



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Συγκριτική γονιδιωματική των γονιδίων της υπομονάδας α της AMPK (AMP-activated protein kinase), και της έκφρασής της κατά την οντογένεση της τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Comparative genomics of AMPK- α (α subunit of AMP-activated protein kinase) genes, and its expression during ontogeny of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)



(<http://www.universalseafoodinc.com/gilthead-sea-bream>)

Αρσένιος Ζαφείριος Λουκίσσας

Λάρισα 2019

Τριμελής Επιτροπή:

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών - Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας -
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής
Γενετικής Ζωικών Οργανισμών - Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών -
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας



Η παρούσα πτυχιακή εργασία έλαβε χώρα στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της αναπληρώτριας καθηγήτριας Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνης.

Περίληψη

Η τσιπούρα αποτελεί το κύριο εκτρεφόμενο ψαρί της μεσογείου, με τεράστια οικονομικά οφέλη κάθε χρόνο. Γι' αυτό τον λόγο κρίνεται αναγκαία η κατανόηση των διαδικασιών ανάπτυξης του οργανισμού, κυρίως στους τομείς της μυογένεσης και λιπογένεσης που έχουν εμπορικό ενδιαφέρον. Το ένζυμο της AMP- εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), αποτελεί ένα ένζυμο-κλειδί στη μεταβολική ισορροπία όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Ενεργοποιείται από πολλά ερεθίσματα, κυρίως μέσω της μείωσης του ενδοκυτταρικού ATP. Η δράση του στοχεύει στην αποκατάσταση της ενεργειακής ομοιόστασης, επάγοντας καταβολικά μονοπάτια που οδηγούν στην αναγέννηση του ATP, και αναστέλλοντας αναβολικά μονοπάτια που έχουν σαν αποτέλεσμα την κατανάλωση του. Αποτελείται από μία καταλυτική υπομονάδα (α) και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες (β , γ). Ρυθμίζεται με πολλούς και διαφορετικούς μηχανισμούς, ενώ ακόμα ανακαλύπτονται στόχοι και τρόποι δράσης του. Ο σημαντικός ρόλος του ενζύμου έχει προταθεί και στους ιχθύες, ιδιαίτερα κατά τις έντονες μεταβολικές δοκιμασίες που αυτοί αντιμετωπίζουν.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της εξέλιξης των γονιδίων της α -υπομονάδας του ενζύμου, μέσω φυλογενετικής ανάλυσης. Επίσης, διερευνήθηκε η έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου της α -2 υπομονάδας του ενζύμου (PRKAA2) που προκύπτουν από την ύπαρξη εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης, κατά την οντογένεση της τσιπούρας.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προέκυψε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν την α υπομονάδα είναι ιδιαίτερα συντηρημένα μεταξύ των οργανισμών, πιθανόν λόγω της δράσης της ως καταλυτική υπομονάδα της AMPK. Όσον αφορά την έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2 αποδείχθηκε ότι το κύτταρο χρησιμοποιεί διαφορετικό ισοζύγιο μεταξύ των θέσεων πολυαδενυλίωσης για κάθε αναπτυξιακό στάδιο, γεγονός που μπορεί να σχετίζεται με τη σταθερότητα και την μετάφραση κάθε ενός από τα παραγόμενα μετάγραφα.

Abstract

Sea bream is an emblematic fish species farmed in the Mediterranean, with huge economic turnover each year. Gaining insight of the organism development processes, especially in myogenesis and lipogenesis, that support the production of the actual fillet is of highest importance. The AMP-dependent protein kinase enzyme (AMPK) is a key enzyme in the metabolic equilibrium of all eukaryotic cells. It is activated by many stimuli, mainly through the reduction of intracellular ATP. Its action aims at restoring energy homeostasis by inducing catabolic pathways that lead to ATP regeneration, and by blocking anabolic pathways that result in its consumption. It consists of one catalytic subunit (a) and two regulatory subunits (b, c). It is regulated by many different mechanisms, and all its aims and modes of action have not yet been revealed. The important role of the enzyme has also been suggested in fishes, especially during the intense metabolic tests they face.

The aim of this thesis is to study the evolution of the α -subunit genes of the enzyme through phylogenetic analysis. The expression of the α -2 subunit alternative transcripts of the enzyme (PRKAA2) gene, that resulted from the use of alternative polyadenylation sites during sea bream ontogeny, was also investigated.

The results of the study showed that the genes encoding the α subunit are highly conserved among organisms, possibly due to its function as an AMPK catalytic subunit. Concerning the expression of alternative transcripts of the PRKAA2 gene, it was shown that the cell uses a different balance between the polyadenylation sites for each developmental stage, which may be related to the stability and translation of each of the produced transcripts.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1. Η Τσιπούρα

- 1.1.2. Αναπαραγωγή και γονιμοποίηση.
- 1.1.3. Στάδια ανάπτυξης τελεόστων.
- 1.1.4. Ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος στους τελεοστέους.
- 1.1.5. Λιπογένεση στους τελεοστέους.

1.2. AMP-activated protein kinase (AMPK)

- 1.2.1. AMPK: ένας υπερδιακόπτης του μεταβολισμού!
- 1.2.2. Δομή του ενζύμου.
- 1.2.3. Ενεργοποίηση του ενζύμου.
- 1.2.4. Εξελικτική πορεία των γονιδίων του ενζύμου.
- 1.2.5. Δράση της AMPK στους ιχθύες.
- 1.3. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης.

Σκοπός της εργασίας

2. Υλικά και Μέθοδοι

- 2.1. Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας.
- 2.2. Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA.
- 2.3. Ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR).
- 2.4. Κανονικοποίηση των δειγμάτων.
- 2.5. Φυλογενετική ανάλυση της α υπομονάδας της AMPK.
- 2.6. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.

3. Αποτελέσματα

- 3.1 Φυλογενετική ανάλυση της α υπομονάδας της AMPK.
- 3.2 Έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του PRKAA2 λόγω πολυαδενυλίωσης στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας.

4. Συζήτηση

- 4.1. Εξελικτική πορεία των γονιδίων PRKAA1 και PRKAA2.
- 4.2. Χρήση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2 κατά την οντογένεση της τσιπούρας.

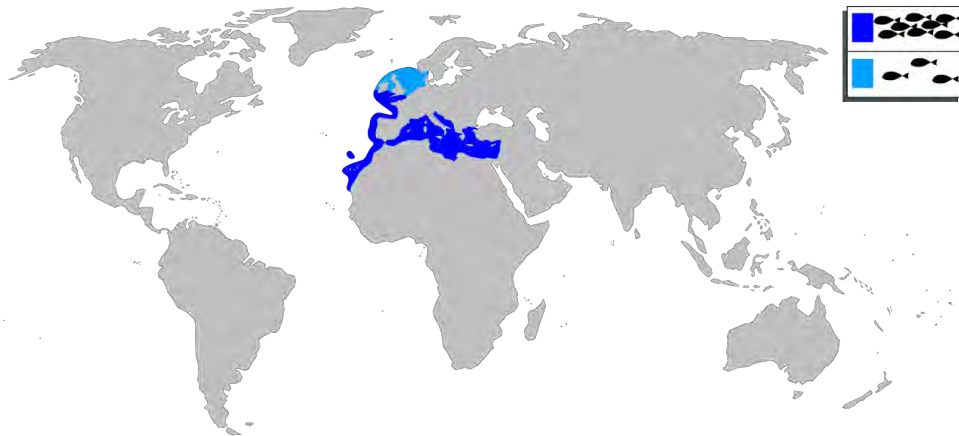
5. Συμπεράσματα

Βιβλιογραφία

1.Εισαγωγή

1.1. Η Τσιπούρα

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*, Linnaeus 1758), ανήκει στην τάξη των περκόμορφων και στην οικογένεια των σπαροειδών, που ανήκουν στους τελεόστεους ιχθύες (Πιν.1) και είναι ένα είδος κοινό στη Μεσόγειο, στην ακτή του Ατλαντικού από τη Μεγάλη Βρετανία ως τη Σενεγάλη, και σπανίως στην Μαύρη Θάλασσα (Εικ.1) [1]. Η τσιπούρα είναι ψάρι ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Έτσι μπορεί να ζήσει τόσο στην ανοικτή θάλασσα όσο σε λιμνοθάλασσες και στις εκβολές ποταμών, κυρίως κατά τα αρχικά στάδια της ζωής της. Είναι ένα παράκτιο είδος, που βρίσκεται σε βραχώδεις και αμμώδεις πυθμένες, και σε περιοχές με υποθαλάσσια φυτική βλάστηση. Τα νεαρά ψάρια συναντώνται σε χαμηλό βάθος (<30m), ενώ τα ενήλικα μπορούν να φτάσουν και σε βαθύτερα νερά (μέγιστο 150m). Πρόκειται για κυρίως σαρκοφάγο ψάρι (τρέφεται με οστρακοειδή, όπως μύδια, στρείδια και μικρά ψάρια) αν και δυνητικά μπορεί να γίνει φυτοφάγο [1,2].



Εικ.1: Γεωγραφική κατανομή τσιπούρας. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sparus_aurata_mapa.svg)

Μορφολογικά, το ψάρι χαρακτηρίζεται από αμφίπλευρη συμμετρία. Το σώμα του έχει ατρακτοειδές σχήμα και καλύπτεται από μεγάλα κτενοειδή λέπια, ενώ η κεφαλή είναι καμπυλωτή με μικρούς οφθαλμούς. Η κάτω γνάθος είναι ελαφρά μικρότερη από την άνω. Έχει ασημένιο χρώμα με μια χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος. Επιπλέον, εντοπίζεται μια χρυσή και μια μαύρη ζώνη μεταξύ των οφθαλμών με τη χρυσή ζώνη να στενεύει προς το κεντρικό τμήμα του ιχθύος. Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φθάσει είναι 70cm, με συνηθισμένο τα 20-30cm, και το μέγιστο βάρος φθάνει τα 5kg, με συνηθισμένο τα 1.5-2kg (Εικ.2) [3]. Αποτελεί ένα ψάρι με τεράστια οικονομική σημασία, αφού είναι το κύριο εκτροφόμενο ψάρι της Μεσογείου. Χαρακτηριστικά το 2010, η εκτροφή τσιπούρας απέφερε κέρδη 831,355 εκατομμυρίων δολαρίων ΗΠΑ, με την παραγωγή περίπου 142.500 τόνων ψαριών [4].



Εικ.2: Τσιπούρα (*Sparus aurata*) (<https://www.alamy.com/gilthead-sparus-aurata-image283112586.html>)

Πίνακας 1: Ταξινόμική κατάταξη της τσιπούρας.

ΒΑΣΙΛΕΙΟ	Ζώα
ΦΥΛΟ	Χορδωτά
ΥΠΟΦΥΛΟ	Σπονδυλωτά
ΥΠΕΡΟΜΟΤΑΞΙΑ	Γναθοστόματα
ΟΜΟΤΑΞΙΑ	Ακτινοπτερύγιοι
ΥΦΟΜΟΤΑΞΙΑ	Τελεόστεοι
ΤΑΞΗ	Περκόμορφα
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Σπαροειδή
ΓΕΝΟΣ	<i>Sparus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Sparus aurata</i>

1.1.2. Αναπαραγωγή και Γονιμοποίηση

Οι τσιπούρες είναι πρωτάνδρα ερμαφρόδιτα ψάρια, δηλαδή γεννιούνται πρώτα ως αρσενικά και μετά από μία περίοδο δύο-τριών χρόνων, όταν αποκτήσουν μήκος πάνω από 30cm μετατρέπονται σε θηλυκά. Η αναπαραγωγική περίοδος τους εκτείνεται από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο. Είναι ωτόκα και απελευθερώνουν

ώριμα ωάρια πλούσια σε λέκιθο, σε εξωτερικά υδάτινα περιβάλλοντα όπου και πραγματοποιείται η γονιμοποίηση. Κατά την αναπαραγωγική περίοδο ένα θηλυκό μπορεί να παράγει 20.000-80.000 αυγά την ημέρα, τα αυγά είναι σφαιρικά και διαυγή και έχουν διάμετρο περίπου 1mm [1]. Η εξωτερική γονιμοποίηση γίνεται στην ανοιχτή θάλασσα, κατά την οποία τα αυγά και τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται ταυτόχρονα στο εξωτερικό περιβάλλον. Ακολουθεί η γονιμοποίηση και η εμβρυική ανάπτυξη, η οποία γίνεται έξω από την μητρική σωματική κοιλότητα. Η είσοδος του σπερματοζωαρίου από την μικροπύλη του χορίου, δηλαδή της σκληρής ελαστικής εξωτερικής στιβάδας του ωαρίου, έχει ως αποτέλεσμα μία σειρά σημαντικών δομικών αναδιατάξεων πριν τον σχηματισμό του ζυγωτού. Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, το σπέρμα των τελεόστεων δεν έχει ακρόσωμα. Η μικροπύλη κλείνει, και λιπιδιακά μόρια ή κυστίδια (cortical granules) του φλοιού από τη λέκιθο εξωκυτταρώνουν το περιεχόμενό τους, ενισχύουν την πλασματική μεμβράνη και μειώνουν την διαπερατότητα της. Τα μόρια που υπάρχουν στο εσωτερικό είναι πολύ μεγάλα για να διαφύγουν μέσα από τους πόρους του χορίου, με αποτέλεσμα η οσμωτική βαθμίδωση να εισάγει μέσα νερό σχηματίζοντας το περιλεκιθικό υγρό. Αυτά τα γεγονότα συμβαίνουν λίγα λεπτά μετά την γονιμοποίηση, και αργότερα το σπερματοζωάριο ενεργοποιεί τις τελικές μειωτικές διαιρέσεις, και οι δυο πυρήνες συντήκονται [7]. Όταν αρχίζει η ανάπτυξη της καρδιάς, των βραγχίων και άλλων σημαντικών οργάνων, το έμβρυο εκκρίνει πρωτεολυτικά ένζυμα για να δημιουργήσει μια σχισμή στο χόριο, επιτρέποντας έτσι στην υποανάπτυκτη προνύμφη με το λεκιθικό σάκο να διαφύγει. Αυτό αποτελεί ένα κρίσιμο σημείο για τη ζωή της προνύμφης καθώς πλέον πρέπει να ανταπεξέλθει στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα θρεπτικά αποθέματα του λεκιθικού σάκου είναι αρκετά μέχρι το σχηματισμό λειτουργικής γνάθου, και έτσι η εξάντληση της λέκιθου ακολουθείται από την πρώτη λήψη τροφής. Κατά γενικό κανόνα, ένα ερμαφρόδιτο ψάρι μπορεί να παράγει μόνο ένα τύπο γαμέτη, σπερματοζωάρια ή ωάρια, σε μία συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Έτσι, η γονιμοποίηση των γαμετών πρέπει να πραγματοποιηθεί από ένα άλλο άτομο του είδους. Η πλειοψηφία των ερμαφρόδιτων ψαριών μπορούν να εναλλάσσουν το φύλο τους κατά τη διάρκεια διαφορετικών αναπαραγωγικών κύκλων [5,6].

1.1.3. Στάδια ανάπτυξης τελεόστεων

Γενικά η ανάπτυξη των τελεόστεων μπορεί να διακριθεί σε τρία βασικά στάδια. Αρχικά είναι το στάδιο του αυγού που περιλαμβάνει όλη τη διαδικασία από την γονιμοποίηση έως την εκκόλαψη, δεύτερο είναι το στάδιο της προνύμφης που περιλαμβάνει την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και της μεταμόρφωσής και τρίτο το στάδιο της ενηλικίωσης, δηλαδή η έναρξη της μεταμόρφωσης και του εφηβικού σταδίου (juvenile) του ιχθυδίου μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγικής ωριμότητας ως ενήλικο άτομο. Μετά την εκκόλαψη το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης παρουσιάζει διακριτές υποκατηγορίες:

- 1) Προνύμφη λεκιθικού σάκου: πρόκειται για το διάστημα μεταξύ εκκόλαψης και εξάντλησης του λεκιθικού σάκου.
- 2) Προνύμφη προ-κάμψης: αφορά την περίοδο από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής.
- 3) Προνύμφη κάμψης: από την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής μέχρι τα πλευρικά οστά να φτάσουν στην κατακόρυφη θέση.
- 4) Προνύμφη μετά-κάμψης: από τον σχηματισμό του ουραίου πτερυγίου και εμφάνιση εξωτερικών μεριστικών χαρακτηριστικών όπως ακτινωτό πτερύγιο [8].

Ανάλογα με το μέγεθος του λεκιθικού σάκου, οι προνύμφες μπορούν να βρίσκονται σε διαφορετική αναπτυξιακή κατάσταση. Οι προνύμφες από αυγά με μικρούς λεκιθικούς σάκους είναι λιγότερο ανεπτυγμένες κατά την εκκόλαψη σε σχέση με εκείνες που εκκολάπτονται από αυγά με μεγαλύτερους. Η επιβίωση της προνύμφης εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της τροφής σε επαρκή ποσότητα και ποιότητα μετά από την ολοκλήρωση του σταδίου εξάντλησης των αποθεμάτων της λεκίθου. Άρα, το άτομο υφίστανται επιλεκτικές πιέσεις, γεγονός που καθιστά απαραίτητο τον σωστό συγχρονισμό της ολοκλήρωσης της απορρόφησης της λεκίθου και της ανάπτυξης της δυνατότητας πρόσληψης τροφής από το εξωγενές περιβάλλον. Ο ρυθμός της απορρόφησης της λεκίθου επηρεάζεται από ένα σύνολο περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως η θερμοκρασία, το φως, η συγκέντρωση του οξυγόνου και η αλατότητα του νερού. Ένας ακόμα σημαντικός παράγοντας επιβίωσης είναι η διόγκωση της νηστικής κύστης, καθώς η μη διόγκωση της νηστικής κύστης μπορεί να προκαλέσει προβλήματα στην επίπλευση και τελικά θάνατο. Στην τσιπούρα η νηστική κύστη διαφοροποιείται την 2^η -3^η dph (dph:days post hatching, ημέρες μετά την εκκόλαψη) και είναι τοποθετημένη ραχιαία μεταξύ του πεπτικού συστήματος και του σπλήνα [8,9].

Κατά την εκκόλαψη τα βασικά χαρακτηριστικά της προνύμφης (0-1 dph) (21 σωμίτες), είναι μια προεξέχουσα κεφαλή και ένας μεγάλος λεκιθικός σάκος από τον οποίο η προνύμφη εξαρτάται πλήρως για την λήψη των θρεπτικών στοιχείων, ενώ σε αυτό το στάδιο η προνύμφη δεν μπορεί να πραγματοποιεί συνεχή πλεύση. Ο μεγάλος λεκιθικός σάκος προσδίδει κιτρινωπή απόχρωση στη προνύμφη. Οι προνύμφες της τσιπούρας αρχίζουν να τρέφονται την 4η dph (Πίν.2).

Οι προνύμφες των 6-9 dph (23-24 σωμίτες) έχουν πιο ανεπτυγμένη κεφαλική περιοχή και το στόμα είναι πλέον ανοιχτό, ενώ ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί σε μεγάλο βαθμό. Σε αυτό το στάδιο τα λέπια και τα πτερύγια του θώρακα έχουν αρχίσει να σχηματίζονται και έτσι η προνύμφη είναι ικανή να εκτελεί σπασμωδικές κινήσεις. Ταυτόχρονα έχει αρχίσει η ανάπτυξη του εντεροπαγκρεατικού συστήματος και τα όρια των σπονδύλων γύρω από την νωτοχορδή είναι εμφανώς αναγνωρίσιμα, ενώ τα βραγχιακά νημάτια σχηματίζονται και καθίστανται λειτουργικά (Πίν.2).





Στο στάδιο των 15-18 dph (24 σωμίτες), η απορρόφηση του περιεχομένου του λεκιθικού σάκου έχει ολοκληρωθεί πλήρως και βρίσκεται σε εξέλιξη η ανάπτυξη ενός λειτουργικού εντέρου και των σχετιζόμενων αδένων του. Επιπλέον, το περίγραμμα των θωρακικών πτερυγίων είναι εμφανές και υπάρχει ικανή ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης. Σε αυτό το στάδιο η προνύμφη έχει την δυνατότητα για μία πιο

σταθερή κίνηση που μοιάζει με αυτή του χελιού και βοηθάει στην πρόσληψη τροφής (Πίν.2).

Στις 30-45 dph (25 σωμαίτες), δηλαδή στο στάδιο της προμεταμόρφωσης, η ανάπτυξη των ιστών είναι πιο έντονη και η προνύμφη εμφανίζει όλα τα χαρακτηριστικά ανατομικά γνωρίσματα ενός ενήλικου, τόσο εξωτερικά όσο και εσωτερικά. Το νευρο-μυϊκόσκελετικό σύστημα είναι καλά ανεπτυγμένο και η προνύμφη εμφανίζει αυξημένη κινητικότητα με σκοπό την εύρεση τροφής. Η πεπτική οδός διαφοροποιείται καθώς το έντερο αναδιπλώνεται και τα πεπτικά όργανα αναπτύσσονται έως ότου αποκατασταθεί η πλήρης λειτουργικότητα, ενώ το αρχικό περίγραμμα των κοιλιακών πτερυγίων είναι πλέον εμφανές (Πίν.2).

Στις 60-90 dph το ιχθύδιο δεν έχει πλέον τα τυπικά χαρακτηριστικά προνύμφης, και τα λέπια καθώς και τα ακτινωτά πτερύγια είναι πλέον καλά οργανωμένα. Αλλά λόγω της έντονης αύξησης του μεγέθους του σώματος απαιτείται πολύ αυξημένη ενέργεια για την κίνηση (Πίν.2) [9,10,11].

Πίνακας 2: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων αναπτυξιακών γεγονότων στην τσιπούρα (0-60 dph) [10]

	days and stages	mm length	n° somites	yolk sac	gut	alimentionation	swimming	caudal fin
 HATCHING	0	2.5	21	present	not open mouth	/	first attempts of darting movements	
	PRE-LARVA	1	2.6					
 LARVA	6	3.5	23	partially resorbed	open mouth	first attempts of feeding	active darting movements	
	9	3.7	24	development of gut and glands in progress	active feeding	continuous eel-like swimming plus darting movements		
	15	3.9	24					
18	4.3	24	not present	functional gut	very active feeding	continuous effective swimming improved by swim bladder		
30	5.5	25				 METAMORPHOSIS		
45	8.1							
FRY	60	14						

1.1.4. Ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος στους τελεοστέους

Η μυογένεση στους τελεοστέους χωρίζεται σε τρεις φάσεις. Πρώτη είναι η εμβρυϊκή μυογένεση που λαμβάνει χώρα στο έμβρυο και κατά την οποία πολυδύναμα βλαστοκύτταρα δεσμεύονται σε μια μυογενή μοίρα, στο τέλος της γαστριδίωσης όταν συγκεκριμένα κύτταρα αρχίζουν να εκφράζουν ρυθμιστικούς παράγοντες μυογένεσης (MRFs) όπως ο *myoD* και ο *myf-5* (των οποίων η έκφραση είναι πολύ καλά ρυθμισμένη τόσο χρονικά όσο και χωρικά) με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός πληθυσμού πρώιμων μυογενητικών κυττάρων (MPC). Ανάλογα με τη θέση τους τα κύτταρα αυτά έχουν και διαφορετική μοίρα. Πρώτη κατηγορία είναι τα αξονικά μυϊκά κύτταρα (adaxial), τα οποία είναι κυβοειδή κύτταρα που βρίσκονται κοντά στην νωτοχορδή και εκφράζουν τον *myoD*. Στην συνέχεια μετά την δημιουργία σωμιτών τα αξονικά κύτταρα υπό την επίδραση της πρωτεΐνης Sonic Hedgehog που παράγεται από την νωτοχορδή μετακινούνται μακριά από αυτήν και δημιουργούν το επιφανειακό στρώμα των μυών από το οποίο προέρχονται οι κόκκινες μυϊκές ίνες. Δεύτερη κατηγορία είναι κύτταρα του πλευρικού μεσοδέρματος τα οποία είναι μικρότερα σε μέγεθος, έχουν ακανόνιστο σχήμα και χωρίζονται από την νωτοχορδή από τα αξονικά, ενώ μέχρι και την δημιουργία σωμιτών δεν εκφράζουν τον παράγοντα *myoD*. Από τα κύτταρα αυτά προέρχονται οι άσπρες μυϊκές ίνες. Έτσι κατά την εμβρυϊκή μυογένεση έχουμε την δημιουργία τόσο των εμβρυϊκών μυϊκών ινών που θα χρησιμοποιηθούν μετά την εκκόλαψη όσο και ένα πληθυσμό αδιαφοροποίητων μυοβλαστών από τους οποίους θα προέλθουν όλες οι υπόλοιπες μυϊκές ίνες. Δεύτερη φάση είναι αυτή της στρωματοποιημένης υπερπλασίας η οποία παρατηρείται κυρίως στην προνύμφη με τον λεκιθικό σάκο. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, ραχιαίες και κοιλιακές ζώνες μυοβλαστών δημιουργούν νέες λευκές μυϊκές ίνες σε κατάλληλες διαστρωματώσεις κατά μήκος του κατακόρυφου άξονα. Σε αυτό το στάδιο οι λευκές μυϊκές ίνες αναπτύσσονται με υπερπλασία (σχηματισμός νέων μυϊκών ινών) αλλά και με υπερτροφία (αύξηση του μεγέθους των υφιστάμενων ινών). Τρίτη φάση είναι, η μωσαϊκή υπερπλασία η οποία αρχίζει από τότε που η προνύμφη ξεκινά να κολυμπάει ελεύθερα, και διαρκεί για όλη την ενήλικη ζωή του ψαριού. Τα πρώιμα μυογενετικά κύτταρα (MPCs) είτε συγχωνεύονται μεταξύ τους και σχηματίζουν νέες μυϊκές ίνες, είτε συγχωνεύονται με ήδη υπάρχουσες (κυρίως λευκές) μυϊκές ίνες και με αυτόν τον τρόπο επάγουν την αύξηση τους. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία του μωσαϊκού προτύπου του μυός αφού αποτελείται από ίνες διαφορετικής διαμέτρου. Τόσο η υπερπλασία όσο και η υπερτροφία συμβαίνουν σε όλη την διάρκεια ζωής του ψαριού. Ωστόσο η υπερπλαστική μυϊκή ανάπτυξη κυριαρχεί κατά τη διάρκεια των αρχικών σταδίων ανάπτυξης, ενώ η υπερτροφία συμβαίνει κυρίως στην ενήλικη ζωή. Στα ψάρια, η ανάπτυξη του μυός επηρεάζεται και από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η αλληλεπίδραση με ορμόνες και το είδος της τροφής [12,13,14,15].

1.1.5. Λιπογένεση στους τελεοστέους

Η κύρια αποθήκη λίπους σε όλα τα σπονδυλωτά είναι ο λευκός λιπώδης ιστός (WAT). Αποτελεί τύπο συνδετικού ιστού και αναπτύσσεται από το εμβρυικό μεσόδερμα. Πρόσφατα διευκρινίστηκε ο ρόλος του σαν ένα ενδοκρινές όργανο που αποτελεί επίσης πλούσια πηγή βλαστοκυττάρων (ASCs: Adipose-derived stromal cells) και συμμετέχει σε διαδικασίες όπως η ενεργειακή ομοιόσταση. Στα ψάρια, ο λιπώδης ιστός αποτελείται από λευκά λιποκύτταρα σε αντίθεση με τα θηλαστικά που αποτελείται και από φαιό λιπώδη ιστό (BAT), ο οποίος έχει σαν κύριο ρόλο την θερμογένεση. Στα ψάρια ο λιπώδης ιστός αποτελείται από σφαιρικά κύτταρα διαφόρων μεγεθών τα οποία αποτελούνται από μία περιορισμένη περιοχή κυτταροπλάσματος η οποία καλύπτει ένα μεγάλο σταγονίδιο ουδέτερων λιπιδίων, με αποτέλεσμα ο πυρήνας και τα οργανίδια να βρίσκονται στην περιφέρεια του κυττάρου. Ο λιπώδης ιστός μπορεί να αυξηθεί σε μέγεθος είτε αυξάνοντας τον όγκο των υπάρχοντων λιποκυττάρων (υπερτροφία), και/ή αυξάνοντας τον αριθμό τους μέσω διαφοροποίησης πρόδρομων κυττάρων (υπερπλασία) [16,17]. Ο λιπώδης ιστός εκκρίνει μια σειρά κυτοκινών, όπως την αδιπονεκτίνη, τη λεπτίνη και τον παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α), οι οποίες έχουν ενδοκρινή λειτουργία, ενεργούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και σε περιφερειακούς ιστούς και ρυθμίζουν διαδικασίες όπως η όρεξη, η ομοιόσταση της γλυκόζης και ο μεταβολισμός λιπιδίων. Βέβαια, οι τελεοστέοι συσσωρεύουν λιπίδια κυρίως με την μορφή τριγλυκεριδίων και σε άλλους ιστούς όπως το συκώτι, σπλαχνικά όργανα, λευκοί και κόκκινοι μύες [18]. Η λιπογένεση ρυθμίζεται κυρίως από την εξωγενή διατροφή και ανάλογα με αυτήν τα λιποκύτταρα αναδιαμορφώνουν την λιπιδιακή τους σύσταση [19]. Τα βλαστοκύτταρα (ASCs) που προέρχονται από τον λιπώδη ιστό είναι πολυδύναμα και έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε λιποκύτταρα, χονδροκύτταρα, οστεοβλάστες, μυοκύτταρα κ.α.. Τελευταίες μελέτες έδειξαν ότι τα κύτταρα αυτά προέρχονται από την περιαγγειακή και ενδοθηλιακή περιοχή του λιπώδους ιστού αλλά και μη λιπώδεις πηγές προγεννητικών κυττάρων όπως το αιμοποιητικό στέλεχος του μυελού των οστών [20]. Μετά τη δημιουργία ενός πρώιμου λιποκυττάρου από τα βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού είναι αναγκαία η ωρίμανση του. Η διαφοροποίηση αυτή γίνεται σταδιακά και πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν η ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων (π.χ. του πυρηνικού υποδοχέα PPAR γ) των πρωτεϊνών σύνδεσης C/EBP α κ.α. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν σε έναν καταρράκτη μεταγραφικών αλληλεπιδράσεων, ο οποίος θα οδηγήσει στην έκφραση ειδικών λιποκυτταρικών γονιδίων, (π.χ. *fabp4*, αδιπονεκτίνη, *glut4*, λιποπρωτεϊνική λιπάση) τα οποία θα συμβάλουν στην ολοκλήρωση της διαφοροποίησης [18]. Στην τσιπούρα η εναπόθεση λίπους γίνεται κυρίως με τη μορφή μυϊκού και σπλαχνικού λίπους. Τα λιπίδια που υπάρχουν στη σάρκα των ψαριών και στις αποθήκες λίπους διακρίνονται σε ουδέτερα και πολικά λιπίδια. Τα πρώτα συμμετέχουν στην αποθήκευση ενέργειας ενώ τα δεύτερα (φωσφολιπίδια) θεωρούνται δομικά λιπίδια και αποτελούν τα κύρια συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. Τα ουδέτερα λιπίδια (τριγλυκερίδια) χρησιμοποιούνται για μακροχρόνια αποθήκευση, και προκύπτουν από την 3-φωσφορική γλυκερόλη (G3P) και τρία μόρια λιπαρών οξέων. Η 3-φωσφορική

γλυκερόλη μπορεί να προέρχεται από: 1) τη γλυκόλυση, 2) τη γλυκερονεογένεση, 3) την αναγέννηση γλυκερόλης κατά την λιπόλυση. Ενώ τα λιπαρά οξέα προέρχονται από: 1) την ενσωμάτωση λιπαρών οξέων δεσμευμένων στην αλβουμίνη, 2) την υδρόλυση λιποπρωτεϊνών, 3) από το ακέτυλο συν-ένζυμο α (acetyl-coA) μέσα στα λιποκύτταρα. Αντίστοιχα σε περιόδους χαμηλής πρόσληψης τροφής, κατά την διαδικασία της γλυκόλυσης, τα τριγλυκερίδια αποικοδομούνται και τα λιπαρά οξέα απελευθερώνονται στο αίμα [18].

1.2. AMP-activated protein kinase (AMPK)

1.2.1. AMPK: ένας υπερδιακόπτης του μεταβολισμού!

Η AMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) είναι ένα μόριο-κλειδί στην ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας, το οποίο εκφράζεται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Όταν ενεργοποιηθεί η AMPK, δρα για να αποκαταστήσει την ενεργειακή ομοιόσταση, επάγοντας καταβολικά μονοπάτια που οδηγούν στην αναγέννηση του ATP, και αναστέλλοντας αναβολικά μονοπάτια που έχουν σαν αποτέλεσμα την κατανάλωση του. Η δράση του ενζύμου μπορεί να ρυθμίζει τον μεταβολισμό τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα [33]. Πρόκειται για μία κινάση η οποία μπορεί να φωσφορυλιώνει θρεονίνες (Thr), αν και προτιμά να φωσφορυλιώνει σερίνες (Ser) [21].

1.2.2. Δομή του ενζύμου

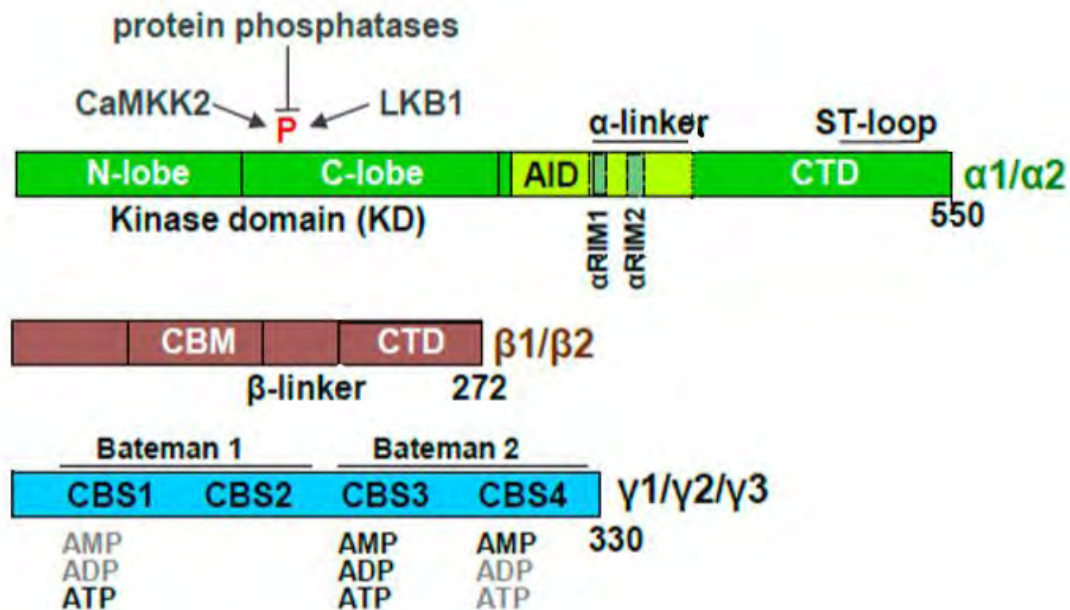
Η AMPK είναι μία ετεροτριμερής πρωτεϊνική κινάση η οποία αποτελείται από μία καταλυτική α υπομονάδα που κωδικοποιείται από τα γονίδια PRKAA, και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες, την β που κωδικοποιείται από τα γονίδια PRKAB, και την γ που κωδικοποιείται από τα γονίδια PRKAG. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τουλάχιστον μία από τις υπομονάδες του ενζύμου έχουν βρεθεί στα γονιδιώματα όλων των ευκαρυωτών, γεγονός που υποδηλώνει ότι είναι παρόντα από την αρχή της ευκαρυωτικής εξέλιξης [22]. Τα θηλαστικά έχουν γονίδια που κωδικοποιούν πολλαπλές ισόμορφες (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2, γ3) με αποτέλεσμα να μπορούν να σχηματιστούν έως και 12 διαφορετικοί συνδυασμοί αβγ ισομορφών [24].

Η α υπομονάδα περιέχει μία περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης (KD), η οποία φωσφορυλιώνεται από άλλες κινάσες ρυθμίζοντας έτσι την ενεργότητα του ενζύμου, μία περιοχή αυτοαναστολής (AID), μία περιοχή a-linker που δρα σαν αισθητήρας αδενινικών νουκλεοτιδίων, και μία καρβοξυτελική περιοχή που αλληλοεπιδρά με την β υπομονάδα (α-CTD), πάνω στην οποία υπάρχει μια περιοχή (ST loop) που έχει προταθεί ότι διαθέτει θέσεις φωσφορυλίωσης για τις κινάσες AKT και PKA (Εικ.3) [25,26].

Η β υπομονάδα αποτελείται από ένα μυριστοϋλιωμένο αμινοτελικό άκρο που περιέχει μία μονάδα πρόσδεσης γλυκογόνου και υδατανθράκων (CBM) (έπειτα από τη σύνδεση του γλυκογόνου στο CBM γίνεται φωσφορυλίωση της συνθάσης του γλυκογόνου και μείωση της δραστηριότητας της [50]), ένα καρβοξυτελικό άκρο (β-CTD)

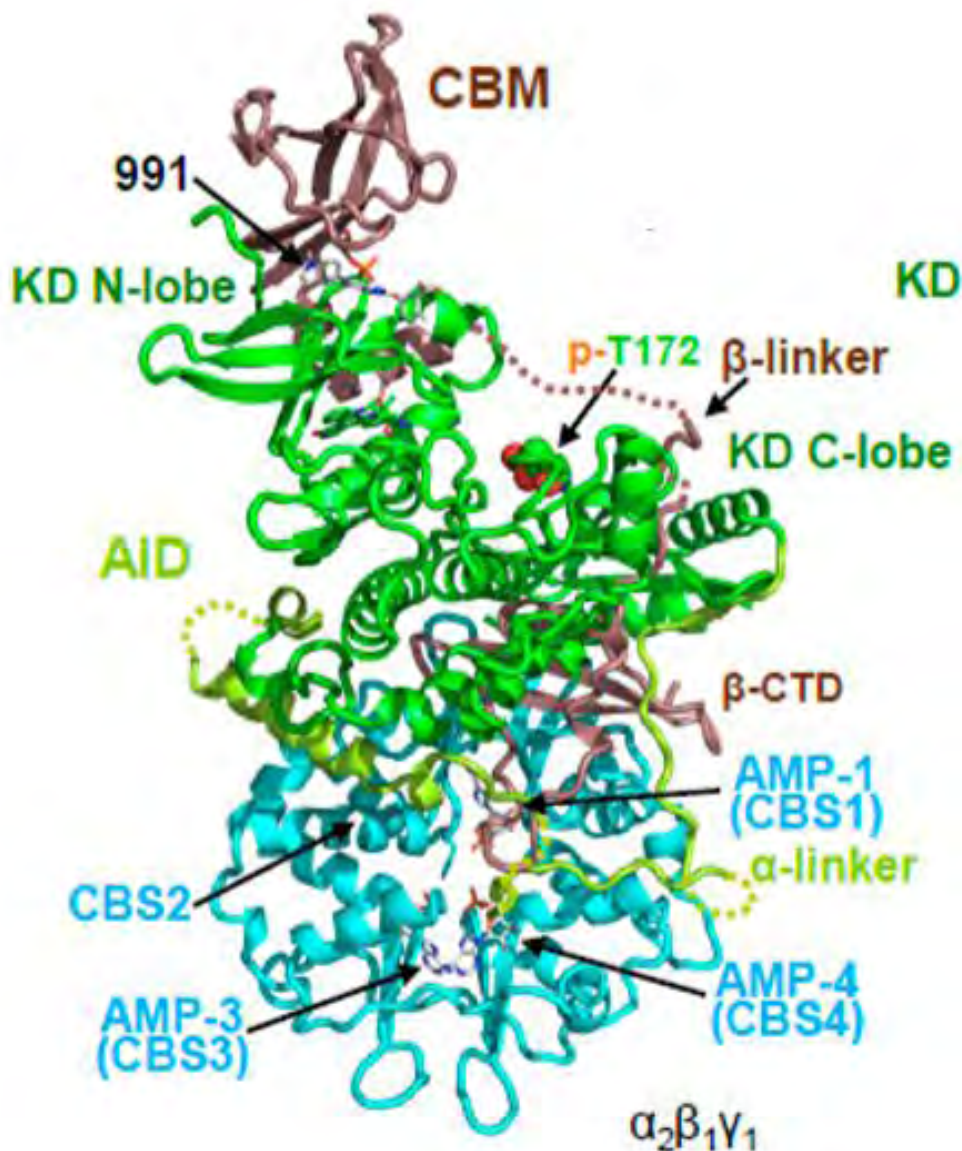
που λειτουργεί ως συνδέτης καθώς αλληλεπιδρά τόσο με την γ υπομονάδα όσο και με το α -CTD, αλλά και μία περιοχή β -linker loop που συνδέει το CBM με το β -CTD (Εικ.3).

Οι τρεις εναλλακτικές γ υπομονάδες αποτελούνται από ένα αμινοτελικό άκρο με διαφορετικά μεγέθη, το οποίο ακολουθείται από μία συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης αδενικών νουκλεοτιδίων { β -συνθάση της κυσταθειόνης (CBS)} που αποτελείται από τέσσερις θέσεις πρόσδεσης AMP/ADP/ATP. Μόνο οι CBS 1,3,4 είναι λειτουργικές, αφού στην CBS2 ένα κατάλοιπο Asp έχει αντικατασταθεί με Arg με αποτέλεσμα κανένα νουκλεοτίδιο να μην μπορεί να προσδεθεί (Εικ.3) [22].



Εικ.3: Δομή των τριών υπομονάδων της AMPK του ανθρώπου. Με πράσινο απεικονίζεται η υπομονάδα α , που αποτελείται από μία περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης (KD), μία περιοχή αυτοαναστολής (AID), μία περιοχή α -linker, και μία καρβοξυτελική περιοχή (α -CTD) πάνω στην οποία υπάρχει μια περιοχή ST-loop. Με κόκκινο απεικονίζεται η β υπομονάδα, που αποτελείται από μία μονάδα πρόσδεσης γλυκογόνου (CBM), ένα καρβοξυτελικό άκρο (β -CTD), και μία περιοχή β -linker που τις συνδέει μεταξύ τους. Με μπλε απεικονίζεται η γ υπομονάδα που αποτελείται από τέσσερις θέσεις πρόσδεσης αδενικών νουκλεοτιδίων { β -συνθάση της κυσταθειόνης (CBS)} [22].

Ο βρόγχος ενεργοποίησης του ενζύμου είναι ιδιαίτερα συντηρημένος και αποτελεί μια σχισμή μεταξύ του αμινο-τελικού και καρβοξυτελικού άκρου της καταλυτικής περιοχής στην οποία συνδέονται τα πεπτιδικά υποστρώματα, τα ιόντα μαγνησίου και το ATP [22]. Μόνο η CBS3 συνδέεται απευθείας με την α υπομονάδα, και πιο συγκεκριμένα με την α -RIM2 αλληλουχία του α -linker (Εικ.3, Εικ.4), η οποία αλληλεπιδρά με το αδενικό νουκλεοτίδιο που είναι συνδεδεμένο στο CBS3, με αποτέλεσμα η α -RIM2 να θεωρείται αισθητήρας αδενικών νουκλεοτιδίων [31]. Στο CBS3 μπορούν να συνδεθούν και τα τρία αδενικά νουκλεοτίδια, ενώ το CBS1 έχει μεγαλύτερη συγγένεια για το ATP. Το CBS4 πιστεύεται ότι είναι συνεχώς συνδεδεμένο με AMP (Εικ.4) [30,32].



Εικ.4: Συνολική δομή της ανθρώπινης AMPK, συνδεδεμένης με AMP ($\alpha_2\beta_1\gamma_1$). Στην εικόνα απεικονίζεται η α_2 υπομονάδα με πράσινο, η β_1 υπομονάδα με κόκκινο και η γ_1 υπομονάδα με μπλε. Επίσης φαίνεται το κατάλοιπο θρεονίνης 172 που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και το οποίο φωσφορυλιώνεται από άλλες κινάσες. {Protein data bank number (PDB):4CFE} [22].

1.2.3. Ενεργοποίηση του ενζύμου

Το ενεργειακό στρες του κυττάρου αποτυπώνεται ως μείωση της αναλογίας ATP προς AMP και ADP. Οποιαδήποτε αύξηση της αναλογίας ADP:ATP μετατρέπεται σε πολύ μεγαλύτερη αύξηση AMP:ATP μέσω της αντίδρασης αδενυλικής κινάσης ($1ADP \leftrightarrow ATP + AMP$). Η μείωση αυτή προκύπτει είτε από αυξημένη κατανάλωση ATP (π.χ. λόγω έντονης άσκησης, κυτταρικού πολλαπλασιασμού ή αναβολισμού), είτε από μειωμένη παραγωγή ATP (π.χ. λόγω χαμηλών επιπέδων γλυκόζης, οξειδωτικού στρες ή υποξίας). Η κινάση αντιλαμβάνεται αυτή την κατάσταση μέσω της ανταγωνιστικής πρόσδεσης των τριών αδενινικών νουκλεοτιδίων στις τρεις θέσεις της γ ρυθμιστικής υπομονάδας (CBS). Κάθε ένα από αυτά που προσδέονται στην γ

υπομονάδα μεταβάλλει την δραστικότητα κινάσης που έχει η α καταλυτική υπομονάδα. Έτσι, με κάθε διαφορετικό αδενινικό νουκλεοτίδιο που προσδέεται το ένζυμο παίρνει διαφορετική διαμόρφωση (Εικ.4) [22]. Μετά την ενεργοποίηση, η AMPK φωσφορυλιώνει πάνω από 60 καθοδικούς στόχους, άμεσα η έμμεσα, ρυθμίζοντας την ενεργότητα μεταγραφικών και μεταφραστικών παραγόντων, μονοπατιών πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης, επιγενετικών ρυθμιστών, καθώς και τον ρυθμό μεταβολικών ενζύμων. Η ενεργοποίηση της AMPK έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, αυτοφαγίας, της πρόσληψης και του μεταβολισμού της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την σύνθεση των λιπαρών οξέων, της χοληστερόλης, του γλυκογόνου, των πρωτεϊνών και των ριβοσωμικών RNA (rRNAs). Παράλληλα, μειώνει την κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση. Λόγω αυτών των σημαντικών της ρόλων η AMPK φαίνεται ότι δυσλειτουργεί σε πολλές μεταβολικές ασθένειες, όπως ο διαβήτης [23]. Βέβαια το ένζυμο ρυθμίζει την ενεργειακή ομοιόσταση όχι μόνο σε κυτταρικό αλλά και σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού. Ορμόνες όπως η λεπτίνη (παράγεται από τον λιπώδη ιστό όταν οι αποθήκες τριγλυκεριδίων είναι γεμάτες), η γκρελίνη (εκκρίνεται από το στομάχι σε περιόδους πείνας) και η αδιπονεκτίνη (εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό όταν τα τριγλυκερίδια είναι χαμηλά) που συμμετέχουν στην διατήρηση την ενεργειακής ισορροπίας αλληλεπιδρούν με την AMPK του υποθαλάμου. Η λεπτίνη καταστέλλει την AMPK του υποθαλάμου και ενεργοποιεί την AMPK των μυών, ενώ η γκρελίνη και η αδιπονεκτίνη ενεργοποιούν την AMPK του υποθαλάμου [49].

Μέσω σύγκρισης γνωστών στόχων του ενζύμου των θηλαστικών έχει αναφερθεί μία αλληλουχία στην οποία στοχεύει το ένζυμο, η ΦβχχχSχχχΦ όπου Φ είναι ένα υδροφοβικό κατάλοιπο (L,M,I,V,F), β ένα βασικό αμινοξύ (R,K,H), S η σερίνη όπου θα φωσφορυλιωθεί, ενώ χ μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ. Βέβαια η ύπαρξη αυτής της αλληλουχίας-στόχου δεν είναι αρκετή για την πρόβλεψη πιθανών στόχων, λόγω της μεγάλης πολυμορφικότητας που υπάρχει σε αυτούς [36].

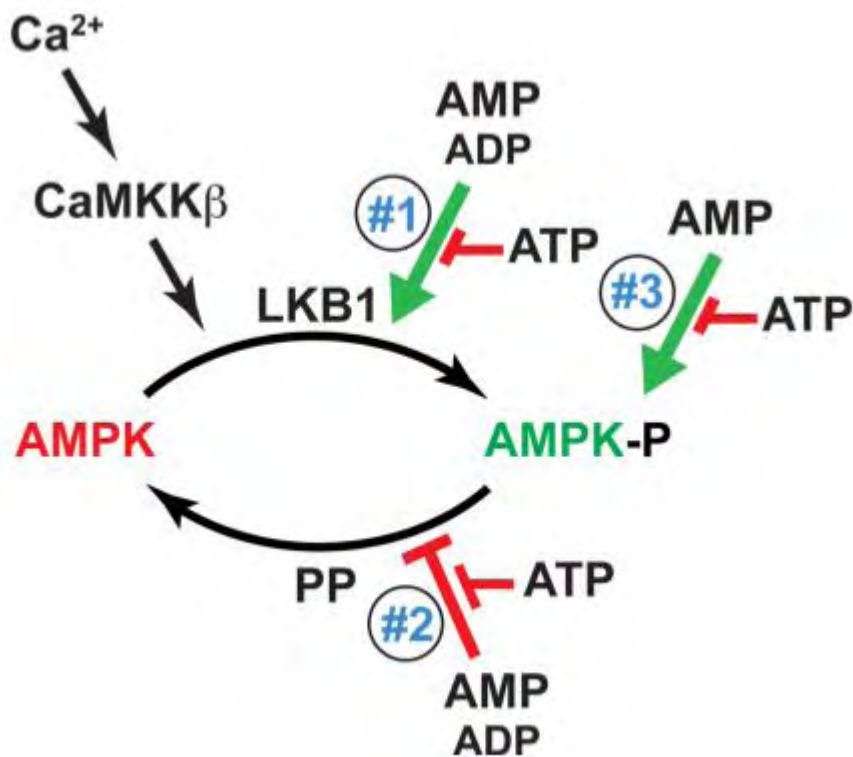
Η ενεργότητα της AMPK ρυθμίζεται σε τρία διαφορετικά επίπεδα:

- 1) Φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης στο p-T172 (φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο θρεονίνης 172) από άλλες κινάσες (π.χ. CaMKK2, LKB1)
- 2) Προστασία έναντι αποφωσφορυλίωσης του βρόγχου ενεργοποίησης στο p-T172 από πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PP)(π.χ. PP2A, PP2C).
- 3) Ανεξάρτητη από φωσφορυλίωση, αλλοστερική ενεργοποίηση της κινάσης (Εικ.5)

Η φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο θρεονίνης (p-T172) στην α υπομονάδα αυξάνει την ενεργότητα της AMPK κατά 100 φορές, ενώ η αλλοστερική ενεργοποίηση κατά 10 (ο αριθμός του καταλοίπου μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών) [27]. Η αλλοστερική ενεργοποίηση της AMPK μπορεί να γίνει μόνο από AMP, ενώ η επαγωγή της φωσφορυλίωσης του T172 και η προστασία του από την αποφωσφορυλίωση γίνεται τόσο από το AMP, αλλά σε μικρότερο βαθμό, και από το ADP. Ταυτόχρονα το ATP ανταγωνίζεται το AMP και ADP και αναστέλλει αυτές τις διαδικασίες [21,28].

Οι δύο κύριες κινάσες που ενεργοποιούν την AMPK στα θηλαστικά είναι: α) η κινάση του ήπατος B1 (LKB1) σε σύμπλοκο με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες όπως η STRAD και η MO25, και η ασβέστιο/καλμοδοούλινο- εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση

β (CaMKK2), η οποία ενεργοποιείται από την αύξηση του ασβεστίου. Αντίστοιχα η πρόσδεση του AMP και σε μικρότερο βαθμό του ADP επάγει την φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης από την LKB1, αφού οδηγεί σε μία καλύτερα προσβάσιμη δομή (Εικ.5) [22]. Επίσης, επάνω στο ένζυμο μπορούν να συνδεθούν το γλυκογόνο (CBM:θέση σύνδεσης του γλυκογόνου) και NADPH, NADH (CBS3), ωστόσο ο φυσιολογικός τους ρόλος δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος [29,30]. Παρ' όλα αυτά η αύξηση του ενδοκυτταρικού NAD⁺ σε συνθήκες ενεργειακού στρες οδηγεί σε αλλοστερική ενεργοποίηση της Sirtuin (Sirt1) μίας NAD-εξαρτώμενης αποακετυλάσης. Η Sirt1 ρυθμίζει την ενεργότητα της AMPK έμμεσα μέσω αποακετυλίωσης της πυρηνικής LKB1. Η LKB1 μπορεί πιο εύκολα να μεταφερθεί στο κυτταρόπλασμα όπου και θα κάνει σύμπλοκο με τις STRAD και MO25 με αποτέλεσμα να επάγει την φωσφορυλίωση της AMPK [35]. Η προστασία που δίνουν το AMP και το ADP από την αποφωσφορυλίωση του p-T172 δεν γίνεται μέσω αναστολής των πρωτεϊνικών φωσφατασών αλλά μέσω της αλλαγής στην προσβασιμότητα του βρόγχου ενεργοποίησης [22] (Εικ.4). Κατά την αλλοστερική ενεργοποίηση του ενζύμου από το AMP, αυτό συνδέεται στην περιοχή CBS3 με αποτέλεσμα το CBS3 να αλληλεπιδρά με την αλληλουχία του α-RIM2 και το αυτό να οδηγεί στην απομάκρυνση της περιοχής αυτοαναστολής (AID) από το ενεργό κέντρο. Ως εκ τούτου, είναι πιο εύκολη η φωσφορυλίωση του T172, και έτσι μπορεί να αυξηθεί η δραστηριότητα του ενζύμου κατά 10 φορές (Εικ.5) [27]. Επιπλέον η φωσφορυλίωση της α υπομονάδας του ενζύμου από άλλες κινάσες όπως PKA, RKC, και AKT αναστέλλουν την ενεργότητα του ενζύμου, αφού η φωσφορυλίωση αυτή εμποδίζει την φωσφορυλίωση στο T172 [34].



Εικ.5: Φυσιολογικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης της AMPK από αδενινικά νουκλεοτίδια και από το ασβέστιο. Το AMP ενεργοποιεί την AMPK με τρεις τρόπους: 1) επάγοντας την

φωσφορυλίωση του T172 από την LKB1, 2) αναστέλλοντας την αποφωσφορυλίωση του T172 από πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PP), 3) μέσω αλλοστερικής ενεργοποίησης του ενζύμου. Και οι τρεις διαδικασίες αναστέλλονται με την ανταγωνιστική πρόσδεση του ATP, ενώ το ADP έχει παρόμοια αποτελέσματα στις διαδικασίες 1,2 αλλά όχι στην 3. Η CaMKK2 φωσφορυλιώνει αντίστοιχα το T172 αλλά ως απόκριση στην αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} [21].

1.2.4. Εξελικτική πορεία των γονιδίων του ενζύμου

Όπως με πολλές οικογένειες γονιδίων των σπονδυλωτών, έτσι και με την AMPK, υπάρχει ένα πρότυπο σύμφωνο με την επίδραση των δύο γύρων διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD). Πριν από 450-550 εκατομμύρια χρόνια, οι πρώτοι άγναθοι πρόγονοι των σπονδυλωτών πέρασαν από δύο γύρους διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος, με αποτέλεσμα την αύξηση του γονιδιακού τους ρεπερτορίου, δημιουργώντας οικογένειες γονιδίων, με μέλη τα οποία εξελίσσονται ανεξάρτητα. Κατ' αρχήν, για κάθε γονίδιο που είχαν τα πρώιμα σπονδυλωτά, οι δύο γύροι γονιδιακού διπλασιασμού (1R,2R) οδήγησαν σε 4 αντίγραφα κάθε γονιδίου [36]. Επιπλέον, ένας τρίτος γύρος διπλασιασμού (3R) έλαβε χώρα στους τελοστέους, που οδήγησε σε περαιτέρω διπλασιασμό κάποιων οικογενειών γονιδίων. Οι γενεαλογίες των τελοστέων και των ολοστέων (holostean) απέκλιναν και στη συνέχεια έλαβε χώρα ο τρίτος γύρος διπλασιασμού με αποτέλεσμα ψάρια όπως το *Lepisosteus oculatus* (spotted gar) να μην έχουν τις επαναλήψεις γονιδίων που μπορούν να βρεθούν στους τελοστέους [38]. Βέβαια, στις περισσότερες περιπτώσεις λόγω εξελικτικής πίεσης γρήγορα εξαλείφθηκαν μερικά ή όλα τα αντίγραφα των γονιδίων μέσω δημιουργίας ψευδογονιδίων, δίνοντας έτσι λιγότερα από τα αναμενόμενα αντίγραφα, 4 στα σπονδυλωτά και 8 στους τελοστέους. Τα γονίδια των υπομονάδων της AMPK είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα διατήρησης των γονιδιακών αντιγράφων σε διαφορετικές τάξεις. Τα αντίγραφα της ίδιας υπομονάδας στον ίδιο οργανισμό που προέκυψαν από διπλασιασμό γονιδίων ονομάζονται παράλογα ενώ τα ίδια γονίδια σε διαφορετικούς οργανισμούς ονομάζονται ορθόλογα. Έτσι τα γονίδια β1 και β2 της β υπομονάδας της AMPK θεωρούνται παράλογα, ενώ τα γονίδια της β υπομονάδας μεταξύ θηλαστικών και τελοστέων θεωρούνται μεταξύ τους ορθόλογα.

Η α υπομονάδα λόγω της καταλυτικής της ενεργότητας είναι και η πιο συντηρημένη, και αποτελείται από δύο ισόμορφες ($\alpha 1, \alpha 2$) που βρίσκονται σε όλα τα χορδωτά (1R ή 2R). Έτσι σημαντικές περιοχές, όπως το κατάλοιπο T172 και η περιοχή αυτοαναστολής, είναι παρούσες σε όλα τα ορθόλογα. Η λιγότερο συντηρημένη περιοχή της θεωρείται το καρβοξυτελικό άκρο το οποίο και αλληλεπιδρά με την β υπομονάδα [33].

Η β υπομονάδα δρα σαν σύνδεσμος μεταξύ α και γ υπομονάδας προσφέροντας στο ένζυμο δομική σταθερότητα. Επιπλέον, αυτή η υπομονάδα καθορίζει και την υποκυτταρική τοπολογία του ενζύμου [39]. Στα περισσότερα σπονδυλωτά αποτελείται από δύο συντηρημένα παράλογα ($\beta 1, \beta 2$), αλλά στους τελοστέους υπάρχουν δύο παράλογα της AMPKβ1, τα β1a και β1b τα οποία

προέρχονται από τον 3^ο γύρο γονιδιακού διπλασιασμού [33]. Θεωρείται αρκετά συντηρημένη όμως υπάρχουν αρκετές διαφορές μεταξύ των οργανισμών.

Η γ υπομονάδα θεωρείται η πιο αποκλίνουσα από όλες, με βαθμό απόκλισης τρεις φορές μεγαλύτερο από την α υπομονάδα. Σε αντίθεση με τις υπόλοιπες, τα τετράποδα έχουν τρία παράλογα για την AMPKγ (γ1,γ2,γ3), αλλά οι τελεοστέοι έχουν αντίγραφα τόσο για την γ1 (γ1a, γ1b) όσο και για την γ2 (γ2a,γ2b) με αποτέλεσμα την ύπαρξη 5 παραλόγων σε αυτή την γενεαλογία. Αν και λίγα είναι γνωστά για τις λειτουργικές διαφορές μεταξύ των παραλόγων, φαίνεται ότι προσδίδουν διαφορετική θέση μέσα στο κύτταρο, διαφορετικούς στόχους φωσφορυλίωσης και διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης από τα αδενινικά νουκλεοτίδια [33,40].

Ως εκ τούτου είναι προφανές ότι λόγω των επιπλέον αντιγράφων στους τελεοστέους, ο αριθμός των πιθανών ισόμορφών του ενζύμου αυξάνεται από τους 12 στους 30, ενώ υπάρχουν ενδείξεις ότι διαφορετικοί συνδυασμοί εκφράζονται σε διαφορετικό ιστό και αναπτυξιακό στάδιο [41].

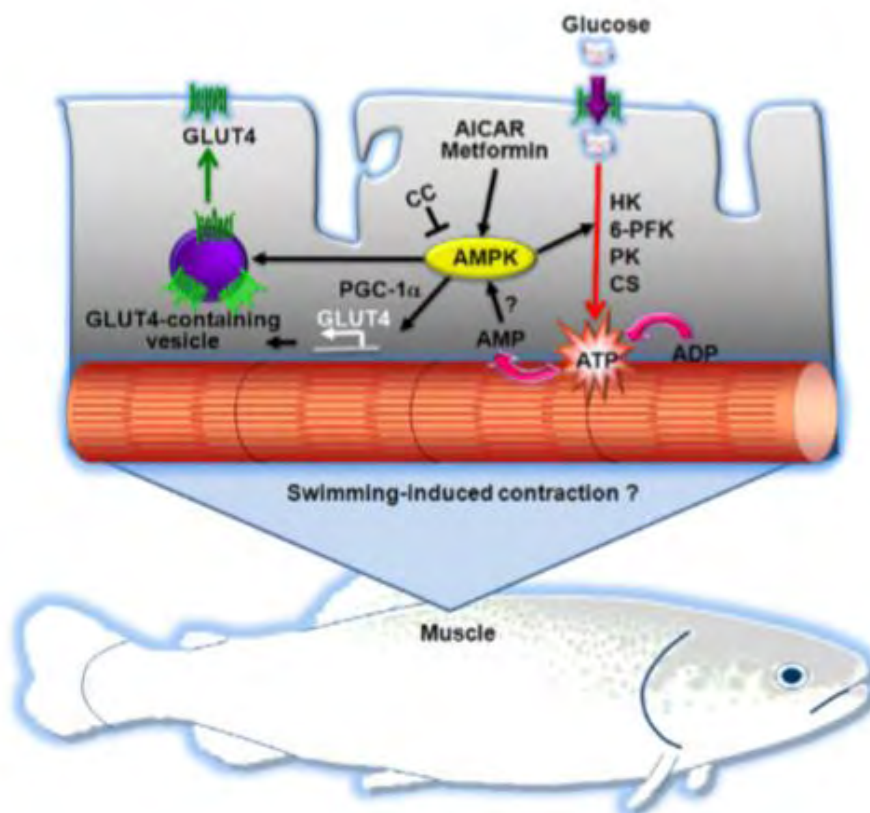
1.2.5. Δράση της AMPK στους ιχθύες

Ο ρόλος του ενζύμου κατά την άσκηση έχει μελετηθεί και στα ψάρια. Κατά κύριο λόγο έχουν μελετηθεί τα σολομοειδή, τόσο για την οικονομική τους σημασία, όσο και για τις ακραίες κινητικές δοκιμασίες που αντιμετωπίζουν κατά τις αναπαραγωγικές μεταναστεύσεις. Πιο συγκεκριμένα, ο Magnoni και οι συνεργάτες του χορήγησαν σε καλλιέργεια μυϊκών κυττάρων πέστροφας *Salmo trutta*, δύο φαρμακολογικούς αγωνιστές της AMPK, το AICAR (adenosine analog 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside) και το metformin (biguanide 1,1 dimethylbiguanide hydrochloride), τα οποία μιμούνται τις επιδράσεις της άσκησης στην AMPK. Τα αποτελέσματα που παρουσίασαν ήταν παρόμοια με αυτά των θηλαστικών, όπως: α) αύξηση των επιπέδων των GLUT4 μεταφορέων στην μεμβράνη που οδηγεί σε αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης (τόσο μέσω της αύξησης της ποσότητας του mRNA τους όσο και με την τοποθέτηση τους στην μεμβράνη), β) αύξηση των επιπέδων mRNA γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση (εξοκινάση (HK), 6-φωσφο-φρουκτοκινάση(6-PFK), κινάση του πυροσταφιλικού(PK) και συνθάση του κιτρικού(CS)), και γ) αύξηση της έκφρασης ρυθμιστών της βιογένεσης μιτοχονδρίων (PGC1a). Αντίθετα, για να καταστείλουν το ένζυμο χρησιμοποίησαν τον φαρμακευτικό ανταγωνιστή Compound C (CC) (Εικ.6). Τα περισσότερα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν και με *in vivo* δοκιμασίες άσκησης αντοχής σε σολομοειδή, στις οποίες φάνηκε ξεκάθαρα ότι η AMPK, αλλά και τα γονίδια στόχοι της επάγονται στους σκελετικούς μυς κατά το έντονο κολύμπι. Επίσης, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην απόκριση της AMPK μεταξύ των διαφορετικών τύπων μυϊκών ινών, κάτι που είναι αναμενόμενο και από μελέτες στα θηλαστικά [42,43,44].

Η AMPK ως σημαντικός μεσολαβητής σε πολλά μεταβολικά μονοπάτια, φαίνεται να παίζει, πολύ σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της επιλογής μεταξύ των πηγών ενέργειας του κυττάρου, κυρίως στην μετάβαση ανάμεσα σε υδατάνθρακες και λιπίδια, αλλά και στην μετάβαση από καταστάσεις επαρκούς τροφής, σε κατάσταση νηστείας.

Ιδιαίτερα τα ψάρια μπορούν να υφίστανται παρατεταμένες περιόδους νηστείας με μικρές συνέπειες στα ενεργειακά τους αποθέματα, γεγονός που ίσως ευθύνεται στην δράση της AMPK. Πιο συγκεκριμένα, έχει δειχθεί ότι κατά την αύξηση της νηστείας στο ψάρι ζέβρα [45], αλλά και στην ιριδίζουσα πέστροφα [46] υπάρχει γρήγορη ενεργοποίηση του ενζύμου, τόσο μέσω αύξησης της ποσότητας των μεταγράφων, όσο και της πρωτεϊνικής ενεργότητας, με ταχεία αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου κατά την μετάβαση σε καταστάσεις επαρκούς τροφής.

Τέλος, η AMPK φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην διατήρηση των ενεργειακών αποθεμάτων, σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών κατά τις εποχιακές διαφορές, στους ενδόθερμους οργανισμούς. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω ενεργοποίησης και απενεργοποίησης της ίδιας αλλά και καθοδικών της στόχων [47]. Για τους εξώθερμους οργανισμούς, όπως τα ψάρια, η αύξηση και η μείωση της θερμοκρασίας σημαίνει αντίστοιχη αύξηση και μείωση του μεταβολικού ρυθμού, μεταβολές στην κατανάλωση ATP, και κατά συνέπεια ενεργοποίηση της AMPK. Πιο συγκεκριμένα, στα σολομοειδή, μέτριες αυξήσεις της θερμοκρασίας είχαν σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της AMPK για την παροχή ATP λόγω της αύξησης του μεταβολικού ρυθμού από την αύξηση της θερμοκρασίας [48]. Άρα είναι προφανές ότι πρόκειται για ένα βασικό ένζυμο για την προσαρμογή του μεταβολισμού σε περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες στρες.



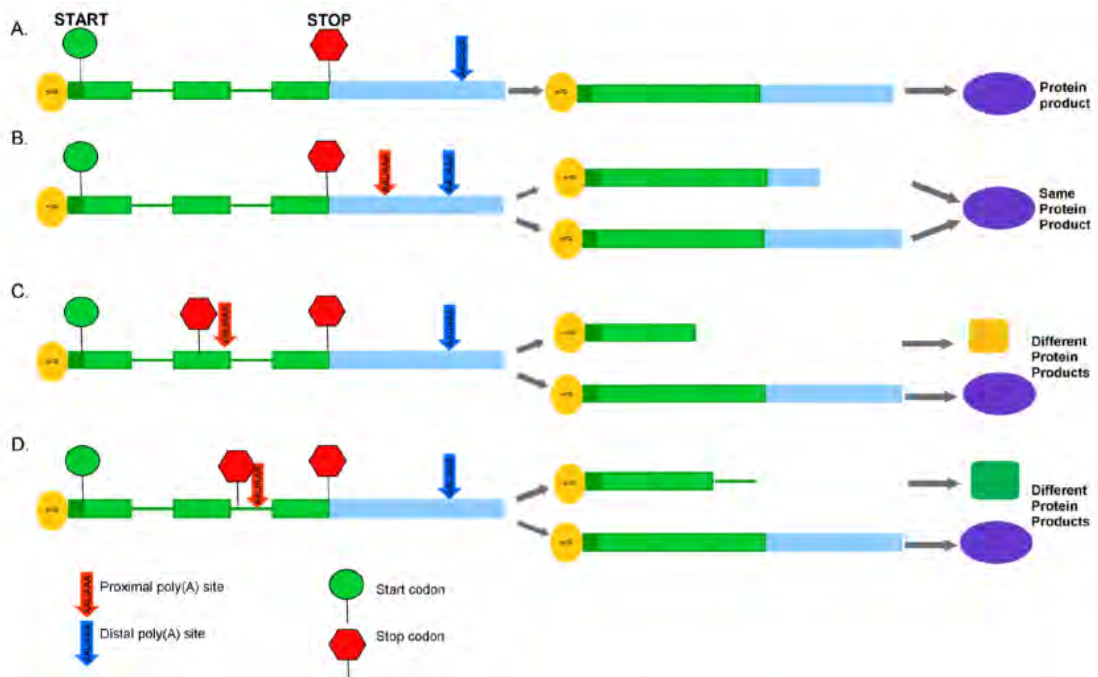
Εικ.6: Προτεινόμενο μοντέλο για την δράση της AMPK στα μυϊκά σκελετικά κύτταρα των ψαριών. Η ενεργοποίηση της AMPK, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από

τα κύτταρα των σκελετικών μυών των ψαριών μέσω: 1) αύξησης των επιπέδων mRNA του GLUT4 (πιθανώς μέσω της αυξημένης έκφρασης του PGC-1α), 2) επαγωγή της τοποθέτησης των μεταφορέων GLUT4 στην πλασματική μεμβράνη. Επίσης κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου φαίνεται να υπάρχει αύξηση της έκφρασης γονιδίων που συμμετέχουν στην γλυκόλυση {εξοκινάση (HK), 6-φωσφοφρουκτοκινάση(6-PFK), κινάση του πυροσταφιλικού(PK) και συνθάση του κιτρικού(CS)}. Η AMPK φαίνεται να ενεργοποιείται με την χορήγηση των φαρμακολογικών αγωνιστών AICAR και Metformin και να καταστέλλεται από τον ανταγωνιστή Compound C (CC). Τέλος υπάρχουν ενδείξεις ότι το ένζυμο ενεργοποιείται κατά την μυϊκή σύσπαση που πραγματοποιείται κατά το κολύμπι [44].

1.3. Μετα-μεταγραφική ρύθμιση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κατά την μεταγραφή παράγεται ένα πρόδρομο μετάγραφο (pre-mRNA) το οποίο πρέπει να περάσει μια σειρά τροποποιήσεων στον πυρήνα γνωστή και ως ωρίμανση του mRNA ώστε να μπορέσει να μεταβεί στο κυτταρόπλασμα και να μεταφραστεί. Αυτές οι τροποποιήσεις είναι η προσθήκη καλύπτρας στο 5' άκρο, η οποία γίνεται από το ένζυμο σύνθεσης καλύπτρας και αποτελείται από την τοποθέτηση ενός νουκλεοτιδίου γουανίνης (συνήθως μιας 7-μέθυλο γουανοσίνης) μπροστά από την 5' μη μεταφραζόμενη περιοχή (5' UTR). Η καλύπτρα αυτή παραμένει και στο ώριμο mRNA προστατεύοντάς το από εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση, αλλά είναι απαραίτητη και για την πρόσδεση με το ριβόσωμα. Το τελευταίο βήμα της ωρίμανσης είναι η συναρμογή του RNA όπου τα ιντρόνια που περιέχονται στο pre-mRNA αφαιρούνται και τα εξόνια συνενώνονται μεταξύ τους, μία διαδικασία που γίνεται σε ειδικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωμάτια τα σωμάτια συναρμογής (spliceosomes). Ακόμη, μία πολύ σημαντική τροποποίηση που συμβαίνει στο 3' άκρο, είναι η πολυαδενυλίωσή του. Αυτή αποτελείται από την προσθήκη 50 έως 250 νουκλεοτιδίων αδενίνης και ονομάζεται πολύ-A ουρά. Αυτή προστίθεται από το ένζυμο πολύ(A) πολυμεράση η οποία χρησιμοποιεί σαν υπόστρωμα ATP χωρίς όμως να υπάρχει κάποια αλληλουχία DNA μήτρα για την σύνθεση αυτού του πολυαδενυλικού άκρου. Το πολυαδενυλικό άκρο παραμένει σε όλη την διάρκεια ζωής του ώριμου mRNA, ρυθμίζοντας την σταθερότητα του και προστατεύοντας το από τη πρόωρη εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση. Η προσθήκη της πολύ(A) ουράς οριοθετεί κατά κάποιον τρόπο το 3' άκρο του mRNA, αφού δεν υπάρχει κάποια αλληλουχία τερματισμού στο DNA που να σηματοδοτεί την λήξη της μεταγραφής του γονιδίου. Η θέση στην οποία προστίθενται οι αδενίνες ονομάζεται θέση πολυ(A) η οποία βρίσκεται περίπου 10-30 νουκλεοτίδια καθοδικά της πρότυπης αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης (AAUAAA ή AUUAAA). Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη CPSF (Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor) δεσμεύεται επάνω στην AAUAAA ή AUUAAA (αν και υπάρχουν και άλλες πρότυπες αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης) ενώ η πρωτεΐνη CstF (Cleavage stimulation Factor) αναγνωρίζει και προσδέεται σε μία αλληλουχία πλούσια στο δινουκλεοτίδιο GU ή σε κατάλοιπα U που βρίσκονται καθοδικά της θέσης πολύ(A). Στην συνέχεια οι παράγοντες αποκοπής CFI και CFII

(Cleavage Factor I και II) προσδένονται στο RNA και το κόβουν. Τέλος, η πολυ(A) πολυμεράση δεσμεύεται πάνω στην CPSF και σχηματίζει την πολυ(A) ουρά, και πάνω της δεσμεύονται μόρια της πρωτεΐνης PABII (Poly(A) Binding protein II), η οποία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη των διαδικασιών της μετάφρασης. Πολλά παραγόμενα pre-mRNA μπορεί να έχουν παραπάνω από μία πολυ(A) θέσεις, με αποτέλεσμα από ένα και μόνο γονίδιο να μπορούν να παράγονται πολλά διαφορετικά mRNA τα οποία διαφέρουν στο 3' άκρο τους. Αυτές οι θέσεις ονομάζονται θέσεις εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης (alternative polyadenylation) [50]. Μέσω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης μπορεί να αλλάξει το μέγεθος των 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών (3' UTR) και να μεταβληθεί ο αριθμός των θέσεων πάνω στις οποίες μπορούν να προσδεθούν microRNA [52]. Τα microRNAs συνήθως καταστέλλουν την μετάφραση και προάγουν την αποικοδόμηση των mRNA πάνω στα οποία συνδέονται, αν και υπάρχουν και αρκετά παραδείγματα που δείχνουν ότι σταθεροποιούν τα μεταγγραφα στα οποία συνδέονται [53]. Επιπλέον, η εναλλακτική πολυαδενυλίωση μπορεί να μεταβάλει και το μέγεθος της κωδικής περιοχής ενός μεταγράφου με αποτέλεσμα να παράγονται πρωτεΐνες με διαφορετικό μέγεθος στο καρβοξυτελικό τους άκρο και συχνά με διαφορετική λειτουργία από το ίδιο γονίδιο. Αυτό γίνεται με την προσθήκη ή αφαίρεση ενός ή περισσότερων εξωνίων ή και τμημάτων τους ανάλογα με το ποια θέση πολυαδενυλίωσης χρησιμοποιείται στις δεδομένες συνθήκες ή στο δεδομένο ιστό (Εικ.7) [54]. Είναι επίσης γνωστό ότι η πολυαδενυλίωση παίζει σημαντικό ρόλο κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Για παράδειγμα, στο αγονιμοποίητο ωκύτταρο αποθηκεύονται πολλά mRNA, τα οποία δεν είναι δυνατόν να εκφραστούν επειδή έχουν κοντές πολυ(A) ουρές (συνήθως 30-50 νουκλεοτίδια). Στο πλαίσιο των αλλαγών που συντελούνται μετά την γονιμοποίηση, διεγείρεται και η επιμήκυνση αυτών των πολυ(A) ουρών, με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται η μετάφραση των αντίστοιχων mRNA και να συντίθενται πρωτεΐνες απαραίτητες για την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη [51].



Εικ7: Εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης σε σχέση με την κύρια θέση πολυαδενυλίωσης. Α) Φυσιολογική θέση πολυαδενυλίωσης Β) Εναλλακτική θέση πολυαδενυλίωσης στην 3' UTR C) Εναλλακτική θέση πολυαδενυλίωσης σε εσωτερικό εξώνιο D) Εναλλακτική θέση πολυαδενυλίωσης σε ιντρόνιο [55].

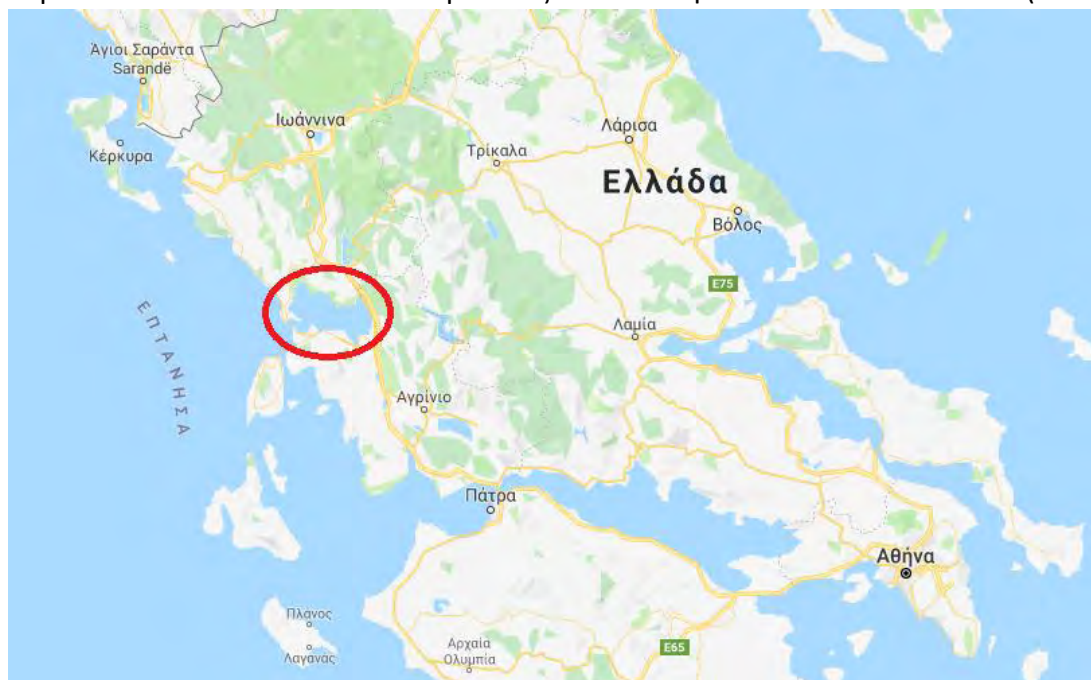
Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη της εξέλιξης των γονιδίων της α -υπομονάδας του ενζύμου AMP-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (AMPK) της τσιπούρας (*Sparus aurata*), μέσω φυλογενετικής ανάλυσης, αλλά και της επίδρασης που είχε στα γονίδια αυτά ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος που έλαβε χώρα στους τελεοστέους. Επίσης, η διερεύνηση της έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου της α -2 υπομονάδας του ενζύμου (PRKAA2), που παράγονται μέσω εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης κατά την οντογένεση της τσιπούρας. Τα αποτελέσματα αυτά θα συνεισφέρουν στην ανάκτηση πληροφοριών για τον ρόλο της AMPK στην ενεργειακή ομοιόσταση κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της τσιπούρας.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας

Οι προνύμφες της τσιπούρας ελήφθησαν από εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό που βρίσκεται στον Αμβρακικό κόλπο, κοντά στην πόλη της Βόνιτσας του νομού Αιτωλοακαρνανίας στην Ελλάδα (Εικ.8).



Εικ.8: Γεωγραφική θέση ιχθυογεννητικού σταθμού δειγματοληψίας.

(<https://www.google.com/maps/place/%CE%92%CF%8C%CE%BD%CE%B9%CF%84%CF%83%CE%B1+300+02/@38.5015115,21.0665664,6.5z/data=!4m5!3m4!1s0x135c3ad12098aba1:0xf88237551b3daf55!8m2!3d38.9190379!4d20.8889257>)

Τα δείγματα συλλέχθηκαν στα πλαίσια του ευρωπαϊκού ερευνητικού προγράμματος PerformFISH (performfish.eu). Η δειγματοληψία των ψαριών έγινε κατά την διάρκεια ενός αναπαραγωγικού κύκλου κατά τις ημέρες 7, 25, 40 και 53 μετά την εκκόλαψη (dph). Συλλέχθηκαν συνολικά 27 δείγματα: 4 (7ημερών), 8 (25ημερών), 8 (40ημερών) και 7 (53ημερών). Οι προνύμφες που συλλέχθηκαν αναισθητοποιήθηκαν σε 2-φαινοξυαιθανόλη και μετά τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο αντιδραστήριο RNA later με σκοπό την μετέπειτα μελέτη της γονιδιακής τους έκφρασης.

2.2. Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Σε όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση του ολικού RNA και αφαιρέθηκαν όλα τα υπολείμματα γενωμικού DNA ώστε να μην υπάρχει επιμόλυνση. Στη συνέχεια έγινε η σύνθεση του cDNA, με την χρήση τυχαίων εκκινητών, η οποία πραγματοποιήθηκε παράλληλα για όλα τα δείγματα ώστε να εξασφαλιστεί η ίδια απόδοση της αντίδρασης.

2.3. Ημιποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR)

Η Real time PCR (PCR πραγματικού χρόνου) αποτελεί μία πολύ χρήσιμη τεχνική κατά την οποία δίνεται η δυνατότητα να γίνει σχετική ποσοτικοποίηση του RNA ενός υπό εξέταση δείγματος. Επίσης παρέχεται η δυνατότητα σύγκρισης του μήκους της αλληλουχίας (RNA) που ενισχύεται μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων. Παρόλο που η real-time PCR βασίζεται στην ίδια αρχή με τη συμβατική PCR, δίνει επιπλέον τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξέλιξης της αντίδρασης και της ποσότητας του ενισχυόμενου προϊόντος, καθώς η αντίδραση εξελίσσεται σε πραγματικό χρόνο. Υπάρχουν αρκετά είδη real time PCR με ανιχνευτές όπως TaqMan probes, molecular beacons, scorpion probes, όμως στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBRGreen. Η SYBRGreen έχει τη δυνατότητα να ενσωματώνεται σε δίκλινα μόρια DNA και να εκπέμπει φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση/ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου που ενισχύεται. Ωστόσο η τεχνική αυτή διαθέτει ένα βασικό μειονέκτημα. Η SYBRGreen προσδένεται μη ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA, δηλαδή δεν μπορεί να διακρίνει αν το δίκλινο μόριο στο οποίο προσδένεται κατά την εξέλιξη της αντίδρασης είναι το επιθυμητό προϊόν. Ο φθορισμός μπορεί να προκύπτει από διμερή των εκκινητών. Ο διαχωρισμός αυτός όμως, δηλαδή αν ενισχύεται τελικά το επιθυμητό τμήμα μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Αρχικά σε κάθε αντίδραση real-timePCR, εκτός από τα υπό εξέταση δείγματα, τοποθετείται και ένα δείγμα ελέγχου (negative control). Το αρνητικό control διαθέτει όλα τα αντιδραστήρια που περιέχονται και στα υπό εξέταση δείγματα, χωρίς όμως την προσθήκη του δείγματος (cDNA). Αντί για cDNA προστίθεται νερό. Με αυτό τον τρόπο αν παρατηρηθεί φθορισμός και στο αρνητικό control αυτό σημαίνει ότι κάποιο από τα αντιδραστήρια μας έχει μολυνθεί ή ότι οι εκκινητές σχηματίζουν διμερή. Επίσης εκτός από το αρνητικό control, μετά το πέρας της αντίδρασης δημιουργούνται οι καμπύλες τήξης (melting curves). Οι καμπύλες αυτές προκύπτουν έπειτα από την αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων και τον προσδιορισμό της θερμοκρασίας τήξης, η οποία εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος. Επομένως αν στην καμπύλη τήξης εμφανιστούν μη αναμενόμενα αποτελέσματα σε θερμοκρασίες τήξης πέρα από τις αναμενόμενες με βάση το μέγεθος των προϊόντων που ενισχύεται, τότε τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα και η αντίδραση πρέπει να πραγματοποιηθεί εκ νέου. Ο φθορισμός που μετράται αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυόμενου προϊόντος σε κάθε κύκλο της αντίδρασης. Όλη η πορεία της αντίδρασης περιγράφεται με ένα διάγραμμα όπου στον έναν άξονα καταγράφεται ο φθορισμός και στον άλλο οι κύκλοι της αντίδρασης. Αρχικά ο φθορισμός παραμένει σε σχεδόν μηδενικά επίπεδα. Έπειτα, και ενώ σιγά σιγά καταναλώνονται τα αντιδραστήρια που έχουν προστεθεί για τη διεξαγωγή της αντίδρασης αρχίζει να συσσωρεύεται το ενισχυόμενο προϊόν και έτσι αυτό μεταφράζεται σε αύξηση του φθορισμού. Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει η έναρξη της εκθετικής φάσης ονομάζεται κατώφλι (threshold cycle, Ct). Ο κύκλος αυτός καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα του δείγματος που υπάρχει στην αρχή της αντίδρασης. Εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα δείγματος στην αρχή της αντίδρασης τότε θα χρειαστούν λίγοι κύκλοι ενίσχυσης για να αποδοθεί το σήμα φθορισμού, ενώ αν

η αρχική ποσότητα του δείγματος είναι μικρή τότε θα χρειαστούν περισσότεροι κύκλοι.

Για να βρεθεί η έκφραση των εναλλακτικών μεταγραφών του γονιδίου που μελετήθηκε χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της Q-PCR (real time PCR). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στο μηχάνημα Rotor-Gene Q 5-Plex HRM της εταιρίας QIAGEN, ενώ σαν χρωστική χρησιμοποιήθηκε η KAPA SYBR FAST qPCR (Cat. No KK4618 KAPA BIOSYSTEMS).

Στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (primers) ανάλογα με το μετάγραφο που εξετάζεται κάθε φορά. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν στα προγράμματα Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) και στο Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) και η αλληλουχία τους δίνεται στον Πίνακα 3.

Στην συνέχεια για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε ένα από τα τέσσερα ζεύγη εκκινητών, δημιουργήθηκε με ανάμειξη ορισμένης ποσότητας όλων των δειγμάτων (pool) και δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/50, 1/80, πάνω στις οποίες ελέγχθηκε η απόδοση (efficiency) κάθε διαφορετικής συγκέντρωσης εκκινητών με την δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Η απόδοση (E) των εκκινητών υπολογίστηκε μέσω του τύπου $E = 10^{-1/\text{slope}}$ [61], όπου slope είναι η κλίση της πρότυπης καμπύλης. Όλοι οι εκκινητές είχαν αρχική συγκέντρωση 10μM.

Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 1,5μl δείγματος cDNA με αραιώση 1:5, KAPA SYBR FAST (2x) σε τελική συγκέντρωση 10X, ενώ τέλος το δείγμα αραιώθηκε με δις απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 20μl. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε επανάληψη (duplicate).

Οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για την Q-PCR ήταν: ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης στους 95°C για 10 min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος αποτελείται από 30 sec στους 95°C, 1 min στους 61°C και 1 min στους 72°C) και τέλος ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης διαχωρισμού (dissociation curve) (1 min στους 95°C, 30 sec στους 55°C και 30 sec στους 95°C) ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση ενός μόνο προϊόντος. Το πρόγραμμα λογισμικού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1, και η τιμή φθορισμού-κατώφλι (Ct) ήταν το 0,3, ενώ έγιναν δεχτές μόνο οι τιμές Ct όπου μεταξύ των duplicate απείχαν λιγότερο από 0,5 μεταξύ τους.

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για το γονίδιο της PRKAA2 που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR

	<i>Forward εκκινητής</i>	<i>Reverse εκκινητής</i>
<i>Primer A</i>	5' ACCCTCGTTGTCACCTGG 3'	5' TGCTTCCTCTCTATGTCTCCGT 3'
<i>Primer B</i>	5' TGTGTGCATGAGCCAGTGT 3'	5' CTGCAAAGATCCTCCCGTCA 3'
<i>Primer C</i>	5' CGGAGCTTACACACATCAG 3'	5' GCAGTCCACGTCAAACCAATT 3'
<i>Primer D</i>	5' AAGGCAATCCATAGACCGTGT 3'	5' GCCTCCTTCTGCACAGTGAT 3'

2.4. Κανονικοποίηση των δειγμάτων

Η σχετική ποσοτικοποίηση βασίζεται στα επίπεδα έκφρασης του υπό εξέταση γονιδίου έπειτα από κανονικοποίηση με τα επίπεδα έκφρασης διαφόρων ιδιοσυστατων γονιδίων αναφοράς (housekeeping genes). Η κανονικοποίηση είναι απαραίτητη για την σύγκριση δειγμάτων τα οποία διαφέρουν ως προς την ποιότητα και την ποσότητα του αρχικού RNA αλλά και την απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής. Για την σύγκριση διαφορετικών δειγμάτων είναι απαραίτητο να υπάρχει κάτι το οποίο να παραμένει σταθερό ώστε οι διαφορές της έκφρασης που παρατηρούνται να οφείλονται στις εξεταζόμενες συνθήκες. Για την κανονικοποίηση της έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 5 ιδιοσυστατα γονίδια (housekeeping genes), τουμπουλίνη, β-ακτίνη, RPS18, RPL13, και EF1a. Η αλληλουχία των εκκινητών που στοχεύουν στα ιδιοσυστατα γονίδια φαίνεται στον Πίνακα 4. Για την εύρεση της σταθερότητας των ιδιοσυστατων γονιδίων {measure of the gene expression stability(M) ($M < 0,15$)}, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα geNorm (<https://genorm.cmgg.be>) [63]. Ο συντελεστής κανονικοποίησης (normalization factor) υπολογίστηκε ως ο γεωμετρικός μέσος των τριών πιο σταθερά εκφραζόμενων ιδιοσυστατων γονιδίων.

Πίνακας 4: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα ιδιοσυστατα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR

	<i>Forward εκκινητής</i>	<i>Reverse εκκινητής</i>
<i>Τουμπουλίνη</i>	5'AGGTGGGCATCAACTACCAG 3'	5'CACCCTCTCCATACCCTCA 3'
<i>EF1a</i>	5'TCAAGGGATGGAAGGTTGAG 3'	5'AGTTCCAATACCGCCGAT 3'
<i>B-Ακτίνη</i>	5'CGACATCCGTAAGGACCTGT 3'	5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'
<i>RPS18</i>	5'AGGGTGTGGCAGACCTTAC 3'	5'GAGGACCTGGCTGATTTGC 3'
<i>RPL13</i>	5'TCTGGAGGACTGTCAGGGGCATGC 3'	5'AGACGCACAATCTTAAGAGCAG 3'

2.5. Φυλογενετική ανάλυση της α υπομονάδας της AMPK

Για την δημιουργία του φυλογενετικού δέντρου για την α υπομονάδα της AMPK χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι βιοπληροφορικής. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια PRKAA1 και PRKAA2 συλλέχθηκαν από την βάση δεδομένων Ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>). Για να βρεθούν ορθόλογα γονίδια σε άλλους οργανισμούς έγινε BLAST-P της πρωτεϊνικής αλληλουχίας των PRKAA1 και PRKAA2 του ανθρώπου σε 10 διαφορετικά είδη. Ταυτόχρονα συλλέχθηκαν όλες οι διαφορετικές αλληλουχίες που προέκυψαν από κάθε είδος ώστε να μελετηθεί και η ύπαρξη παραλόγων στο εσωτερικό κάθε είδους. Αντίστοιχα οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες για το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) συλλέχθηκαν από την βάση δεδομένων του Ινστιτούτου Max Planck (<http://public-genomes-ngs.molgen.mpg.de/cgi-bin/hgGateway?org=Dicentrarchus+labrax&db=dicLab1&hgside=5496>), ενώ για την

τσιπούρα (*Sparus aurata*) από την biocluster.her.hcmr.gr (http://biocluster.her.hcmr.gr/myGenomeBrowser?portalname=Saurata_v1) (Πιν.5) [57].

Οι 25 συνολικά αλληλουχίες στοιχήθηκαν μέσω του προγράμματος MUSCLE [56], και αφαιρέθηκαν όλα τα κενά που προέκυψαν από την στοιχίση των αλληλουχιών. Έπειτα το δέντρο δημιουργήθηκε με την με την χρήση του προγράμματος MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (<https://www.megasoftware.net/>) [58], μέσω της μεθόδου Neighbor Joining (NJ). Ο αλγόριθμος του NJ εφαρμόζεται στην κατασκευή δέντρων βάσει απόστασης ανεξάρτητα από το κριτήριο βελτιστοποίησης. Τέλος, η αξιοπιστία του δέντρου εκτιμήθηκε με bootstrap 500. Η μέθοδος bootstrap είναι μία μέθοδος αξιολόγησης και το αποτέλεσμα από την ανάλυση είναι συνήθως ένας αριθμός αντιστοιχισμένος σε έναν ορισμένο κλάδο του φυλογενετικού δέντρου, ο οποίος δείχνει το ποσοστό των αντιγράφων που υποστηρίζουν την μονοφυλετικότητα του συγκεκριμένου κλάδου. Περιλαμβάνει παραγωγή νέων συνόλων δεδομένων μέσω τυχαίας δειγματοληψίας από το αρχικό σύνολο και ταυτόχρονο υπολογισμό ενός αριθμού που δείχνει πόσες φορές μια ορισμένη διακλάδωση κάνει την εμφάνιση της στο δέντρο. [62]

Πίνακας 5: Παράθεση των κωδικών των πρωτεϊνών (Accession Numbers) των PRKAA1 και των PRKAA2 για τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στη δημιουργία του φυλογενετικού δένδρου

Όνομα οργανισμού	Κωδικοί πρωτεϊνών PRKKA1	Κωδικοί πρωτεϊνών PRKKA2
<i>Lepisosteus oculatus</i> (spotted gar)	ENSLOCP00000013790	ENSLOCP00000010709
<i>Gadus morhua</i> (cod)	ENSGMOP00000003723	ENSGMOP00000008352
<i>Oryzia latipes</i> (Japanese medaka)	ENSORLP00000004715	ENSORLP00000002164
<i>Takifugu rubripes</i> (fugu)	ENSTRUP000000047211	ENSTRUP00000004188
<i>Gasterosteus aculeatus</i> (stickleback)	ENSGACP000000021019	ENSGACP00000001523
<i>Latimeria chalumnae</i> (coelacanth)	ENSLACP000000003950	ENSLACP000000006413
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	ENSGALP000000023897	ENSGALP000000017580
<i>Mus musculus</i> (mouse)	ENSMUSP000000063166	ENSMUSP00000003024
<i>Homo sapiens</i> (human)	ENSP000000346148	ENSP000000360290
<i>Dicentrarchus labrax</i> (sea bass)	DLAgn_00082510	DLAgn_00152080
<i>Sparus aurata</i> (gilthead sea bream)	Sa_23140.2.1	Sa_12146.2.3

<i>Eptatretus burgeri</i> (hagfish)		ENSEBUP00000021038 ENSEBUP00000014623
<i>Ciona intestinalis</i>		ENSCINP00000006320

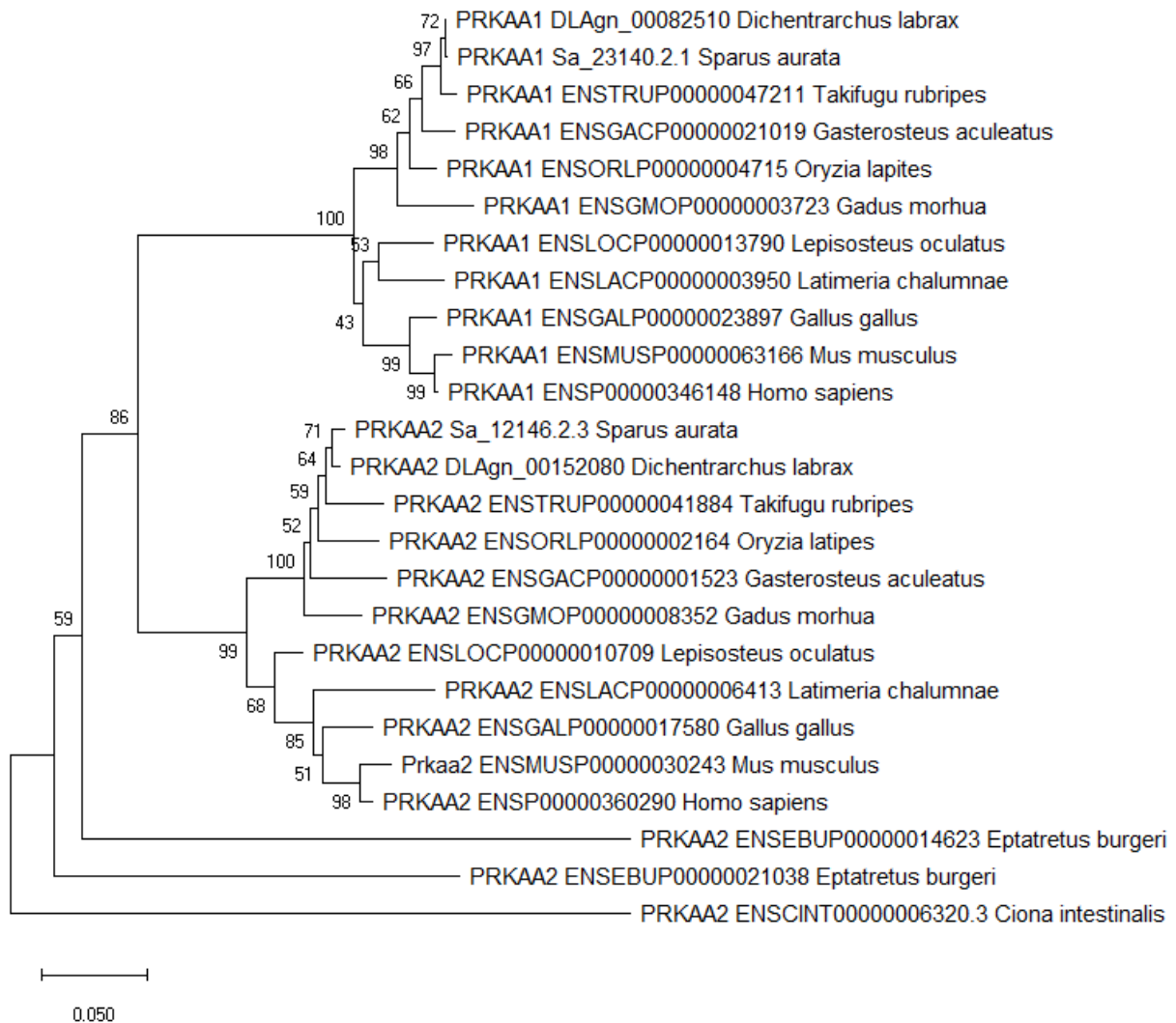
2.6 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης αφού κανονικοποιήθηκαν με τον συντελεστή κανονικοποίησης (normalization factor) [75], μετασχηματίστηκαν σε τετραγωνική ρίζα (sqrt), επειδή τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Η στατιστική σημαντικότητα, των διαφορών των αποτελεσμάτων της γονιδιακής έκφρασης τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά σετ εκκινητών όσο και μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων υπολογίστηκε μέσω της μεθόδου ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA). Το διάστημα εμπιστοσύνης που χρησιμοποιήθηκε ήταν 95% και τα αποτελέσματα με p-value < 0,05 θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά [64]. Έπειτα έγινε συσχέτιση (correlation) μεταξύ των δειγμάτων του ίδιου σετ εκκινητών αλλά διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Τέλος, η αναπαράσταση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων έγινε ως μέσος όρος ± τη τυπική απόκλιση.

3. Αποτελέσματα

3.1 Φυλογενετική ανάλυση της α υπομονάδας της AMPK

Για την κατασκευή του φυλογενετικού δέντρου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες PRKAA1 και PRKAA2 από 13 συνολικά είδη (Εικ.9). Οι αλληλουχίες συλλέχθηκαν βάσει της ομοιότητας τους με τις PRKAA1 και PRKAA2 του ανθρώπου. Όλα τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία ανήκουν στο φύλο των χορδωτών. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν, η *Ciona intestinalis* (λευκόφουσκα) από το υπόφυλο των ουροχορδωτών, το *Eptatretus burgeri* (μυξίνος) από την υπερκλάση των αγνάθων, ο *Homo sapiens* (άνθρωπος) ο *Mus musculus* (ποντικός) και το *Gallus gallus* (κοτόπουλο) από την υπερομοταξία των τετράποδων. Το *Latimeria chalumnae* (κουλάκανθος) από την ομοταξία των σαρκοπτερύγιων. Το *Lepisosteus oculatus* (spotted gar) από την υφομοταξία των ολοστέων. Τέλος, ο *Gadus morhua* (μπακαλιάρος ατλαντικού), το *Oryzia latipes* (ρυζόψαρο), το *Gasterosteus aculeatus* (stickleback), το *Takifugu rubripes* (ψάρι fugu), το *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) και η *Sparus aurata* (τσιπούρα) από την υφομοταξία των τελεοστέων [65]. Οι πρωτεϊνικές αλληλουχίες των γονιδίων PRKAA1 και PRKAA2 συγκρίθηκαν για το ίδιο φυλογενετικό δέντρο. Κατά την αναζήτηση αλληλουχιών PRKAA2 για τους μυξίνους βρέθηκαν δύο ταιριαστές αλληλουχίες (ENSEBUP00000021038, ENSEBUP00000014623), οι οποίες απεικονίζονται και στο δέντρο. Σαν ρίζα του δέντρου χρησιμοποιήθηκε το ασπόνδυλο *Ciona intestinalis*.

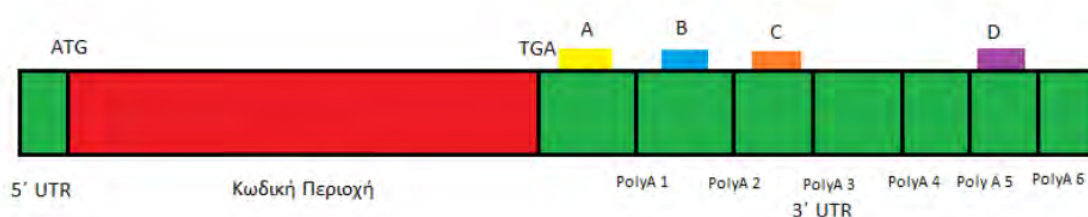


Εικόνα 9: Φυλογενετικό δέντρο της α -υπομονάδας της AMPK. Στο δέντρο απεικονίζονται οι κωδικοί των πρωτεϊνών (Accession Numbers), καθώς και τα ονόματα των ειδών που αντιστοιχούν σε κάθε κλάδο (taxa) του δέντρου. Στη βάση κάθε κλάδου εμφανίζεται ο αριθμός που προέκυψε από το bootstrap, ο οποίος δείχνει το ποσοστό των αντιγράφων που υποστηρίζουν την μονοφυλετικότητα του συγκεκριμένου κλάδου. Σαν ρίζα του δέντρου χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία του PRKAA2 του ασπόνδυλου *Ciona intestinalis* (λευκόφουσκα).

3.2 Έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του PRKAA2 λόγω πολυαδενυλίωσης στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας

Η έκφραση εναλλακτικών μεταγράφων μελετήθηκε σε cDNA από προνύμφες τσιπούρας 7, 25, 40 και 53 ημερών. Αρχικά ελέγχθηκε η αλληλουχία του mRNA του γονιδίου PRKAA2 της τσιπούρας, ως προς την ύπαρξη εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης. Στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή του πρώιμου mRNA εντοπίστηκαν 6 πιθανές εναλλακτικές πρότυπες αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης, τέσσερις με αλληλουχία ATAAA και δύο με αλληλουχία AATAAA. Για να μελετηθεί

η έκφραση κάθε ενός από τα πιθανά εναλλακτικά μετάγραφα σχεδιάστηκαν τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών τα οποία στοχεύουν σε διαφορετικές περιοχές της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του ζεύγους εκκινητών A σχεδιάστηκε να στοχεύει σχεδόν αμέσως μετά το κωδικόνιο λήξης και πριν την πρώτη πρότυπη αλληλουχία πολυαδενυλίωσης (Εικ.10). Το ζεύγος εκκινητών B σχεδιάστηκε μεταξύ της πρώτης και δεύτερης πρότυπης αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης (Εικ.10), το ζεύγος εκκινητών C σχεδιάστηκε ανάμεσα στη δεύτερη και τρίτη πρότυπη αλληλουχία πολυαδενυλίωσης (Εικ.10). Ακολουθεί η τέταρτη αλληλουχία πολυαδενυλίωσης (AATAAA), και το ζεύγος εκκινητών D σχεδιάστηκε να ενισχύει μεταξύ της πέμπτης (ATTTAAA) και έκτης (AATAAA) πρότυπης αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης (Εικ.10).

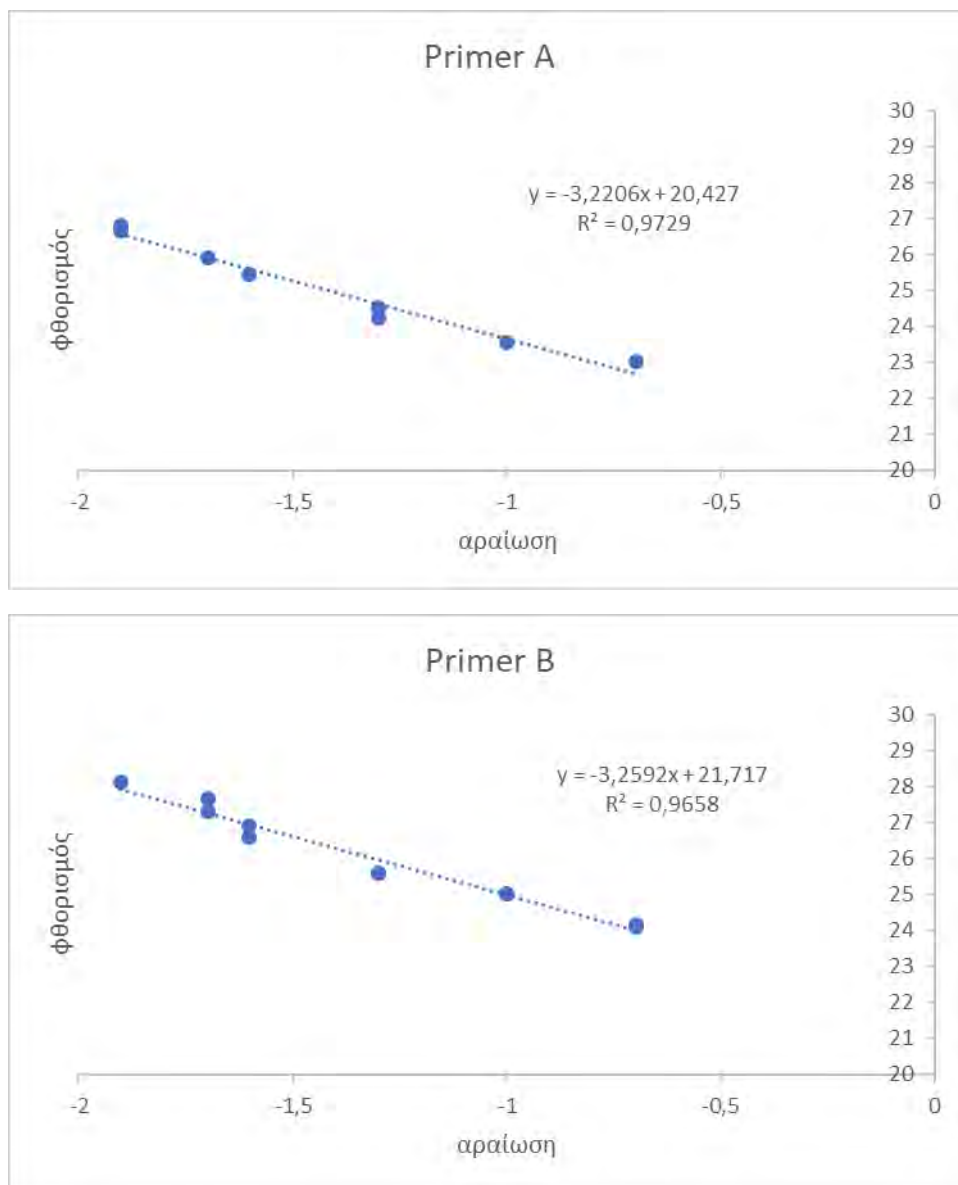


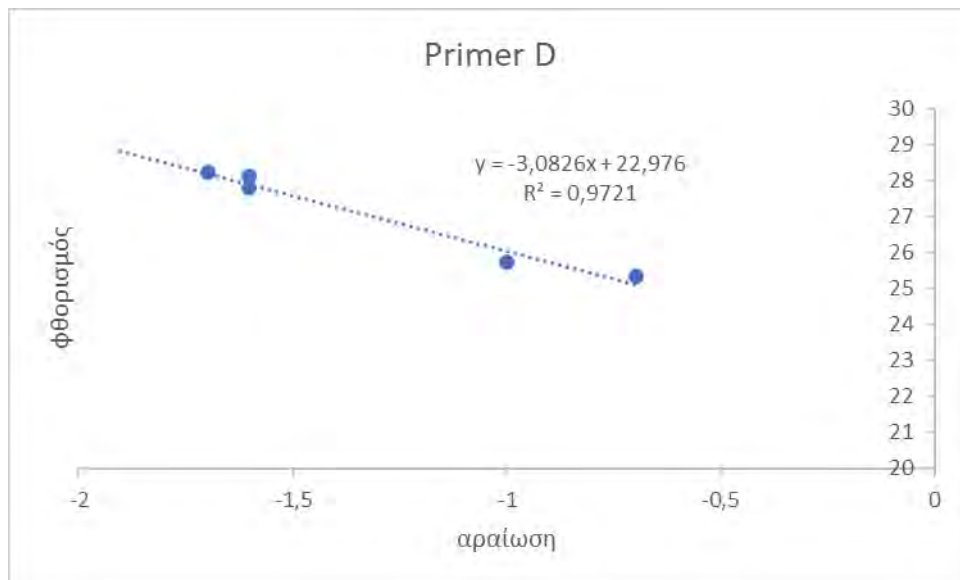
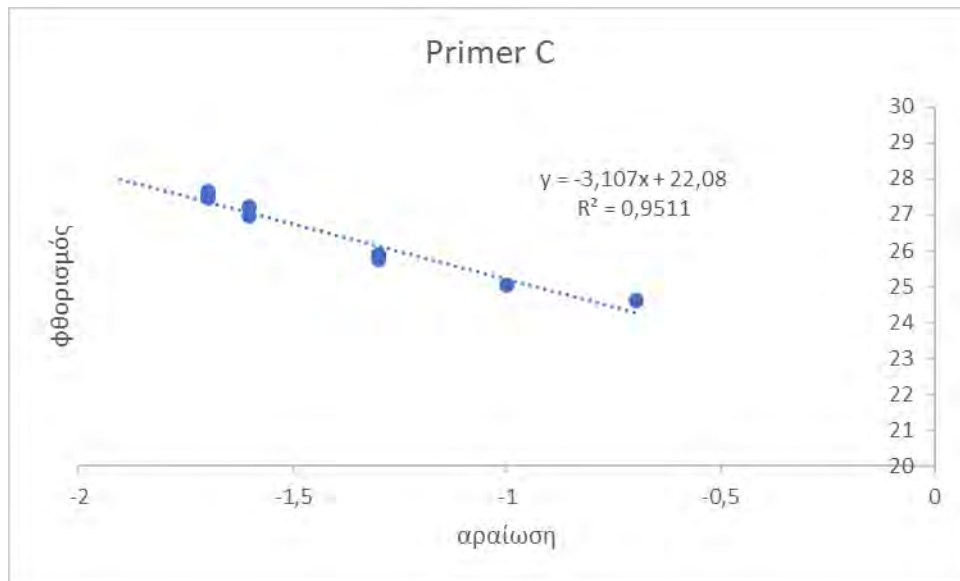
Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του πρώιμου mRNA του γονιδίου PRKAA2. Πάνω στο σχήμα απεικονίζονται οι 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές του μεταγράψου (UTR), τα κωδικόνια έναρξης (ATG) και λήξης (TGA) της κωδικής περιοχής, οι περιοχές πάνω στις οποίες ενισχύουν τα ζεύγη εκκινητών A, B, C, D, καθώς και οι εναλλακτικές πρότυπες αλληλουχίες πολυαδενυλίωσης (PolyA). Οι PolyA 1, 2, 3, 5 αποτελούνται από AATTAAA, ενώ των PolyA 4,6 από AATAAA. (Τα μεγέθη του σχήματος δεν ανταποκρίνονται στις πραγματικές αποστάσεις μεταξύ των αλληλουχιών του μεταγράψου).

Για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε ένα από τα τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, ελέγχθηκε η απόδοση [efficiency (E)] διαφορετικών αραιώσεων, μέσω της δημιουργίας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε κάνοντας ανάμειξη όλων των δειγμάτων και με τη δημιουργία διαδοχικών αραιώσεων 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/50, 1/80. Αναλυτικότερα, για το primer A δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 150nM και 200nM, για τον οποίο βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 150nM με E=1,04. Για τον primer B δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 150nM και 250nM, και βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 150nM με E=1,02. Για τον primer C δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 200nM και 300nM, με τη δεύτερη να αποτελεί τη βέλτιστη, και η απόδοση της αντίδρασης ήταν 1,09. Τέλος, για τον primer D δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 150nM και 200nM, και η 200nM ήταν η βέλτιστη με απόδοση 1,11. Οι πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινητών A, B, C, D φαίνονται στην εικόνα 10.

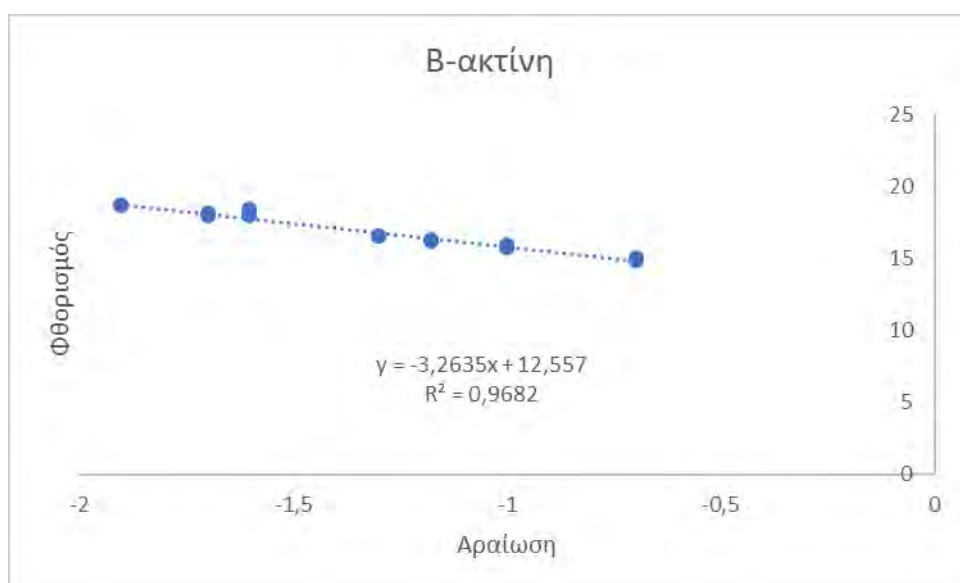
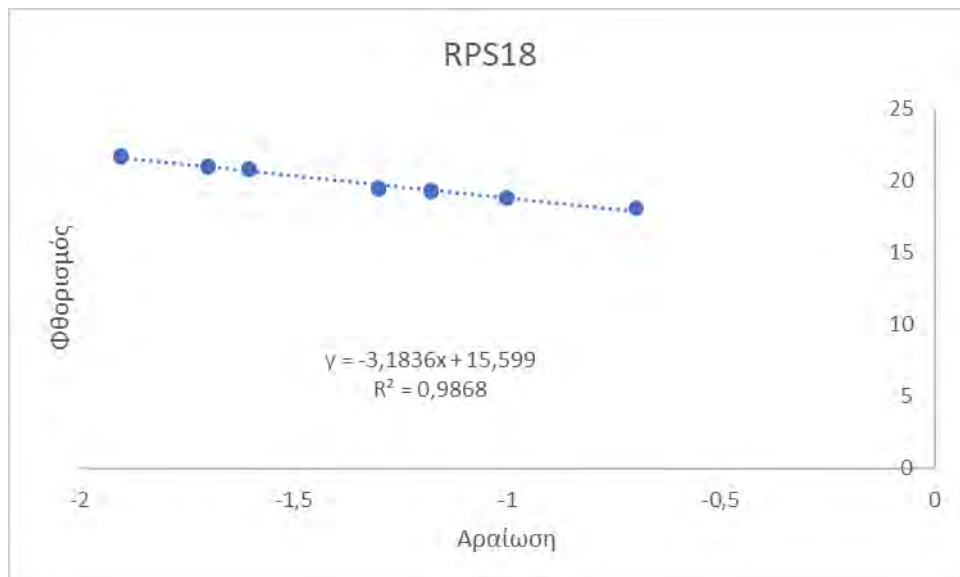
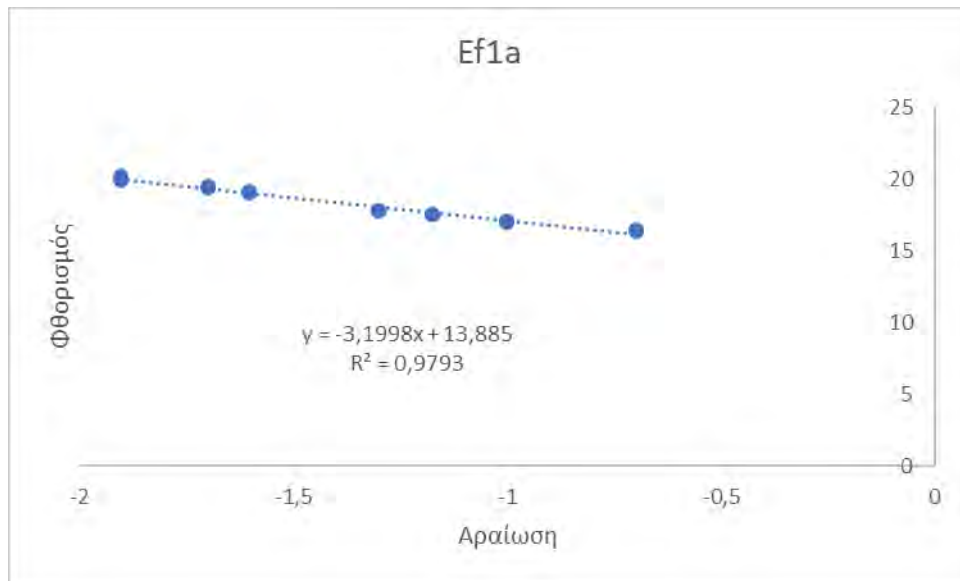
Αντίστοιχα μελετήθηκε η απόδοση για τα ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν σε γονίδια που παρουσιάζουν ιδιοσυστατη έκφραση. Για την τουμπουλίνη

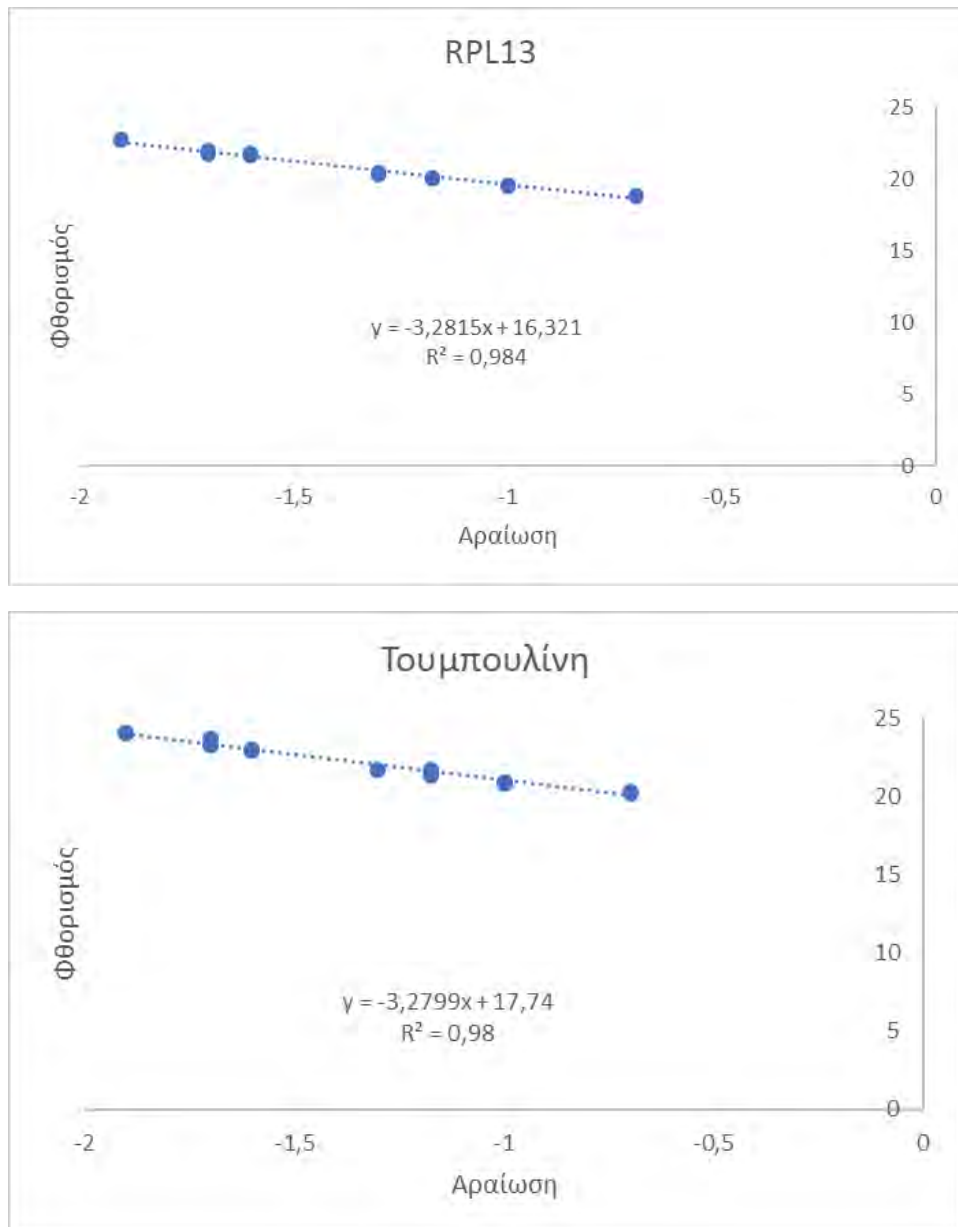
δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 200nM και 250nM, για την οποία βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 250nM με $E=1,02$. Για τη β-ακτίνη η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 200nM με $E=1,02$. Για το γονίδιο RPS18 δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 200 nM και 250 nM, και βρέθηκε ότι η καλύτερη συγκέντρωση είναι τα 200 nM με $E=1,06$. Για το RPL13 βρέθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 200nM με $E=1,02$. Τέλος, για το ιδιοσύστατο γονίδιο EF1a δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις 200nM και 250nM, με την πρώτη να αποτελεί την βέλτιστη και η απόδοση της αντίδρασης ήταν 1,05. Οι πρότυπες καμπύλες για όλα τα παραπάνω ιδιοσυστάτα γονίδια φαίνονται στην Εικόνα 11.





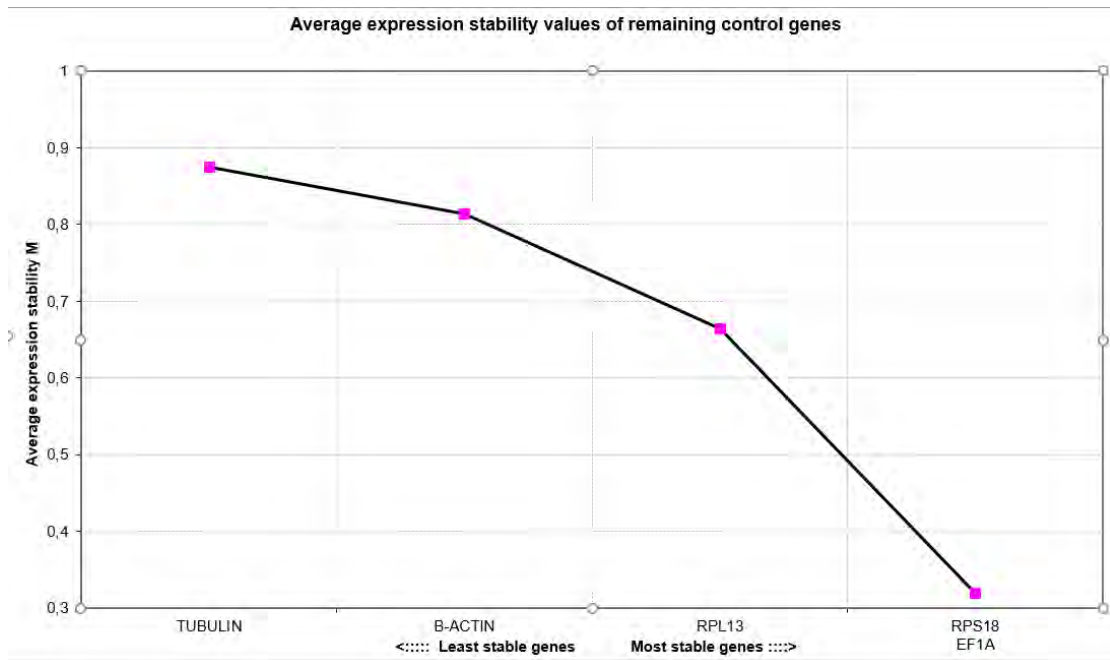
Εικόνα 10: Πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινήτων A, B, C, D. Στον άξονα y φαίνεται η ποσότητα φθορισμού, ενώ στον άξονα x η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).



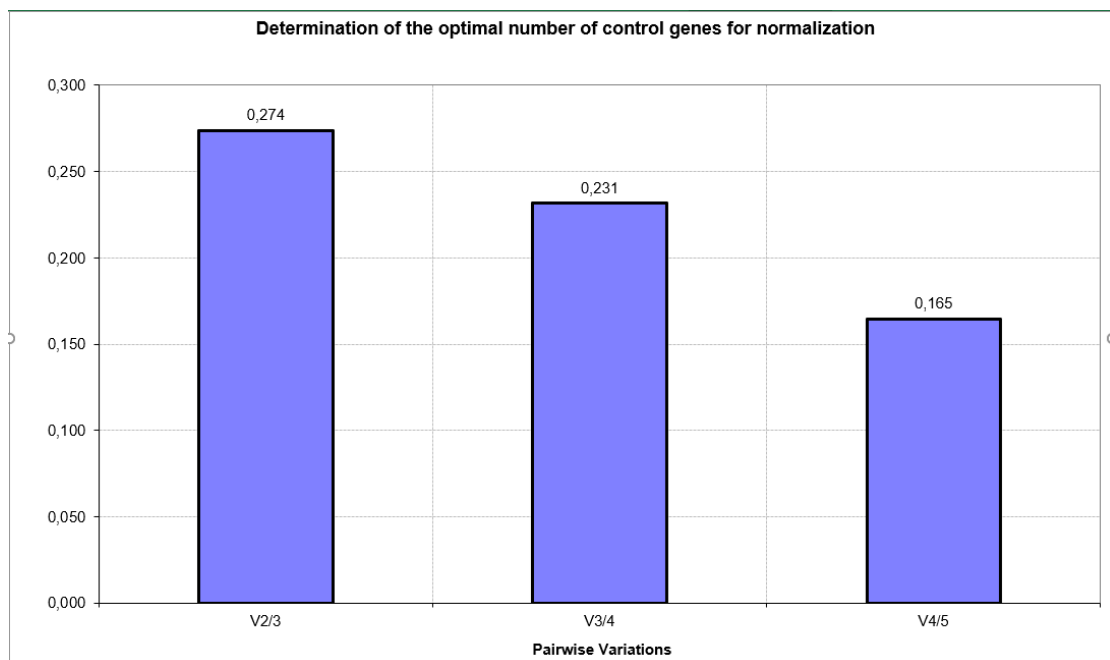


Εικόνα 11: Πρότυπες καμπύλες των εκκινητών που στοχεύουν σε ιδιοσύστατα γονίδια. Στον άξονα y φαίνεται η ποσότητα φθορισμού, ενώ στον άξονα x η αραίωση που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).

Στην συνέχεια, για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι αναγκαία η εύρεση της σταθερότητας των ιδιοσύστατων γονιδίων {measure of the gene expression stability(M)}. Για αυτό το σκοπό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα geNorm. Οι τιμές που προέκυψαν από το πρόγραμμα ήταν: $M=0,748$ για το RPL13, $M=0,965$ για την τουμπουλίνη, $M=0,918$ για την Β-ακτίνη, $M=0,882$ για το RPS18, $M=0,860$ για το EF1a (Εικ.12). Ενώ ο βέλτιστος αριθμός γονιδίων ελέγχου που προέκυψε για την περαιτέρω ανάλυση των αποτελεσμάτων ήταν 2-3 (Εικ.13). Έτσι, για τον υπολογισμό του συντελεστή κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τα τρία πιο σταθερά εκφραζόμενα γονίδια RPL13, RPS18 και EF1a.



Εικόνα 12: Διάγραμμα απεικόνισης της σταθερότητας έκφρασης των ιδιοσυστατων γονιδίων. Στον άξονα x απεικονίζονται τα γονίδια από τα λιγότερο σταθερά (αριστερά), έως τα δύο πιο σταθερά (δεξιά).

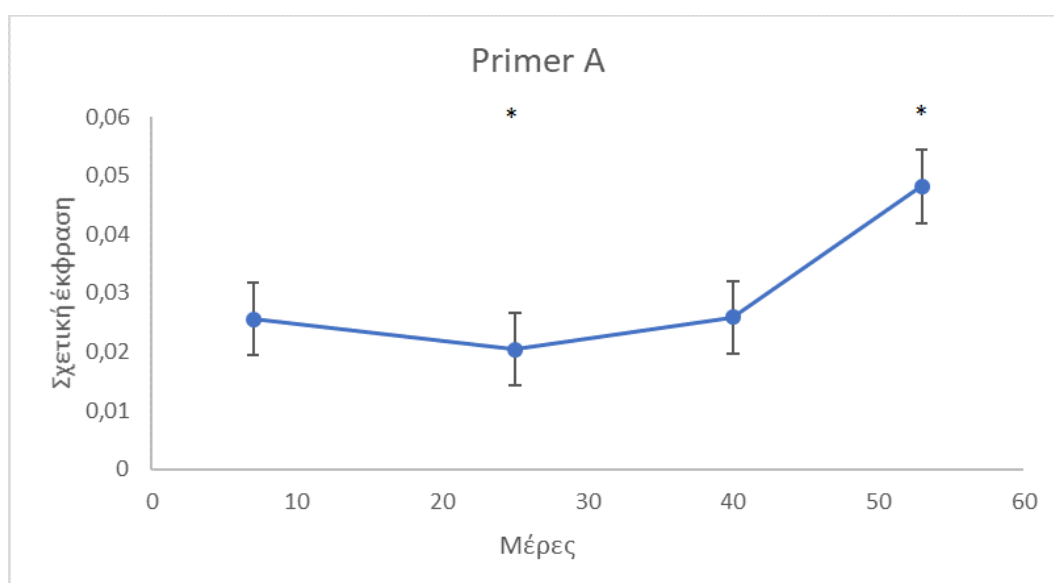


Εικόνα 13: Γράφημα προσδιορισμού του βέλτιστου αριθμού γονιδίων ελέγχου για κανονικοποίηση. Σε αυτό το γράφημα απεικονίζεται τα επίπεδα μεταβολής της σταθερότητας του «μέσου» αριθμού γονιδίων αναφοράς, με την διαδοχική προσθήκη γονιδίων αναφοράς στην εξίσωση. Ξεκινάει από τα πιο σταθερά εκφραζόμενα γονίδια στα αριστερά και προσθέτει περισσότερα όσο κινείται προς τα δεξιά.

Μέσω ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου έγινε σχετική ποσοτικοποίηση της ποσότητας των εναλλακτικών μεταγράφων που υπάρχουν στα δείγματα. Έτσι τα μεταγράφα στα οποία η πολυαδενυλίωση έχει γίνει στην θέση 1 ενισχύονται μόνο

από το ζεύγος εκκινητών A. Τα μετάγραφα στα οποία η πολυαδενυλίωσή έχει γίνει στην θέση 2 ενισχύονται από το ζεύγος εκκινητών A και B. Τα μετάγραφα τα οποία είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 3, 4, 5 ενισχύονται από τα ζεύγη εκκινητών A, B, C. Ενώ τέλος, τα μετάγραφα στα οποία η πολυαδενυλίωσή έχει γίνει στην θέση 6 ενισχύονται από τα ζεύγη εκκινητών A, B, C, D (Εικ.9). Άρα, αν από τις κανονικοποιημένες τιμές φθορισμού που προέρχονται από το ζεύγος εκκινητών A αφαιρεθούν οι τιμές φθορισμού που προέρχονται από το ζεύγος εκκινητών B, μπορεί να βρεθεί η ποσότητα φθορισμού που προέχεται αποκλειστικά από τα μετάγραφα που η πολυαδενυλίωσή έχει συμβεί στην θέση 1 (Εικ.9). Αντίστοιχα αν από τον φθορισμό που προέρχεται από την ενίσχυση με το ζεύγος εκκινητών B αφαιρεθεί η ποσότητα που προέρχεται από το ζεύγος εκκινητών C, μπορεί να βρεθεί ο φθορισμός από τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 2 (Εικ.9). Ενώ αν από το φθορισμό του ζεύγους εκκινητών C, αφαιρεθεί ο φθορισμός που προέρχεται από την ενίσχυση με το ζεύγος εκκινητών D, μπορεί να βρεθεί η ποσότητα του φθορισμού από τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 3, 4, 5 (Εικ.9). Τέλος, η ποσότητα που προέρχεται από την χρήση του ζεύγους εκκινητών D αντιστοιχεί αποκλειστικά στα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης 6 (Εικ.9).

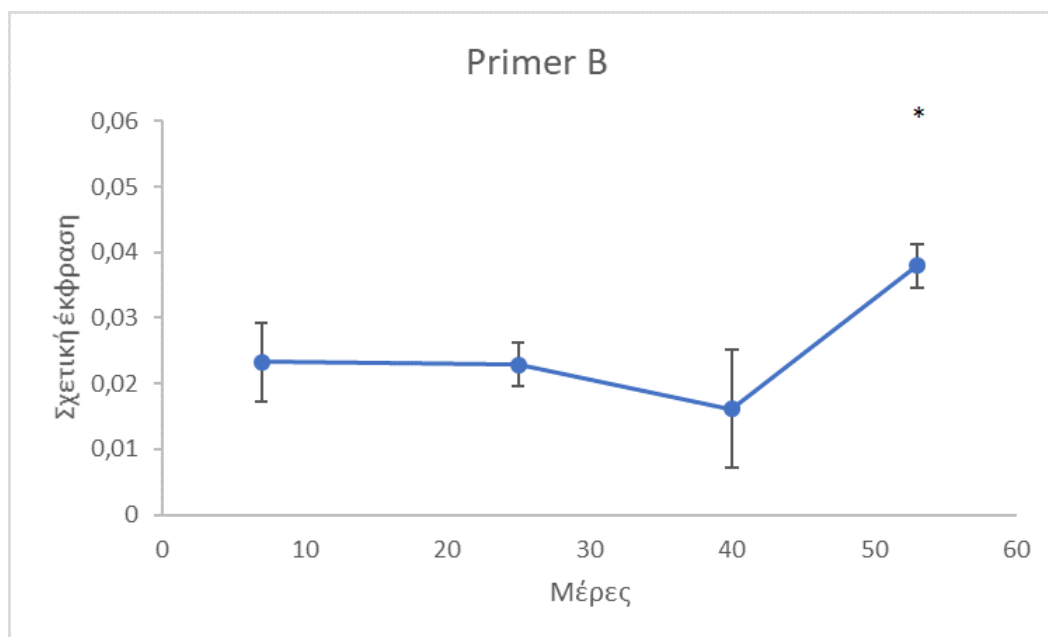
Η έκφραση των μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2 που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 1, μελετήθηκε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών A και παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας. Αναλυτικότερα, μεταξύ της ημέρας 7 και της ημέρας 25 υπάρχει μία οριακά στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων της έκφρασης, στην συνέχεια ακολούθησε μία μικρή αύξηση μέχρι την ημέρα 40, χωρίς η διαφορά μεταξύ των ημερών 25 και 40 να θεωρείται στατιστικά σημαντική. Έπειτα από την ημέρα 40 έως την ημέρα 53 ακολουθεί μία στατιστικώς σημαντική αύξηση, με αποτέλεσμα η έκφραση του μεταγράφου να φτάσει στα υψηλότερα επίπεδα (Εικ.14).



Εικόνα 14: Σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 1, στα αναπτυξιακά στάδια των 7, 25, 40, 53 ημερών (dph). Η μελέτη της έκφρασης έγινε με την

χρήση του ζεύγους εκκινητών A. Οι διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα. Οι ημέρες με στατιστικώς σημαντική διακύμανση απεικονίζονται με *.

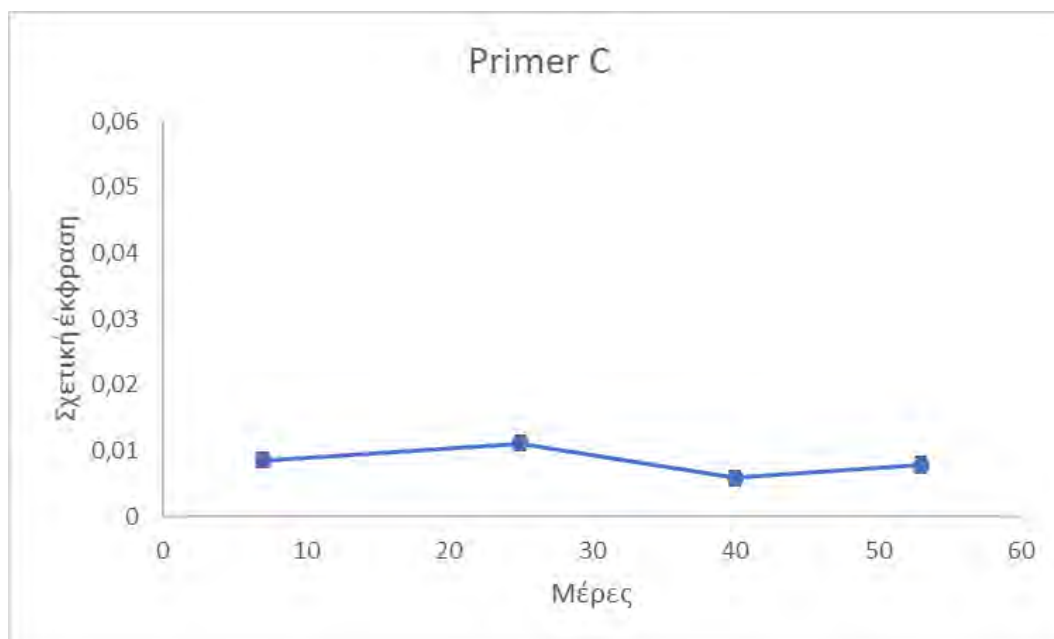
Τα μετάγραφα του γονιδίου PRKAA2 που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 2 μελετήθηκαν ως προς τη σχετική τους έκφραση τους με την χρήση των εκκινητών B. Η έκφραση των πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων στην θέση δύο, μεταξύ των ημερών 7 και 25 παρουσίασε σταθερή ποσότητα έκφρασης. Στην συνέχεια ακολούθησε μία μικρή μείωση μέχρι την ημέρα 40, η οποία όμως δεν είναι στατιστικώς σημαντική και έχει μεγάλο εύρος τυπικού σφάλματος. Μεταξύ των ημερών 40 και 53 διαπιστώθηκε μία στατιστικώς σημαντική αύξηση με αποτέλεσμα η σχετική έκφραση του μεταγράφου να φτάσει στα υψηλότερα επίπεδα, όπως έγινε και τη θέση πολυαδενυλίωσης 1 (Εικ.15). Άρα υποδεικνύεται ότι η έκφραση του μεταγράφου που πολυαδενυλιώνεται στην θέση 2 είναι σταθερή στις πρώτες μέρες της οντογένεσης και αυξάνεται μετά από την ημέρα 40.



Εικόνα 15: Σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 2, στα αναπτυξιακά στάδια των 7, 25, 40, 53 ημερών (dph). Η μελέτη της έκφρασης έγινε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών B. Οι διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα. Οι ημέρες με στατιστικώς σημαντική διακύμανση απεικονίζονται με *.

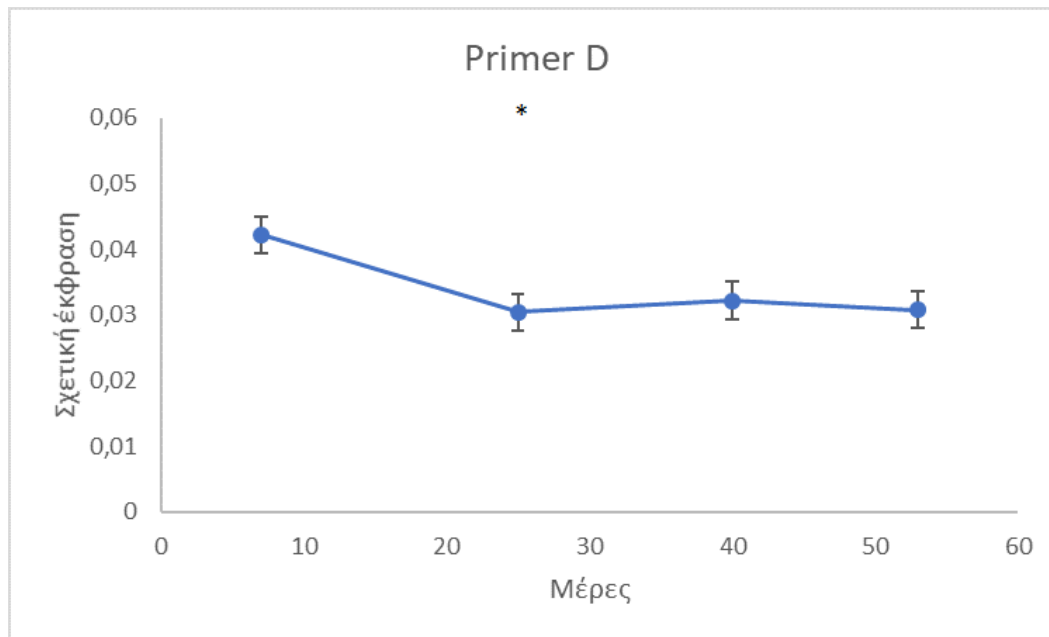
Η σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 3,4,5 μελετήθηκε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών C. Όπως φαίνεται και στο σχήμα (Εικ.16) σε κανένα από τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια σημαντική διακύμανση, ενώ καμία από τις μικρές αυξομειώσεις που παρατηρούνται δεν φαίνεται να είναι στατιστικώς σημαντική. Έτσι μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η σχετική έκφραση των

πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων στις θέσεις 3, 4, 5, σε όλη την διάρκεια της οντογένεσης της τσιπούρας είναι σταθερή και αρκετά μικρής ποσότητας.



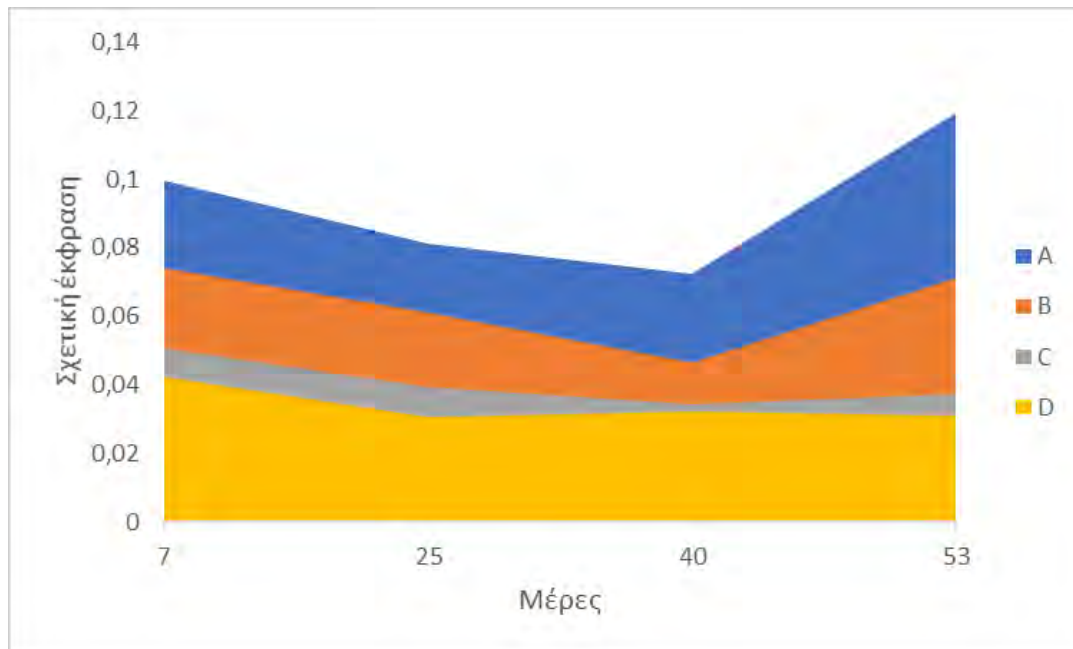
Εικόνα 16: Σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 3, 4, 5, στα αναπτυξιακά στάδια των 7, 25, 40, 53 ημερών (dph). Η μελέτη της έκφρασης έγινε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών C. Οι διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα. Οι ημέρες με στατιστικώς σημαντική διακύμανση απεικονίζονται με *.

Τέλος, η σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 μελετήθηκε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών D. Από την ημέρα 7 έως την ημέρα 25 υπήρξε μια στατιστικώς σημαντική μείωση η οποία στην συνέχεια μεταξύ των ημερών 25-40, και 40-53 φαίνεται να σταθεροποιείται (Εικ.17). Η σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 φαίνεται ότι είναι η μεγαλύτερη σε σχέση με τις υπόλοιπες θέσεις πολυαδενυλίωσης.



Εικόνα 17: Σχετική έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6, στα αναπτυξιακά στάδια των 7, 25, 40, 53 ημερών (dph). Η μελέτη της έκφρασης έγινε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών D. Οι διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω της μεθόδου ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one-way ANOVA). Το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα. Οι ημέρες με στατιστικώς σημαντική διακύμανση απεικονίζονται με *.

Από το γράφημα απεικόνισης της σχετικής έκφρασης μεταξύ διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων παρατηρείται ότι η ποσότητα φθορισμού η οποία προήλθε από τη χρήση του ζεύγους εκκινητών C, είναι σχετικά σταθερή στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας. Το ζεύγος εκκινητών D εμφανίζει μία μείωση μεταξύ των ημερών 7 και 25 και μετά και αυτό διατηρεί ένα σταθερό πρότυπο έκφρασης. Από την άλλη μεριά όσον αφορά τα ζεύγη εκκινητών A και B παρατηρούνται σημαντικές διακυμάνσεις. Συγκεκριμένα και στα δύο ζεύγη εκκινητών παρατηρείται μία μείωση της έκφρασης μέχρι την ημέρα 40, η οποία όμως στη συνέχεια αυξάνεται δραματικά, κυρίως στο ζεύγος A, με αποτέλεσμα τόσο ο A όσο και ο B να φτάσουν στη μέγιστη τιμή τους κατά την ημέρα 53 (Εικ.18)



Εικόνα 18: Γράφημα απεικόνισης, της σχετικής έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών ζευγών εκκινητών, στα αναπτυξιακά στάδια των 7,25,40,53 ημερών (dph). Στον άξονα y απεικονίζεται η σχετική έκφραση, ενώ στον άξονα x οι διαφορετικές ημέρες. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η έκφραση του ζεύγους εκκινητών A, με πορτοκαλί του ζεύγους εκκινητών B, με γκρι του ζεύγους εκκινητών C και με κίτρινο του ζεύγους εκκινητών D.

4. Συζήτηση

4.1. Εξελικτική πορεία των γονιδίων PRKAA1 και PRKAA2

Τα γονίδια PRKAA1 και PRKAA2 κωδικοποιούν τις $\alpha 1$ και $\alpha 2$ ισομορφές της α-καταλυτικής υπομονάδας του ενζύμου, αντίστοιχα. Η φυλογενετική ανάλυση της α-υπομονάδας της AMPK έγινε μέσω της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου (Εικ.9, Ενότητα 3.1.).

Στον πρώτο κόμβο του δέντρου φαίνεται ο διαχωρισμός του γονιδίων PRKAA2 των μυξίνων, γεγονός που αντιστοιχεί στο διαχωρισμό των αγνάθων από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά. Τα δύο παράλογα γονίδια PRKAA2 που εμφανίζονται στην γενεαλογία των μυξίνων φαίνεται ότι προέκυψαν από διπλασιασμό ο οποίος συνέβη πριν το διαχωρισμό της υπερομοταξίας των αγνάθων από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά. Άρα μπορούμε να υποθέσουμε ότι πρόκειται για παράλογα γονίδια τα οποία προήλθαν από τον πρώτο γύρο γονιδιακού διπλασιασμού (1R) και διατηρήθηκαν στην υπερομοταξία των αγνάθων. Στην συνέχεια, απεικονίζεται στο δέντρο ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού (2R), μέσω της δημιουργίας δύο υποδέντρων (subtree), ένα για την PRKAA1 και ένα για την PRKAA2 (Εικ.9). Όπως φαίνεται και στο δέντρο ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού του γονιδιώματος συνέβη μετά ή περίπου κατά την διάρκεια της απόκλισης των αγνάθων από τα γναθοστόματα σπονδυλωτά περίπου 450-550 εκατομμύρια χρόνια πριν (Mya) [36]. Τα παράλογα γονίδια που προέκυψαν από αυτόν είναι εμφανές ότι διατηρήθηκαν σε όλα τα γναθοστόματα του φυλογενετικού δέντρου και μπορούν να εξελίσσονται ανεξάρτητα στα διαφορετικά είδη.

Και στα δύο υπο-δέντρα εμφανίζεται ο διαχωρισμός των τελεοστέων από τους ολοστέους (ακτινοπτερύγιους ιχθύες) (π.χ. *Lepisosteus oculatus*). Είναι γνωστό ότι στην βάση της διακλάδωσης των τελεοστέων συνέβη ένας τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (3R), (teleost-specific, TS-WGD) διπλασιάζοντας για ακόμα μία φορά το γονιδιακό ρεπερτόριο αυτών των οργανισμών [24]. Παρόλα αυτά, στην μελέτη που πραγματοποιήθηκε δεν βρέθηκαν παράλογα γονίδια ούτε για την PRKAA1, ούτε για την PRKAA2 στην γενεαλογία των τελεοστέων. Γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αντίγραφα που δημιουργήθηκαν για την α υπομονάδα της AMPK, από τον τρίτο γύρο γονιδιακού διπλασιασμού, πιθανώς να εξαλείφθηκαν μέσω της δημιουργίας ψευδογονιδίων.

Τέλος σε κανέναν από τους οργανισμούς οι οποίοι μελετήθηκαν δεν φαίνεται να υπάρχει περεταίρω διπλασιασμός των γονιδίων εντός του είδους [66] (Εικ.9). Λόγω της σημαντικής δράσης της α υπομονάδας, ως το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου, η αλληλουχία που την κωδικοποιεί εμφανίζεται ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών του φυλογενετικού δέντρου [33]. Ενώ οι δύο διαφορετικές ισομορφές της ($\alpha 1$ και $\alpha 2$) υπάρχουν ενδείξεις ότι εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια [41], καθώς και ότι έχουν διαφορετική υποκυτταρική τοπολογία, διαφορετικούς στόχους φωσφορυλίωσης και διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης από τα αδενινικά νουκλεοτίδια [24,33,40].

4.2. Χρήση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2 κατά την οντογένεση της τσιπούρας

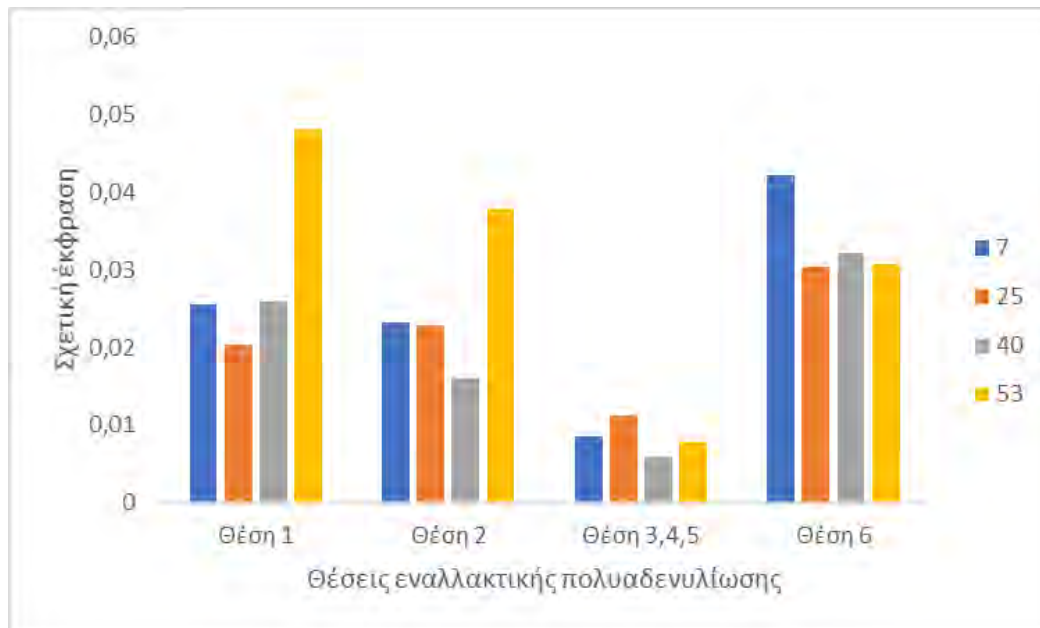
Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν, ότι μεταξύ διαφορετικών ημερών κατά την οντογένεση της τσιπούρας επάγεται η χρήση από το κύτταρο, διαφορετικών θέσεων πολυαδενυλίωσης για την ωρίμανση του πρόδρομου mRNA του γονιδίου PRKAA2.

Συγκεκριμένα, κατά την ημέρα 7, δηλαδή την περίοδο που η προνύμφη έχει ακόμα τον λεκιθικό σάκο και κάνει τις πρώτες τις απόπειρες για τροφή, παρατηρείται αυξημένη έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6, δηλαδή έχουν όσο το δυνατόν πιο μεγάλη 3' μη-μεταφραζόμενη περιοχή. Η έκφραση αυτή φαίνεται να είναι δύο φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη στα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 1 και 2 (Εικ.19).

Κατά την ημέρα 25 δηλαδή την περίοδο που ο λεκιθικός σάκος έχει καταναλωθεί πλήρως, και η προνύμφη κάνει μία πιο σταθερή κίνηση που την βοηθάει στην πρόσληψη τροφής. Τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 εμφανίζουν μείωση στην ποσότητα έκφρασης τους αν και ακόμα βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα. Αντίστοιχα, η έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 1 και στην θέση 2 παραμένουν σχετικά σταθερά, με τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα να παρουσιάζουν μία μικρή αλλά στατιστικά σημαντική μείωση (Εικ.19).

Στην ημέρα 40 δηλαδή στο στάδιο της προμεταμόρφωσης, η έκφραση των πολυαδενυλιωμένων μεταγράφων στην θέση 6 παραμένει σταθερή, ενώ αντίστοιχα για αυτά στην θέση 1 υπάρχει μία μικρή αύξηση, και για αυτά στην θέση 2 υπάρχει μία μικρή μείωση χωρίς αυτές οι μεταβολές να είναι στατιστικώς σημαντικές (Εικ.19).

Την ημέρα 53 όπου έχει ήδη γίνει η μεταμόρφωση και η προνύμφη έχει μεταβεί στο ενήλικο στάδιο, ώστε οι ενεργειακές τις ανάγκες να αυξάνονται λόγω μεγάλου μεγέθους. Η έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 είναι σταθερή ενώ αυτών που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 1,2 αυξάνονται ραγδαία. Ειδικά τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 1 η έκφραση τους διπλασιάζεται. Τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 3,4,5 φαίνεται να έχουν σταθερή ποσότητα έκφρασης, σε όλη την διάρκεια της οντογένεσης η οποία είναι χαμηλή. (Εικ.19).



Εικόνα 19: Γράφημα απεικόνισης, της σχετικής έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών θέσεων εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, στα αναπτυξιακά στάδια των 7,25,40,53 ημερών (dph). Στον άξονα y απεικονίζεται η σχετική έκφραση, ενώ στον άξονα x οι θέσεις εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης. Με μπλε χρώμα παρουσιάζεται η έκφραση του αναπτυξιακού σταδίου 7, με πορτοκαλί του αναπτυξιακού σταδίου 25, με γκρι του αναπτυξιακού σταδίου 40 και με κίτρινο του αναπτυξιακού σταδίου 53.

Μεταξύ της πρότυπης αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης 1 και της πρότυπης αλληλουχίας πολυαδενυλίωσης 6 μεσολαβεί μία απόσταση 3237 βάσεων την στιγμή που ολόκληρο το mRNA του γονιδίου είναι 8053 βάσεις. Μέσω της εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης το μέγεθος της 3' μη μεταφραζόμενη περιοχής μπορεί να αλλάξει δραματικά.

Λόγω αυτής της αλλαγής μπορεί να μεταβάλλεται η σταθερότητα του παραγόμενου μεταγράφου, συγκεκριμένα αλλαγή στην 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή μπορεί να μεταβάλει τον αριθμό των αλληλουχιών στόχων για miRNA μικρών (~22nt) συμπληρωματικών RNA τα οποία μεταβάλουν την σταθερότητα και την μετάφραση των mRNA πάνω στα οποία προσδένονται [67].

Επίσης, μπορεί να μεταβληθεί ο αριθμός και άλλων θέσεων πάνω στις οποίες προσδένονται παράγοντες που αποσταθεροποιούν το mRNA, όπως στοιχεία πλούσια σε AU (AREs), και στοιχεία πλούσια σε GU (GREs) τα οποία αποτελούν στόχους για πρωτεΐνες πρόσδεσης στο RNA (RBPs) οι οποίες μπορούν να επιδράσουν στην σταθερότητα του mRNA [68]. Άρα γίνεται φανερό ότι mRNA με μικρή 3' μη μεταφραζόμενη περιοχή είναι πιο σταθερά σε σχέση με αυτά που έχουν μεγαλύτερη, αν και αυτό αμφισβητείται [71].

Επιπλέον έρευνες έχουν δείξει ότι το μέγεθος της 3' μη μεταφραζόμενη περιοχής μπορεί να επηρεάσει την πρόσβαση του mRNA στο ριβόσωμα με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η διαδικασία της μετάφρασης [72].

Το μέγεθος της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής μπορεί να εμποδίσει την έξοδο ενός mRNA από τον πυρήνα, αφού mRNA με μεγάλες 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές τείνουν να βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία στον πυρήνα σε σχέση με το κυτταρόπλασμα [69,70].

Στη συνέχεια το μέγεθος της μη μεταφραζόμενης περιοχής φαίνεται να επιδρά και στην υποκυτταρική τοπολογία του mRNA στο κυτταρόπλασμα. Για παράδειγμα, στα νευρικά κύτταρα οι «κοντές ισόμορφες» mRNA του προερχόμενου από το εγκέφαλο νευροτροφικού παράγοντα (BDNF) περιορίζονται στο κυτταρικό σώμα ενώ οι «μακριές» ισόμορφες εντοπίζονται στους δενδρίτες όπου και μεταφράζονται [73]. Ενώ τέλος, έχει αποδειχθεί ότι το μέγεθος της 3' μη μεταφραζόμενης περιοχής παίζει πολύ σημαντικό ρόλο και στην δευτεροταγή δομή όπου θα λάβει το mRNA (πχ. δομή φουρκέτας) [74].

Η χρήση εναλλακτικών θέσεων πολυαδενυλίωσης, είναι μια διαδικασία που συμβαίνει πολύ συχνά στην διάρκεια ωρίμανσης του πρόδρομου mRNA των ιχθύων. Αναλυτικότερα, σε μελέτες που έγιναν στο μεταγράψωμα εμβρύων στο ψάρι ζέβρα (*Danio rerio*), βρέθηκε ότι το 43% των εκφραζόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες υποβάλλονται σε εναλλακτική πολυαδενυλίωση κατά την διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης. Επίσης βρέθηκε η ύπαρξη ενός μοτίβου με τις κοντές 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές να αφθονούν στο μεταγράψωμα του ζυγωτού και να «αυξάνουν» το μέγεθος τους κατά την διάρκεια της γαστριδίωσης [76].

Αντίστοιχη μελέτη πραγματοποιήθηκε από τον Igor Ulitsky και τους συνεργάτες του, οι οποίοι μελέτησαν το πρότυπο πολυαδενυλίωσης κατά την οντογένεση στο ψάρι ζέβρα. Ανακάλυψαν την ύπαρξη ενός ιστοειδικού πρότυπου με τις ισομορφές που έχουν μικρότερες 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές να υπερεκφράζονται στις ωοθήκες του ψαριού, ενώ αυτές που έχουν μεγαλύτερες, να υπερεκφράζονται στον εγκέφαλο [77].

Ένα ακόμα παράδειγμα εναλλακτικής πολυαδενυλίωσης, είναι η έκφραση του γονιδίου της α ισομορφής της ελαφριάς αλυσίδας της μυρσίνης (MLC2A) κατά την οντογένεση της τσιπούρας. Από το γονίδιο αυτό παράγονται τρία εναλλακτικά μεταγράφα η έκφραση των οποίων μεταβάλλεται ανάλογα το αναπτυξιακό στάδιο [78].

Στα αποτελέσματα του πειράματος παρατηρείται, ότι τις πρώτες μέρες ανάπτυξης κατά τις οποίες υπάρχει η παρουσία του λεκιθικού σάκου το κύτταρο χρησιμοποιεί κυρίως την θέση πολυαδενυλίωσης 6. Έπειτα μεταξύ των ημερών 25 και 40 υπάρχει μία εξισορρόπηση μεταξύ των θέσεων 1,2,6 αλλά πάλι με την 6 να έχει σαφώς μεγαλύτερη έκφραση. Ωστόσο, μετά την μεταμόρφωση το κύτταρο φαίνεται να χρησιμοποιεί περισσότερο την θέση 2 και κυρίως την θέση 1. Μία προφανής διαφορά μεταξύ αυτών των αναπτυξιακών σταδίων είναι οι ενεργειακές ανάγκες του οργανισμού. Στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια η προνύμφη έχει όλα τα θρεπτικά που χρειάζεται στον λεκιθικό σάκο και χαμηλές ενεργειακές ανάγκες λόγω του μικρού της μεγέθους, ενώ μετά την μεταμόρφωση το ιχθύδιο πρέπει να αναζητήσει μόνο του την τροφή του και οι ενεργειακές του ανάγκες αυξάνονται. Έτσι λόγω της δράσης του ενζύμου στον μεταβολισμό το κύτταρο μπορεί να μεταβάλει το

μέγεθος των πρόδρομων mRNA που παράγονται ώστε να μεταβάλει και την ποσότητα ή την δραστικότητα του ενζύμου.

Λόγω της πολύ σημαντικής δράσης της AMPK σε καταστάσεις χαμηλής ενέργειας, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η έκφραση των μεταγράφων του, έχει άμεση σχέση με το ενεργειακό ισοζύγιο του οργανισμού. Έτσι σε περιόδους που υπάρχει διαθεσιμότητα τροφής για την προνύμφη λόγω της ύπαρξης του λεκιθικού σάκου, το κύτταρο επιλέγει την θέση πολυαδενυλίωσης 6 από την οποία προκύπτει ένα πολύ μεγάλο μετάγραφο, που σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μπορεί να είναι και πιο ασταθές [74]. Αντίθετα μετά την μεταμόρφωση κατά την οποία ο οργανισμός έχει αυξημένες διατροφικές ανάγκες λόγω μεγέθους και έντονη κινητική δραστηριότητα, με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία και η ενεργοποίηση του ενζύμου φαίνεται να επάγεται η χρήση των θέσεων πολυαδενυλίωσης 1,2, οι οποίες δίνουν ένα πιο μικρό μετάγραφο, και κατά πάσα πιθανότητα πιο σταθερό και με μεγαλύτερη απόδοση κατά την πρωτεϊνοσύνθεση [74].

Ένα άλλο σενάριο που αιτιολογεί το πρότυπο έκφρασης των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2 είναι η συσχέτιση του με την διαδικασία της μυογένεσης. Μέχρι την ημέρα 25 γνωρίζουμε ότι η οι λευκοί μυς της τσιπούρας αναπτύσσονται μέσω υπερπλασίας, μεταξύ των ημερών 25 και 35 υπάρχει μία μεταβατική περίοδος, και από την ημέρα 35 και μετά μέσω υπερτροφίας [78]. Στα αποτελέσματα, κατά την ημέρα 7 υπάρχει μεγάλη έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 η οποία μειώνεται κατά την ημέρα 25 και έπειτα. Αντίστοιχα τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 1 και 2 έχουν μία περίπου σταθερή έκφραση μέχρι την ημέρα 40 και μετά αυξάνονται ραγδαία. Άρα θα μπορούσε να υποτεθεί ότι τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6 έχουν κάποια σχέση με την ανάπτυξη των μυών μέσω υπερπλασίας, ενώ αυτά που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 1 και 2 σχετίζονται με την ανάπτυξη μέσω υπερτροφίας.

Βέβαια για να διαπιστωθούν τα αίτια της χρήσης των διαφορετικών θέσεων πολυαδενυλίωσης κατά την ωρίμανση του mRNA σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας, απαιτείται περαιτέρω μελέτη. Σε αυτή την κατεύθυνση θα ήταν πολύ χρήσιμη μία βιοπληροφορική ανάλυση πληροφοριών από βάσεις δεδομένων, ώστε να διαπιστωθεί η ύπαρξη αλληλουχιών στόχων για miRNA ή άλλων παραγόντων, στην 3'μη μεταφραζόμενη περιοχή που οδηγούν στην αποσταθεροποίηση ή και στη σταθερότητα του μεταγράφου που προέρχεται από αυτό το γονίδιο-κλειδί του μεταβολισμού.

5. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης έδειξαν ότι η αλληλουχία που κωδικοποιεί την α υπομονάδα του ενζύμου AMPK είναι ιδιαίτερα συντηρημένη μεταξύ των οργανισμών, πιθανώς λόγω της δράσης της ως καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επίσης δεν βρέθηκαν παράλογα γονίδια για τις δύο ισομορφές της υπομονάδας εντός της γενεαλογίας των τελεοστέων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού του γονιδιώματος, πιθανώς χάθηκαν μέσω της δημιουργίας ψευδογονιδίων. Όσον αφορά την έκφραση των εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου PRKAA2, κατά τις πρώτες μέρες ανάπτυξης υπάρχει αύξηση στην έκφραση των μεταγράφων που είναι πολυαδενυλιωμένα στην θέση 6, η οποία στη συνέχεια μειώνεται και σταθεροποιείται. Ενώ τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 1 και 2 φαίνεται να έχουν μια παρόμοια έκφραση στις πρώτες μέρες ανάπτυξης η οποία αυξάνεται ραγδαία στην ημέρα 53. Τα μετάγραφα που είναι πολυαδενυλιωμένα στις θέσεις 3,4,5 φαίνεται να έχουν σταθερή έκφραση σε όλη την διάρκεια οντογένεσης της τσιπούρας. Αυτή η χρήση διαφορετικών θέσεων πολυαδενυλίωσης είναι συνήθης κατά την ανάπτυξη των ιχθύων και μεταβάλλει τόσο τη σταθερότητα όσο και την μετάφραση του mRNA που μεταγράφηκε.

Βιβλιογραφία.

- 1) Koven, W. (2002). Gilthead seabream, *Sparus aurata*. Nutrient Requirements and Feeding of Finfish for Aquaculture, (September 2014), 64–78.
- 2) Arabaci, M., Yilmaz, Y., Ceyhun, S. B., Erdogan, O., Dorlay, H. G., Diler, I., ... Koncagul, S. (2010). A review on population characteristics of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(6), 976–981.
<https://doi.org/10.3923/javaa.2010.976.981>.
- 3) Pavlidis, M. A. (2011). *Biology and Aquaculture of Gilthead Sea Bream and Other Species* Edited by. pp 31. doi: 10.1002/9781444392210.
- 4) «Global Aquaculture production for *Sparus aurata*». FAO Fishery Statistic. FAO.
- 5) Heming, T. A. and Buddington, R. K. (1988). Yolk absorption in embryonic and larval fishes. In *Fish Physiology*, vol. XIA (ed. W. S. Hoar and D. J. Randall), pp. 407-446.
- 6) K. Coward¹, N.R. Bromage (2002). Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. doi: 10.1023/A:1022613404123.
- 7) Hart, N. H. (1990). Fertilization in Teleost Fishes: Mechanisms of Sperm-Egg Interactions. *International Review of Cytology*, 121(C), 1–66. doi: 10.1016/s0074-7696(08)60658-0.
- 8) Kendall, A. W., Ahlstrom, E. H., & Moser, H. G. (1984). Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes*, 11–22.
- 9) Moretti A., Criado, M.P.F., Cittolin, G, Guidastri, R., (1999) Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream. Food and Agriculture Organization of the United Nation Vol. 1, pp 194.
- 10) Patruno, M., Radaelli, G., Mascarello, F., & Candia Carnevali, M. D. (1998). Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomy and Embryology*, 198(6), 487–504.
<https://doi.org/10.1007/s004290050199>.
- 11) Aral, F., Sahnoz, E., & Dogu, Z. (2012). Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish. *Recent Advances in Fish Farms*, (April). <https://doi.org/10.5772/17687>.
- 12) Blagden, C. S., Currie, P. D., Ingham, P. W., & Hughes, S. M. (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by sonic hedgehog. *Genes and Development*, 11(17), 2163–2175. <https://doi.org/10.1101/gad.11.17.2163>.
- 13) Johnston, I. A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2249–2264. <https://doi.org/10.1242/jeb.02153>.
- 14) Koumans, J. T. M., & Akster, H. A. (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology*, 110(1), 3–20.
[https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)00150-R](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)00150-R).
- 15) Georgiou, S., Alami-Durante, H., Power, D. M., Sarropoulou, E., Mamuris, Z., & Moutou, K. A. (2016). Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy

in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Cell and Tissue Research*, 363(2), 541–554. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2254-0>.

16) Weil, C., Lefevre, F. and Bugeon, J. (2013). Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 23, 157-173. doi: 10.1242/jeb.161588.

17) Gesta, S., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2007). Developmental Origin of Fat: Tracking Obesity to Its Source. *Cell*, 131(2), 242–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.004>.

18) Salmerón, C. (2018). Adipogenesis in fish. *The Journal of Experimental Biology*, 221(Suppl 1), jeb161588. <https://doi.org/10.1242/jeb.161588>.

19) Flynn, E. J., Trent, C. M. and Rawls, J. F. (2009). Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Lipid Res.* 50, 1641-1652. doi: 10.1194/jlr.M800590-JLR200.

20) Hilton, C., Karpe, F. and Pinnick, K. E. (2015). Role of developmental transcription factors in white, brown and beige adipose tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 686-696. doi: 10.1016/j.bbali.2015.02.003.

21) D. Grahame Hardie, Bethany E. Schaffer, and Anne Brunet (2016). AMPK: an energy-sensing pathway with multiple inputs and outputs. *Trends Cell Biol.* 2016 March; 26(3): 190–201. doi: 10.1016/j.tcb.2015.10.013.

22) Yan, Y., Zhou, X. E., Xu, H. E., & Melcher, K. (2018). Structure and Physiological Regulation of AMPK. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11). doi: 10.3390/ijms19113534.

23) Hardie, D.G. Keeping the home fires burning: AMP-activated protein kinase. *J. R. Soc. Interface* 2018, 15, 20170774. doi: 10.1098/rsif.2017.0774.

24) Ross, F. A., MacKintosh, C., & Hardie, D. G. (2016). AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavors. *FEBS Journal*, 283, 2987–3001. doi: 10.1111/febs.13698.

25) Hawley, S.A.; Ross, F.A.; Gowans, G.J.; Tibarewal, P.; Leslie, N.R.; Hardie, D.G. (2014) Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochem. J.* 2014, 459, 275–287. doi: 10.1042/BJ20131344.

26) Hurley, R.L.; Barre, L.K.; Wood, S.D.; Anderson, K.A.; Kemp, B.E.; Means, A.R.; Witters, L.A. (2006) Regulation of AMP-activated protein kinase by multisite phosphorylation in response to agents that elevate cellular cAMP. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 36662–36672. doi: 10.1074/jbc.M606676200.

27) Xiao, B.; Heath, R.; Saiu, P.; Leiper, F.C.; Leone, P.; Jing, C.; Walker, P.A.; Haire, L.; Eccleston, J.F.; Davis, C.T.; et al. (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 2007, 449, 496–500. doi: 10.1038/nature06161.

28) Gowans, G.J.; Hawley, S.A.; Ross, F.A.; Hardie, D.G. (2013) AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* 013,18,556–566. doi: 10.1016/j.cmet.2013.08.019.

29) Polekhina, G.; Gupta, A.; van Denderen, B.J.; Feil, S.C.; Kemp, B.E.; Stapleton, D.; Parker, M.W. (2005) Structural basis for glycogen recognition by AMP-activated protein kinase. *Structure* 2005, 13, 1453–1462. doi: 10.1016/j.str.2005.07.008.

- 30) Xiao, B.; Sanders, M.J.; Underwood, E.; Heath, R.; Mayer, F.V.; Carmena, D.; Jing, C.; Walker, P.A.; Eccleston, J.F.; Haire, L.F.; et al. (2011) Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature* 2011, 472, 230–233. doi: 10.1038/nature09932.
- 31) Chen, L.; Xin, F.J.; Wang, J.; Hu, J.; Zhang, Y.Y.; Wan, S.; Cao, L.S.; Lu, C.; Li, P.; Yan, S.F.; et al. (2013) Conserved regulatory elements in AMPK. *Nature* 2013, 498, E8–E10. doi: 10.1038/nature12189.
- 32) Gu, X.; Yan, Y.; Novick, S.J.; Kovich, A.; Goswami, D.; Ke, J.; Tan, M.H.E.; Wang, L.; Li, X.; de Waal, P.; et al. (2017) Deconvoluting AMP-dependent kinase (AMPK) adenine nucleotide binding and sensing. *J. Biol. Chem.* 2017, 292, 12653–12666. doi: 10.1074/jbc.M117.793018.
- 33) Craig, P. M., Moyes, C. D., & LeMoine, C. M. R. (2018). Sensing and responding to energetic stress: Evolution of the AMPK network. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 156–169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.11.001>.
- 34) Hawley, S.A., Ross, F.A., Gowans, G.J., Tibarewal, P., Leslie, N.R., Hardie, D.G., (2014). Phosphorylation by Akt within the ST loop of AMPK- α 1 downregulates its activation in tumour cells. *Biochem. J.* 459: 275–287. doi: 10.1042/BJ20131344.
- 35) Ruderman, N.B., Xu, X.J., Nelson, L., Cacicedo, J.M., Saha, A.K., Lan, F., Ido, Y., (2010). AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E751-760. doi: 10.1152/ajpendo.00745.2009.
- 36) Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A., (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 251–262. doi: 10.1038/nrm3311.
- 37) Ohno S., (1970). *Evolution by gene duplication*. New York: Springer Verlag.
- 38) Meyer, A. and Van de Peer, Y., (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays* 27, 937-945. doi: 10.1002/bies.20293.
- 39) Sanz, P., Rubio, T., Garcia-Gimeno, M.A., (2013). AMPK beta subunits: more than just a scaffold in the formation of AMPK complex. *FEBS J.* 280, 3723-3733. doi: 10.1111/febs.12364.
- 40) Pinter, K., Grignani, R.T., Watkins, H., Redwood, C., (2013). Localization of AMPK γ subunits in cardiac and skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 34, 369-378. doi: 10.1007/s10974-013-9359-4.
- 41) Turnley, A.M., Stapleton, D., Mann, R.J., Witters, L.A., Kemp, B.E. Bartlett, P.F., (1999). Cellular Distribution and Developmental Expression of AMP-Activated Protein Kinase Isoforms in Mouse Central Nervous System. *J. Neurochem.* 72, 1707–1716. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.721707.x.
- 42) Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A. and Hardie, D.G., (1995). 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* 229, 558-565. doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20498.x.
- 43) Magnoni, L.J., Palstra, A.P., Planas, J.V., (2014). Fueling the engine: induction of AMP-activated protein kinase in trout skeletal muscle by swimming. *J. Exp. Biol.* 217, 1649–1652. <http://doi.org/10.1242/jeb.099192>.
- 44) Magnoni, L.J., Vraskou, Y., Palstra, A.P., Planas, J.V., (2012). AMP-activated protein

- kinase plays an important evolutionary conserved role in the regulation of glucose metabolism in fish skeletal muscle cells. *PLoS ONE* 7, e31219. doi: 10.1371/journal.pone.0031219.
- 45) Craig, P.M., Moon, T.W., (2011). Fasted zebrafish mimic genetic and physiological responses in mammals: a model for obesity and diabetes? *Zebrafish* 8, 109–117. <http://doi.org/10.1089/zeb.2011.0702>.
- 46) Polakof S, Panserat S, Craig PM, Martyres DJ, Plagnes-Juan E, Savari S, Aris-Brosou S, Moon, TW. (2011). The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout. *PLoS One* 6(5):e20228. doi: 10.1371/journal.pone.0020228.
- 47) Kahn, B.B., Alquier, T, Carling, D., Hardie, D.G, (2005). AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, 1, 15-25. doi: 10.1016/j.cmet.2004.12.003.
- 48) Callaghan, N.I., Tunnah, L., Currie, S., MacCormack, T.J., (2016). Metabolic adjustments to short-term diurnal temperature fluctuation in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol Biochem Zool.* 89, 498-510. doi: 10.1086/688680.
- 49)Schneeberger, M., & Claret, M. (2012). Recent Insights into the Role of Hypothalamic AMPK Signaling Cascade upon Metabolic Control. *Frontiers in Neuroscience*, 6(December), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00185>.
- 50) Peter J. Russell. (2009) *I Genetics: A Mentelian Approach* pg 543-545, 908-910.
- 51) Geoffrey M. Cooper, Robert E. Hausman. (2009) *The Cell: A molecular Approach* pg 435
- 52) Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB (June 2008). "Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites". *Science*. 320 (5883): 1643–7. doi: 10.1126/science.1155390.
- 53) Ghosh T, Soni K, Scaria V, Halimani M, Bhattacharjee C, Pillai (2008). "MicroRNA-mediated up-regulation of an alternatively polyadenylated variant of the mouse cytoplasmic {beta}-actin gene". *Nucleic Acids Research*. 36 (19): 6318–32. doi: 10.1093/nar/gkn624.
- 54) Gruber, A. R., Martin, G., Keller, W., & Zavolan, M. (2014). Means to an end: Mechanisms of alternative polyadenylation of messenger RNA precursors. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 5(2), 183–196. <https://doi.org/10.1002/wrna.1206>.
- 55) B. Akman, H., & E. Erson-Bensan, A. (2014). Alternative Polyadenylation and Its Impact on Cellular Processes. *MicroRNA*, 3(1), 2–9. <https://doi.org/10.2174/2211536602666131210001152>.
- 56) Edgar RC (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput". *Nucleic Acids Research*. 32 (5): 1792–97. doi:10.1093/nar/gkh340.
- 57) Pauletto, M., Manousaki, T., Ferrareso, S., Babbucci, M., Tsakogiannis, A., Louro, B., ... Bargelloni, L. (2018). Genomic analysis of *Sparus aurata* reveals the evolutionary dynamics of sex-biased genes in a sequential hermaphrodite fish. *Communications Biology*, 1(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0122-7>.
- 58) Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- 59) Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z (2002) Processing of gene expression data

- generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques* 32(6): 1372–1378.
- 60) Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- 61) Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- 62) Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42(2), 182–192. doi: 10.1093/sysbio/42.2.182.
- 63) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: research0034. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- 64) Ostertagova, E. (2016). Methodology and Application of One-Way ANOVA Methodology and Application of One-way ANOVA. *American Journal of Mechanical Engineering*, 1(7), 256–261. <https://doi.org/10.12691/ajme-1-7-21>.
- 65) <https://a-z-animals.com/reference/>.
- 66) Dehal P, Boore JL. (2005) Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *PLoS Biol.* 2005;3(10):e314. doi: 10.1371/journal.pbio.0030314.
- 67) Bartel, D. P (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- 68) Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. (2007) The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 113–126. doi: 10.1038/nrm2104.
- 69) Neve, J. et al. (2016) Subcellular RNA profiling links splicing and nuclear DICER1 to alternative cleavage and polyadenylation. *Genome Res.* 26, 24–35. doi: 10.1101/gr.193995.115.
- 70) Djebali, S. et al. (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108. doi: 10.1038/nature11233.
- 71) Spies, N., Burge, C. B. & Bartel, D. P. (2013) 3' UTR-isoform choice has limited influence on the stability and translational efficiency of most mRNAs in mouse fibroblasts. *Genome Res.* 23, 2078–2090. doi: 10.1101/gr.156919.113.
- 72) Floor, S. N. & Doudna, J. A. (2016) Tunable protein synthesis by transcript isoforms in human cells. *eLife* 5, e10921. doi: 10.7554/eLife.10921.
- 73) An, J. J. et al. (2008) Distinct role of long 3' UTR BDNF mRNA in spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal neurons. *Cell* 134, 175–187. doi: 10.1016/j.cell.2008.05.045.
- 74) Tian, B., & Manley, J. L. (2016). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 18. doi: 10.1038/nrm.2016.116.
- 75) Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-85>.

76) Li, Y., Sun, Y., Fu, Y., Li, M., Huang, G., Zhang, C., ... Xu, A. (2012). Dynamic landscape of tandem 3' UTRs during zebrafish development. *Genome Research*, 22(10), 1899–1906. <https://doi.org/10.1101/gr.128488.111>.

77) Ulitsky, I., Shkumatava, A., Jan, C. H., Subtelny, A. O., Koppstein, D., Bell, G. W., ... Bartel, D. P. (2012). Extensive alternative polyadenylation during zebrafish development. *Genome Research*, 22(10), 2054–2066. <https://doi.org/10.1101/gr.139733.112>.

78) Sarropoulou E, Power DMP, Mamuris Z, Moutou KA (2006) The two isoforms of myosin light chain 2 in gilthead sea bream (*Sparus aurata*); alternative polyadenylation site selection and tissue expression. *Arch Tierz Dumm* 49 (Special Issue):92–96. doi: 10.1007/s00441-015-2254-0.