Επωάζεται το δείγμα μας στους 42 ° C για 1 ώρα.
- Συνεχίζεται η επώαση αυξάνοντας την θερμοκρασία στους 75 ° C για 10 min.
- Τοποθετείται το δείγμα στον πάγο .
- Φυγοκεντρείται το δείγμα στις 14.000 στροφές / min για μερικά δευτερόλεπτα .
- Για κάθε ένα δείγμα c DNA παίρνεται ένα καθαρό σωληνάκι (eperdorff των 0,5 ml) και ονομάζεται "A" και το άλλο " B" .
- Μεταφέρονται 2 ml από το δείγμα σε κάθε " B " σωληνάκι.
- Συμπληρώνεται με 78 ml στείρο – H₂O το κάθε " B" σωληνάκι .
- Μεταφέρονται τα υπόλοιπα 8 ml του δείγματος στο "A" σωληνάκι
- Συμπληρώνεται με κατά τον ίδιο τρόπο με 72 ml στείρο – H₂O .
- Αποθηκεύονται όλα τα διαλύματα c DNA στους – 20 ° C για κάθε χρήση .

2.A.2.5. Εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) .

Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 2 μl διαλύματος c DNA , 1 μl P primers , 1 μl T primers και προστέθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια στις συγκεντρώσεις που φαίνονται στον παρακάτω πίνακα .

Αντίδραση (25 λ)

Αντιδραστήριο	Αρχική Συγκέντρωση	Ποσότητα / Αντίδραση
Buffer	10x	2,5 μl
dNTP's	10 mmol each	4 μl
MgCl ₂	25 Mm	2 μl
H ₂ O	1x	11,5μl
Taq	1 u/λ	1 μl

Πίνακας 3. Οι αρχικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ανά αντίδραση . Το Buffer 1x PCR αποτελείται από (500 mM KCL , 100 mM Tris pH 9.0)

Για τον πολλαπλασιασμό του c DNA δοκιμάστηκαν οι παρακάτω εκκινητές από το σύνολο του Delta Kit .

A/α	P primer	T primer
1	P ₅	T ₆
2	P ₆	T ₇
3	P ₅	T ₄
4	P ₇	T ₉
5	P ₇	T ₆
6	P ₉	T ₉

Πίνακας 4 . Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

Το c DNA ενισχύθηκε μέσα από μία διαδικασία 48 κύκλων. Οι τρεις πρώτοι κύκλοι πραγματοποιήθηκαν σε μη αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης. Ο πρώτος κύκλος ολοκληρώθηκε σε 15 min , από 5 min στους 94 ° C , 5 min στους 40 ° C και 5 min στους 68 ° C . Οι δύο επόμενοι ήταν διάρκειας 12 min , ήτοι 2 min στους 94 ° C , 5 min στους 40 ° C και 5 min στους 68 ° C .

Οι 45 κύκλοι που ακολουθούν πραγματοποιήθηκαν σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης , ήτοι 1 min στους 94 ° C , 1 min στους 60 ° C , 2 min στους 68 ° C . Τέλος ακολουθεί μια περίοδος παράτασης διάρκειας 7 min στους 68 ° C .

Πίνακας 5 . PCR . ενίσχυση του c DNA (Τροποποίηση) .

Κύκλοι	Θερμοκρασία (° C)	Χρόνος
1	94	5 min
	40	5 min
	68	5 min
2	94	2 min
	40	5 min
	68	5 min
45	94	1 min
	60	1 min
	68	2 min
1	68	7 min

2.A.2.6 Ηλεκτροφόρηση νουκλεονικών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου .

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (gel) είναι από τις καλύτερες μεθόδους διαχωρισμού , καθαρισμού και απομόνωσης τμημάτων νουκλεϊνικών οξέων(DNA , RNA) και πρωτεϊνών (ή πολυπεπτιδίων). Συνήθως οι πηκτές αυτές έχουν ως βάση την αγαρόζη και το πολυακρυλαμίδιο. Η πλάκα του πηκτώματος είχε διαστάσεις 16,5 x 14,5 x 0,15 cm. Το πήκτωμα δημιουργήθηκε με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N,N – μεθυλεν – δις – ακρυλαμιδίου (bis). Το bis – ακρυλαμίδιο σε αναλογία 1gr : 29 gr ως προς το ακρυλαμίδιο χρησιμοποιείται στο πλέγμα σαν σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου.

Το πήκτωμα ακρυλαμιδίου, σύνθεσης 6 % , παρασκευάστηκε από 4,8 gr Ουρίας , 10 ml από το μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου 30 % , 2,5 ml TBE 20X (121 gr Tris – 61,7 gr Boric acid – 80 ml EDTA) συμπληρώνοντας με νερό έως τελικού όγκου 1 λίτρο . Το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με d H₂O έως τα 50 ml.

Προστίθενται επιπλέον 50 μl TEMED και 300 μl διαλύματος APS

(Ammonium Persulfate) 20% , για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμιδίου . Αμέσως το διάλυμα χύνεται στην συσκευή πηκτής και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Όταν δουλεύεται το ακρυλαμίδιο λόγω του ότι αυτό είναι νευροτοξικό , απαιτείται η χρήση γαντιών. Το πολυμερισμένο ακρυλαμίδιο δεν είναι τοξικό , εκτός και αν υπάρχει ακρυλαμίδιο το οποίο δεν πολυμερίστηκε.

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση .

Σε ένα φιαλίδιο eppendorf προστίθενται :

- ♦ Η κατάλληλη ποσότητα από το δείγμα (προϊόντα PCR) στην συγκεκριμένη περίπτωση 7 μl και τα υπόλοιπα 3 μl με Loading - Buffer (διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων – αποτελούμενο από 5 ml γλυκερόλη , 250 μl TBE 40 x , 1 ml κυανού της Βρωμοφαινόλης 10 % , και 3,75 ml dd - H₂O) έως τελικού όγκου 10 μl .

- ◆ Τοποθετούνται τα δείγματά με την μικροπιπέττα σε κάθε ένα από τα πηγάδια . Στην αρχή και στο τέλος των δειγμάτων τοποθετείται πάντα γνωστός μάρτυρας (DNA marker) 100 –1300 bp βάσεων , σε ποσότητα 1 μl και 3 μl διάλυμα φόρτωσης και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου 10 μl .
- ◆ Στην συνέχεια εφαρμόζεται σταθερή τάση 40 mA και ηλεκτροφορούνται τα δείγματα για 1 – 2 ώρες περίπου. Το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης αποτελείται από TBE 1X .

Για την στερέωση , την χρώση και τον αποχρωματισμό της πηκτής ηλεκτροφόρησης έγιναν τα εξής βήματα :

- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 72 ml d H₂O , 8 ml αιθανόλης 95 % , 10 μl οξικού οξέος , μέχρι τελικού όγκου 400 ml. Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 3 min στα 200 ml του διαλύματος σε διαρκή ανακίνηση και 3 min στα υπόλοιπα 200 ml διαλύματος σε διαρκή ανακίνηση.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε AgNO₃ συγκέντρωσης 1 gr / lit , διαλύματος τελικού όγκου 200 ml . Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 10 min σε διαρκή ανακίνηση .
- ◆ Ξέπλυμα του πηκτώματος σε απεσταγμένο νερό δύο φορές.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 3 gr NaOH , 0,01 gr NaBH₄ , 0,8 ml HCHO 37 % , τελικού όγκου 200 ml. Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 15 – 20 min , μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες ηλεκτροφόρησης σε διαρκή ανακίνηση.
- ◆ Ξέπλυμα του πηκτώματος 2 –3 φορές με απεσταγμένο νερό και τοποθέτησή του σε ζελατίνα , και διατηρείται στο ψυγείο .

2.A.2.7. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου.

Η τεχνική αυτή προσφέρει τη δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών , του ελέγχου της καθαρότητάς τους και του υπολογισμού του μοριακού τους βάρους.

2.A.2.7.1. Απομόνωση πρωτεϊνών από το κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες από τις γονάδες των ψαριών .

Η διαδικασία παρασκευής κυτταροπλάσματος από τους γονάδες των ψαριών ήταν η ίδια σε κάθε είδος που χρησιμοποιήθηκε.

- ◆ Ζυγίστηκε ποσότητα 1 gr και τοποθετήθηκε σε ειδικό ποτήρι που περιείχε 4 ml περίπου Tris – HCL 50 mM σε pH 7,5 και 0,9 % NaCl και στη συνέχεια ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού (10 περίπου φορές) στη συσκευή ομογενοποίησης.
- ◆ Μετά την ομογενοποίηση μεταφέρθηκε το μίγμα σε σκληρό πλαστικό σωληνάκι μέσα στο οποίο φυγοκεντρήθηκε στις 5000 RPM (Revolutions per Minute) στους 4 ° C, για 20 min. Ο σκοπός της φυγοκέντρησης είναι να απομακρυνθούν οι κυτταρικές μεμβράνες , οι πυρήνες και τα μιτοχόνδρια , τα οποία λαμβάνονται υπο τη μορφή ιζήματος, μετά το πέρας της φυγοκέντρησης.
- ◆ Το υπερκείμενο που συλλέχθηκε αποτελεί το κυτταρόπλασμα που μας ενδιαφέρει (αν και περιέχει και μικροσωμάτια) .
- ◆ Τοποθετούμε τα προϊόντα φυγοκέντρησης στους – 20 ° C .

Κατά τον ίδιο ακριβώς τρόπο έγινε η μεταχείριση του ιζήματος που απέμεινε κατά τον χειρισμό του κυτταροπλάσματος , το οποίο περιέχει στο μεγαλύτερο μέρος του πυρήνες και θα ονομάζεται στο εξής πυρηνικό κλάσμα .

- ◆ Συγκεκριμένα στο κάθε δείγμα προστείνονται 3 ml περίπου από το (sample - Buffer) ήτοι , Tris – HCl 50 mM σε pH 7,5 και 0,9 % NaCl σε ειδικό ποτήρι , και ομογενοποιείται με τη βοήθεια ηλεκτροκίνητου περιστρεφόμενου γουδιού (10 περίπου φορές) .
- ◆ Φυγοκεντρείται το μίγμα στις ίδιες στροφές όπως και για το κυτταρόπλασμα και συλλέγεται το υπερκείμενο.
- ◆ Τοποθετείται το δείγμα στους -20°C .

2.A.2.7.2. Υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στο κυτταρόπλασμα – πυρήνες.

Ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης στα παρασκευάσματά έγινε με την μέθοδο του Bradford (Bradford 1976) ως εξής :

- Παρασκευάζονται 100 ml πυκνής χρωστικής , η οποία περιέχει 0,05 gr χρωστικής Coomassie blue , 15 ml μεθανόλης 95 % , 65 ml φωσφορικού οξέος 85 % και 20 ml απεσταγμένο νερό . Στη μεθανόλη διαλύθηκε η χρωστική Coomassie blue και εν συνεχεία προστέθηκε το φωσφορικό οξύ και το απεσταγμένο νερό.
- Αραιώνεται η χρωστική με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1 : 5, πριν τον υπολογισμό της ποσότητας των πρωτεϊνών στα παρασκευάσματα .
- Στη συνέχεια λαμβάνεται ποσότητα 5 μl και 10 μl από το κάθε δείγμα και την τοποθετείται αντίστοιχα σε 5 ml αραιωμένου διαλύματος χρωστικής.
- Αναδεύονται καλά τα δείγματα .
- Μετράται την απορρόφηση στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm (A_{595}) .
- Υπολογίζεται την ποσότητα της πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης γνωστής πρωτεΐνης της αλβουμίνης (10 mg /ml) που περιγράφεται στη συνέχεια .

2.A.2.7.3 . Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε συνθήκες μετουσίωσης σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.

Η τεχνική αυτή προσφέρει την δυνατότητα διαχωρισμού των πρωτεϊνών , του ελέγχου της καθαρότητάς τους και του υπολογισμού του μοριακού τους βάρους.

Η μετουσίωση των πρωτεϊνών πετυχαίνεται με την χρήση του απορρυπαντικού νατριούχο άλας του θειϊκού δωδεκυλίου (Sodium Dodecyl Sulfate , SDS) και θέρμανση. Έτσι , προκαλείται αποδιάταξη των πρωτεϊνών , γεγονός που οφείλεται στο ότι σε ουδέτερο pH το SDS περιβάλλει τις πρωτεΐνες , με συνέπεια αυτές να αποκτούν αρνητικό φορτίο.

Αποτέλεσμα , όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο οι τελευταίες να μετακινούνται προς την άνοδο. Η κινητικότητά τους εξαρτάται αποκλειστικά από το μοριακό τους βάρος. Οι πρωτεΐνες με το μικρότερο μοριακό βάρος είναι αυτές που κινούνται γρηγορότερα.

Η τάση του ρεύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα της μετανάστευσης των πρωτεϊνών στο πήκτωμα. Επιθυμείται να μην είναι πολύ μεγάλη έτσι ώστε οι ζώνες των πρωτεϊνών που σχηματίζονται να διαχωρίζονται σωστά και να μην διαχέονται οι τελευταίες στην πλάκα ηλεκτροφόρησης.

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου είναι 10 % στη σύνθεσή του . Η πλάκα του πήκτωματος είχε διαστάσεις 16,5 x 14,5 x 0,15 cm . Το πήκτωμα δημιουργήθηκε με πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου και του N , N – μεθυλεν – δις – ακρυλαμιδίου (bis) (16,6 ml) . Το bis – ακρυλαμίδιο σε αναλογία 0,8 : 30 ως προς το ακρυλαμίδιο , χρησιμοποιείται στο πλέγμα σαν σύνδεσμος των αλυσίδων του ακρυλαμιδίου.

Επίσης στο πήκτωμα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl 1,5 M pH 8,8 (16 ml) , SDS 0,1 % μέχρι τελικής συγκέντρωσης , 30 ml TEMED , το οποίο χρησιμεύει στην μετάδοση των ελεύθερων ριζών στο σύστημα πολυμερισμού , οι οποίες εμφανίζονται λόγω της παρουσίας του καταλύτη , 400 ml υπερθειϊκού αμμωνίου 20 % (APS) , το οποίο παίζει το ρόλο καταλύτη και τέλος απεσταγμένο νερό έως τελικού όγκου 50 ml.

Το μίγμα τοποθετήθηκε μεταξύ των δύο γυάλινων πλακών ηλεκτροφόρησης μέχρι 2 –3 περίπου cm κάτω από την επιφάνεια και διατηρείται για δύο περίπου ώρες μέχρι να πήξει .

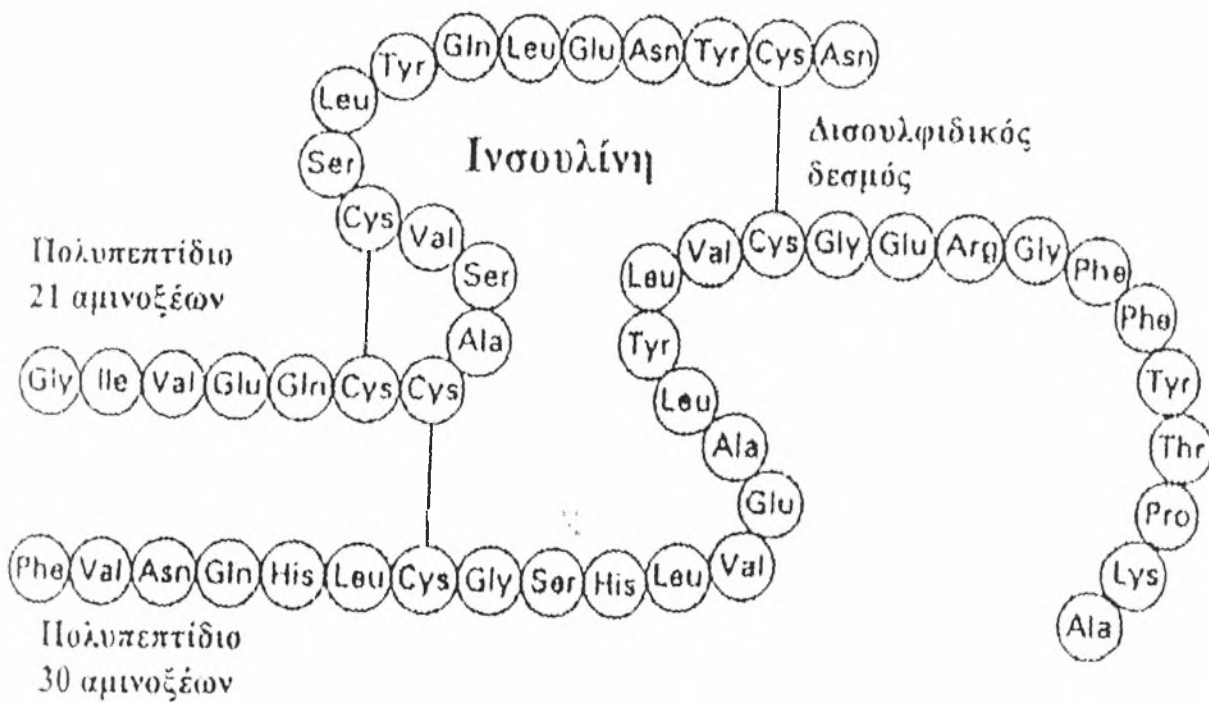
Ο λόγος που αφήνονται άδειες οι πλάκες περίπου 2 – 3 cm από την επιφάνεια , είναι γιατί χρησιμοποιείται το (stacking gel) πήκτωμα , προκειμένου να συμπιέστούν οι πρωτεΐνες στην μετανάστευσή τους , μέσα από το πήκτωμα σύνθεσης 10 % . Κατ' αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να υπάρξουν συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των δειγμάτων που φορτώνονται στην ηλεκτροφόρηση.

Όσο αφορά την σύνθεση του (stacking gel) πηκτώματος , χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υλικά , μόνο που οι αναλογίες τους ήταν διαφορετικές. Το bis – acrylamide 0,8 : 30 σε ποσότητα (1,5 ml) , Tris – HCL 1,25 M pH 6,8 (1 ml) , SDS 0,1% μέχρι τελικής συγκέντρωσης (0,1 ml), TEMED (20 ml) , APS 20 % (80 ml) , και συμπληρώθηκε με απεσταγμένο νερό (7,3 ml) μέχρι τελικού όγκου 10 ml.

Το μίγμα τοποθετήθηκε στις πλάκες ηλεκτροφόρησης και προστέθηκε η ειδική χτένα δημιουργίας υποδοχών (πηγάδια) όπου φορτώνονται τα δείγματά .

Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα (sample buffer) με μερκαπταιθανόλη σε αναγωγικές συνθήκες. Η μερκαπταιθανόλη χρησιμοποιείται γιατί διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς και επιτρέπει το διαχωρισμό των υπομονάδων της πρωτεΐνης , αν υπάρχουν . Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται η δομή της πρωτεΐνης ινσουλίνη. Το ρυθμιστικό διάλυμα (αναγωγικές συνθήκες) περιείχε Tris – HCL τελικής συγκέντρωσης 0,06 M pH 6,8 , 3 % SDS, 10 % γλυκερίνης , 5 % μερκαπταιθανόλη , 0,05 % κυανού της βρωμοφαινόλης (BPB)

Το διάλυμα των πρωτεϊνών με τη μερκαπταιθανόλη θερμάνθηκε στους 100 ° C για περίπου 5 λεπτά , έτσι ώστε να διαχωρισθούν οι υπομονάδες τους .



Σχήμα 8 . Δισουλφιδικοί δεσμοί στην πρωτεΐνη ινσουλίνη .

Στη συνέχεια τοποθετούνται τα δείγματα στις υποδοχές (πηγάδια) ηλεκτροφόρησης , και εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης 25 mA για 3 – 4 περίπου ώρες . Υπολογίζουμε περίπου γύρω στα 20 µg πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης και συμπληρώνεται με (sample buffer) μέχρι 10 µl σε κάθε πηγάδι.Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα (Running Buffer) του οποίου η σύνθεση ήταν 14 ,4 gr γλυκίνης , 3,03 gr Tris – base , 1 gr SDS και συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 1 λίτρο διαλύματος . Σαν μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη αλβουμίνη σε συγκέντρωση 0,5 µg / ml πάντα στην αρχή και στο τέλος των δειγμάτων.

Για την στερέωση , την χρώση και τον αποχρωματισμό της πλάκας ηλεκτροφόρησης , έγιναν τα παρακάτω :

- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 50 % μεθανόλη και 10 % οξικό οξύ . Η διάρκεια της εμβάπτισης , ήταν περίπου 30 min σε διαρκή κίνηση.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 5 % μεθανόλη και 7 % οξικό οξύ. Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 30 min σε διαρκή κίνηση.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα που περιείχε 10 % γλουταραλδεΐδη . Η διάρκεια της εμβάπτισης ήταν 30 min σε διαρκή κίνηση.
- ◆ Ξέπλυμα του πηκτώματος σε απεσταγμένο νερό όπου παρέμεινε για χρονικό διάστημα από δύο ώρες έως όλη την νύχτα.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα DTT , τελικής συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 30 min σε διαρκή κίνηση .
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε διάλυμα νιτρικού αργύρου 0,1 % . Η διάρκεια εμβάπτισης ήταν 30 min σε διαρκή κίνηση .
- ◆ Γρήγορο ξέπλυμα , δύο φορές με απεσταγμένο νερό.
- ◆ Γρήγορο ξέπλυμα μια φορά με 250 ml εμφανιστικού υγρού (developer) . Το διάλυμα αυτό περιείχε στα 500 ml απεσταγμένο νερό , 500 μl φορμαλδεΐδης 37 % και 15 gr ανθρακικού νατρίου.
- ◆ Εμβάπτιση του πηκτώματος σε 250 ml εμφανιστικού υγρού , έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες πρωτεϊνών με διαρκή ανακίνηση.
- ◆ Μετά την εμφάνιση των ζωνών , προστέθηκε διάλυμα 5 ml οξικού οξέος και 45 ml απεσταγμένου νερού , σύνολο 50 ml στο εμφανιστικό υγρό , για το σταμάτημα της χρώσης.
- ◆ Ξέπλυμα του πηκτώματος 2 –3 φορές με απεσταγμένο νερό , τοποθέτηση του σε ζελατίνα και διατήρηση στο ψυγείο .

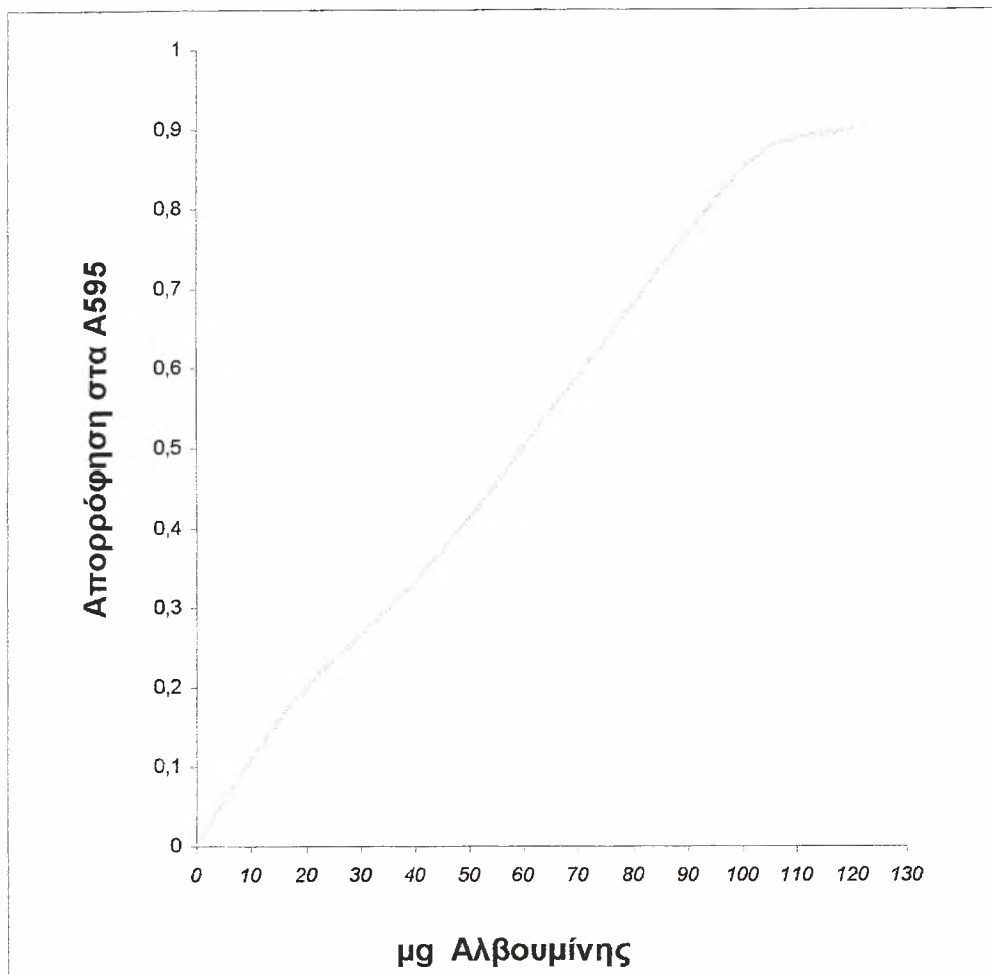
2.B . ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.B.1 Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης .

Για τον υπολογισμό των ποσοτήτων πρωτεΐνης στα διάφορα διαλύματα με την χρήση του φασματοφωτομέτρου έπρεπε να κατασκευασθεί κάποια καμπύλη αναφοράς (πρότυπη καμπύλη) κάποιου διαλύματος γνωστής ποσότητας πρωτεΐνης. Συγκεκριμένα , χρησιμοποιήθηκε για τον σκοπό αυτό διάλυμα αλβουμίνης περιεκτικότητας 10 mg / ml .

Πίνακας . Οι τιμές της απορρόφησης στο φασματοφωτόμετρο στα 595 nm διαφόρων ποσοτήτων διαλύματος αλβουμίνης 10 mg / ml .

ΠΟΣΟΤΗΤΕΣ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ 10 mg / ml	A_{595}
0 μ g	0
10 μ g	0,11
20 μ g	0,20
50 μ g	0,41
100 μ g	0,85
120 μ g	0,90



Σχήμα 9 . Πρώτυπη καμπύλη αλβουμίνης

2.B.2 Επιλογή των εκκινητών (primers) και συνδυασμοί μεταξύ αυτών.

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή χρησιμοποιήθηκαν 10 τυχαίοι P primers και 9 oligo (d T) primers . Αυτό δίνει την δυνατότητα 90 συνδυασμών προς δύο κατευθύνσεις. Οι P primers επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν μόνοι τους ή σε συνδυασμένο ζευγάρι με επίσης P primer.(Mc Clelland et al., 1990) . Αυτό δίνει την δυνατότητα άλλων 55 συνδυασμών. (Βλέπε Πίνακα 1 & 2) .

Οι T primers επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθούν μόνοι τους ή σε συνδυασμό με άλλους. Οι συνδυασμοί P & T primer (ή μόνο T primer) βασικά παράγουν προϊόντα PCR εξαγόμενα από το 3 άκρο του m RNA , ενώ οι P primer καθώς και οι συνδυασμοί μεταξύ αυτών ευνοούν τις εσωτερικές περιοχές των m RNA .

Στην παρούσα εργασία δοκιμάστηκαν έξι συνδυασμοί των P & T εκκινητών (Βλέπε Πίνακα 4) για την ενίσχυση των c DNA s των δειγμάτων και σε αναλογία όπως δίνεται στον Πίνακα .

A/a	Ζεύγος	Αναλογία Εκκινητών σε (μl)
1	P ₅ - T ₆	1-1
2	P ₆ - T ₇	1-1
3	P ₅ - T ₄	1-1
4	P ₇ - T ₉	1-1
5	P ₇ - T ₄	1-1
6	P ₉ - T ₉	1-1
7	P ₅ - T ₆	0,5 - 0,5
8	P ₅ - T ₆	1,5 - 1,5

Πίνακας 6 . Οι αναλογίες των ζευγαριών των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν .

Τα παραπάνω ζεύγη των εκκινητών και στις αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν , δοκιμάστηκαν σε διαφορετικές ποσότητες cDNAs προερχόμενα από τις αρσενικές και θηλυκές γονάδες της Γόπας (Boops boops) , των οποίων , η απομόνωση του mRNA πραγματοποιήθηκε και με τις δύο μεθόδους που προανέφερα .

Στον Πίνακα 7, παραθέτονται τα δείγματα , οι ποσότητες των cDNAs σε (μl) που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία , τα ζεύγη των εκκινητών και οι αναλογίες τους.

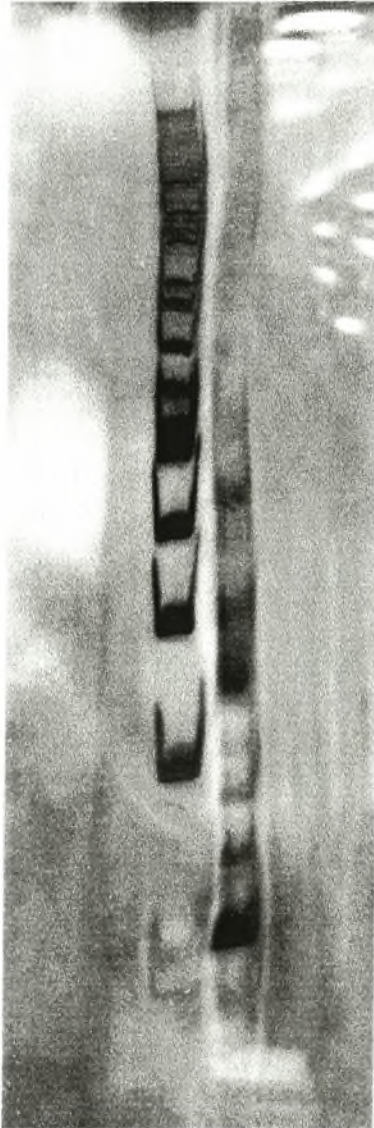
Πίνακας 7 . Συνδυασμοί που δοκιμάστηκαν στο πείραμα

Δείγμα	Ποσότητα cDNA(μl)	Ζεύγος	Αναλογία (μl)
Γόπα ♂	2	P ₅ - T ₆	1-1
Γόπα ♀	2	P ₅ - T ₆	1-1
Γόπα ♂	2	P ₆ - T ₇	1-1
Γόπα ♀	2	P ₆ - T ₇	1-1
Γόπα ♂	2	P ₅ - T ₆	1-1
Γόπα ♀	2	P ₅ - T ₆	1-1
Γόπα ♂	0,5	P ₅ - T ₄	1-1
Γόπα ♂	1	P ₅ - T ₄	1-1
Γόπα ♂	0,75	P ₇ - T ₉	1-1

Γόπα ♂	0,75	$P_7 - T_6$	1-1
Γόπα ♂	0,5	$P_9 - T_9$	1-1
Γόπα ♂	0,75	$P_9 - T_9$	1-1
Γόπα ♂	0,75	$P_5 - T_6$	1-1
Γόπα ♂	1	$P_5 - T_6$	1-1
Γόπα ♂	1	$P_5 - T_6$	0,5 - 0,5
Γόπα ♂	1	$P_5 - T_6$	1,5 - 1,5

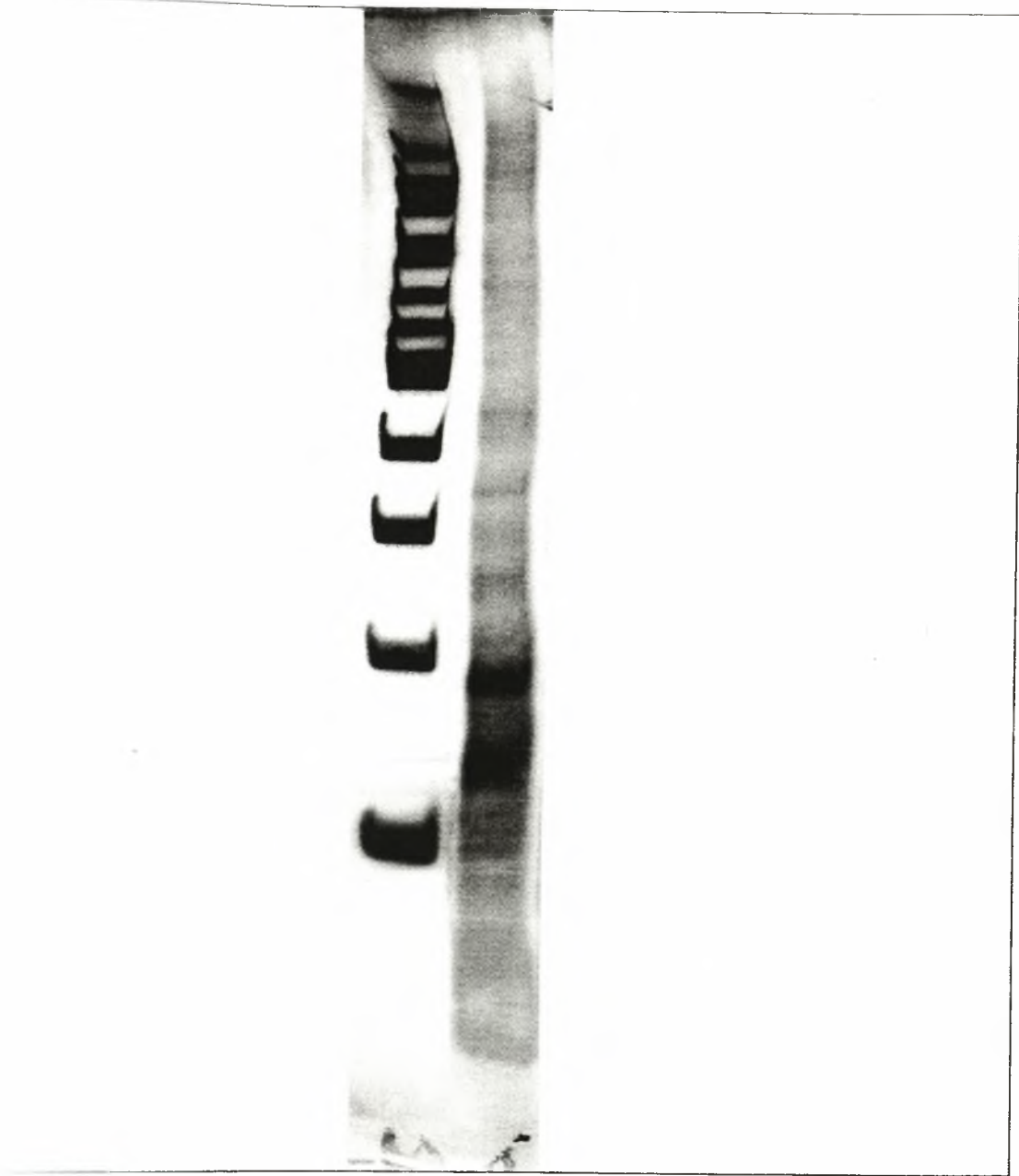
2.B.2.1 Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης νουκλεϊνικών οξέων

Από την χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο , όπου είχαν αναλυθεί τα προϊόντα της PCR , ενός ατόμου αρσενικού και ενός θηλυκού της γόπας (*Boops boops*) και με τις δύο μεθόδους απομόνωσης , φαίνεται ότι ο καλύτερος συνδυασμός ο οποίος έδωσε και το καθαρότερο αποτέλεσμα , ήταν εκείνος των εκκινήτων P₅ - T₆ (Πίνακας 6 & 7 . Αποτελέσματα) .



{ Μάρτυρας } { Γόπα }

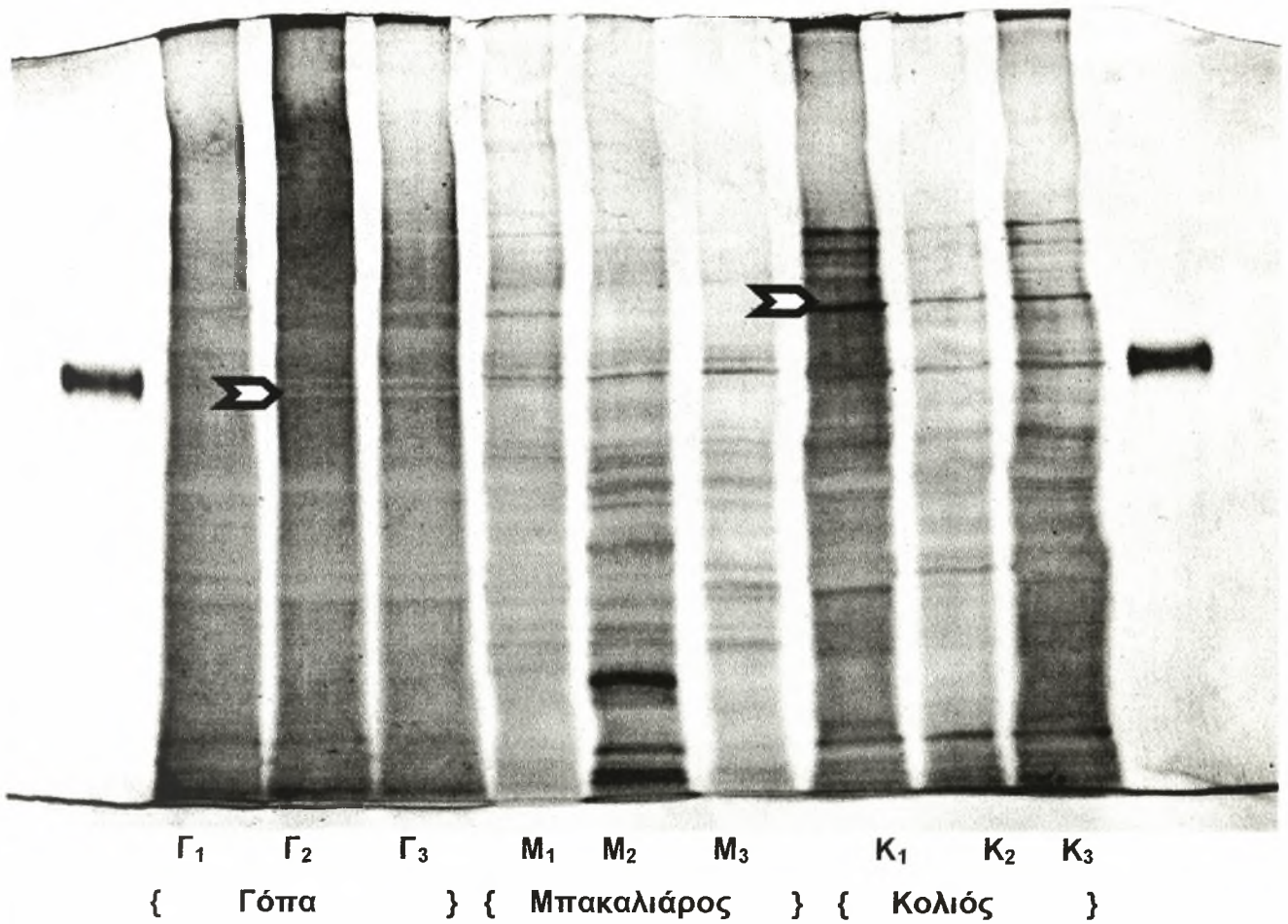
Σχήμα 10. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου . θυληκό άτομο της γόπας (*Boops boops*) . Η απομόνωση του m RNA έγινε με το E.Z.N.A Kit. Ο μάρτυρας αναφέρεται σε γνωστό DNA (100 – 1300 bp) βάσεων .



{ Μάρτυρας}{Γόπα }

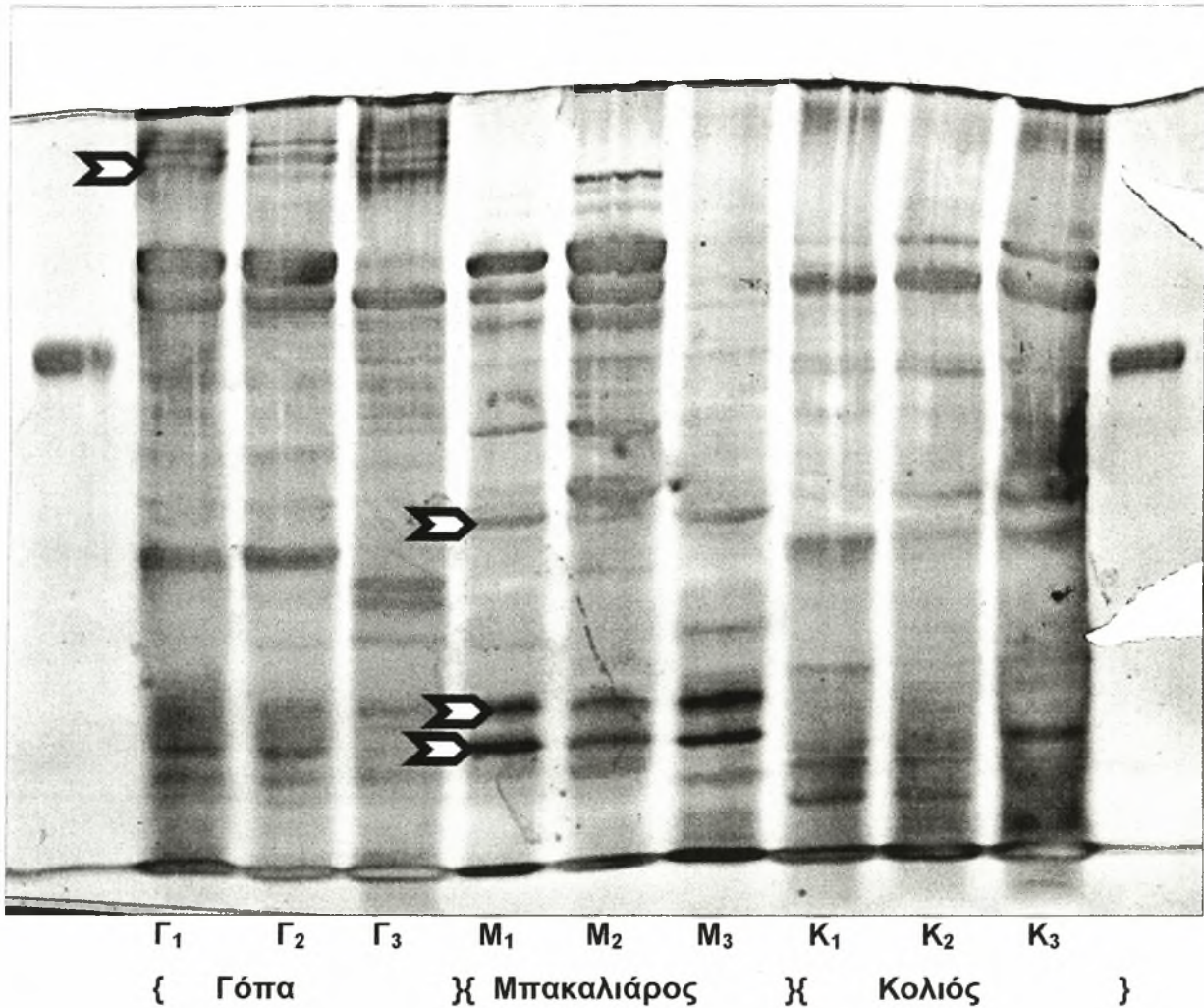
Σχήμα 11. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου . Αρσενικό άτομο της γόπας (*Boops boops*) . Η απομόνωση του mRNA έγινε με TRIzol[®] Reagent .

2.B.3.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος στις γονάδες αρσενικών ατόμων γόπας , μπακαλιάρου & κολιού.



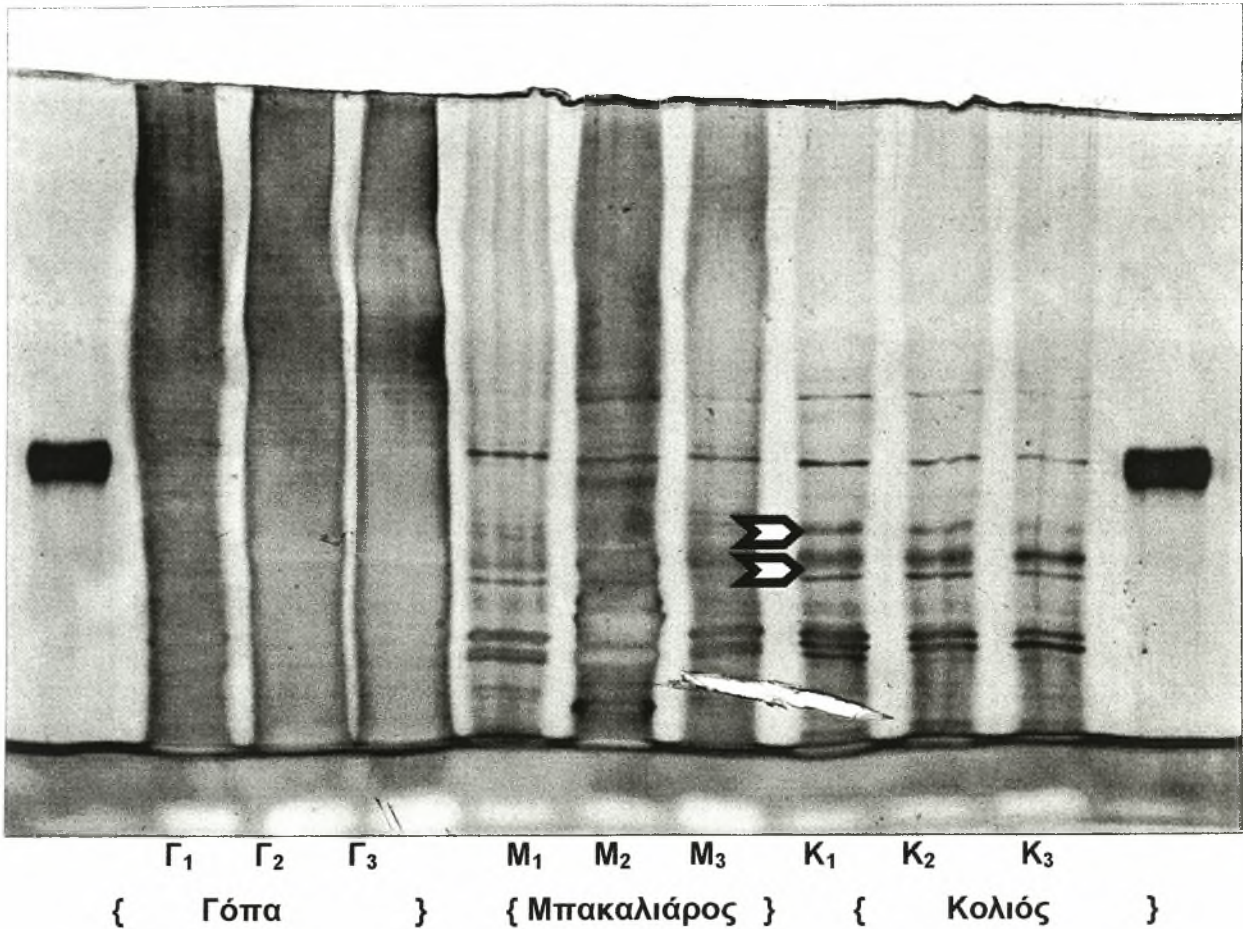
Σχήμα 13. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος σε πηκτή πολυακρυλαμίδης . Αρσενικά άτομα γόπας (*Boops boops*) , μπακαλιάρου (*Merlangius merlangus*) , κολιού (*Scomber japonicus*).

2.B.3.3. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων στις γονάδες θηλυκών ατόμων γόπας , μπακαλιάρου & κολιού.



Σχήμα14 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης . Θηλυκά άτομα γόπας (*Boops boops*) , μπακαλιάρου (*Merlangius merlangus*) ,κολιού (*Scomber japonicus*).

2.Β.3.4. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων σε γονάδες
αρσενικών ατόμων γόπας , μπακαλιάρου & κολιού.



Σχήμα 15 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών πυρήνων σε πηκτή πολυακρυλαμίδης . Αρσενικά άτομα γόπας (*Boops boops*) , μπακαλιάρου (*Merlangius merlangus*) , κολιού (*Scomber japonicus*).

3 . ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως ήδη έχει αναφερθεί στο γενικό μέρος , στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μη ραδιενεργός εναλλακτική μέθοδος ταυτοποίησης διαφορετικά εκφρασμένων mRNAs , βασισμένη στα θεμελιώδη χαρακτηριστικά της κλασικής μεθόδου Differential Display - PCR (Liang & Pardee 1992). Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της τροποποιημένης μεθόδου , οι διαφορές συνοψίζονται στα παρακάτω σημεία .

- Την χρήση τυχαίων εκκινητών αποτελούμενων από εικοσιπενταμερή ή εικοσιεξαμερή εκκινητή με γενική δομή 5´ - ATTAACCCTCACTAAAN₁ N₁ N₁ N₁ N₁ N₁ N₁ N₁ N₁ - 3´ όπου N₁ = G , T , C ή A και ένα τριαντακονταμερή εκκινητή με γενική δομή 5´ - CATATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTT N₁ N₁ - 3´ όπου N₁ = G , C ή A.
- Την αποτελεσματική ενίσχυση του c DNA στην PCR αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων σε 48 .
- Τον προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6 % , σε σύντομο χρονικό διάστημα , λιγότερο από μία ώρα .
- Την αποκάλυψη των ζωνών της πηκτής κάνοντας την χρώση με νιτρικό άργυρο αντί της αυτοραδιογραφίας.

Όσο αφορά την απομόνωση των mRNAs , δοκιμάστηκε , με την χρήση δύο πρωτόκολλων , με Trk lysis Buffer και με TRIzol® Reagent . Και στα δύο η ποσότητα του mRNA που απομονώθηκε ήταν ικανοποιητική . Το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν και τα δύο έγκειται καθαρά σε πειραματικούς λόγους , στις γονάδες των ψαριών , αφού και στις δύο περιπτώσεις τα αποτελέσματα ήταν καλά . Η δεύτερη μέθοδος απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην απομόνωση.

Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές ποσότητες c DNA των 2μl , 1μl , 0,75 μl , 0,5 μl , (Πίνακας 7 σελ.61) αντίστοιχα μέχρι να ληφθεί ικανοποιητικό αποτέλεσμα. Το c DNA που συντέθηκε από το m RNA ενισχύθηκε στην PCR με την χρήση ζευγών εικοσιπενταμερών ή εικοσιεξαμερών εκκινητών με τριαντακονταμερείς εκκινητές .

Προκειμένου να αποκαλυφθούν οι ζώνες στην δομή του m RNA , η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου , χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί των P & T εκκινητών και σε αναλογία 1μl : 1 μl καθώς επίσης και κατάλληλος συνδυασμός της ποσότητας του c DNA και των εικοσιπενταμερών ή εικοσιεξαμερών και των τριαντακονταμερών εκκινητών.

Από την χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο , όπου είχαν αναλυθεί τα προϊόντα της PCR , ενός ατόμου αρσενικού και ενός θηλυκού της γόπας (Boops boops) και με τις δύο μεθόδους απομόνωσης , φαίνεται ότι ο καλύτερος συνδυασμός ο οποίος έδωσε και το καθαρότερο αποτέλεσμα , ήταν εκείνος των P5 & T6 εκκινητών (Πίνακας 6 & 7 .σελ 60-61) . Η δομή των παραπάνω εκκινητών δίνεται παραπάνω .

Η βασική ιδέα της παραπάνω εργασίας ήταν το στήσιμο της παραπάνω τροποποιημένης μεθόδου της DD – PCR (όπως περιγράφηκε παραπάνω) , πάνω στις αρσενικές και θηλυκές γονάδες των ψαριών – δειγμάτων και των τριών ειδών .Έχοντας πλέον ένα καλό προφίλ του συγκεκριμένου κομματιού του γενετικού υλικού , στην κοινή γόπα και με τις δύο μεθόδους απομόνωσης του m RNA , εύκολα αποδεικνύεται ότι είναι άτομα του ίδιου είδους (και στα δύο φύλα) σαν μια πρώτη προσέγγιση της μελέτης της γονιδιακής έκφρασης , αλλά και επιπλέον συγκρίνοντας τα άτομα μεταξύ τους , για τυχόν διαφορές στην γονιδιακή έκφραση.

Στην προσπάθεια μου , να υπάρξουν συγκριτικά αποτελέσματα , μεταξύ των τριών ειδών των ψαριών (και στα δύο φύλα) , αλλά αυτή την φορά σε επίπεδο πρωτεϊνών μελετώντας την γονιδιακή έκφραση , έγινε απομόνωση των τελευταίων από το κυτταρόπλασμα και τους πυρήνες των γονάδων τους .

Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των πρωτεϊνών των γονάδων των ψαριών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου , υπο την παρουσία μερκαπτααιθανόλης , δηλαδή κάτω από αναγωγικές συνθήκες επιτρέποντας το διαχωρισμό των υπομονάδων των πρωτεϊνών διασπώντας τους δισουλφιδικούς δεσμούς (Σχήμα 8) , αλλά και με την χρήση του (stacking gel) για την καλύτερη μετανάστευσή τους στο πήκτωμα της πολυακρυλαμιδης φαίνονται στα παραπάνω (Σχήματα 12 , 13 , 14 & 15) .

Συγκεκριμένα στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος στις γονάδες θηλυκών ατόμων γόπας , μπακαλιάρου & κολιού (Σχήμα 12) , διαπιστώνονται κάποιες διαφορές τόσο στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών όσο και στην ποσότητα που εκφράζονται συγκριτικά στα τρία είδη που εξετάστηκαν.

- ◆ Ο λόγος των πρωτεϊνών B / A στον K_1 , K_2 , K_3 , διαφοροποιείται μεταξύ των τριών δειγμάτων και συγκεκριμένα στο $K_1 = 1/1$, $K_2 = 1/8$, $K_3 = 2/4$, ενώ για τις ίδιες πρωτεΐνες , η A απουσιάζει από τον M_2 , M_3 , όπως επίσης και από την Γ_1 , Γ_2 , Γ_3 . Στο M_1 για τις συγκεκριμένες πρωτεΐνες δεν υπάρχει καλό προφίλ.
- ◆ Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης και στα τρία δείγματα της Γ_1 , Γ_2 , Γ_3 , με αυξημένη ποσότητα στα δύο τελευταία , δε φαίνεται να υπάρχει σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.
- ◆ Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο M_2 , M_3 , φαίνεται να μην υπάρχει σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

- ♦ Χαμηλά στο M_1, M_2, M_3 , εκφράστηκαν οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες σχεδόν διπλάσια ποσότητα στο M_1 από ότι στο M_3 και λιγότερο στο M_2 , ενώ δεν εκφράστηκαν σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα ή εκφράστηκαν ελάχιστα.
- ♦ Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στο K_1, K_2, K_3 , δε φαίνεται να υπάρχει σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

Στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών κυτταροπλάσματος στις γονάδες αρσενικών ατόμων γόπας, μπακαλιάρου & κολιού (Σχήμα 13), διαπιστώθηκαν εξίσου κάποιες διαφορές στην έκφραση συγκεκριμένων πρωτεϊνών τόσο από άποψη θέσης όπως επίσης και από θέμα ποσότητας, συγκριτικά και στα τρία είδη των δειγμάτων που εξετάσθηκαν.

- ♦ Η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον K_1, K_2, K_3 , όπως επίσης και στον M_1 δε φαίνεται να υπάρχει στα υπόλοιπα δείγματα.
- ♦ Στην Γ_2, Γ_3 αλλά και στην Γ_1 (λόγω μη καλού προφίλ), φαίνεται να εκφράζονται και οι δύο πρωτεΐνες, ενώ δεν εκφράζονται σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

Στην ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών πυρήνων στις γονάδες ατόμων θηλυκών των ειδών γόπας, μπακαλιάρου & Κολιού (Σχήμα 14), αν και δεν αξιολογούνται για συγκριτικές διαφορές στην έκφραση ορισμένων πρωτεϊνών μεταξύ των δειγμάτων που εξετάζονται, όπως εκείνων στις πρωτεΐνες κυτταροπλάσματος, εντούτοις παρουσιάζουν κάποιες διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών.

- ♦ Στην $\Gamma_1, \Gamma_2, \Gamma_3$, η έκφραση των δύο διαδοχικών πρωτεϊνών, φαίνεται ότι δεν υπάρχει σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

Το ίδιο διαπιστώνεται στον M_1, M_2, M_3 , η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης φαίνεται να μην υπάρχει σε κανένα από τα υπόλοιπα δείγματα.

- ♦ Στα ίδια, δηλαδή M_1, M_2, M_3 , η έκφραση των δύο πρωτεϊνών δεν υπάρχει στα υπόλοιπα δείγματα.
- ♦ Τέλος, στα αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών πυρήνων από γονάδες αρσενικών ατόμων και των τριών ειδών που εξετάσθηκαν (Σχήμα 15) οι διαφορές στην έκφραση των πρωτεϊνών περιορίζονται.
- ♦ Συγκεκριμένα η έκφραση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης στον K_1, K_2, K_3 , όπως επίσης και στον M_1, M_2, M_3 φαίνεται να μην υπάρχει στη γόπα.
- ♦ Το ίδιο και στην έκφραση της πρωτεΐνης λίγο πιο κάτω, στον K_1, K_2, K_3 φαίνεται μόνο στον M_1 και όχι αλλού.

Όπως αναφέρθηκε στην αρχή, η αναπαραγωγή αλλά και η ανάπτυξη τόσο των τελεόστεων όσο και των ανώτερων σπονδυλωτών, βρίσκονται κάτω από ένα αυστηρό ορμονικό έλεγχο (ενδοκρινής ρύθμιση). Συγκεκριμένα στη ρύθμιση της αναπαραγωγικής ικανότητας, οι ορμόνες οι οποίες εμπλέκονται και παίζουν ουσιώδη ρόλο είναι η τεστοστερόνη και η οιστραδιόλη. Μάλιστα σε πολλά ζώα η σχέση τεστοστερόνη / οιστραδιόλη έχει ζωτική σημασία και κάθε διαταραχή αυτής της σχέσης, μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά προβλήματα στην αναπαραγωγική ικανότητα.

Τα τελευταία χρόνια έχει βρεθεί ότι αρκετές χημικές ενώσεις, όπως είναι ορισμένα παρασιτοκτόνα (μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, συνθετικά στεροειδή κ.λπ), που κυκλοφορούν ευρέως στην Ελλάδα, αλλά και στην υπόλοιπη Ευρωπαϊκή Ένωση, μπορούν να μιμούνται την δράση των οιστρογόνων (xenoestrogens). Τα τελευταία έχουν εισαχθεί στο περιβάλλον που ζει ο άνθρωπος, αλλά και πολλά ζώα και ψάρια, όπου σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, προκαλούν ανωμαλίες στο γεννητικό σύστημα των αρσενικών ατόμων διαφόρων ζώων και ειδικά άγριων.

Στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα της μελέτης της γονιδιακής έκφρασης στους γονάδες των ψαριών των συγκεκριμένων ειδών, είναι δυνατόν να ενθαρρύνουν τους ερευνητές προκειμένου να καταλήξουν στη αναγνώριση γονιδίων – δεικτών τα οποία επηρεάζονται μετά από έκθεση σε τέτοιου είδους ρύπους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία επιδιώχθηκε μια απλή προσέγγιση της μελέτης της διαφορικής γονιδιακής έκφρασης , απομονώνοντας το ολικό mRNA , από τις αρσενικές και θηλυκές γονάδες συγκεκριμένων ειδών ψαριών του Παγασητικού Κόλπου .

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου Differential Display , για την ταυτοποίηση και κλωνοποίηση όλων των διαφορικά εκφρασμένων mRNAs που απομονώθηκαν από τα δείγματά μας .

Συγκεκριμένα εφαρμόστηκε η τροποποιημένη μέθοδος DD – PCR , η οποία διαφοροποιείται στην χρήση απλού oligo (d T) εκκινήτη στην αντίστροφη μεταγραφή (RT) , στους τυχαίους εικοσιπενταμερείς και εικοσιεξαμερείς εκκινήτες σε συνδυασμό με τριαντακονταμερείς εκκινήτες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) , στην αύξηση των κύκλων της PCR , και τέλος στην χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο .

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε στις γονάδες αρσενικών και θηλυκών ατόμων) της γόπας (*Boops boops*), του μπακαλιάρου (*Merlangius merlangus*) και του κολιού (*Scomber japonicus*) με πολύ καλά αποτελέσματα.

Επίσης αναλύθηκαν σε SDS – ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες του κυτταροπλάσματος και των πυρήνων των παραπάνω δειγμάτων και βρέθηκαν χαρακτηριστικές πρωτεΐνες που διαφοροποιούν τα δείγματα μεταξύ τους είτε αναφερόμαστε σε αρσενικές , είτε σε θηλυκές γονάδες των ψαριών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ali Hellani , Jingwei Ji, Claire Mauduit Deschildre C, Tabone E, and Benahmed M, (2000) . Developmental and Hormonal Regulation of the Expression of Oligodendrocyte – Specific Protein / Claudin 11 in Mouse Testis. Endocrine Society .

Albert Zendman , Ine Cornelissen , Ulrich Weidle , Dirk Ruiter and Gops Muijen . (1999) . CTp11 , a Novel Member of the Family of Human Cancer / Testis Antigens . Cancer Research 59 , 6223 – 6229 .

Alberts Bray , Johnson Lewis , Raff Roberts Walter (2000) . Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας . Εισαγωγή στην Μοριακή Βιολογία του Κυττάρου . Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης .

Αρσενάκης , Μ. (1999) . Μοριακή Βιολογία , Σημειώσεις από τις παραδόσεις του μαθήματος . Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης .

Atsuto Inoue , Atsushi Ishiji , et all . (2000) The Transcript for a Novel Protein with a Zinc Finger Motif Is Expressed at Specific Stages. Biochemical and Biophysical Research Communications 273 , 398 – 403 .

Βιοτεχνολογία Αναπαραγωγής Ζωικών Οργανισμών . (1998) . Ph.D. Δημήτρης Κουρέτας . Π.Θ.

Doss , R . P. (1996) Differential Display with out radioactivity – A modified procure . Biotechniques 21 : 408 – 410.

Guo Cai –xia , Tang Tie –shan , Mu Xiao –ming , Li Shu – hong , Fu Guo – qiang , Liu He and Liu Yi – xun . (1999) . Cloning of Novel Temperature – Related Expressed Sequence Tags in Rat Testis during

Spermatogenesis. Biochemical and Biophysical Research Communications 258 , 401 –406 .

Hansis C, Iahner D, Spiess A, Boettcher K, and Ivell R . (1998) . The gene for the Alzheimer – associated β - amyloid – binding protein (ERAB) is differentially expressed in the testicular Leyding cells of the azoospermic by w/ w^v mouse.Eur. J. Biochem. 258, 53 –60 .

Ito , T. , Kito , K., Adati , N., Mitsui , Y., Hagiwara , H., Sakaki , Y. (1994) . Fluorescent differential display : Arbitrary primed RT – PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer . FEBS Lett 351 : 231 –236 .

Kociok ,N., Unfried , K., Esser , P., Krott , R., Sachraermeyer , U., Heimann , K., (1998) . The nonradiosotopoic representation of RNA fingerprinting and differential display . Mol Biotechnol 9 : 21 –34 .

Liang , P., Zhu , W., Zhang , X., Guo , Z., O' Connell , R., Averboukh , L., Wang , F., and Pardee , A.B . (1994) . Differential display using onebase anchored oligo – d T primers . Nucleic Acids Res. 22 : 5763 – 5764 .

Martin , K., Kwan , C –P , and Sager , R ., (1997) . Direct – sequencing – based strategy for identifying and cloning c DNAs from differential display gels . In Methods in molecular Biology . Differential Display : methodw and Applications (Pardee , A.B and Liang , P.) Humana , Totorea , N.J (in press) .

Meier – Ewert , S., Maier , E., Ahmadi , A., Curtis , J., and Lehrach , H . (1993) . An automated approach to generating expressed sequence catalogues . Nature 361 : 375 – 376 .

Motlik , J., Carnwath , J. W., Hermann , D., Terletski , V., Anger , M.,

Niemann , H., (1998) .Automated recording of RNA differential display patterns from pig granulose cells . Bio techniques 24 : 148 –153.

Ocubo , K., Hori ,N., Matoba , R., Niiyama , T., Fukyshima . A., Kojima , Y., et al (1992) . Large scale c DNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. Nat Genet .2 : 173 – 179 .

Pienta , K., Sachwad , E. D. (2000). Modified Differential Display Technique that Eliminates Radioactivity and Decreases Screening Time . Bio Techniques 28 : 272 – 277 .

Πρακτικά Ημερίδας (1997) . Ι.Γ.Γεωργιάτσου . Σύγχρονες απόψεις στη Βιοχημεία .

Rayani , H., Wert , j., Floros , J., (1998) . Expression and c DNA sequence of helix destabilizing protein (HDP) in rat lung . Experimental Lung Research , 24 : 101 –118 .

Sager , R., Anisowicz , A., Neveu , M., Liang ,P., and Sotiropoulou , G., (1993) . Identification by differential display of alpha 6 integrin aw a candidate tumor suppressor gene. FASEB J. 7 : 964 –970 .

Schema . ., Shalon , D., Davis , R. W., and Brown , P.O . (1995) . Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray . Science 270 : 467 – 470 .

Σημειώσεις του Μαθήματος << Φυσιολογία Αναπαραγωγής Ζωικών Οργανισμών>> . (2001) . Δρ . Λάμπρος Κοκοκύρης . Π.Θ.

Σωτηροπούλου , Γ. (1997) . Ταυτοποίηση και κλωνοποίηση καρκινικών γονιδίων με την μέθοδο Differential Display . Σύγχρονες απόψεις στην Βιοχημεία , Πρακτικά ημερίδας , Θεσσαλονίκη.

Τρακατέλλης Αντώνης (1990) .Βιοχημεία . 2^η Έκδοση . Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη , Θεσσαλονίκη.

Welsh , J., et al. (1992) . Arbitrary primed PCR fingerprinting of RNA . Nucleic Acids Res. 20 : 4965 – 4970 .

Xinkang , W., Xiang , L., Feuerstein , G.Z (1998) . Use of Novel Downstream Primers for Differential Display RT – PCR . Bio Techniques 24 : 382 –386 .

Zhao , S., Ooi , S.L., Pardee , A.B. (1995) . New primer strategy improves precision of differential display . Bio Techniques 20 : 842 – 850.

