



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ, ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ιστοειδική έκφραση των γονιδίων της β' και γ' υπομονάδας της AMPK (AMP-activated protein kinase) στο λαβράκι (*Dicentrarchus Labrax*)

Tissue specific expression of the genes encoding for beta and gamma subunits of AMPK (AMP-activated protein kinase) in sea bass (*Dicentrarchus Labrax*)



http://www.biopix.com/european-seabass-dicentrarchus-labrax_photo-74284.aspx

Κατριτζόγλου Αικατερίνη του Άνθιμου
Λάρισα 2020

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

Το λαβράκι αποτελεί ένα εκτρεφόμενο ψάρι της Μεσογείου με υψηλή διατροφική αξία και μεγάλη εμπορική ζήτηση. Για αυτόν τον λόγο, η κατανόηση των διαδικασιών ανάπτυξης και αύξησης του οργανισμού είναι αναγκαία για τη βελτιστοποίηση και την αύξηση της εκτροφής του. Το ένζυμο της AMP- εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK), αποτελεί έναν κύριο ενεργειακό αισθητήρα όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων. Θεωρείται ένζυμο-κλειδί του μεταβολισμού και μπορεί να ενεργοποιηθεί 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 στο υδάτινο περιβάλλον.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η μελέτη των γονιδίων των ρυθμιστικών υπομονάδων β' και γ' της AMPK και η αποτύπωση της εικόνας της ιστοειδικής τους έκφρασης. Οι υπομονάδες αυτές διαθέτουν ζεύγη παραλόγων που προέκυψαν από το τον τρίτο γύρο γονιδιακού διπλασιασμού στους τελεόστεους. Έτσι στην εργασία αυτή διερευνήθηκαν τόσο οι λειτουργικές σχέσεις μεταξύ παραλόγων όσο και η σύγκριση της ιστοειδικής τους έκφρασης με αυτή άλλων οργανισμών που έχουν ήδη μελετηθεί.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προέκυψε ότι η δομή της κινάσης AMPK διαφοροποιείται ανάλογα με τον ιστό έκφρασης και συγκεκριμένα το ρόλο που διαδραματίζει ο ιστός σε μεταβολικές διεργασίες του οργανισμού. Υψηλή έκφραση των μεταγράφων της AMPK στα δείγματα λαβρακιού παρατηρήθηκε στους ιστούς του ήπατος, του εντέρου, του παγκρέατος και των ενδοκρινών αδένων. Τέλος, ενισχύθηκε η θέση ότι η σχέση μεταξύ παραλόγων γονιδίων μπορεί να είναι συνεργική εντός του ίδιου ιστού και ότι πιθανώς μεταβάλλεται με την αλλαγή αναπτυξιακού σταδίου του οργανισμού.

Abstract

European sea bass is a Mediterranean farmed fish of high nutritional value and commercial demand. Understanding the developmental and growth processes of this organism, is instrumental for optimizing the farming practices and ensuring increasing growth of production. The enzyme AMP-dependent protein kinase (AMPK) is a major energy sensor of all eukaryotic cells. It is activated by many stimuli, mainly through the reduction of intracellular ATP. Its action aims to restore 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 many modes of action remain to be revealed. The important role of the enzyme has also been suggested in fish, especially during the intense metabolic tests they face in the aquatic environment.

The aim of this thesis is to study the genes encoding the regulatory subunits b' and c' of AMPK and to reveal their tissue specific expression patterns. These subunits have pairs of paralog genes that resulted from the third round of gene duplication in teleosts. Thus, this research aimed to study both the functional relationship between paralogs and compare their tissue specific expression with that of other organisms.

The results showed that the structure of AMPK kinase may vary depending on the tissue of expression and, specifically, the role this tissue plays in metabolic processes in the body. High expression of AMPK transcripts in seabass samples were observed in the liver, intestine, pancreas, and endocrine glands. Finally, the results strongly suggest that the relationship between paralog genes may be synergistic within the same tissue and that it may differ depending on the developmental stage of the organism.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή

1.1 Λαβράκι (*Dicentrarchus Labrax*)

1.1.2 Ανάπτυξη, ωρίμανση και αναπαραγωγή

1.1.3 Μυογένεση στους τελεοστέους

1.1.4 Λιπογένεση τους τελεοστέους

1.2. AMP-activated protein kinase (AMPK)

1.2.1 Λειτουργικός ρόλος και δομή

1.2.2 Μηχανισμοί ενεργοποίησης AMPK

1.2.3 Ρόλος AMPK στον λιπώδη ιστό

1.2.4 Ρόλος AMPK στον μυ

1.2.5 Ρόλος AMPK στους ιχθύες

1.3 **Ανίχνευση θρεπτικών ουσιών (nutrient sensing) στους ιχθύες**

1.4 **Ιστοειδική έκφραση της AMPK**

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 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα της Real Time PCR στους ιστούς του λαβρακιού

3.2 Σχετική ιστοειδική έκφραση των παραλόγων γονιδίων της β' και γ' υπομονάδας της AMPK

4. Συζήτηση

Βιβλιογραφία

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Λαβράκι (*Dicentrarchus Labrax*)

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) είναι ένα ψάρι που ανήκει στην οικογένεια των Μορονίδων (Πίνακας 1), απαντάται κυρίως στη Μεσόγειο και μαζί με την τσιπούρα θεωρείται περιζήτητο λόγω της υψηλής διατροφικής του αξίας. Το λαβράκι είναι ένα είδος ωκεανόδρομο και πέρα από τη Μεσόγειο, απαντάται στη Μαύρη Θάλασσα και στον Ατλαντικό από τη Νορβηγία μέχρι τη Σενεγάλη (Εικόνα 1) [1]. Ζει σε παραλιακά ύδατα, σε βάθος μέχρι 100 μέτρων. Είναι ψάρια ευρύαλο και ευρύθερμο, αντέχει δηλαδή σε μεγάλες μεταβολές αλατότητας και θερμοκρασίας του νερού. Είναι κυρίως ψάρι της ανοικτής θάλασσας, αλλά πλησιάζει σε υφάλμυρα και γλυκά νερά, όπως σε λιμνοθάλασσες και εκβολές ποταμών. Θεωρείται ότι έχει καλή όραση και βλέπει καθαρά και στο σκοτάδι, ώρα στην οποία κυνηγάει. Τρέφεται αδηφάγα κυρίως με άλλα ψάρια, ενώ τα μικρότερα ψάρια του είδους περισσότερο με ασπόνδυλα, όπως μαλάκια και γαρίδες [2].



Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή λαβρακιού (<https://www.iucnredlist.org/species/135606/4159287>)

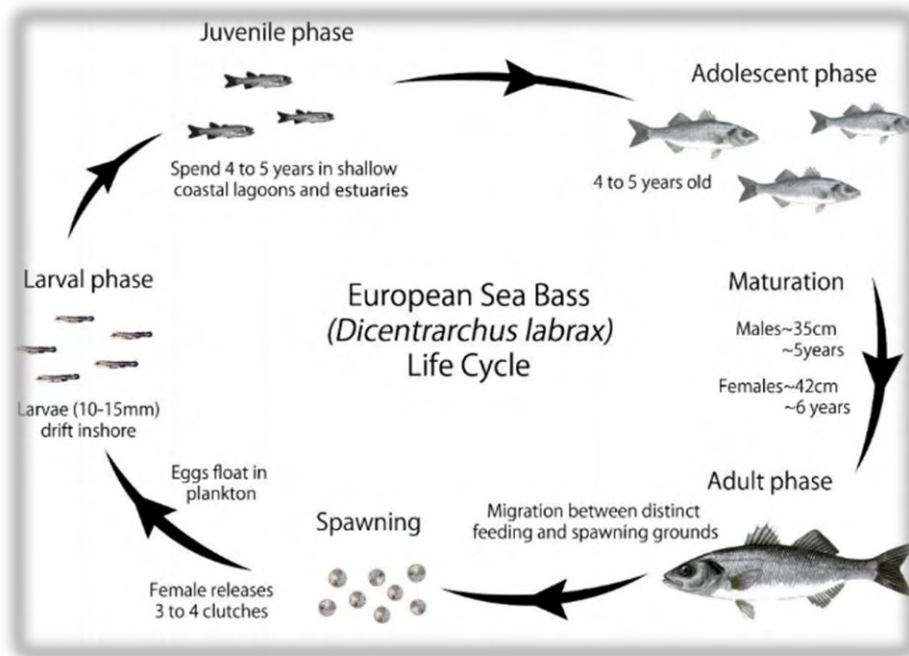
Το λαβράκι έχει σύνηθες μήκος 40 με 65 εκατοστά και βάρος 5 με 7 κιλά, ενώ μπορεί να φτάσει σε μήκος το ένα μέτρο και βάρος τα 15 κιλά. Έχει καταγραφεί ότι μπορεί να ζήσει μέχρι 15 χρόνια. Το σώμα του είναι επιμήκες. Το όνομα δικέντραρχος έχει να κάνει με την παρουσία δύο ραχιαίων πτερυγίων, το πρόσθιο τριγωνικό και το οπίσθιο τραπεζοειδές. Έχει ασημί χρώμα, ενώ τα μικρά ιχθύδια φέρουν μαύρα στίγματα σε πλάτη και πλευρά [2,3].

Πίνακας 1: Ταξινόμηση κατάταξη της λαβρακιού (Linnaeus, 1758)

<u>Συστηματική ταξινόμηση</u>	
<u>Βασίλειο:</u>	<u>Ζώα</u> (<i>Animalia</i>)
<u>Φύλο:</u>	<u>Χορδωτά</u> (<i>Chordate</i>)
<u>Υπόφυλο:</u>	<u>Σπονδυλωτά</u> (<i>Vertebrates</i>)
<u>Υπερομοταξία:</u>	<u>Γναθοστόματα</u> (<i>Gnathostomata</i>)
<u>Ομοταξία:</u>	<u>Ακτινοπτερύγια</u> (<i>Actinopterygii</i>)
<u>Υφομοταξία:</u>	<u>Τελεόστεοι</u> (<i>Teleosts</i>)
<u>Τάξη:</u>	<u>Περκόμορφα</u> (<i>Perciformes</i>)
<u>Οικογένεια:</u>	<u>Μορονίδες</u> (<i>Moronidae</i>)
<u>Γένος:</u>	<u>Δικέντραρχος</u> (<i>Dicentrarchus</i>)
<u>Είδος:</u>	<i>D. labrax</i>

1.1.2 Ανάπτυξη, ωρίμανση και αναπαραγωγή

Ο κύκλος ζωής του λαβρακιού μπορεί να χωριστεί σε πέντε ευρείες φάσεις: αυγά (eggs), προνύμφες (larvae), ιχθύδια (juvenile), νεαρά (adolescent) και ενήλικες (adults) [58]. Το λαβράκι φτάνει στην πλήρη ωριμότητα μεταξύ 4 και 7 ετών (το μήκος του κυμαίνεται 35 και 42 cm) και μπορεί να συνεχίσει να αναπαράγεται μέχρι και για 20 χρόνια (Εικόνα 2) [59]. Εισέρχεται στο νεανικό στάδιο, γίνεται δηλαδή ιχθύδιο, περίπου 2 μήνες μετά την γονιμοποίηση. Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού οι προνύμφες παραμένουν στο πλαγκτόν και μεταφέρονται σε παράκτια ενδιαίτηματα από ρεύματα όπως σε εκβολές ποταμών και ρηχά παράκτια ύδατα όπου φθάνουν σε συνολικό μήκος περίπου 10 - 15 mm [4].



1) **Εικόνα 2: Κύκλος ζωής του λαβρακιού** (Abi Carroll (2014), Population Dynamics of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Welsh Waters) [4]

Η ζωή αρχίζει με την σύντηξη αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Μόλις γονιμοποιηθεί το ωάριο από ένα σπερματοζωάριο, σχηματίζεται το ζυγωτό και αρχίζει η εμβρυϊκή ανάπτυξη η οποία τελειώνει με την εκκόλαψη.

Το εμβρυϊκό στάδιο περιλαμβάνει την περίοδο από τη γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη των αυγών. Τα αυγά των ωοτόκων θαλάσσιων ψαριών είναι τελολεκιθικά με μεροβλαστικές αυλακώσεις. Περιβάλλονται από το χόριο, έχουν μικρό περιλεκιθικό χώρο (χώρος μεταξύ γονιμοποιημένου ωαρίου και χορίου) και συνήθως φέρουν μία ή περισσότερες σταγόνες λιπιδίων.

Το προνυμφικό στάδιο περιλαμβάνει την οντογενετική περίοδο από την εκκόλαψη μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης των προνυμφών σε ιχθύδια. Διακρίνεται σε επιμέρους φάσεις: α) Οι λεκιθοφόρες προνύμφες (από την εκκόλαψη μέχρι την έναρξη της διατροφής), β) οι εξωγενώς τρεφόμενες προνύμφες, και γ) η φάση μεταμόρφωσης της προνύμφης (από το στάδιο σχηματισμού όλων των πτερυγίων συνήθως μέχρι την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των λεπιών και του χρωματισμού του σώματος). Κατά την εκκόλαψη οι προνύμφες έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και στηρίζονται για την ανάπτυξή τους στα μητρικής προέλευσης λεκιθικά αποθέματα. Οι οφθαλμοί είναι άχρωμοι και μη λειτουργικοί και το στόμα κλειστό. Το μοναδικό πτερύγιο που έχουν οι λεκιθοφόρες προνύμφες είναι η πρωτογενής περιφερειακή πτερυγιοπτυχή. Με την πρόοδο της ανάπτυξης το μήκος του σώματος αυξάνεται, τα λεκιθικά

αποθέματα και η σταγόνα λιπιδίων καταναλώνονται και τα κύτταρα χρωματισμού μεταναστεύουν και αλλάζουν σε αριθμό. Ακόμη, οι οφθαλμοί γίνονται λειτουργικοί και τα ζεύγη των νευρομαστών καθώς και οι πτυχές των θωρακικών πτερυγίων, το στομάχι, το ήπαρ, το έντερο και το στόμα σχηματίζονται. Στο τέλος του προνυμφικού σταδίου, τα λεκιθικά αποθέματα έχουν καταναλωθεί πλήρως και τα άτομα είναι έτοιμα να περάσουν στην εξωγενή διατροφή. Αντίθετα, η σταγόνα λιπιδίων δεν έχει καταναλωθεί πλήρως και είναι αυτή που θα στηρίξει τη θρέψη των νυμφών κατά τις πρώτες ημέρες διατροφής.

Μετά την κατανάλωση των λεκιθικών αποθεμάτων, το στάδιο του ιχθυδίου χαρακτηρίζεται από την εξωγενή θρέψη και την ταυτόχρονη αύξηση και ανάπτυξη. Περιλαμβάνει τη διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος μέσω της αλλομετρικής αύξησης, την ηθολογική διαφοροποίηση, την εξέλιξη του χρωματισμού αλλά και την ανάπτυξη της νηκτικής κύστης, των βραγχίων, των πτερυγίων, των λεπιών και όλων των λειτουργικών συστημάτων του οργανισμού (πεπτικό, μυϊκό, σκελετικό, νευρικό, κλπ). Η διάρκεια του σταδίου εξαρτάται από το είδος, τη θερμοκρασία την αφθονία και την ποιότητα της τροφής, τον ενδοειδικό ανταγωνισμό, την ποιότητα του νερού και τη συγκέντρωση του οξυγόνου. Στο στάδιο του ιχθυδίου, τα διάφορα οντογενετικά γεγονότα δεν πραγματοποιούνται σε σταθερή ηλικία (ακόμη και στην ίδια θερμοκρασία), αλλά σε σταθερό, λίγο ως πολύ, μέγεθος σώματος (στενή σύνδεση της αύξησης με τη διαφοροποίηση) [5,6].

Ανάμεσα στα στάδια των προνυμφών και των ιχθυδίων, υπάρχει ένα μεταβατικό στάδιο. Μορφολογικά το στάδιο μετασχηματισμού χαρακτηρίζεται από μια αλλαγή στη μορφή του σώματος των προνυμφών σε νεανική μορφή ενήλικου σώματος. Στο τέλος αυτού του σταδίου τα ψάρια γενικά μοιάζουν με τα ενήλικα, με μεγάλες διαφορές μόνο στα μοτίβα χρωματισμού.

Τα ενήλικα λαβράκια αναπαράγονται σεξουαλικά με εξωτερική γονιμοποίηση. Η αναπαραγωγική περίοδος διαρκεί από τον Φεβρουάριο μέχρι τον Ιούλιο. Η θερμοκρασία αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα για τη χρονική έναρξη και τη θέση πραγματοποίησης της ωοτοκίας επειδή τα αυγά λαβρακιού σπάνια βρίσκονται εκεί όπου το νερό είναι ψυχρότερο από 8,5-9,0 °C ή σε νερό θερμότερο από 15 °C . Κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας, κάθε ώριμο ενήλικο θηλυκό μπορεί να παράγει μεταξύ ενός τετάρτου και μισού εκατομμυρίου αυγών ανά κιλό σωματικού βάρους. Το γονιμοποιημένο ωάριο λαβρακιού είναι πλακτονικό και εκκολάπτεται μεταξύ 4 και 9 ημερών μετά τη γονιμοποίηση, ανάλογα με τη θερμοκρασία της θάλασσας. Κατά τους επόμενους 2-3 μήνες, οι αναπτυσσόμενες προνύμφες μετακινούνται από την ανοιχτή θάλασσα προς την ακτή και τελικά σε κολπίσκους, καταρράκτες και εκβολές ποταμών. Αυτά τα προστατευόμενα ενδιαίτηματα χρησιμοποιούνται από το νεαρό λαβράκι για τα επόμενα 4-5 χρόνια, πριν ωριμάσουν και υιοθετήσουν τις μεταναστευτικές κινήσεις των ενηλίκων [8] .

1.1.3 Μυογένεση στους τελεοστέους

Ο μυϊκός ιστός στους τελεοστέους πρωτοεμφανίζεται στην πρώιμη εμβρυϊκή ζωή και η ανάπτυξή του καθοδηγείται από παράγοντες που προϋπάρχουν στο αυγό και ρυθμίζονται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας και του οξυγόνου. Η μυογένεση ξεκινά σε πιο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης στα έμβρυα ψαριών απ' ότι στα αμνιωτά, όπως σε πτηνά και θηλαστικά. Αυτό πιθανότατα αντανακλά την απαίτηση για προώθηση κολύμβησης πιο νωρίς και συσχετίζεται με την εξωτερική γονιμοποίηση στα ψάρια. Σε κάθε περίπτωση περιλαμβάνει τέσσερα στάδια: πολλαπλασιασμό μυοβλαστών, μετανάστευση, σύντηξη και τελική διαφοροποίηση.

Η εμβρυϊκή μυϊκή μάζα αναπτύσσεται σε κυτταρικά "διαμερίσματα" που ονομάζονται σωματίτες, τα οποία βρίσκονται σε ζεύγη κατά μήκος του άξονα του σώματος και χωρίζονται από τη νωτοχορδή και το νευρικό σωλήνα. Τα κύτταρα των σωματιών διαφοροποιούνται στο μυοτόμιο με τέσσερις κύριους τύπους μυϊκών ινών που είναι αναγνωρίσιμοι σε έμβρυα zebrafish ως: muscle pioneers, slow muscle, fast muscle and medial fast muscle. Η τελική διαφοροποίηση των κυττάρων σε κάθε μία από αυτές τις σειρές εξαρτάται από μέλη μιας οικογένειας κύριων μεταγραφικών παραγόντων για τη μυογένεση σπονδυλωτών που ονομάζονται MRFs (myogenic regulatory factors, myoD, myf5, mrf4) [62]. Ένας τέταρτος MRF που ονομάζεται μυογενίνη λειτουργεί σε συνδυασμό με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του myoD για τη διατήρηση της διαφοροποίησης και την επαγωγή γονιδίων που σχετίζονται με την μυϊκή ανάπτυξη. [10]

Η πρώτη φάση της ανάπτυξης του μυϊκού συστήματος στους τελεοστέους αρχίζει με την έκφραση των MRFs από τα κύτταρα στο τέλος της γαστριδίωσης, 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 μυογενετικών κυττάρων (MPC). Από αυτά προκύπτουν οι εμβρυϊκές μυϊκές ίνες που θα χρησιμοποιηθούν μετά την εκκόλαψη, όσο και ένας πληθυσμός αδιαφοροποίητων μυοβλαστών από τους οποίους θα προέλθουν όλες οι υπόλοιπες μυϊκές ίνες. Δεύτερη φάση είναι η στρωματοποιημένη υπερπλασία η οποία παρατηρείται κυρίως στην προνύμφη μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου. 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 μετά τη μεταμόρφωση, και διαρκεί για όλη την ενήλικη ζωή του ψαριού. Τα πρώιμα μυογενετικά κύτταρα (MPCs) είτε συγχωνεύονται μεταξύ τους και σχηματίζουν νέες μυϊκές ίνες ή 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 επειδή 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 [9,11].

Πολλά γονίδια που ρυθμίζουν τη μυϊκή αύξηση βρίσκονται σε πολλαπλά αντίγραφα ως συνέπεια της διατήρησης παραλόγων τα οποία προκύπτουν από το διπλασιασμό ολόκληρου του γονιδιώματος (whole genome duplication). Ο διπλασιασμός αυτός είναι ένα γεγονός που δημιουργεί έναν οργανισμό με επιπλέον αντίγραφα ολόκληρου του γονιδιώματος του είδους του. Τα σωματικά κύτταρα των περισσότερων οργανισμών που αναπαράγονται σεξουαλικά περιέχουν δύο αντίγραφα ολόκληρου του γονιδιώματός τους (1R), ένα από τα οποία κληρονομείται από κάθε γονέα, μια κατάσταση γνωστή ως διπλοειδία. Το whole genome duplication (WGD) μπορεί να προκύψει από έναν οργανισμό που κληρονόμησε δύο αντίγραφα του γονιδιώματός του από κάθε γονέα (σύνολο τεσσάρων αντιγράφων) (2R). Η αναπαραγωγή ενός γονιδίου οδηγεί σε δύο θυγατρικά γονίδια, που ονομάζονται παράλογα (προκύπτουν δηλαδή από ένα γεγονός διπλασιασμού εντός του γονιδιώματος, ανεξάρτητως του μηχανισμού) [16].

Οι πρώιμοι 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. Επιπλέον, ένας τρίτος γύρος διπλασιασμού (3R) έλαβε χώρα στους τελεοστέους. 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 τελεοστέους. Επιπρόσθετα του whole genome duplication στη βάση εξέλιξης των τελεοστέων, έλαβαν μέρος και πιο πρόσφατοι διπλασιασμοί γονιδιώματος που διαμόρφωσαν την εξέλιξη των ψαριών. WGD γεγονότα έχουν πραγματοποιηθεί στα σαλμονοειδή όσο και στις κυπρινίδες [18,19].

1.1.4 Λιπογένεση τους τελεοστέους

Λιπώδης ιστός (Adipose Tissue, AT) ονομάζεται ο χαλαρός συνδετικός ιστός που αποτελείται από λιποκύτταρα. Στα ψάρια, ο λιπώδης ιστός αποτελείται από λευκά λιποκύτταρα σε αντίθεση με τα θηλαστικά στα οποία αποτελείται και από φαιό λιπώδη ιστό (BAT) και 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 που 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) [12,13].

Ο ιστός αυτός συμμετέχει στην ομοιοστάση ολόκληρου του οργανισμού μέσω: (i) της ρύθμισης της ανανέωσης των λιποκυττάρων, (ii) της έκκρισης κυτοκινών [π.χ. αδιπονεκτίνη, λεπτίνη, παράγοντα νέκρωσης όγκων α (TNF α)] οι οποίες έχουν ενδοκρινή λειτουργία και δρουν στο κεντρικό νευρικό σύστημα (CNS) και στους περιφερειακούς ιστούς για τη ρύθμιση διαδικασιών όπως η όρεξη, η ομοιοστάση της γλυκόζης και ο μεταβολισμός των λιπιδίων. Οι τελοστέοι συσσωρεύουν λιπίδια, κυρίως με τη μορφή τριγλυκεριδίων (TG), σε διαφορετικές θέσεις (σπλαχνικά όργανα, ήπαρ, υποδόριο ιστό, κόκκινο και λευκό μυ, εγκέφαλος, πάγκρεας, οισοφάγος). Επιπλέον στους τελοστέους, ο λιπώδης ιστός συμβάλλει, ως πηγή μεταβολικής ενέργειας, στην αύξηση, στην αναπαραγωγή, και στην ανάπτυξη του λεκιθικού σάκου της προνύμφης καθώς και στο κολύμπι [14]. 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 από άλλες μη λιπώδεις πηγές προγεννητικών κυττάρων, όπως το αιμοποιητικό στέλεχος του μυελού των οστών [15]. Μετά τη δημιουργία ενός πρώιμου λιποκυττάρου από τα βλαστοκύτταρα του λιπώδους ιστού είναι αναγκαία η ωρίμανση του. Η διαφοροποίηση αυτή γίνεται σταδιακά και η ενεργοποίηση ποικίλων μεταγραφικών παραγόντων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο. Ο λιπώδης ιστός συμβάλλει σημαντικά στη ρύθμιση του λιπιδιακού μεταβολισμού για τους εξής λόγους. Πρώτον, τα ώριμα λιποκύτταρα χρησιμεύουν ως αποθέματα ενέργειας διότι κατά τη διαδικασία της λιπογένεσης χρησιμοποιούν λιπαρά οξέα (FAs) ή άλλα υποστρώματα (π.χ. γλυκόζη ή αμινοξέα) που προέρχονται από την τροφή του ψαριού και τα μετατρέπουν σε τριγλυκερίδια (TG) για μακροχρόνια αποθήκευση. Δεύτερον, κατά τη διάρκεια περιόδων υψηλότερων ενεργειακών απαιτήσεων, τα λιποκύτταρα διασπούν τα τριγλυκερίδια σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη (λιπόλυση), τα οποία στη συνέχεια μπορούν να απελευθερωθούν στο αίμα. Ένας τρίτος τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται τα λιπίδια στον ιστό, αν και λιγότερης σημασίας, είναι η οξειδωση τους για την παροχή ενέργειας στα μιτοχόνδρια. Αυτές οι διαδικασίες λιπογένεσης, λιπόλυσης και β-οξειδωσης ρυθμίζονται από διάφορες ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες, με τη συμμετοχή πολλών ενζύμων και παραγόντων που συμμετέχουν στη μεταγραφή. Κατά τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων στα ψάρια, η έκφραση και η δραστηριότητα αυτών των ενζύμων αυξάνεται ως μέρος της διαδικασίας της ωρίμανσης τους [14].

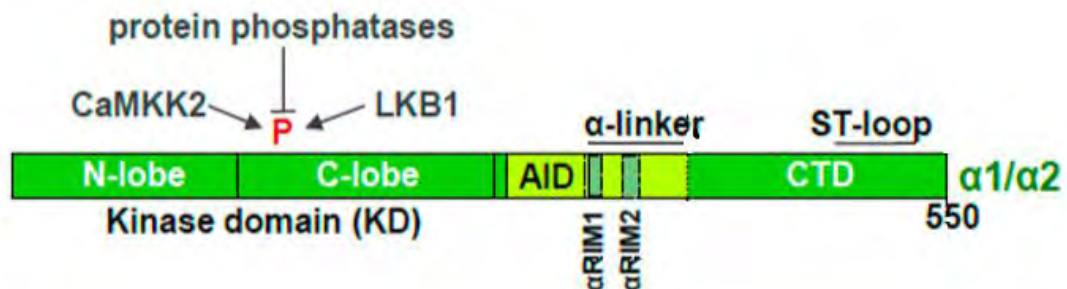
1.2 AMP-activated protein kinase (AMPK)

1.2.1 Λειτουργικός ρόλος και δομή

Ένας από τους κύριους ρυθμιστές του μεταβολισμού τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού στους ευκαρυώτες είναι η πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από το AMP (AMPK). Θα μπορούσε να παρομοιαστεί με έναν ενεργειακό αισθητήρα που ενεργοποιείται όταν τα επίπεδα ATP στο εσωτερικό του κυττάρου είναι χαμηλά. Η AMPK είναι πολύ καλά συντηρημένη πρωτεΐνη που απαντάται σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, γεγονός που αποτελεί και ένδειξη για την ύπαρξη της από την απαρχή της εξελικτικής τους πορείας. Η απόκριση της στα ενεργειακά επίπεδα του κυττάρου έχει ως αποτέλεσμα την προώθηση καταβολικών σηματοδοτικών μονοπατιών που θα οδηγήσουν στην παραγωγή περισσότερου ATP, και την παρεμπόδιση αναβολικών μονοπατιών [20].

Η AMPK είναι ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο που περιλαμβάνει μία καταλυτική υπομονάδα, την α υπομονάδα, και δύο ρυθμιστικές υπομονάδες, β και γ. Η κλωνοποίηση των cDNA που κωδικοποιούν τις τρεις αυτές υπομονάδες στα τρωκτικά και στον άνθρωπο έδειξε ότι υπάρχουν πολλαπλές ισομορφές κάθε υπομονάδας (AMPK-α1 / -α2, AMPK-β1 / -β2 και AMPK-γ1 / -γ2 / -γ3) (46). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις α, β και γ υπομονάδες μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν σε γονιδιωματικές αλληλουχίες σχεδόν όλων των ευκαρυωτών, συμπεριλαμβανομένων των πρωτίστων, των μυκήτων και των φυτών καθώς και των ζώων [21].

Η α υπομονάδα περιέχει i) μία περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης (KD), η οποία φωσφορυλιώνεται από άλλες κινάσες ρυθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την ενεργότητα του ενζύμου, ii) μία περιοχή αυτοαναστολής (AID), iii) μία περιοχή που ονομάζεται α-linker η οποία δρα σαν αισθητήρας αδενινικών νουκλεοτιδίων, και iv) 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 (Εικόνα 3) [22,23].



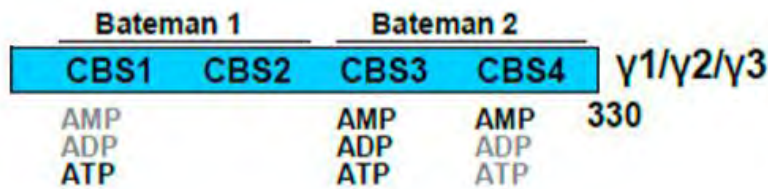
Εικόνα 3: Δομή της α' υπομονάδας της AMPK. Με πράσινο απεικονίζεται η υπομονάδα α, που αποτελείται από μία περιοχή κινάσης σερίνης/θρεονίνης (KD), μία περιοχή αυτοαναστολής (AID), μία περιοχή α-linker, και μία καρβοξυτελική περιοχή (α-CTD) πάνω στην οποία υπάρχει μια περιοχή ST-loop [26].

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 [24]. Διαθέτει i) ένα καρβοξυτελικό άκρο (β-CTD) που λειτουργεί ως συνδέτης καθώς αλληλεπιδρά τόσο με την γ υπομονάδα όσο και με το α-CTD, και ii) μία περιοχή β-linker loop που συνδέει το CBM με το β-CTD (Εικόνα 4). 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 [25]. Στα περισσότερα σπονδυλωτά αποτελείται από δύο συντηρημένα παράλογα (β1,β2), αλλά στους τελεοστέους υπάρχουν δύο παράλογα της AMPKβ1, τα β1a και β1b τα οποία προέρχονται από τον 3^ο γύρο διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος. Θεωρείται αρκετά συντηρημένη, ωστόσο, υπάρχουν αρκετές διαφορές μεταξύ των οργανισμών [17].



Εικόνα 4: Δομή της β' υπομονάδας της AMPK. 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 [26].

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 (Εικόνα 5). 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 [26]. 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 τελεόστειοι έχουν αντίγραφα τόσο για την γ3 (γ3a, γ3b) όσο και για την γ2 (γ2a,γ2b) με αποτέλεσμα την ύπαρξη 5 παραλόγων σε αυτή την γενεαλογία [27]. Οι λειτουργικές διαφορές μεταξύ των παραλόγων δεν είναι ακόμα κατανοητές, αλλά φαίνεται ότι ρυθμίζουν την υποκυτταρική τοποθέτηση του ενζύμου και προσδίδουν διαφορετικούς στόχους φωσφορυλίωσης και διαφορετικό βαθμό ενεργοποίησης από τα αδενικά νουκλεοτίδια [17].



Εικόνα 5: Δομή της γ' υπομονάδας της AMPK. Με μπλε απεικονίζεται η γ υπομονάδα που αποτελείται από τέσσερις θέσεις πρόσδεσης αδενινικών νουκλεοτιδίων {β-συνθάση της κυσταθειόνης (CBS)} [26] .

1.2.2 Μηχανισμοί ενεργοποίησης AMPK

Όπως υποδηλώνει το όνομα της, η δραστηριότητα της AMPK ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση του AMP. Δεδομένου ότι κάθε κατάσταση δέσμευσης AMP ανταγωνίζεται με τη δέσμευση ATP, θεωρείται ότι το ένζυμο ρυθμίζεται από τον λόγο AMP/ATP. Μια υψηλή αναλογία οδηγεί σε υψηλή δραστηριότητα AMPK. Το AMP ρυθμίζει τη δραστηριότητα του ενζύμου με πολλαπλούς μηχανισμούς, τόσο αλλοστερικούς όσο και ομοιοπολικούς [17].

Σε όλα τα είδη, η AMPK ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση ενός συντηρημένου κατάλοιπου θρεονίνης εντός του "βρόγχου ενεργοποίησης" της περιοχής κινάσης στην α υπομονάδα. Αυτή η κρίσιμη θέση φωσφορυλίωσης αναφέρεται συνήθως ως Thr172 λόγω της θέσης της στις αλληλουχίες της καταλυτικής υπομονάδας του αρουραίου. Η φωσφορυλίωση του Thr172 καταλύεται κατά κύριο λόγο από ένα ετεροτριμερές σύμπλοκο που περιέχει την πρωτεϊνική κινάση LKB1. Το κατάλοιπο Thr172 μπορεί επίσης να φωσφορυλιώνεται από την εξαρτώμενη από την καλμοδουλίνη κινάση, CaMKKβ. Αυτό υποδεικνύει έναν εναλλακτικό μηχανισμό μέσω του οποίου η AMPK μπορεί να ενεργοποιηθεί από αυξήσεις στο ενδοκυτταρικό Ca²⁺ απουσία οποιονδήποτε αλλαγών στα νουκλεοτίδια αδενίνης. Ωστόσο, αν τα δύο σήματα ενεργοποίησης (AMP και Ca²⁺) είναι αυξημένα μπορούν να δράσουν συνεργικά (Εικόνα 6).

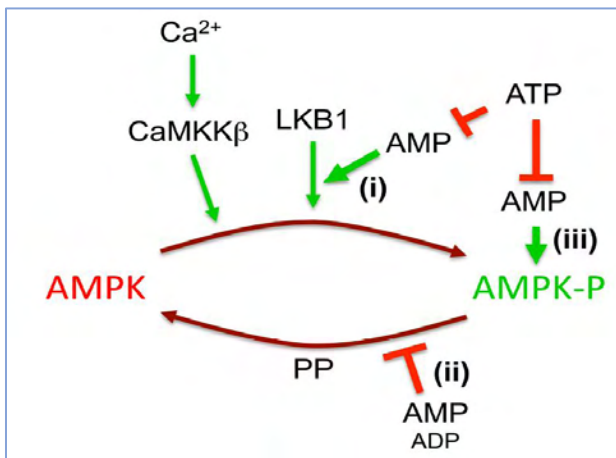
Σε αντίθεση με τη CaMKKβ, η κινάση LKB1 φαίνεται να είναι ιδιοσυστάτα ενεργή [145]. Ωστόσο, η αύξηση του AMP όχι μόνο προκαλεί αλλοστερική ενεργοποίηση της AMPK αλλά προάγει τη φωσφορυλίωση του κατάλοιπου Thr172 από την LKB1. Αυτό δεν επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της LKB1 (ή με αναστολή πρωτεϊνικών φωσφατάσων) αλλά με δέσμευση AMP στην υπομονάδα γ της AMPK, προκαλώντας μεταβολές της διαμόρφωσης της, που τροποποιούν την κατάσταση φωσφορυλίωσης του Thr172 στην α υπομονάδα [28].

Συνοψίζοντας, η πρόσδεση του AMP στη γ υπομονάδα ενεργοποιεί την AMPK με τρεις ξεχωριστούς μηχανισμούς (Εικόνα 6):

- 1) Προώθηση φωσφορυλίωσης του βρόγχου ενεργοποίησης στο κατάλοιπο T172 (φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο θρεονίνης 172) από άλλες κινάσες (π.χ. CaMKK2, LKB1)
- 2) Προστασία έναντι αποφωσφορυλίωσης του βρόγχου ενεργοποίησης στο κατάλοιπο T172 από πρωτεϊνικές φωσφατάσες (PP) (π.χ. PP2A, PP2C)

3) Αλλοστερική, ανεξάρτητη από φωσφορυλίωση, ενεργοποίηση της κινάσης [29].

Αυτές οι τρεις επιδράσεις της δέσμευσης του AMP (ή ADP) στις υπομονάδες AMPK-γ, ανταγωνίζονται με την πρόσδεση ATP και δρουν με τρόπο ώστε να παράσχουν έναν πολύ ευαίσθητο μηχανισμό για ενεργοποίηση AMP σε απόκριση μικρών αυξήσεων της αναλογίας AMP:ATP (ή ADP: ATP) στο κύτταρο.



Εικόνα 6: 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+} [31].

Μετά την ενεργοποίηση, η AMPK φωσφορυλιώνει πάνω από 60 καθοδικούς στόχους, άμεσα ή 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, της 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) [30].

1.2.3 Ρόλος AMPK στον λιπώδη ιστό

Ο λιπώδης ιστός θεωρούνταν εδώ και δεκαετίες απλώς ως όργανο αποθήκευσης ενέργειας, ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αναδειχθεί ο ενεργός ενδοκρινικός του ρόλος. Τα λιποκύτταρα εκκρίνουν πρωτεΐνες, γνωστές ως αδιποκίνες, που μετέχουν στη ρύθμιση της όρεξης και του μεταβολισμού. Η AMPK ρυθμίζει τόσο τη λιπογένεση όσο και τη λιπόλυση στον λιπώδη ιστό [32]. Αρχικά η AMPK “ανακαλύφθηκε” ως κινάση που φωσφορυλιώνει τα κρίσιμα για τον λιπιδιακό μεταβολισμό ένζυμα: καρβοξυλάσες του ακετύλου συνενζύμου α (ACC1 & ACC2) και την αναγωγάση του 3-υδροξυ-3-μεθυλογλουταρυλο-CoA (HMG-CoA reductase), που συμμετέχουν στη σύνθεση λιπαρών οξέων και στερολών σε ευρεία ποικιλία ευκαρυωτικών οργανισμών .

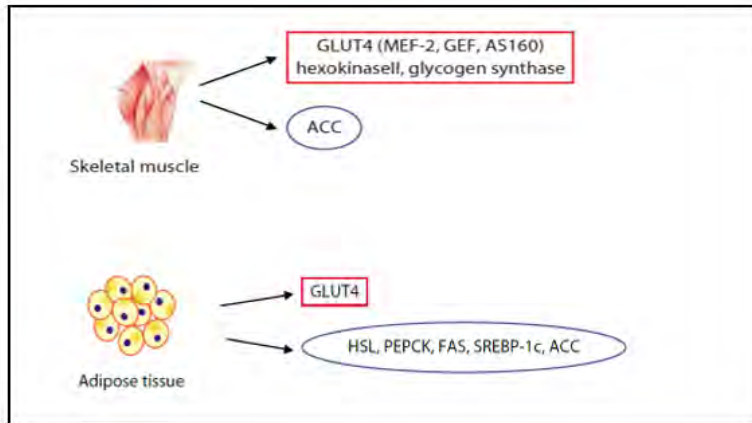
Επίσης, στον λιπώδη ιστό, η AMPK φωσφορυλιώνει άμεσα λιπάσες, συμπεριλαμβανομένων της HSL (hormone sensitive lipase) και της ATGL (adipocyte triglyceride lipase). Ο Srebp1 είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που επιδρά στον λιπώδη ιστό και επάγει ένα γονιδιακό μονοπάτι το οποίο έχει ως στόχους τα γονίδια ACC1 και FASN που διεγείρουν τη σύνθεση λιπαρών οξέων στα κύτταρα. Ο Srebp1 πέρα από ότι είναι ένας κρίσιμος ρυθμιστής των λιπιδίων στο ήπαρ και σε άλλους μεταβολικούς ιστούς, αποτελεί και ρυθμιστή της κυτταρικής διαίρεσης. Η AMPK βρέθηκε πρόσφατα να φωσφορυλιώνει ένα καλά διατηρημένο κατάλοιπο σερίνης εντός του Srebp1, καταστέλλοντας την ενεργοποίησή του [20].

Κατά τη διάρκεια της νηστείας, η λιπόλυση ενεργοποιείται στον λιπώδη ιστό προκειμένου να παρέχει λιπαρά οξέα και γλυκερόλη ως καύσιμα για περιφερειακούς ιστούς. Παρόλα αυτά, οι αναφορές για την επίδραση της ενεργοποίησης AMPK στη λιπόλυση φαίνεται να είναι αντιφατικές. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ενεργοποίηση του AMPK έχει ανασταλτική επίδραση στη λιπόλυση [26, 29]. Σε συνθήκες που πραγματοποιείται λιπόλυση στον οργανισμό, όπως σε περιόδους νηστείας και άσκησης, η AMPK ενεργοποιείται αλλά ως ένας μηχανισμός ανατροφοδότησης. Αυτή η ενεργοποίηση οδηγεί σταδιακά σε αναστολή της λιπόλυσης, η οποία είναι μια διαδικασία που καταναλώνει ενέργεια από τα λιποκύτταρα [27]. Επιπλέον, σε AMPKα1 knock out ποντίκια, το μέγεθος των λιποκυττάρων είναι μειωμένο και τα επίπεδα λιπόλυσης είναι υψηλότερα από εκείνα των λιποκυττάρων των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται ως αρνητικοί έλεγχοι του πειράματος (control) [26]. Αντιθέτως, η μελέτη των Yin et al. [30] πρότεινε μια λιπολυτική δράση για την AMPK και η μελέτη των Koh et al. [31] πρότεινε ότι η επαγόμενη από αδρεναλίνη λιπόλυση οφείλεται σε ενεργοποίηση της AMPK. Υπάρχουν επίσης αντιφατικά ευρήματα που σχετίζονται με την επίδραση της AMPK στη μεταφορά γλυκόζης στον λιπώδη ιστό [32–34]. Οι κυριότεροι μεταβολικοί στόχοι της AMPK στον λιπώδη ιστό συνοψίζονται στην Εικόνα 7.

Συμπερασματικά, η ενεργοποίηση της AMPK στον λιπώδη ιστό, υπό συνθήκες όπως άσκηση, νηστεία ή μετά από διέγερση με λεπτίνη, αδιπονεκτίνη, μειώνει τη λιπογένεση, τη σύνθεση των τριγλυκεριδίων και τη λιπόλυση και αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων, συμβάλλοντας στη βελτιωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη [32].

1.2.4 Ρόλος AMPK στον μυ

Ο σκελετικός μυς είναι ο κύριος ιστός πρόσληψης γλυκόζης, μια διαδικασία που διεγείρεται κυρίως από ινσουλίνη αλλά και από άλλα μεταβολικά μονοπάτια που δεν ενεργοποιούνται από αυτήν την ορμόνη. Η άσκηση διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης στον σκελετικό μυ, με την AMPK να φαίνεται ότι αποτελεί το διαμεσολαβητή αυτής της επίδρασης, κυρίως στον γλυκολυτικό λευκό μυ. Ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της, ενεργοποιεί την AMPK στους σκελετικούς μύες και οδηγεί στην ενίσχυση πρόσληψης γλυκόζης μέσω αύξησης των GLUT4 μεταφορέων της [60]. Η χρόνια ενεργοποίηση της AMPK αυξάνει επίσης την έκφραση της εξοκινάσης II, του πρώτου ενζύμου της οδού γλυκόλυσης και απενεργοποιεί τη συνθετάση γλυκογόνου. Η επίδραση της AMPK διαφέρει κατά την άσκηση δύναμης (π.χ άρση βάρους) με την άσκηση αντοχής (π.χ. τρέξιμο απόστασης). Η AMPK διεγείρει την πρόσληψη γλυκόζης και την έκφραση/μεταφορά GLUT4 στους γρήγορους μύες (γλυκολυτικός, λευκός μυς) αλλά όχι στους αργούς μύες (οξειδωτικός, κόκκινος μυς) [32]. Η κινάση AMPK ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της άσκησης στους μύες, πιθανώς ως αποτέλεσμα της επαγόμενης από την άσκηση απελευθέρωσης IL-6, μιας κυτοκίνης που ενεργοποιεί την AMPK σε απομονωμένους μύες αρουραίων [33]. Επιπρόσθετα, πέρα από την αύξηση της γλυκολυτικής δραστηριότητας η AMPK αυξάνει και την οξείδωση των λιπαρών οξέων [61]. Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερη εναπόθεση λιπιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση της ικανότητας του μυός να ανταποκρίνεται στις ενεργειακές ανάγκες. Μελέτες με διαγονιδιακά ζώα έχουν δείξει ότι η AMPK είναι ο κύριος διαμεσολαβητής, αν και όχι ο μόνος, των προσαρμογών (αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης, οξείδωση λιπαρών οξέων, αναστολή της σύνθεσης γλυκογόνου) του σκελετικού μυός ως απόκριση στην άσκηση. Οι κυριότεροι μεταβολικοί στόχοι της AMPK στον μυϊκό ιστό συνοψίζονται στην Εικόνα 7 [32].



Εικόνα 7: Μεταβολικοί στόχοι της AMPK στον μυ και στο λιπώδη ιστό. Απεικονίζονται οι στόχοι του ενζύμου στο μυϊκό ιστό (skeletal muscle) και στο λιπώδη ιστό (adipose tissue). GLUT4=Glucose transporter 4, MEF-2=myocyte enhancer factor-2, GEF=GLUT4 enhancer factor, AS-160=Akt-substrate-of-160kDa, ACC =acetyl-coenzyme A carboxylase, PEPCK =phosphoenolpyruvate Carboxykinase, FAS=fatty acid synthase; SREBP-1c=sterol regulatory element binding protein-1 HSL=hormone-sensitive lipase [32]

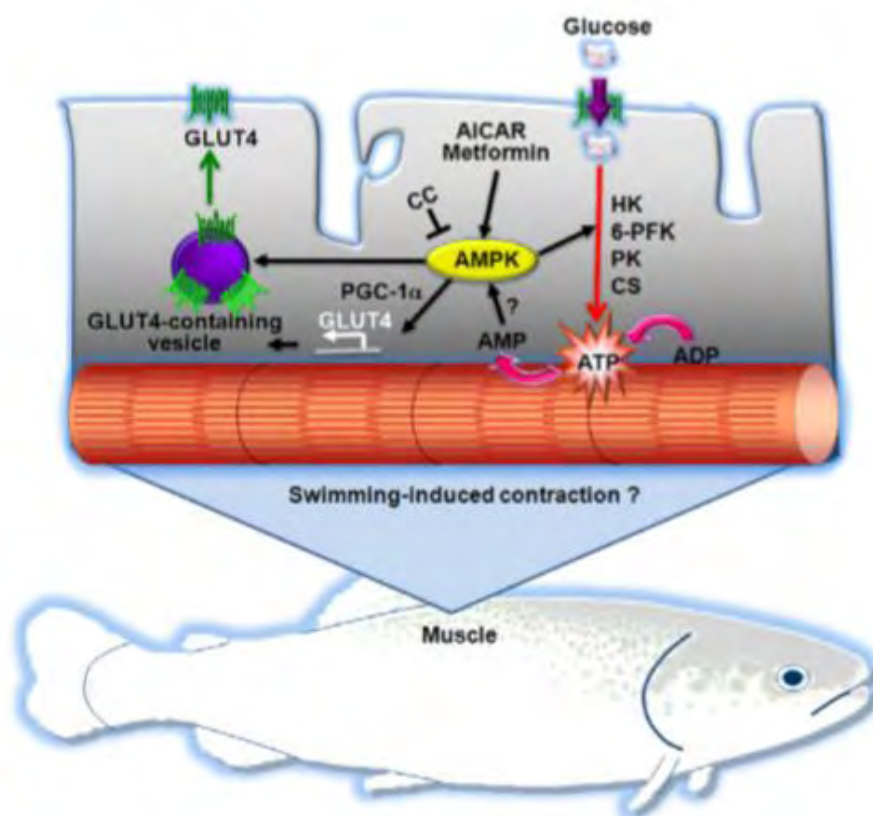
1.2.5 Ρόλος AMPK στους ιχθύες

Τα ψάρια παρουσιάζουν μια ενδιαφέρουσα περίπτωση όσον αφορά τη δραστηριότητα της AMPK, καθώς μπορούν να υποβληθούν σε παρατεταμένες περιόδους νηστείας με ελάχιστες συνέπειες στα ενεργειακά αποθέματα. Η ανταπόκριση στη δραστηριότητα AMPK εμφανίζεται διατηρημένη στα ψάρια, καθώς υπάρχει μια γρήγορη ενεργοποίηση, τόσο μέσω της αφθονίας των μεταγράφων της όσο και της πρωτεϊνικής δραστηριότητας όπως βρέθηκε κατά την έναρξη της νηστείας σε zebra fish και στην ιριδιζουσα πέστροφα, με ταχεία αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου κατά την μετάβαση σε καταστάσεις επαρκούς τροφής.

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 {εξοκίνηση (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) (Εικόνα 8). 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 [34,35,36].

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 των καθοδικών της στόχων [37]. 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. Τυπικά, οι εξώθερμοι οργανισμοί αντιμετωπίζουν μια σειρά δύσκολων, ενεργειακά δαπανηρών επιπτώσεων που συνδέονται με τις ακραίες θερμοκρασίες που συχνά αντιμετωπίζουν. Καθώς αυξάνονται και πέφτουν οι θερμοκρασίες, το ίδιο κάνουν και οι μεταβολικοί ρυθμοί των εξώθερμων οργανισμών και είναι ενδιαφέρον να εξεταστεί η συντηρημένη φύση της δραστηριότητας AMPK μέσω της επίδρασης της θερμοκρασίας σε αυτούς [17].



Εικόνα 8: Προτεινόμενο μοντέλο για την δράση της AMPK στα μυϊκά κύτταρα του σκελετικού μυ των ψαριών. Η ενεργοποίηση της AMPK, έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης από τα κύτταρα των σκελετικών μυών των ψαριών μέσω: 1) της αύξησης των επιπέδων mRNA του GLUT4 (πιθανώς μέσω της αυξημένης έκφρασης του PGC-1α), 2) της επαγωγής 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-φωσφο-φρουκτοκινάση(6-PFK), κινάση του πυροσταφυλικού (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)[35].

1.3 Ανίχνευση θρεπτικών ουσιών (nutrient sensing) στους ιχθύες

Τα στοιχεία που έρχονται στην επιφάνεια τα τελευταία χρόνια σε μερικά είδη, ιδιαίτερα στην ιριδιζουσα πέστροφα, υποστηρίζουν την παρουσία μηχανισμών ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών στους ιχθύες. Η ικανότητα ανίχνευσης αποθεμάτων γλυκόζης εντοπίζεται στο κεντρικό νευρικό σύστημα (υποθάλαμο και οπίσθιο εγκέφαλο) και περιφερικό νευρικό σύστημα (ήπαρ, σώματα Brockmann ή BB, κύρια συσσώρευση παγκρεατικών ενδοκρινών κυττάρων σε διάφορα είδη ψαριών) και σε θέσεις εντέρου, ενώ οι αισθητήρες λιπαρών οξέων φαίνεται να είναι παρόντες στον υποθάλαμο και στα σώματα Brockmann (Εικ. 9). Στα ψάρια οι ικανότητες ανίχνευσης γλυκόζης και λιπαρών οξέων σχετίζονται με τη ρύθμιση της πρόσληψης τροφής και το μεταβολισμό.

Η ανίχνευση μιας συγκεκριμένης θρεπτικής ουσίας μπορεί να προκύπτει άμεσα μέσω της σύνδεσης των μορίων της σε έναν "αισθητήρα", ή έμμεσα, μέσω της ανίχνευσης συσχετιζόμενων με την θρεπτική ουσία μορίων που αποτελούν μέτρο της αφθονίας του [63] .

Ο όρος glucosensing είναι η ικανότητα των εξειδικευμένων κυττάρων να ανιχνεύουν αλλαγές στα επίπεδα της γλυκόζης. Αυτή η ικανότητα σχετίζεται με τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής και τις επακόλουθες ρυθμίσεις στις μεταβολές των επιπέδων των μεταβολιτών στο πλάσμα και σε περιοχές του εγκεφάλου, όπως ο υποθάλαμος και ο οπίσθιος εγκέφαλος. Τα παγκρεατικά ενδοκρινικά κύτταρα και το έντερο συνδέονται με την απελευθέρωση ορμονών ενώ το ήπαρ συνδέεται με έναν μεταβολικό διακόπτη χρήσης γλυκόζης και της παραγωγής της (Εικόνα 9). Υπάρχουν διάφοροι glucosensing μηχανισμοί που έχουν χαρακτηριστεί στα θηλαστικά. Στον πιο διαδεδομένο μηχανισμό, μεσολαβεί η γλυκοκινάση (GK), όπως παρατηρείται στους εγκεφαλικούς νευρώνες, στα παγκρεατικά β-κύτταρα και στα ηπατοκύτταρα [63,64,65] . Σε αυτόν τον μηχανισμό, η γλυκόζη λαμβάνεται από το μεταφορέα τύπου 2 (GLUT2) [54,66]. Στη συνέχεια φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη από την GK και μετά μεταβολίζεται μέσω γλυκόλυσης αυξάνοντας την ενδοκυτταρική αναλογία ATP/ADP. Αυτή η αυξημένη αναλογία επάγει το κλείσιμο του εξαρτώμενου από ATP καναλιού επανορθωτικού ρεύματος καλίου που προκαλεί την εκπόλωση της μεμβράνης και την είσοδο ασβεστίου στο κύτταρο μέσω των τασεοεξαρτώμενων L τύπου καναλιών ασβεστίου. Αυτή η είσοδος του ασβεστίου οδηγεί τελικά σε αλλαγές στη δραστηριότητα των νευρώνων (εγκεφαλικό), στη διαμόρφωση της απελευθέρωσης ορμονών (ενδοκρινικά κύτταρα) ή στις αλλαγές στον μεταβολισμό (ήπαρ) [54,66]. Στα ψάρια, σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία υποστηρίζεται η παρουσία ενός εξαρτημένου από την GK μηχανισμού ανίχνευσης γλυκόζης τόσο σε κεντρικές όσο και σε περιφερειακές περιοχές της ιριδιζουσας πέστροφας [78,79] .

Οι μεταβολικοί αισθητήρες ρυθμίζουν τον ενδιάμεσο μεταβολισμό στα θηλαστικά μέσω ελέγχου της ενδοκυτταρικής χρήσης γλυκόζης [68], συμπεριλαμβανομένης της AMPK (ενεργοποιείται όταν το επίπεδα ενέργειας στο κύτταρο είναι χαμηλά) ή του mTOR (ενεργοποιείται όταν αυξάνονται τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών). Υπό μεταγευματικές συνθήκες, η φωσφορυλίωση της AMPK μειώνεται στο ήπαρ και η φωσφορυλίωση του mTOR αυξάνεται στο ήπαρ και στους μύες της πέστροφας [69,70,71]. Επιπλέον, η φαρμακολογική ενεργοποίηση της ηπατικής AMPK και η αναστολή του μονοπατιού mTOR προκαλούν καταβολισμό της γλυκόζης και αυξημένη γλυκονεογένεση [70,71] .

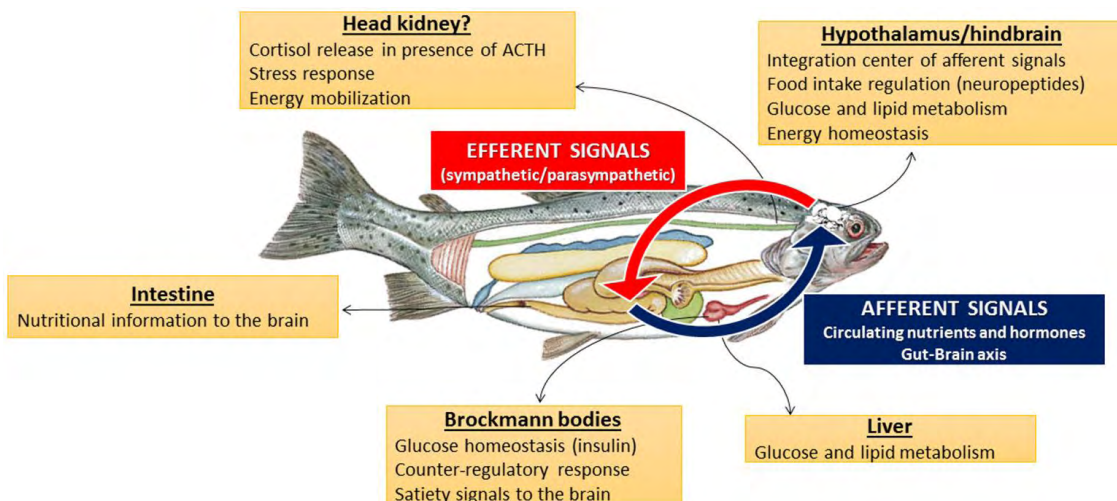
Τα λιπίδια είναι κύρια θρεπτικά συστατικά στα ψάρια και υποστηρίζουν πολλές διαφορετικές μεταβολικές διεργασίες [72,73,74]. Μια άλλη ιδιαιτερότητα των συστημάτων ανίχνευσης λιπαρών οξέων στα ψάρια είναι η ικανότητά τους να ανταποκρίνονται σε αλλαγές στα επίπεδα των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA). Η διατροφή των περισσότερων ψαριών είναι ιδιαίτερα πλούσια σε PUFA μακράς αλυσίδας και συνεπώς είναι άφθονα και στους ιστούς τους [74] .

Επίσης, η ενισχυμένη αποθήκευση λιπιδίων συνδέεται συνήθως με μειωμένη πρόσληψη τροφής [75,76,77]. Επομένως, ο μεταβολισμός των λιπιδίων επηρεάζει σαφώς τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής στα ψάρια. Λαμβάνοντας υπόψη τη σχετική υψηλή σημασία των λιπαρών οξέων, τόσο στη διατροφή των ψαριών όσο και στη σύνθεση των ιστών τους, δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι οι διαθέσιμες μελέτες σε ψάρια επικεντρώθηκαν στα λιπαρά οξέα.

Σε κάποια είδη πέστροφας για παράδειγμα, το ψάρι επιδίδονταν σε δίαιτες που περιείχαν διαφορετική σύνθεση λιπιδίων. Η χαμηλότερη πρόσληψη τροφής εμφανίστηκε σε ψάρια με τα υψηλότερα επίπεδα λιπαρών οξέων στο πλάσμα [67]. Με αυτή την μελέτη υποστηρίζεται ότι οι κεντρικοί μηχανισμοί ανίχνευσης λιπαρών οξέων μεσολαβούν στη μείωση της πρόσληψης τροφής που προκαλείται από λιπίδια.

Ακόμη, έχει αποδειχθεί ότι με την πρόσληψη λιπιδίων αυξάνονται τα επίπεδα έκφρασης παραγόντων οι οποίοι συμμετέχουν σε μονοπάτια που σχετίζονται με τη διαχείριση των ενεργειακών αποθεμάτων των κυττάρων των ιστών, με την πρωτεϊνική σύνθεση, την απόπτωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον μεταβολισμό της γλυκόζης (AMPK, mTOR, Akt).

Τέλος, αρκετές ορμόνες που συμβάλλουν στη ρύθμιση της ομοιόστασης της ενέργειας συμμετέχουν και στη διαμόρφωση των συστημάτων ανίχνευσης γλυκόζης και λιπαρών οξέων στα ψάρια. Αυτές περιλαμβάνουν την γκρελίνη, την ινσουλίνη, τη λεπτίνη, τη χολοκυστοκίνη (CCK), τις αδιπονεκτίνες, τα κανναβινοειδή και τα γλυκοκορτικοειδή. Παρά τις περισσότερες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε glucosensing συστήματα και λίγα στα συστήματα ανίχνευσης λιπαρών οξέων, ένα προκαταρκτικό συμπέρασμα μπορεί να εξαχθεί. Οι ανορεξιογόνες/αναβολικές ορμόνες έδειξαν ότι ενεργοποιούν τα συστήματα ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών, ενώ οι ορεξιογόνες/καταβολικές ορμόνες τα αναστέλλουν. Υπάρχουν διαφορές στην κατεύθυνση και στο μέγεθος των αποκρίσεων στα ψάρια σε σύγκριση με το μοντέλο των θηλαστικών, το οποίο μεταξύ άλλων μπορεί να σχετίζεται με τον υψηλό βαθμό παραλλαγών των ορμονών που υπάρχουν στα ψάρια (ως αποτέλεσμα του επιπρόσθετου διπλασιασμού γονιδιώματος) σε συνδυασμό με τη διαφορά στις διατροφικές συνήθειες. Η έρευνα που πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια παρείχε πληροφορίες για την παρουσία και τη λειτουργία των πιθανών συστημάτων ανίχνευσης θρεπτικών ουσιών είτε σε περιφερειακές είτε σε κεντρικές περιοχές των λίγων ειδών ψαριών που έχουν αξιολογηθεί μέχρι σήμερα σχετικά με αυτό το ζήτημα, κυρίως στην πέστροφα [38].



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση που συνοψίζει τις λειτουργίες των συστημάτων ανίχνευσης θρεπτικών σε κεντρικούς και περιφερειακούς ιστούς των ψαριών. Η ικανότητα ανίχνευσης αποθεμάτων γλυκόζης είναι παρούσα στον κεντρικό νευρικό σύστημα (υποθάλαμο και οπίσθιο εγκέφαλο) και περιφερικό νευρικό σύστημα (ήπαρ, σώματα Brockmann ή BB) και σε θέσεις εντέρου, ενώ οι αισθητήρες λιπαρών οξέων φαίνεται να είναι παρόντες στον υποθάλαμο και στα σώματα Brockmann. Τα παγκρεατικά ενδοκρινικά κύτταρα και το έντερο συνδέονται με την απελευθέρωση ορμονών ενώ το ήπαρ συνδέεται με έναν μεταβολικό διακόπτη χρήσης γλυκόζης και της παραγωγής της [38].

1.4 Ιστοειδική έκφραση της AMPK

Ομόλογα γονίδια και των τριών υπομονάδων της AMPK έχουν ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά, στη *Drosophila melanogaster*, στο *Caenorhabditis elegans*, στο *Saccharomyces cerevisiae* και στο *Arabidopsis thaliana* και στο πρωτόζωο πρωτόζωο *Giardia lamblia*, με υψηλό βαθμό συντήρησης που υποδηλώνει ότι αυτό το αρχαίο κύκλωμα σηματοδότησης εξελίχθηκε τουλάχιστον ένα δισεκατομμύριο χρόνια πριν από τη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος δράσεων στη μεταβολική ομοίωση. Στα θηλαστικά, δύο έως τρεις ισομορφές κάθε υπομονάδας ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια είναι γνωστό ότι δημιουργούν μια μεγάλη ποικιλία συνδυασμών ετεροτριμερών, με παραλλαγές συναρμογής (για τα γονίδια $\gamma 2$ και $\gamma 3$) συμβάλλοντας στην ποικιλομορφία του ενζύμου. Επιπλέον, οι διαφορές στην κατανομή προτύπων έκφρασης καταλυτικών και ρυθμιστικών ισομορφών έχουν καταγραφεί. Έτσι, πρόσφατα βρέθηκε σε μελέτες διερεύνησης της σύνθεσης των ισομορφών των συμπλόκων της AMPK στον σκελετικό μυ του ανθρώπου ότι μόνο 3 από τα 12 θεωρητικά πιθανά σύμπλοκα AMPK ήταν παρόντα ($\alpha 2\beta 2\gamma 1 \gg \alpha 2\beta 2\gamma 3 = \alpha 1\beta 2\gamma 1$) τα οποία ενεργοποιήθηκαν με διαφορετικό τρόπο ανάλογα με την ένταση και τη διάρκεια της άσκησης.

Τα γενετικά μοντέλα στα οποία έγινε η διαγραφή των ισομορφών της β υπομονάδας της AMPK αποκάλυψαν πρόσφατα ότι διαφορετικές ισομορφές της υπομονάδας β της AMPK δεν είναι σε θέση να αντισταθμίσουν την απώλεια μεταξύ τους, δηλαδή η απώλεια για παράδειγμα της $\beta 1$ ισομορφής δεν μπορεί να αντικατασταθεί με την ισομορφή $\beta 2$ τουλάχιστον στο ήπαρ και

στο σκελετικό μυ, κάτι που καταδεικνύει εξειδικευμένη ιστοειδική έκφραση ή υποκυτταρική τοποθέτηση των ισομορφών [39].

Τα πρότυπα έκφρασης των τριών ισομορφών της ρυθμιστικής γ υπομονάδας της ενεργοποιημένης με AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) προσδιορίστηκαν σε διάφορους ιστούς από ενήλικες ανθρώπους, ποντίκια και αρουραίους, καθώς και σε ανθρώπινα πρωτογενή μυϊκά κύτταρα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA έδειξε παρόμοια πρότυπα έκφρασης στα τρία είδη και μια καλή συσχέτιση με την πρωτεϊνική έκφραση σε ποντίκια και αρουραίους. Η ισομορφή $\gamma 3$ εμφανίστηκε εξαιρετικά ειδική για το σκελετικό μυ, ενώ η $\gamma 1$ και η $\gamma 2$ έδειξαν ευρεία κατανομή στους ιστούς. Επιπλέον, η αναλογία λευκών ινών τύπου IIb στα δείγματα μυών ποντικού και αρουραίου, έδειξε ισχυρή θετική συσχέτιση με την έκφραση της $\gamma 3$. Σε δείγματα λευκού σκελετικού μυός, η $\gamma 3$ φάνηκε να είναι η πιο άφθονη ισομορφή. Η διαφοροποίηση των ανθρώπινων πρωτογενών μυϊκών κυττάρων από τους μυοβλάστες σε πολυπύρηνους μωσωλήνες συνοδεύτηκε από αύξηση της έκφρασης του $\gamma 3$ mRNA, ενώ τα επίπεδα της $\gamma 1$ και $\gamma 2$ παρέμειναν σε μεγάλο βαθμό αμετάβλητα. Η παρατήρηση ότι η ισομορφή $\gamma 3$ της AMPK εκφράζεται πρωτίστως στο λευκό σκελετικό μυ υποδηλώνει έντονα ότι η $\gamma 3$ έχει βασικό ρόλο σε αυτόν τον ιστό [40].

Στον σκελετικό μυ, η $\beta 2$ υπομονάδα εκφράζεται σε πολύ υψηλά επίπεδα, αλλά η υπομονάδα $\beta 1$ κυριαρχεί στο ήπαρ. Τα σύμπλοκα AMPK που περιέχουν την $\alpha 1$ ή την $\alpha 2$ υπομονάδα αντιπροσωπεύουν το καθένα για το ήμισυ περίπου της συνολικής δραστηριότητας της AMPK στο ήπαρ. Τα σύμπλοκα AMPK που περιέχουν την καταλυτική υπομονάδα $\alpha 1$ εκφράζονται κυρίως στον λιπώδη ιστό, ενώ τα σύμπλοκα AMPK που περιέχουν την καταλυτική υπομονάδα $\alpha 1$ κυριαρχούν στους σκελετικούς και καρδιακούς μύες [39].

Διαφορετικοί τύποι κυττάρων και ιστών εκφράζουν ξεχωριστούς συνδυασμούς των ισομορφών της AMPK. Σε φαρμακευτικές μελέτες στοχευμένες στην AMPK, υπήρξαν επίσης ενδείξεις διαφορών μεταξύ των ειδών σε σχέση με την ειδικότητα ιστού των ισομορφών AMPK. Οι Stephenne et al. [42] πρόσφατα υπέδειξαν ότι τα ανθρώπινα και τα τρωκτικά ηπατοκύτταρα διαφέρουν ως προς την έκφραση των ισομορφών των υπομονάδων της AMPK. Το σύμπλοκο $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ ήταν το κύριο στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα, ενώ το $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ εκφραζόταν κυρίως στους ηπατικούς ιστούς του αρουραίου και του ποντικού και το $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ στους ηπατικούς ιστούς του σκύλου [41].

Μια μετάλλαξη στη γ -υπομονάδα της AMPK έχει περιγραφεί ότι προκαλεί προσδευτικό νευροεκφυλισμό στη *Drosophila*. Αυτή η μελέτη υποστηρίζει περαιτέρω τον αναδυόμενο ρόλο της AMPK στη διατήρηση της νευρωνικής ακεραιότητας στα θηλαστικά. Η διαγραφή της μοναδικής α -υπομονάδας AMPK στη *Drosophila* (επειδή η μύγα διαθέτει ένα γονίδιο για κάθε υπομονάδα) έδειξε έναν θανατηφόρο φαινότυπο, αποδεικνύοντας την αναγκαιότητα της δραστηριότητας της AMPK κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης όπως έχει παρουσιαστεί στα θηλαστικά [40].

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η ιστοειδική μελέτη των γονιδίων των ρυθμιστικών υπομονάδων β' και γ' της AMP- εξαρτώμενης πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) στο λαβράκι (*Dicentrarchus Labrax*). Μερικά απ' τα γονίδια των β' και γ' υπομονάδων που μελετήθηκαν είναι μεταξύ τους παράλογα. Σε αυτή την εργασία διερευνήθηκε η ρύθμιση της έκφρασης των παραλόγων στους διάφορους ιστούς του οργανισμού.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Ψάρια και στάδια δειγματοληψίας

Τα δείγματα λαβρακιού που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είναι γεννήτορες, έχουν περάσει δηλαδή το στάδιο της ωρίμανσης και βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία. Ελήφθησαν από τον ιχθυογεννητικό σταθμό της εταιρείας Philosophish στη Λάρυμνα Βοιωτίας. Η δειγματοληψία έγινε από τέσσερα ώριμα λαβράκια τα οποία αναισθητοποιήθηκαν και απομονώθηκαν οι ιστοί τους. Συλλέχθηκαν συνολικά 80 δείγματα από 20 διαφορετικούς ιστούς του κάθε οργανισμού.

2.2. Απομόνωση RNA και σύνθεση cDNA

Σε όλα τα δείγματα έγινε απομόνωση του ολικού RNA και αφαιρέθηκαν όλα τα υπολείμματα γενωμικού DNA με DNAase 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. Ποσοτική 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, ωστόσο, 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-time PCR, 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 αυτόν τον τρόπο αν παρατηρηθεί φθορισμός και στο αρνητικό control σημαίνει ότι κάποιο από τα αντιδραστήρια 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 έξι 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 2.

Στην συνέχεια για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε ένα από τα έξι 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 σε αραιώση 1:5, KAPA SYBR FAST (2x) σε τελική συγκέντρωση 1x, 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 2: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR

	<i>Forward εκκινητής</i>	<i>Reverse εκκινητής</i>
<i>PRKAB1</i>	5'-CTCAGTCGCTCCAATCCTAC-3'	5'-ATTACCGCCACTCTATGTCTAC-3'
<i>AAKB1</i>	5'-GCTCAACAGAAGTCAGAAGAAC-3'	5'-CCACAAACCGTCCACACAGAA-3'
<i>PRKAG2</i>	5'-TGCCATCTTACTCTACCTACA-3'	5'-GAACTCACACCACTCTCTCCTA-3'
<i>PRKAG2*</i>	5'-AGGCTGGTTGTCGTTGATGAG-3'	5'-TGTGTCTGGTTCTGTTGAGTCC-3'
<i>PRKAG3</i>	5'-GGACCAGGAAGAGGATGAGGAA-3'	5'-GGGGCGCAAGAGCATGTGT-3'
<i>PRKAG3*</i>	5'-TCACAGGTGTCATTCCCAA-3'	5'-TTTGCCACCAGTGCATAAAA-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 δύο ιδιοσυστατα γονίδια (housekeeping genes) το Fau και το RPL13α. Η αλληλουχία των εκκινητών που στοχεύουν στα ιδιοσυστατα γονίδια φαίνεται στον Πίνακα 3. Για τη σχετική κανονικοποίηση δειγμάτων απαιτείται η μελέτη έκφρασης τουλάχιστον πέντε ιδιοσυστατων γονιδίων[43]. Από τα γονίδια αυτά επιλέγονται εκείνα με την πιο σταθερή έκφραση μέσω του προγράμματος Genorm. Στην

παρούσα εργασία επιλέχθηκαν τα προαναφερόμενα γονίδια, Fau και Rpl13a, καθώς αυτά επιλέχθηκαν σε προηγούμενη πτυχιακή εργασία που εκπονήθηκε στο εργαστήριο από την προπτυχιακή φοιτήτρια Λουκία Κελλάρη.

Πίνακας 3: Οι αλληλουχίες των εκκινητών για τα ιδιόσυστατα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την real time PCR

	<i>Forward εκκινητής</i>	<i>Reverse εκκινητής</i>
<i>Fau</i>	5'-CTTCGTGAATGTTGTGCC-3'	5'-ACTGATGGATGGTGATGA-3'
<i>RPL13a</i>	5'-GAAGGCATCAACATCTCC-3'	5'-CTCTGAAGTGGTAAGGTC-3'

2.5 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης των παραλόγων γονιδίων της β' και γ' υπομονάδας της AMPK κανονικοποιήθηκαν με τον συντελεστή κανονικοποίησης (normalization factor). Αυτός υπολογίζεται από το γεωμετρικό μέσο της σχετικής έκφρασης των γονιδίων που παρουσιάζουν ιδιόσυστατη έκφραση. Έπειτα τα αποτελέσματα μετασχηματίστηκαν σε τετραγωνική ρίζα (sqrt), επειδή τα δεδομένα δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Η τετραγωνική ρίζα (sqrt) αποτυπώνει την έκφραση του κάθε γονιδίου στους διαφορετικούς ιστούς [43]. Η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών της έκφρασης τόσο ανάμεσα στα διαφορετικά γονίδια όσο και μεταξύ των διαφορετικών ιστών ελέγχθηκε μέσω της μεθόδου ανάλυσης διακύμανσης κατά ένα παράγοντα (one way ANOVA) μέσω του προγράμματος Excel που παρέχει τη δυνατότητα της στατιστικής αυτής ανάλυσης. Η ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) είναι μια συλλογή στατιστικών μοντέλων και των σχετικών διαδικασιών εκτίμησής τους που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση των διαφορών μεταξύ μεταβλητών και της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών αυτών [44].

Τα αποτελέσματα θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικά για $p \text{ value} < 0.05$. Στη συνέχεια έγινε συσχέτιση (correlation) μεταξύ των διαφορετικών γονιδίων μέσω της οποίας διαπιστώνουμε αν οι δυο μεταβλητές, συνδέονται μεταξύ τους. Θετική τιμή του correlation υποδηλώνει σύνδεση μεταξύ των δύο μεταβλητών ενώ αρνητική το αντίθετο.

3. Αποτελέσματα

3.1 Αποτελέσματα της Real Time PCR στους ιστούς του λαβρακιού

Για να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση για κάθε ένα από τα έξι διαφορετικά ζεύγη εκκινητών, ελέγχθηκε η απόδοση [efficiency (E)] διαφορετικών αραιώσεων, μέσω της δημιουργίας πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη κατασκευάστηκε κάνοντας ανάμειξη όλων των δειγμάτων (gene pool) και αραιώνοντάς το πέντε φορές. Στη συνέχεια από το αραιωμένο gene pool δημιουργήθηκαν περαιτέρω διαδοχικές αραιώσεις 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/40, 1/50, 1/80 και 1/100, 1/200 σε μερικά σετ εκκινητών που φαίνεται να απέδιδαν καλύτερα στις μικρότερες αυτές συγκεντρώσεις. Σε όλα τα ζεύγη εκκινητών δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 150 nM μέχρι 300 nM και βρέθηκαν οι βέλτιστες που φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 4) μαζί με τα αντίστοιχα Efficiencies (E).

Πίνακας 4: Βέλτιστες συγκεντρώσεις των ζευγών εκκινητών των β' και γ' υπομονάδων της AMPK με τις αντίστοιχες αποδόσεις.

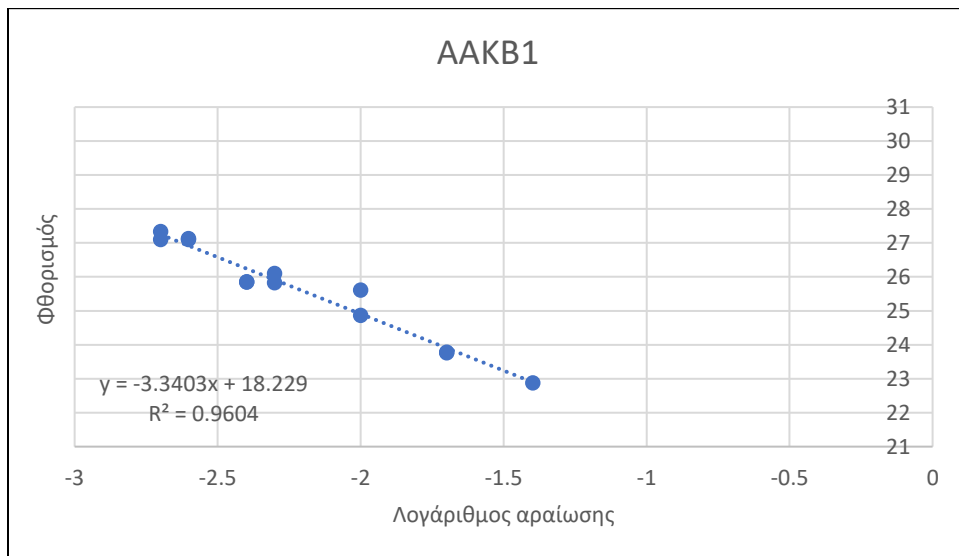
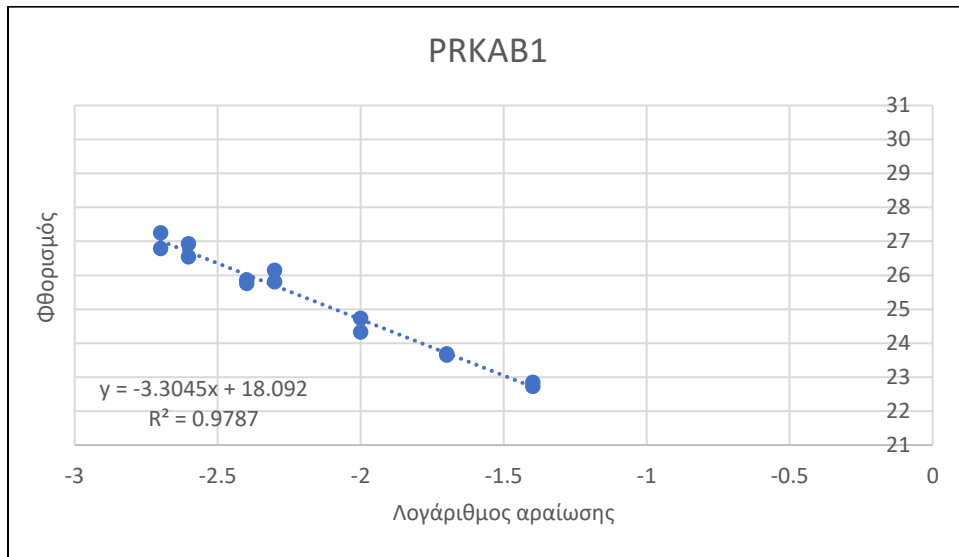
Γονίδιο	Βέλτιστη Συγκέντρωση (C)	Απόδοση (E)
AAKB1	200 nM	0,99
PRKAB1	250 nM	1,01
PRKAG2	200 nM	0,97
PRKAG2*	300 nM	0,96
PRKAG3	250 nM	0,99
PRKAG3*	200 nM	0,98

Αντίστοιχα μελετήθηκε η απόδοση για τα ζεύγη εκκινητών που στοχεύουν σε γονίδια που παρουσιάζουν ιδιόσυστατη έκφραση. Πάλι δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 150 nM μέχρι 300 nM και προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες όπως φαίνεται στον Πίνακα 5.

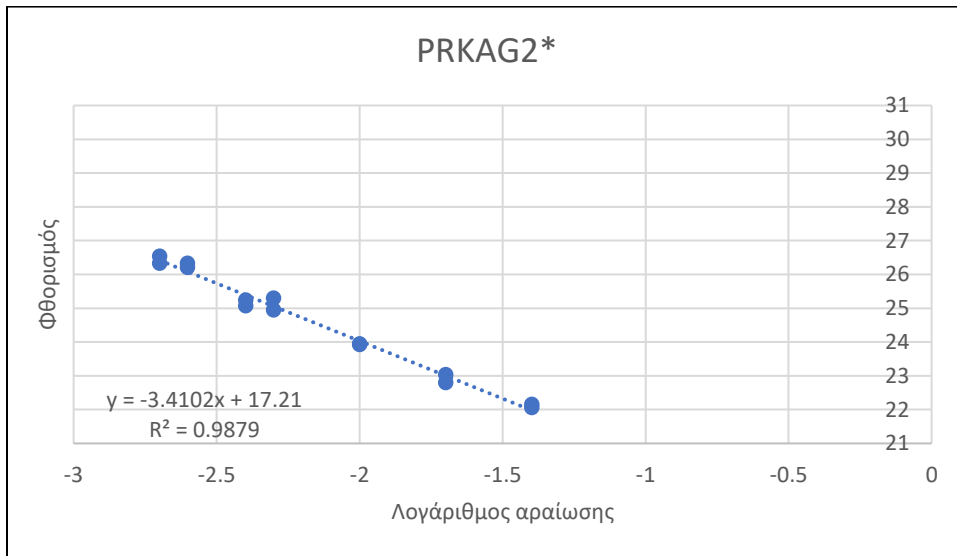
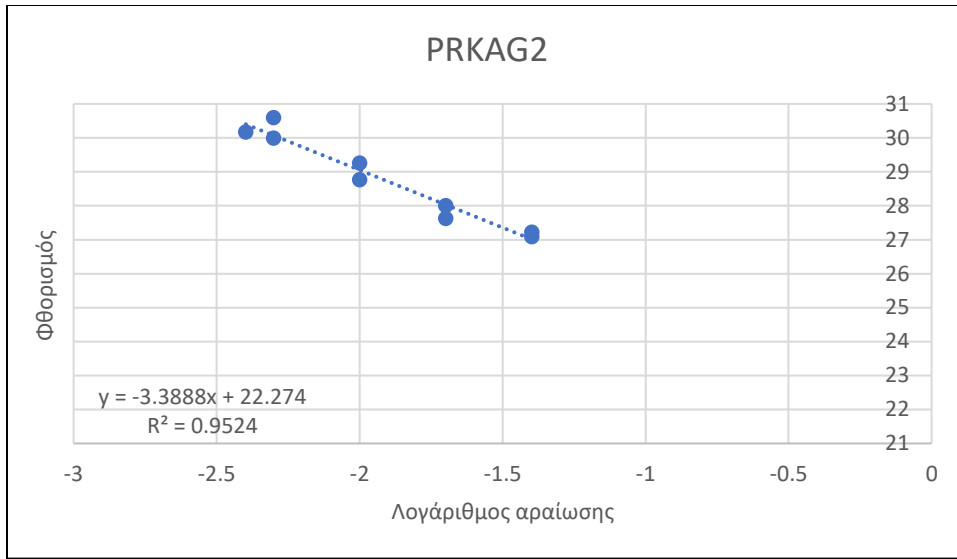
Πίνακας 5: Βέλτιστες συγκεντρώσεις εκκινητών για τα γονίδια που παρουσιάζουν ιδιόσυστατη έκφραση με τα αντίστοιχα Efficiencies.

Γονίδιο	Βέλτιστη C	E
FAU	250 nM	0,97
Rpl13a	300 nM	0,98

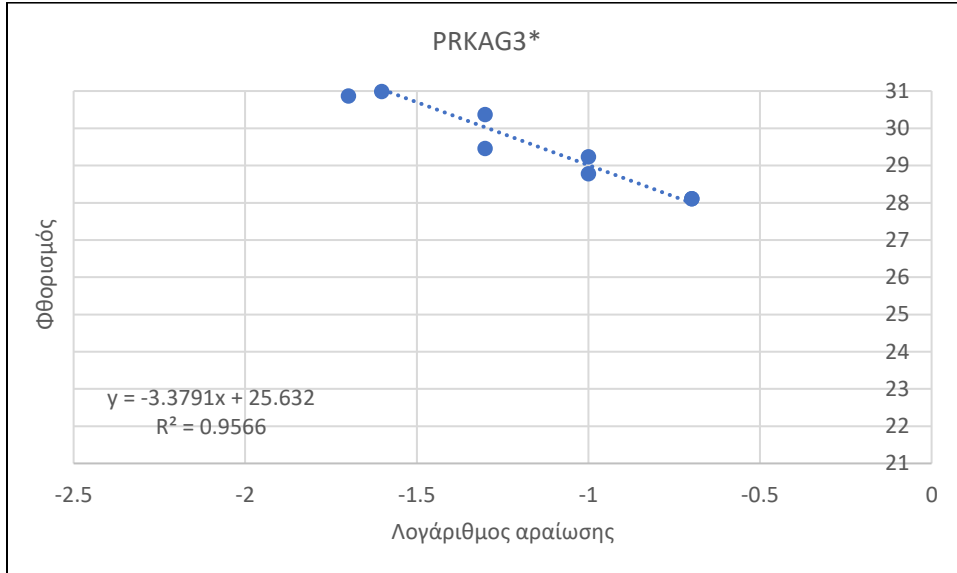
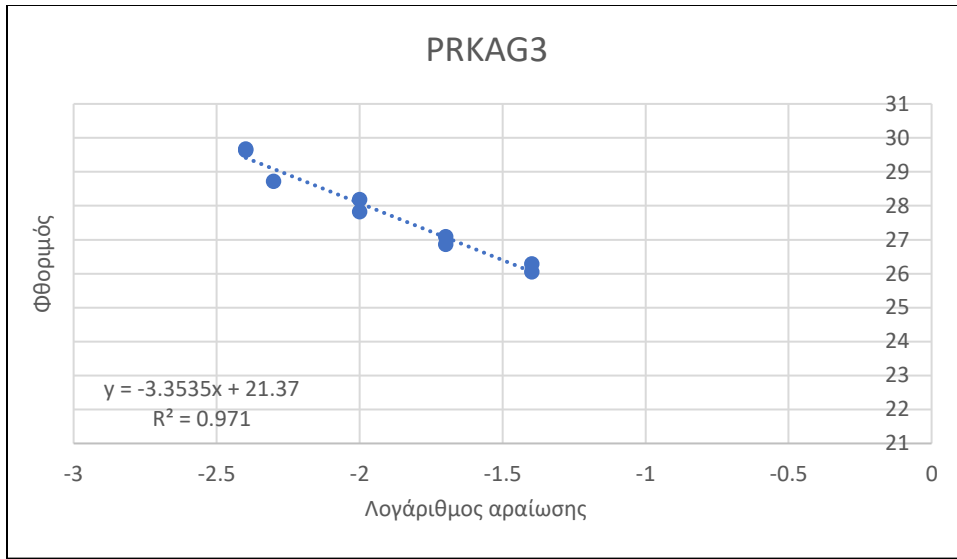
Παρακάτω παραθέτονται οι πρότυπες καμπύλες για κάθε ζεύγος εκκινητών των β' και γ' υπομονάδων (Εικόνες 11-13) και στη συνέχεια οι πρότυπες καμπύλες για τα γονίδια που παρουσιάζουν ιδιόσυστατη έκφραση (Εικόνα 14).



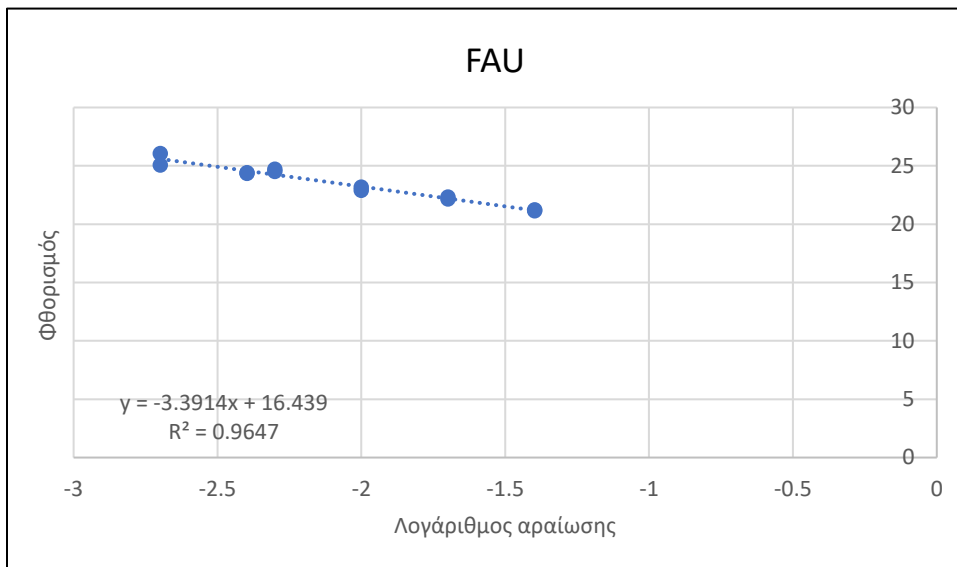
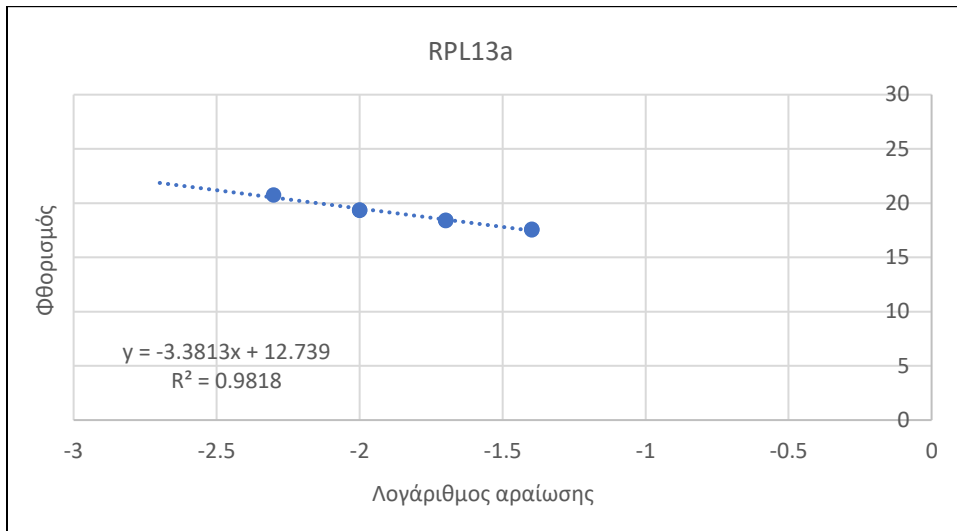
Εικόνα 11: Πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινήτων των γονιδίων PRKAB1 και AAKB1. Στον άξονα y φαίνεται ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης που απαιτήθηκε για να παραχθεί μια συγκεκριμένη ποσότητα φθορισμού που αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυόμενου προϊόντος, ενώ στον άξονα x ο λογάριθμος της αραίωσης που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).



Εικόνα 12: Πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινητών των γονιδίων PKAG2 και PRKAG2 Στον άξονα γ φαίνεται ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης που απαιτήθηκε για να παραχθεί μια συγκεκριμένη ποσότητα φθορισμού που αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυόμενου προϊόντος, ενώ στον άξονα x ο λογάριθμος της αραίωσης που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).



Εικόνα 13: Πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινητών των γονιδίων PRKAG3 και PRKAG3*. Στον άξονα y φαίνεται ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης που απαιτήθηκε για να παραχθεί μια συγκεκριμένη ποσότητα φθορισμού που αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυόμενου προϊόντος, ενώ στον άξονα x ο λογάριθμος της αραιώσης που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).



Εικόνα 14: Πρότυπες καμπύλες για τα ζεύγη εκκινητών των ιδιοσύστατων γονιδίων RPLA13a και FAU. Στον άξονα y φαίνεται ο αριθμός των κύκλων ενίσχυσης που απαιτήθηκε για να παραχθεί μια συγκεκριμένη ποσότητα φθορισμού που αντιπροσωπεύει την ποσότητα του ενισχυόμενου προϊόντος, ενώ στον άξονα x η αραιώση που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον απεικονίζεται η εξίσωση της καμπύλης αλλά και η κλίση (slope) της (R).

3.2 Σχετική ιστοειδική έκφραση των παραλόγων γονιδίων της β' και γ' υπομονάδας της AMPK

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης κατά ένα παράγοντα μεταξύ της σχετικής έκφρασης όλων των μεταγράφων στους υπό μελέτη ιστούς από την οποία προέκυψε $p = 0.000273$. Αρνητική τιμή correlation παρουσιάστηκε μεταξύ των γονιδίων AKKB1 και PRKAG3, και των PRKAG2* και PRKAG3*. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες έξι αναλύσεις διακύμανσης για κάθε ένα μετάγραφο, για να διακρίνουμε εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν, ανά μία μεταβλητή (δηλαδή ως προς ένα μετάγραφο). Σε όλες τις αναλύσεις τα p value που προέκυψαν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6), και όλα είναι μικρότερα του 0.05.

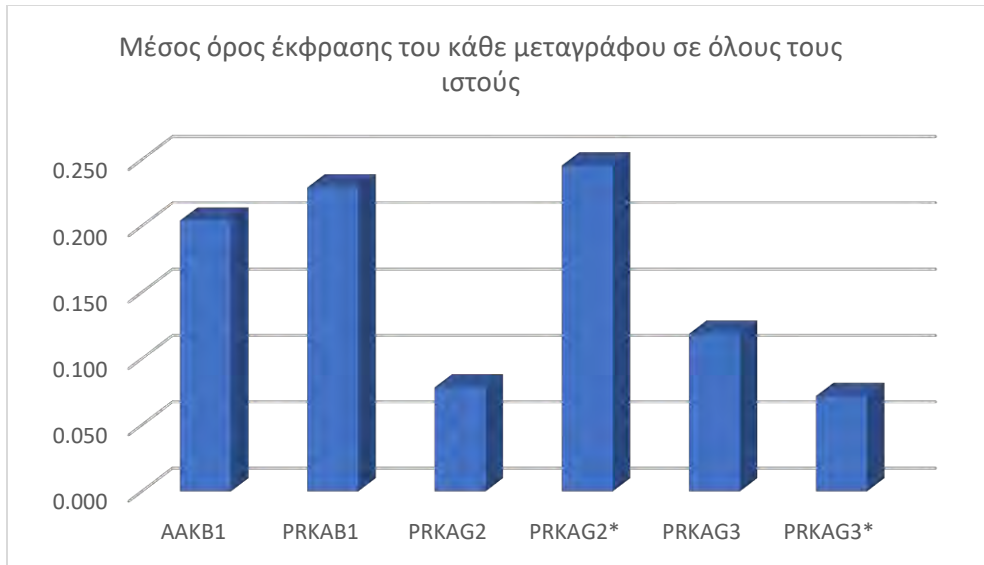
Πίνακας 6: P value που προέκυψαν από ANOVA για κάθε μετάγραφο

ΓΟΝΙΔΙΟ	P VALUE
AAKB1	2.27×10^{-10}
PRKAB1	2.43×10^{-10}
PRKAG2	6.44×10^{-10}
PRKAG2*	9.68×10^{-10}
PRKAG3	7.09×10^{-10}
PRKAG3*	6.35×10^{-10}

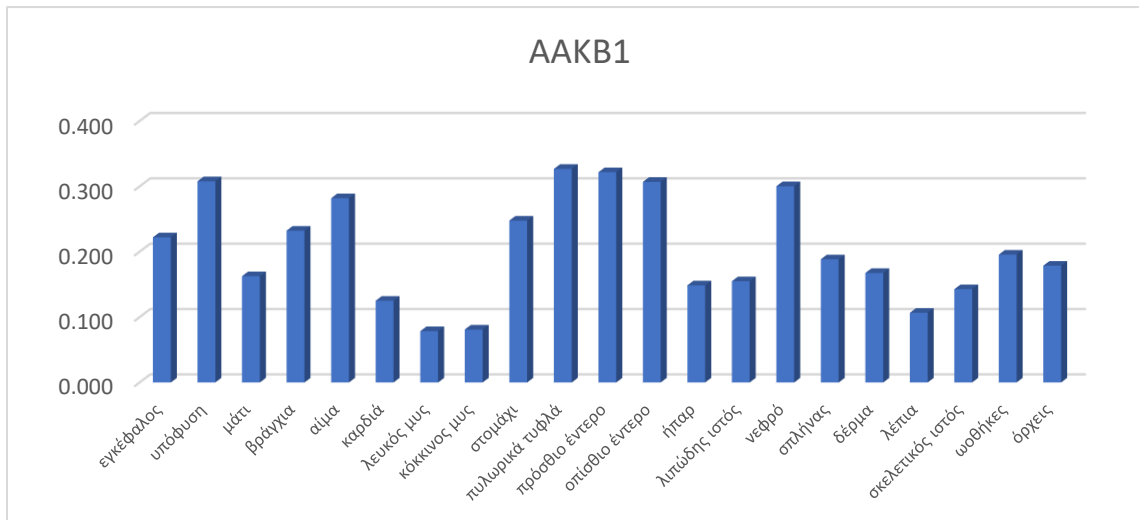
Τα μετάγραφα PRKAG2 και PRKAG3* παρουσίασαν τη χαμηλότερη κατά μέσο όρο έκφραση σε όλους τους ιστούς (Εικόνα 15). Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης για κάθε ένα μετάγραφο και την ιστοειδική του έκφραση στο σύνολο των δειγμάτων που μελετήθηκαν.

Το μετάγραφο AAKB1 της β' υπομονάδας της AMPK εμφανίζεται να έχει αυξημένη έκφραση στα νεφρά, στον πεπτικό σωλήνα, στο αίμα και στην υπόφυση. Αντίθετα συγκριτικά μειωμένη είναι η έκφραση του στον κόκκινο και λευκό μυ και στα λέπια ενώ η έκφραση στους υπόλοιπους ιστούς κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα (Εικόνα 16).

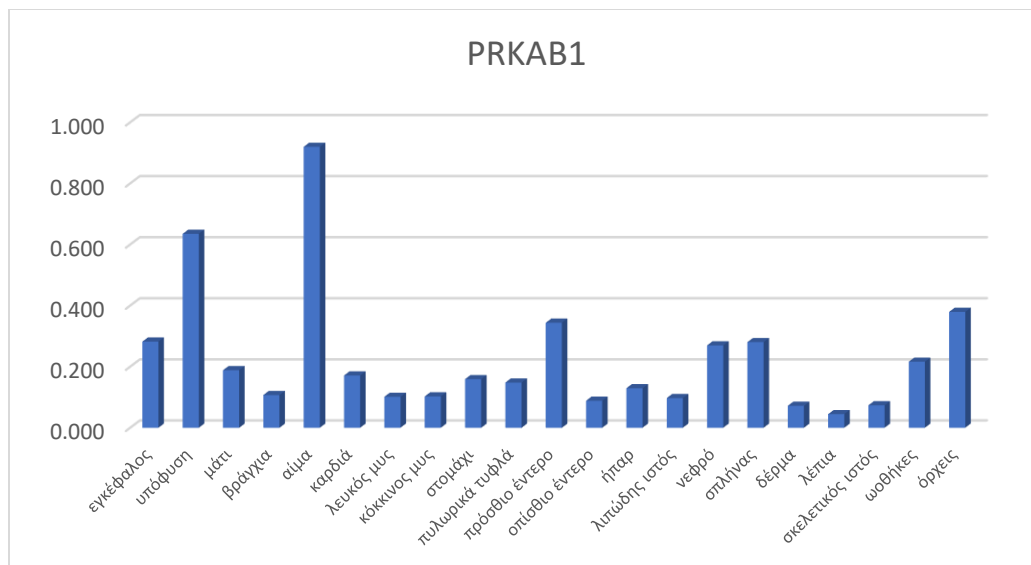
Το μετάγραφο PRKAB1 της β υπομονάδας εμφανίζει αρκετά μεγάλες διακυμάνσεις έκφρασης ανα ιστό. Διακρίνουμε πολύ υψηλή έκφραση στο αίμα και στην υπόφυση, ενώ η έκφραση του είναι πολύ χαμηλή στα λέπια του λαβρακιού, στο δέρμα, στον σκελετικό ιστό και στο οπίσθιο έντερο. Στους υπόλοιπους ιστούς η έκφραση είναι στα ίδια επίπεδα (Εικόνα 17).



Εικόνα 15: Μέσος όρος της σχετικής έκφρασης κάθε μεταγράφου σε όλους τους ιστούς. Στον άξονα γ απεικονίζεται η σχετική έκφραση, ενώ στον άξονα x τα διαφορετικά μεταγράφα. Το διάγραμμα απεικονίζει το μέσο όρο (mean) της σχετικής έκφρασης του κάθε μεταγράφου από όλα τα δείγματα κάθε ιστού που μελετήθηκαν.



Εικόνα 16: Σχετική έκφραση του μεταγράφου AAKB1 στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα γ φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου AAKB1 της β' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία



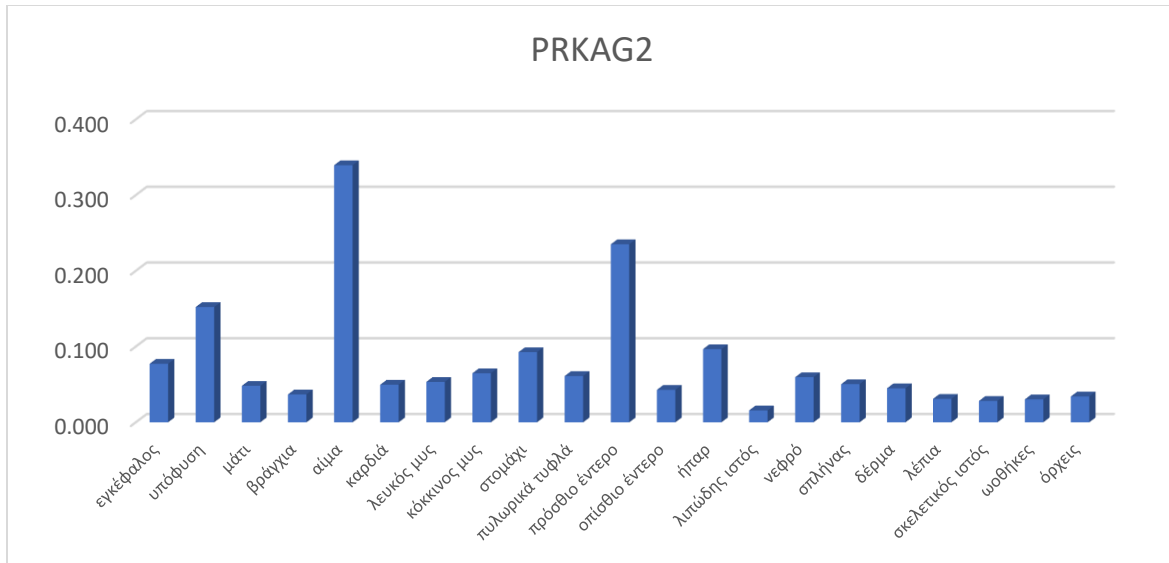
Εικόνα 17: Σχετική έκφραση του μεταγράφου PRKAB1 στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα γ φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου PRKAB1 της β' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία.

Όσον αφορά τα μετάγραφα της γ' ρυθμιστικής υπομονάδας της υπό μελέτη κινάσης, το PRKAG2 φαίνεται να έχει αρκετά μειωμένη έκφραση σε όλους τους ιστούς (Εικόνα 18). Οι ιστοί στους οποίους φαίνεται η σχετική του έκφραση να είναι συγκριτικά αυξημένη είναι οι εξής: πρόσθιο έντερο, αίμα και υπόφυση (Εικόνα 18).

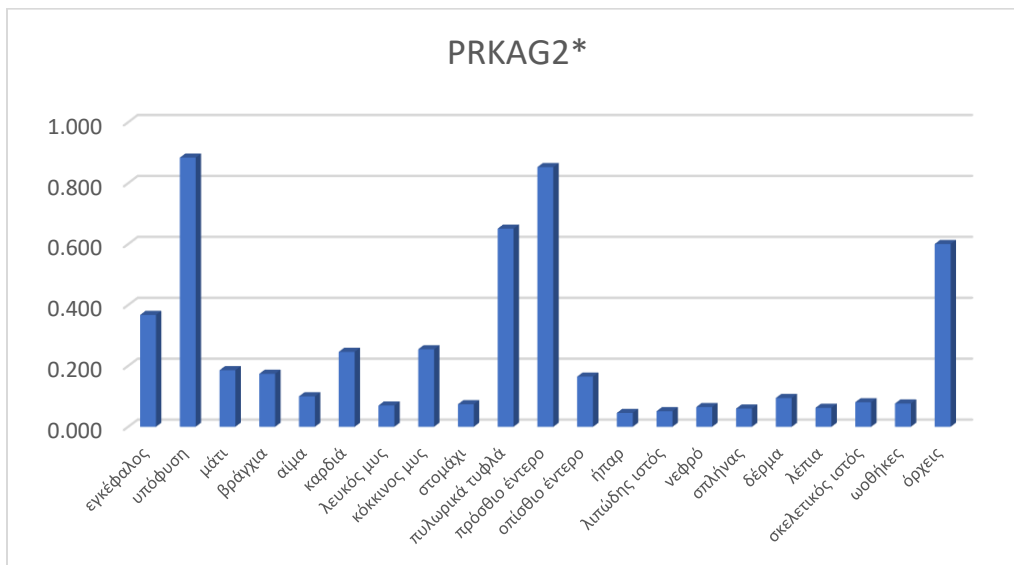
Το μετάγραφο PRKAG2* έχει πολύ υψηλή έκφραση σε αρκετούς ιστούς όπως στους όρχεις, στην υπόφυση, στα πλωρικά τυφλά και στο πρόσθιο έντερο. Σε χαμηλή συγκέντρωση εντοπίστηκε στο ήπαρ, στον λιπώδη ιστό, στους νεφρούς, στα λέπια, στο δέρμα, στο λευκό μυ, στο στομάχι στο σκελετικό ιστό και στις ωοθήκες. Στους υπόλοιπους ιστούς π.χ. εγκέφαλος ή κόκκινος μυς παρατηρούνται παρόμοια επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 19).

Το μετάγραφο PRKAG3 έδειξε υψηλή έκφραση στο αίμα, στο λευκό και στο κόκκινο μυ και στο πρόσθιο έντερο και πολύ χαμηλότερη στους υπόλοιπους ιστούς. Στους όρχεις, στην καρδιά, στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό παρουσίασε μεσαία επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 20).

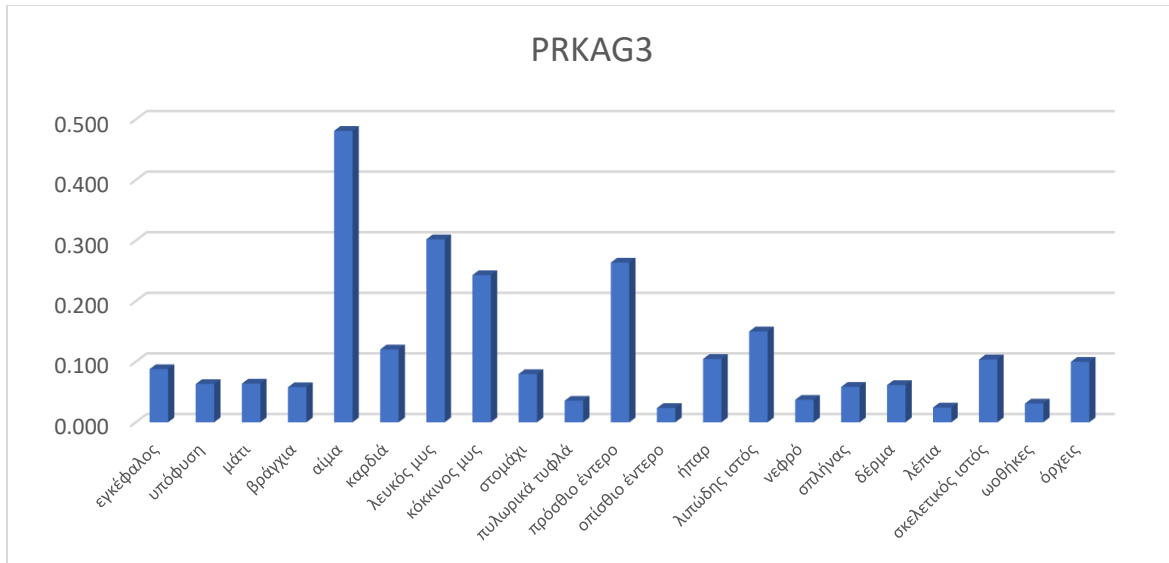
Τέλος, το μετάγραφο του παραλόγου γονιδίου PRKAG3* έχει τη μικρότερη έκφραση σε όλους τους ιστούς από τα υπόλοιπα, μαζί με το PRKAG2. Πέρα από το αίμα όπου διακρίνεται και η μεγαλύτερη ποσότητα μεταγράφου, δεν φαίνεται να είναι κυρίαρχο μετάγραφο στους υπόλοιπους ιστούς (Εικόνα 21).



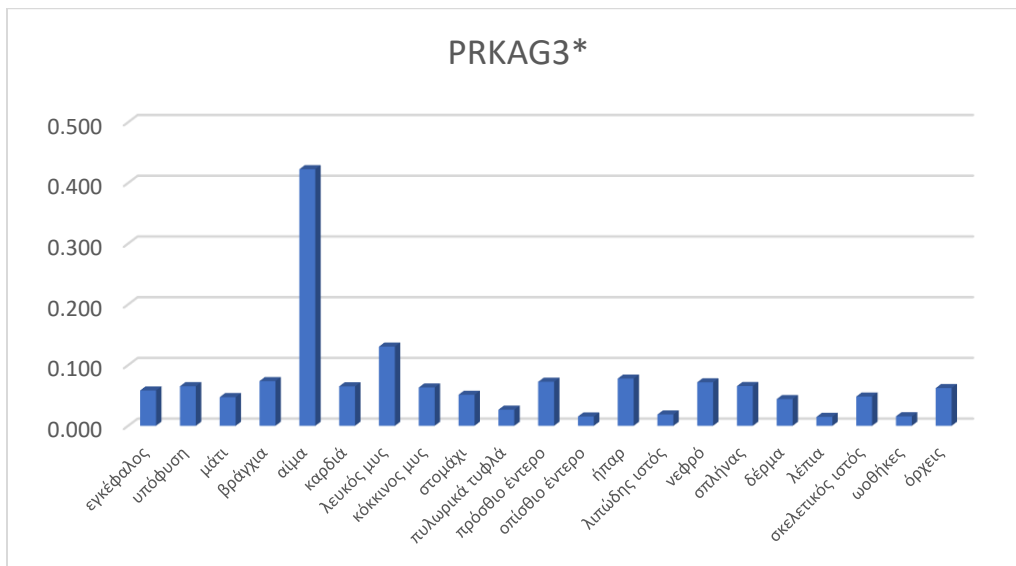
Εικόνα 18: Σχετική έκφραση του μεταγράφου PRKAG2 στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα γ φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου PRKAG2 της γ' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία.



Εικόνα 19: Σχετική έκφραση του μεταγράφου PRKAG2* στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα γ φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου PRKAG2 της γ' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία.



Εικόνα 20: Σχετική έκφραση του μεταγράφου PRKAG3 στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα y φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου PRKAG3 της γ' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία.



Εικόνα 21: Σχετική έκφραση του μεταγράφου PRKAG3* στους υπο μελέτη ιστούς. Στον άξονα y φαίνεται η έκφραση του μεταγράφου PRKAG2 της γ' υπομονάδας της AMPK, ενώ στον άξονα x οι ιστοί του λαβρακιού που εξετάστηκαν σε αυτήν εργασία.

4. Συζήτηση

Η ενεργοποιημένη με AMP πρωτεϊνική κινάση 5'-AMP (AMPK) είναι ένα τριμερές πρωτεϊνικό σύμπλοκο, που αποτελείται από μια καταλυτική α υπομονάδα και δύο ρυθμιστικές β και γ υπομονάδες. Χωρίς να περιλαμβάνονται παραλλαγές που προκύπτουν από την εναλλακτική συναρμογή, κάθε μία από αυτές τις υπομονάδες εκφράζεται σε δύο ή τρεις ισομορφές ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ και $\gamma 3$) δίνοντας τη δυνατότητα σχηματισμού 12 διαφορετικών ετεροτριμερών συμπλοκών (βλ. Ενότητα 1.4, Εισαγωγή). Ομόλογα και των τριών υπομονάδων έχουν ταυτοποιηθεί σε θηλαστικά, στη *Drosophila melanogaster*, στο *Caenorhabditis elegans*, στο *Saccharomyces cerevisiae* και στο *Arabidopsis thaliana* και στο πρωτόζωο πρωτόζωο *Giardia lamblia*, με υψηλό βαθμό συντήρησης που υποδηλώνει ότι αυτό το αρχαίο κύκλωμα σηματοδότησης της AMPK εξελίχθηκε τουλάχιστον ένα δισεκατομμύριο χρόνια πριν από τη ρύθμιση ενός ευρέος φάσματος δράσεων στη μεταβολική ομοίωση [39].

Στη διπλωματική αυτή εργασία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων αυτών σε είκοσι διαφορετικούς ιστούς, κάτι πρωτοποριακό για την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία στην οποία ανεξαιρέτως οργανισμού, γίνονται αναφορές μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς. Η AMPK, όντας ενεργειακός αισθητήρας έχει μελετηθεί εκτενώς σε ιστούς όπως ο κόκκινος και ο λευκός μυς, καρδιά, εγκέφαλος και λιγότερο έντερο, ήπαρ και νεφροί και σχεδόν καθόλου σε πολλούς άλλους για παράδειγμα μάτια, γονάδες. Για αυτό το λόγο η σύγκριση της έκφρασης με άλλους οργανισμούς μοντέλα από προηγούμενες έρευνες, αφορούν περισσότερο τους ιστούς που προαναφέρθηκαν. Ακόμη, τα ζεύγη παραλόγων γονιδίων στο λαβράκι δεν αντιστοιχούν απαραίτητα με αυτά των άλλων οργανισμών, δεν είναι δηλαδή ορθόλογά τους. Για να ελεγχθεί αυτό στα πλαίσια της εργασίας, χρησιμοποιήθηκαν τα κωδικά ονόματα των μεταγράφων τα οποία αναφέρονται στη βιβλιογραφία που αξιοποιήθηκε στη συζήτηση. Στη συνέχεια μέσω της βάσης δεδομένων GenBank, βρέθηκε ο κωδικός πρωτεΐνης (protein id) του κάθε γονιδίου, με τον οποίο έγινε blast στη βάση δεδομένων του λαβρακιού (<http://public-genomes-ngs.molgen.mpg.de/cgi-bin/hgGateway?org=Dicentrarchus+labrax&db=dicLab1&hgsid=5496>).

Γενικά, μελέτες σε θηλαστικά και συγκεκριμένα σε δείγματα ιστών αρουραίου έδειξαν ότι τα μετάγραφα της β υπομονάδας ήταν τα λιγότερα "επικρατή" με παρόμοια επίπεδα σε διαφορετικούς ιστούς εκτός από τον εγκέφαλο, ενώ τα μετάγραφα της γ υπομονάδας είχαν μεγάλη έκφραση στην καρδιά, στους πνεύμονες, στους σκελετικούς μύες, στο ήπαρ και στους νεφρούς. Σε μια προηγούμενη μελέτη σχετικά με την κατανομή της δραστηριότητας AMPK σε διάφορους ιστούς αναφέρθηκε ότι η AMPK ήταν κατά κύριο λόγο ένα ένζυμο του ήπατος [47]. Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, ενώ οι υπομονάδες AMPK εκφράζονται σε κάθε ιστό και το σύμπλεγμα AMPK $\alpha\beta\gamma$ μπορεί να υφίσταται σε 12 διαφορετικά ετεροτριμερή στα θηλαστικά, οι υπομονάδες AMPK μεμονωμένα, σε ανθρώπους και ποντίκια, εμφανίζουν σημαντικές διακυμάνσεις στην έκφραση σε συγκεκριμένους ιστούς και φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση υπομονάδας και υποκυτταρικού εντοπισμού. Η έκφραση της ισομορφής $\gamma 2$ σε επίπεδο RNA

έδειξε μια ευρεία κατανομή στους ιστούς σε ποντίκια, αρουραίους και ανθρώπους. Σε ποντίκια και αρουραίους, ανιχνεύτηκαν τα υψηλότερα επίπεδα της ισομορφής $\gamma 2$ στους όρχεις και στον καφέ λιπώδη ιστό, ενώ η υψηλότερη έκφραση mRNA της $\gamma 2$ ισομορφής του ανθρώπου βρέθηκε στην καρδιά. Σε ποντίκια και αρουραίους, η real time PCR χρησιμοποιήθηκε επίσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό των σχετικών αναλογιών των δύο διαφορετικών μεταγράφων $\gamma 2$ που είχαν παρατηρηθεί προηγουμένως σε ανθρώπους [PRKAG2-a και PRKAG2-b], που έδειξαν ότι το Prkag2-a είναι το εξαιρετικά κυρίαρχο αντίγραφο στους περισσότερους ιστούς. Στην πραγματικότητα, οι υψηλότερες αναλογίες Prkag2-b επί του συνολικού Prkag2 βρέθηκαν στον σκελετικό μυ ($\leq 48\%$ σε ποντίκια) και στον εγκέφαλο ($\sim 16\%$) [45]. Σε περαιτέρω έρευνες που έγιναν στον άνθρωπο τα $\alpha 1$, $\gamma 1$ και $\gamma 2$ εκφράζονται ευρέως στους περισσότερους ιστούς σε όλο το σώμα ενώ τα $\alpha 2$ και $\beta 2$ περιορίζονται περισσότερο στον σκελετικό μυ, τον καρδιακό μυ και το συκώτι. Η $\alpha 2$ -υπομονάδα κυριαρχεί στην καρδιά του αρουραίου, ενώ το $\gamma 2$ παρουσιάζει ελάχιστα μεγαλύτερη έκφραση από το $\gamma 1$ [48]. Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η άσκηση ενεργοποιεί το $\alpha 2$ περισσότερο από το $\alpha 1$ στον σκελετικό μυ αρουραίου [49], πιθανώς λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας στο AMP [50]. Η ισομορφή $\gamma 3$ περιορίζεται σε μεγάλο βαθμό στους σκελετικούς μύες και ιδιαίτερα στους τύπους ταχείας συστολής/λευκών ινών. Αν και αυτή η ειδικότητα ιστού περιορίζει τον αριθμό των πιθανών ετεροτριμερών συμπλοκών σε έναν συγκεκριμένο ιστό, και οι επτά ισομορφές της γ υπομονάδας έχουν ταυτοποιηθεί στον σκελετικό μυ αφήνοντας τη στοιχειομετρία και τη ρύθμιση της AMPK σε αυτόν τον ιστό πολύ περίπλοκη. Προστίθεται σε αυτήν την πολυπλοκότητα η ετερογένεια του σκελετικού μυϊκού ιστού που περιέχει όχι μόνο μυϊκές ίνες αλλά και ενδοθηλιακά και λιπώδη κύτταρα, ινοβλάστες και διαφορετικούς τύπους κυττάρων αίματος. Αν και αποτελούν μειονότητα, αυτοί οι άλλοι τύποι κυττάρων θα μπορούσαν να συμβάλουν με τα ετεροτριμερή AMPK που δεν υπάρχουν στις ίδιες τις μυϊκές ίνες [46].

Σε σύγκριση με τα θηλαστικά και συγκεκριμένα δείγματα αρουραίου παρατηρήθηκαν μεγάλες διαφορές στα δείγματα που μελετήθηκαν στο λαβράκι στην παρούσα εργασία. Αρχικά σε δείγματα αρουραίου παρατηρήθηκε μια όμοια και ευρεία κατανομή μεταγράφων της υπομονάδας β σε όλους τους ιστούς κάτι το οποίο ισχύει εν μέρει μόνο για το μετάγραφο AAKB1 όπου δεν διακρίνουμε μεγάλη διακύμανση στην έκφραση, αλλά όχι για το PRKAB1 το οποίο εκφράζεται κυρίως στο αίμα, στην υπόφυση, στους όρχεις, στα νεφρά και στον σπλήνα και μια μεσαίου επιπέδου έκφραση στους υπόλοιπους ιστούς (Εικόνες 16,17). Όσον αφορά τα γονίδια PRKAG2 και PRKAG2* επιβεβαιώθηκε πως είναι ορθόλογα με τα αντίστοιχα PRKAG2a και PRKAG2b που μελετήθηκαν στα θηλαστικά. Τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας έδειξαν ότι το PRKAG2* (ή PRKAG2b) είναι το κυρίαρχο στους περισσότερους ιστούς, από το ζεύγος των δύο παραλόγων. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα θηλαστικά στα οποία, όπως προαναφέρθηκε, σε ιστούς ποντικών φαίνεται να επικρατεί το PRKAG2 (ή PRKAG2a) μετάγραφο. Το μετάγραφο PRKAG2* (ή PRKAG2b) έχει πολύ υψηλή έκφραση σε αρκετούς ιστούς όπως στους όρχεις, στο πρόσθιο έντερο, στην υπόφυση, στα πυλωρικά τυφλά, στον εγκέφαλο και στον κόκκινο μυ σε

σύγκριση με το PRKAG2 (PRKAG2a) μετάγραφο, που δεν φαίνεται να εκφράζεται τόσο στους ιστούς πέραν του αίματος και του πρόσθιου εντέρου (Εικόνες 18, 19). Οι ομοιότητες με το μοντέλο του ανθρώπου στην έκφραση του PRKAG2*(ή PRKAG2b) εκδηλώνονται στον εγκέφαλο και στον κόκκινο μυ του λαβρακιού καθώς και στον άνθρωπο, παρότι το μετάγραφο αυτό δεν είναι το επικρατές, εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη έκφραση στους αντίστοιχους ιστούς. Μια άλλη παρατήρηση που μπορεί να αποτυπωθεί από τις σχέσεις παραλόγων και φαίνεται και για το ζεύγος PRKAG2 και PRKAG2*(ή PRKAG2b) είναι ότι η έκφραση του ενός δεν “ανταγωνίζεται” απαραίτητα αυτή του άλλου (π.χ. σαφής επικράτηση κάθε παραλόγου σε διαφορετικό ιστό). Αυτό ενισχύεται και από έρευνες που έχουν γίνει σε σαλμονοειδή, στις οποίες υποδεικνύεται ότι δεν υπάρχουν δύο παράλογα γονίδια υπομονάδων της AMPK που να ενεργούν εντελώς ανταγωνιστικά και το πιο πιθανό σενάριο είναι ότι υπάρχει μια σχέση συνέργειας μεταξύ τους [51]. Όσον αφορά το PRKAG3 γονίδιο, που κωδικοποιεί για τη γ3 υπομονάδα, το λαβράκι διαθέτει δύο παράλογα γονίδια το PRKAG3 και το PRKAG3*. Στα δείγματα της παρούσας εργασίας φαίνεται ότι το PRKAG3 έχει υψηλότερη έκφραση στους περισσότερους ιστούς συγκριτικά με το παράλογο του. Όπως διαπιστώθηκε από τη βάση δεδομένων ensemble (<https://www.ensembl.org/index.html>) ο άνθρωπος ο αρουραίος και το ποντίκι δεν διαθέτουν παράλογα για τη γ3 υπομονάδα όπως το λαβράκι. Η “κυριαρχία” του PRKAG3 για τη γ υπομονάδα (γ3) που παρατηρείται στα θηλαστικά, στο μυ και ιδιαίτερα στο λευκό μυ, φαίνεται να ισχύει και για το λαβράκι. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως τα πρότυπα έκφρασης των τριών ισομορφών της ρυθμιστικής γ υπομονάδας της ενεργοποιημένης με AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) έχουν προσδιοριστεί σε διάφορους ιστούς από ενήλικες ανθρώπους, ποντίκια και αρουραίους, καθώς και σε ανθρώπινα πρωτογενή μυϊκά κύτταρα. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του mRNA έδειξε παρόμοια πρότυπα έκφρασης στα τρία είδη και μια καλή συσχέτιση με την πρωτεϊνική έκφραση σε ποντίκια και αρουραίους. Η ισομορφή γ3 εμφανίστηκε εξαιρετικά ειδική για το σκελετικό μυ, ιδιαίτερα για το λευκό, ενώ η γ1 και η γ2 έδειξαν ευρεία κατανομή στους ιστούς.

Η έκφραση των γονιδίων σε επίπεδο RNA της AMPK σε έναν υγιή τύπο μυδιών προσδιορίστηκε σε πέντε ιστούς: στο σκληρό κάλυμμα, στα βράγχια, στις γονάδες, στον προσαγωγό μυ και στο έντερο. Σε γενικές γραμμές, τα γονίδια AMPK εκφράζονται σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν, αλλά είχαν υψηλότερη έκφραση στις γονάδες, στα βράγχια και στο έντερο. Οι υπομονάδες AMPK-β και AMPK-γ είχαν την υψηλότερη έκφραση στο βράγχια και την αμέσως μεγαλύτερη έκφραση στο έντερο. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων AMPK παρατηρήθηκαν στα βράγχια, που είναι ένας από τους κύριους ιστούς του μεταβολισμού της ενέργειας, και ρυθμίζει αναπνευστικές λειτουργίες και λειτουργίες σχετικές με την πρόσληψη τροφής στα μαλάκια. Σε αντίθεση με τις υπομονάδες AMPK-β και AMPK-γ, η AMPK-α εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στο έντερο, το οποίο είναι το κύριο όργανο πέψης και απορρόφησης του μαλακίου, και επίσης ένας σημαντικός ιστός μεταβολισμού ενέργειας

[80,81,82]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν το ρόλο κλειδί του ενζύμου AMPK στον ενεργειακό μεταβολισμό του οργανισμού [52].

Τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας, έδειξαν ιστοειδική έκφραση όλων των μεταγράφων που μελετήθηκαν στους είκοσι ιστούς κάτι που συμπίπτει με τα ευρήματα στα μύδια και στους περισσότερους οργανισμούς στους οποίους μελετήθηκε η AMPK (παρότι οι υπό μελέτη ιστοί σε άλλες έρευνες ήταν συνήθως λιγότεροι). Για τα μαλάκια το έντερο αποτελεί πολύ σημαντικό ιστό απορρόφησης θρεπτικών αλλά και πέψης και συνεπώς αποτελεί ιστό με έντονη ρύθμιση του ενεργειακού μεταβολισμού, γεγονός στο οποίο είναι πιθανό να βασίζεται η αυξημένη έκφραση του ενζύμου της AMPK. Στους τελεόστεους, πέρα από την πέψη ο βασικότερος ρόλος του εντέρου έγκειται στην ωσμωρρύθμιση και στην ικανότητά του να απορροφά αποτελεσματικά υγρό. Επίσης, το έντερο είναι ζωτικής σημασίας για την αντιστάθμιση των απωλειών νερού στο υπερωσμωτικό περιβάλλον της θάλασσας. Η ικανότητα του εντέρου να επαναρροφά υγρό είναι απαραίτητη για την ανανέωση των απωλειών νερού και ηλεκτρολυτών κατά τη διάρκεια συνήθων φυσιολογικών διαδικασιών όπως η πέψη στα ψάρια [55]. Αυξημένη έκφραση των γονιδίων της β' και της γ' υπομονάδας στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο παρατηρήθηκε και στο λαβράκι κάτι που μπορεί να συνδεθεί με την έντονη μεταβολική δραστηριότητα του ιστού αυτού, και τη σημασία του για την εύρυθμη λειτουργία του στο υδάτινο περιβάλλον. Επίσης, η αυξημένη έκφραση στις γονάδες, ένας ιστός για τον οποίο δεν αναφέρονται άλλες έρευνες για την ιστοειδική έκφραση της AMPK πέρα από αυτή στα μύδια, παρατηρήθηκε και στο λαβράκι ιδιαίτερα για τα γονίδια PRKAB1 και PRKAG2*.

Χάρη στον τρίτο γονιδιακό διπλασιασμό στους τελεόστεους δημιουργήθηκαν επιπλέον αντίγραφα για την κάθε υπομονάδα της AMPK, με αποτέλεσμα ο αριθμός των πιθανών ισόμορφων του ενζύμου αυξάνεται από τους 12 στους 30. Συνεπώς η ύπαρξη παραλόγων γονιδίων κάνει περισσότερο περίπλοκη την κατανόηση αυτής της συσχέτισης ετεροτριμερούς με συγκεκριμένο ιστό. Όσον αφορά τους τελεόστεους έχει αποδειχθεί ότι η AMPK είναι συντηρημένη. Στην πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) έχει ήδη αναφερθεί η ύπαρξη παραλόγων και για τις τρεις υπομονάδες της AMPK οι οποίες εμφανίζουν ιδιαίτερα ενισχυμένη έκφραση στο ήπαρ, στους μύς και στον υποθάλαμο [56]. Η AMPK παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των μεταβολικών οδών της γλυκόζης και των λιπιδίων στα ψάρια και συγκεκριμένα στα σολωμοειδή όπως στην καφέ πέστροφα (*Salmo trutta*) [36]. Η σηματοδότηση AMPK πιστεύεται ότι ρυθμίζεται από τα επίπεδα υδατανθράκων διατροφής και τα επίπεδα λίπους [81].

Η δραστηριότητα της AMPK στο χρυσόψαρο (*Carassius auratus*) μελετήθηκε υπό ανοξικές και υποξικές συνθήκες. Συγκεκριμένα, η δραστηριότητα της AMPK ενεργοποιείται στο ήπαρ του χρυσόψαρου μετά από 12 ώρες υποξίας [36]. Υποξικές και ανοξικές συνθήκες φαίνεται να ενεργοποιούν την AMPK τόσο στον εγκέφαλο του όσο και τον καρδιακό μυ [46]. Πρόσφατα, έχει επίσης αναφερθεί η ικανότητα αύξησης της δραστηριότητας της AMPK από το AICAR στα ηπατοκύτταρα χρυσόψαρου *in vitro* [53]. Το AICAR και η μετφορμίνη (που αποτελούν ενεργοποιητές της AMPK) φαίνεται επίσης να αυξάνουν τη δραστηριότητά της στο ήπαρ της

ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) *in vivo* και *in vitro* [54]. Έχει αποδειχθεί ότι οι ενεργοποιητές της AMPK, AICAR και μετφορμίνη αυξάνουν τη δραστικότητα AMPK στους μυοσωλήνες πέστροφας, με αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης γλυκόζης με τη μεσολάβηση GLUT4, και υποδηλώνουν ότι η AMPK μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό μεταβολικό ρόλο στον σκελετικό μυ των ψαριών, ιδιαίτερα υπό συνθήκες έντονης ενεργειακής δαπάνης (π.χ. άσκηση). Το κύριο σύμπλοκο AMPK στην πέστροφα, στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα, είναι το $\alpha 1\beta 2\gamma 1$. Επίσης, στην ιριδίζουσα πέστροφα (rainbow trout) λήφθηκαν στοιχεία για την παρουσία και τη λειτουργία των αισθητήρων ενέργειας όπως της AMPK και των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στην κυτταρική σηματοδότηση (mTOR και Akt), στον υποθάλαμο. Αυτές οι πρωτεΐνες στον υποθάλαμο και στο ήπαρ ενεργοποιούνται σε ψάρια που τρέφονται με δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά υποδηλώνοντας ότι οι κυτταρικές αυτές οδοί σηματοδότησης, ενεργοποιούνται ως απόκριση στην αυξημένη διαθεσιμότητα λιπαρών οξέων [36].

Τα επίπεδα mRNA σε μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε έναν άλλο τελεόστεο, στο κυπρίνο (*Carassius carassius*), πρότειναν διαφορές στη σύνθεση των υπομονάδων μεταξύ καρδιακού και εγκεφαλικού ιστού. Στην καρδιά, το $\alpha 2$ κυριάρχησε στο $\alpha 1$ σε αναλογία 10:1, ενώ στον εγκέφαλο, τα $\alpha 1$ και $\alpha 2$ εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης. Το $\beta 1\beta$ -παράλογο κυριάρχησε στο $\beta 1\alpha$ -παράλογο στον καρδιακό ιστό (αναλογία 25:1), ενώ και οι δύο β -υπομονάδες εμφάνισαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο. Η $\gamma 2\alpha$ -υπομονάδα παρουσίασε μεγαλύτερη έκφραση από την $\gamma 2\beta$ -υπομονάδα στον καρδιακό ιστό (αναλογία 5:1), ενώ έδειξαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης στον εγκέφαλο. Δεδομένων των παραπάνω, η πιο πιθανή σύνθεση του συμπλόκου της AMPK στην καρδιά του κυπρίνου είναι η $\alpha 2\beta 1\beta\gamma 2\alpha$. Σε σύγκριση με την έκφραση των υπομονάδων που παρατηρείται στην καρδιά του κυπρίνου, ο εγκέφαλος έδειξε μια πιο ομοιόμορφη έκφραση των διαφόρων υπομονάδων.

Τα παράλογα $\beta 1\alpha$ και $\beta 1\beta$ του κυπρίνου, σύμφωνα με το άρθρο [57], είναι και τα δύο ορθόλογα του γονιδίου PRKAB1 στο λαβράκι σε αυτή την έρευνα, όπως και τα $\gamma 2\alpha$ και $\gamma 2\beta$ είναι ορθόλογα του PRKAG2. Η συγκεκριμένη μελέτη στο λαβράκι έδειξε ότι στους ιστούς του εγκεφάλου και της καρδιάς επικρατεί το PRKAG2* γονίδιο για τη γ' υπομονάδα που δεν συνάδει με τα ευρήματα στον κυπρίνο που επικρατούν μετάγραφο της $\gamma 2$ (PRKAG2). Στη β' υπομονάδα του λαβρακιού φαίνεται το PRKAB1 να είναι το επικρατέστερο μετάγραφο κάτι που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα στον κυπρίνο στον οποίο κυριαρχεί η $\beta 1$ υπομονάδα. Δεν μπορεί να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για τη $\gamma 2\beta$ υπομονάδα του λαβρακιού (PRKAG2*) διότι σύμφωνα με την έρευνα αυτή, ο κυπρίνος δεν διαθέτει ορθόλογο της. Τα PRKAG2 και PRKAB1, όπως υποδεικνύουν τα αποτελέσματα της διπλωματικής αυτής εργασίας, είναι τα επικρατέστερα γονίδια στο λαβράκι για την β' και γ' υπομονάδα σε όλους τους ιστούς. Μελετώντας μεμονωμένα ζεύγη παραλόγων για τον οργανισμό αυτό δεν μπορεί να εξαχθεί ένα γενικότερο συμπέρασμα για την επικρατέστερη ισομορφή του ενζύμου. Η κινάση AMPK αποτελεί ένα ένζυμο 'αισθητήρα' του ενεργειακού μεταβολισμού και φαίνεται να έχει μεγάλη

διακύμανση στην ιστοειδική έκφραση μεταξύ των οργανισμών κάτι που εξηγείται από τις διαφορετικές μεταβολικές ανάγκες του. Ο ρόλος της γ3 υπομονάδας στους μύες είναι η κύρια ομοιότητα που παρατηρήθηκε με τα θηλαστικά ενώ οι κύριοι ιστοί έκφρασης ήπαρ, γονάδες, έντερο και πυλωρικά τυφλά στο λαβράκι συμπίπτουν σε μεγάλο βαθμό με τα μαλάκια και τους τελεόστεους που προαναφέρθηκαν. Συγκεκριμένα η έρευνα που έγινε σε μύδια, ήταν η μόνη που έκανε αναφορά στην έκφραση του ενζύμου της AMPK στις γονάδες, γεγονός που αντιστοιχείται με τα ευρήματα της παρούσας εργασίας μιας και όλα τα μετάγραφα εκφράστηκαν στο ιστό αυτό. Η έκφραση αυτή όλων των μεταγράφων υποδηλώνει, τόσο για τις γονάδες όσο και για άλλους ιστούς όπως τα μάτια ή το στομάχι, για τους οποίους δεν υπάρχουν αναφορές στη βιβλιογραφία για την AMPK, ότι ο λειτουργικός ρόλος του ενζύμου πιθανώς επεκτείνεται πολύ περισσότερο από ότι είναι ήδη γνωστό και τεκμηριωμένο και η ρύθμιση του μέσω διαφορετικών ισομορφών φαίνεται να είναι πολύ εξειδικευμένη.

Η υψηλή έκφραση των μεταγράφων της AMPK στους ιστούς του ήπατος, του εντέρου, του παγκρέατος και της υπόφυσης που παρατηρήθηκε στα δείγματα λαβρακιού της παρούσας εργασίας θα μπορούσε να συσχετιστεί με το διαφοροποιημένο σύστημα ανίχνευσης θρεπτικών στα ψάρια, το οποίο βασίζεται στην τροποποιημένη φυσιολογία και στις μεταβολικές τους ανάγκες σε σύγκριση με άλλους οργανισμούς. Όπως αναλύθηκε και στην Ενότητα 1.3 στην Εισαγωγή, η διαδικασία ανίχνευσης θρεπτικών (nutrient sensing) στα ψάρια εμπλέκει συγκεκριμένους ιστούς συνθέτοντας έτσι ένα δίκτυο ελέγχου όπου η AMPK φαίνεται να παίζει ρόλο κλειδί στην ενεργοποίηση και απενεργοποίηση σηματοδοτικών μονοπατιών. Συγκεκριμένα, τα παγκρεατικά ενδοκρινικά κύτταρα και το έντερο συνδέονται με την απελευθέρωση ορμονών ενώ το ήπαρ συνδέεται με έναν μεταβολικό διακόπτη χρήσης γλυκόζης και της παραγωγής της. Η ικανότητα ανίχνευσης αποθεμάτων γλυκόζης και οι αισθητήρες λιπαρών οξέων είναι παρόντες στα σώματα Brockmann ή BB που αποτελούν κύρια συσώρευση παγκρεατικών ενδοκρινών κυττάρων σε διάφορα είδη ψαριών και σε θέσεις εντέρου. Τα ψάρια έχουν αναπτύξει ένα σημαντικό πλεονέκτημα, καθώς μπορούν να υποβληθούν σε παρατεταμένες περιόδους νηστείας με ελάχιστες συνέπειες στα ενεργειακά αποθέματα λόγω του ευαίσθητου αυτού μηχανισμού ανίχνευσης. Η σηματοδότηση ενεργοποιημένη από AMPK ρυθμίζει την έκφραση συσχετιζόμενων με τον μεταβολισμό γονιδίων στο ήπαρ τόσο στα θηλαστικά όσο και στα ψάρια, λόγω της ικανότητας του οργάνου αυτού να αποθηκεύει και να απελευθερώνει γλυκογόνο και λιπίδια για να ικανοποιήσει τις μεταβολικές απαιτήσεις και να διατηρήσει την ομοιόσταση θρεπτικών συστατικών ολόκληρου του σώματος

Όπως έχει προαναφερθεί ο τρίτος γύρος γονιδιακού διπλασιασμού στους τελεόστεους έχει ως επακόλουθο την ύπαρξη πολλών διαφορετικών παραλόγων. Στο λαβράκι αλλά και στους περισσότερους οργανισμούς μοντέλα διακρίνουμε έκφραση και των δύο σε όλους τους ιστούς κάτι που υποδεικνύει μια σχέση συνεργασίας μεταξύ τους και όχι επικράτηση του ενός έναντι του άλλου σε ιστοειδικό επίπεδο [51]. Μία άλλη ενδιαφέρουσα οπτική περί ύπαρξης παραλόγων αφορά τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του οργανισμού. Ιδιαίτερα τα ψάρια

από τη στιγμή εκκόλαψης μέχρι την πλήρη ενηλικίωση τους σε ώριμα άτομα περνάνε από διαφορετικές αναπτυξιακές φάσεις στις οποίες διαφέρει τόσο η μορφολογία τους όσο και οι μεταβολικές τους ανάγκες. Συνεπώς ένα ένζυμο όπως η AMPK είναι εύλογο να μην ακολουθεί το ίδιο μοτίβο έκφρασης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης κάτι που μπορεί να ρυθμίζεται από τη διαφορετική “δομική σύσταση” των καταλυτικών και ρυθμιστικών υπομονάδων της.

Συνολικά η πτυχιακή αυτή εργασία αναδεικνύει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα της ιστοειδικής έκφρασης του ενζύμου της AMPK στους τελεόστεους. Τα αποτελέσματα της αφορούν συγκεκριμένα γονίδια που κωδικοποιούν τις ρυθμιστικές υπομονάδες του ενζύμου στο λαβράκι, δηλαδή τη β΄ και τη γ΄, οπότε η παρούσα εργασία δεν μπορεί να εξάγει ένα γενικευμένο συμπέρασμα για την πιο επικρατή ισομορφή του ενζύμου στον οργανισμό αυτό, παρόλα αυτά η προσθήκη της στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δίνει μία βάση για περαιτέρω έρευνα σε ένα μεγαλύτερο εύρος ιστών και στη μελέτη ρύθμισης και λειτουργίας των παραλόγων γονιδίων των ρυθμιστικών υπομονάδων. Από αυτήν την σύγκριση έκφρασης μεταξύ λαβρακιού και άλλων οργανισμών μπορούν να προκύψουν πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα μέσω της καλύτερης κατανόησης της λειτουργίας της κινάσης AMPK σε διαφορετικούς ιστούς, με μεγάλο ερευνητικό ή οικονομικό όφελος όπως τη φαρμακευτική αξιοποίηση της κινάσης ή τη χρήση της για τη ρύθμιση μεταβολικών λειτουργιών σε εκτρεφόμενους οργανισμούς.

Βιβλιογραφία

- 1) Freyhof J, Kottelat M (2008) *Dicentrarchus labrax*. In: IUCN 2008. IUCN Red List of Threatened Species, <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T135606A4159287.en>
- 2) «Cultured Aquatic Species Information Programme» *Dicentrarchus labrax*, FAO Fisheries and Aquaculture Department
- 3) Froese, Rainer and Pauly, Daniel (2017). "*Dicentrarchus labrax*" in FishBase.
- 4) Abi Carroll (2014), Population Dynamics of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*), Welsh Waters
- 5) Fuiman L.A. 2002. Special Considerations of Fish Eggs and Larvae. The Unique Contributions of Early
- 6) Life Stages (Fuiman L.A. and Werner R.G., eds), pp 1-32. Blackwell Science.

- 7) Koumoundouros G., Divanach P., Kentouri M. 1998. Embryonic and yolk-sac larval development of *Dentex dentex* Linnaeus 1758 (Osteichthyes, Sparidae). *Marine Life*, 6: 41-50
- 8) A. W. KENDALL, JR., E. H. AHLSTROM AND H. G. MOSER, *Early Life History Stages of Fishes and Their Characters*
- 9) Pickett, Graham D., Pawson, Michael G. 1994. *Sea Bass-Biology, Exploitation, and Conservation*. Chapman & Hall, London
- 10) 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).
- 11) Ian A. Johnston, Neil I. Bower, Daniel J. Macqueen (2011), Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish, *Journal of Experimental Biology*, 214: 1617-1628; doi: 10.1242/jeb.038620
- 12) 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>.
- 13) Weil, C., Lefevre, F. & Bugeon, J. (2013). Characteristics and metabolism of different adipose tissues in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 23, 157-173. doi: 10.1242/jeb.161588.
- 14) 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>.
- 15) Cristina Salmerón (2018), Adipogenesis in Fish, *Journal of Experimental Biology* 2018 221: jeb161588 doi: 10.1242/jeb.161588
- 16) 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.bbailip.2015.02.003.
- 17) Glasauer SM, Neuhauss SC (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol Genet Genomics*;289(6):1045-1060. doi:10.1007/s00438-014-0889-2
- 18) 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>.
- 19) 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.

- 20) 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
- 21) Mihaylova, M. M., & Shaw, R. J. (2011). The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature cell biology*, 13(9), 1016–1023. <https://doi.org/10.1038/ncb2329>
- 22) Hardie D. G. (2014). AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annual review of nutrition*, 34, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161148>
- 23) 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-alpha1 down-regulates its activation in tumour cells. *Biochem. J.* 2014, 459, 275–287. doi: 10.1042/BJ20131344.
- 24) 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.
- 25) Peter J. Russell. (2009) *I Genetics: A Mentelian Approach* pg 543-545, 908-910
- 26) 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
- 27) 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.
- 28) 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
- 29) Hardie D. G. (2014). AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annual review of nutrition*, 34, 31–55. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071812-161148>
- 30) 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.
- 31) 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.

- 32) 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.
- 33) Kola, B., Grossman, A. B., & Korbonits, M. (2008). The role of AMP-activated protein kinase in obesity. *Frontiers of hormone research*, 36, 198–211. <https://doi.org/10.1159/000115366>
- 34) Hardie, D. G., & Sakamoto, K. (2006). AMPK: a key sensor of fuel and energy status in skeletal muscle. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 48–60. <https://doi.org/10.1152/physiol.00044.2005>
- 35) 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.
- 36) 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>.
- 37) 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.
- 38) 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
- 39) Conde-Sieira, M., & Soengas, J. L. (2017). Nutrient Sensing Systems in Fish: Impact on Food Intake Regulation and Energy Homeostasis. *Frontiers in neuroscience*, 10, 603. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603>
- 40) Violette, B., Athes, Y., Mounier, R., Guigas, B., Zarrinpashneh, E., Horman, S., Lantier, L., Hebrard, S., Devin-Leclerc, J., Beauloye, C., Foretz, M., Andreelli, F., Ventura-Clapier, R., & Bertrand, L. (2009). AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, 19–44. <https://doi.org/10.2741/3229>
- 41) Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjälml, G., Barnes, B. R., Krook, A., Zierath, J. R., Andersson, L., & Marklund, S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 286(2), E194–E200. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00147.2003>
- 42) Wu, J., Puppala, D., Feng, X., Monetti, M., Lapworth, A. L., & Geoghegan, K. F. (2013). Chemoproteomic analysis of intertissue and interspecies isoform diversity of AMP-activated

protein kinase (AMPK). *The Journal of biological chemistry*, 288(50), 35904–35912.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.508747>

- 43) Stephenne, X., Foretz, M., Taleux, N., van der Zon, G. C., Sokal, E., Hue, L., Viollet, B., and Guigas, B. (2011) Metformin activates AMP-activated protein kinase in primary human hepatocytes by decreasing cellular energy status. *Diabetologia* 54, 3101–3110
- 44) 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
- 45) 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>.
- 46) Mahlapuu, M., Johansson, C., Lindgren, K., Hjälml, G., Barnes, B. R., Krook, A., Zierath, J. R., Andersson, L., & Marklund, S. (2004). Expression profiling of the gamma-subunit isoforms of AMP-activated protein kinase suggests a major role for gamma3 in white skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 286(2), E194–E200.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00147.2003>
- 47) Stenslkken, K. O., Ellefsen, S., Stecyk, J. A., Dahl, M. B., Nilsson, G. E., & Vaage, J. (2008). Differential regulation of AMP-activated kinase and AKT kinase in response to oxygen availability in crucian carp (*Carassius carassius*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(6), R1803–R1814. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90590.2008>
- 48) Stapleton, D., Mitchelhill, K. I., Gao, G., Widmer, J., Michell, B. J., Teh, T., House, C. M., Fernandez, C. S., Cox, T., Witters, L. A., & Kemp, B. E. (1996). Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *The Journal of biological chemistry*, 271(2), 611–614.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.2.611>
- 49) Li J, Coven DL, Miller EJ, Hu XY, Young ME, Carling D, Sinusas AJ, Young LH. Activation of AMPK - and -isoform complexes in the intact ischemic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1927– H1934, 2006
- 50) Coven DL, Hu XY, Cong L, Bergeron R, Shulman GI, Hardie DG, Young LH. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E629 –E636, 2003.
- 51) Salt I, Celler JW, Hawley SA, Prescott A, Woods A, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the 2-isoform. *Biochem J* 334: 177–187, 1998.

- 52) Causey, D.R., Kim, J., Devlin, R.H. (2019) The AMPK system of salmonid fishes was expanded through genome duplication and is regulated by growth and immune status in muscle.
- 53) Wang, J., Fang, L., Wu, Q., Li, D., Huo, Z., & Yan, X. (2020). Genome-wide identification and characterization of the AMPK genes and their distinct expression patterns in response to air exposure in the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Genes & genomics*, 42(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s13258-019-00872-0>
- 54) Lau G, Richards J (2011) AMP-activated protein kinase plays a role in initiating metabolic rate suppression in goldfish hepatocytes. *J Comp Physiol B*. pp 1–13.
- 55) Polakof S, Panserat S, Craig P, Martyres D, Plagnes-Juan E, et al. (2011) The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout. *PLoS ONE* 6: e20228
- 56) Whittamore J. M. (2012). Osmoregulation and epithelial water transport: lessons from the intestine of marine teleost fish. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 182(1), 1–39. <https://doi.org/10.1007/s00360-011-0601-3>
- 57) Tian, Juan & Lu, Xing & Jiang, Ming & Wu, Fan & Liu, Wei & Yu, Lijuan & Wen, Hua. (2019). AMPK activation by dietary AICAR affects the growth performance and glucose and lipid metabolism in juvenile grass carp. *Aquaculture Nutrition*. 26. 10.1111/anu.12951.
- 58) Stensløkken, K. O., Ellefsen, S., Stecyk, J. A., Dahl, M. B., Nilsson, G. E., & Vaage, J. (2008). Differential regulation of AMP-activated kinase and AKT kinase in response to oxygen availability in crucian carp (*Carassius carassius*). *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 295(6), R1803–R1814. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90590.2008>
- 59) Dando, Paul & Demir, Necla. (1985). On the Spawning and Nursery Grounds of Bass, *Dicentrarchus Labrax*, in the Plymouth Area. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*. 65. 159-168. 10.1017/S0025315400060872
- 60) Pawson, M., Pickett, G., & Kelley, D. (1987). The distribution and migrations of bass, *Dicentrarchus labrax* L., in waters around England and Wales as shown by tagging. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67(1), 183-217. doi:10.1017/S0025315400026448
- 61) Vagn Korsgaard, T., Colding-Jørgensen, M. (2006). Time-dependent Mechanisms in Beta-cell Glucose Sensing. *J Biol Phys* 32, 289–306. <https://doi.org/10.1007/s10867-006-9017-9>
- 62) C. L. Carlson and W. W. Winder (1999). Liver AMP-activated protein kinase and acetyl-CoA carboxylase during and after exercise. *Journal of Applied Physiology* 86:2, 669-674

- 63) Yaniv Hinits, Daniel P. S. Osborn, Simon M. Hughes (2009). Differential requirements for myogenic regulatory factors distinguish medial and lateral somitic, cranial and fin muscle fibre populations. *Development*, 136: 403-414; doi: 10.1242/dev.028019
- 64) Efeyan, A., Comb, W. & Sabatini (2015). D. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302–310 <https://doi.org/10.1038/nature14190>
- 65) Blouet, C., & Schwartz, G. J. (2010). Hypothalamic nutrient sensing in the control of energy homeostasis. *Behavioural brain research*, 209(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.024>
- 66) Efeyan, A., Comb, W. C., & Sabatini, D. M. (2015). Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature*, 517(7534), 302–310. <https://doi.org/10.1038/nature14190>
- 67) Marty, N., Dallaporta, M., & Thorens, B. (2007). Brain glucose sensing, counterregulation, and energy homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 22, 241–251. <https://doi.org/10.1152/physiol.00010.2007>
- 68) Luo, Lin & Xue, Min & VACHOT, Christiane & Geurden, Inge & Kaushik, Sadasivam. (2014). Dietary medium chain fatty acids from coconut oil have little effect on profiles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. s 420–421. 24–31. 10.1016/j.aquaculture.2013.10.024.
- 69) Polakof, S., Panserat, S., Soengas, J. L., and Moon, T. W. (2012a). Glucose metabolism in fish a review. *J. Comp. Physiol. B*. 182, 1015–1045. doi:10.1007/s00360-012-0658-7
- 70) Seiliez, I., Gabillard, J. C., Skiba-Cassy, S., Garcia-Serrana, D., Gutiérrez, J., Kaushik, S., et al. (2008). An in vivo and in vitro assessment of TOR signaling cascade in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R329–R335. doi:10.1152/ajpregu.00146.2008
- 71) Lansard, M., Panserat, S., Plagnes-Juan, E., Seiliez, I., and Skiba-Cassy, S. (2010). Integration of insulin and amino acids signals that regulate hepatic metabolism-related gene expression in rainbow trout: role of TOR. *Amino Acids* 39, 801–810. doi:10.1007/s00726-010-0533-3
- 72) Polakof, S., Panserat, S., Craig, P. M., Martyres, D. J., Plagnes-Juan, E., Savari, S., et al. (2011e). The metabolic consequences of hepatic AMP-kinase phosphorylation in rainbow trout. *PLoS ONE* 6:e20228. doi:10.1371/journal.pone.0020228
- 73) Polakof, S., Médale, F., Skiba-Cassy, S., Corraze, G., and Panserat, S. (2010b). Molecular regulation of lipid metabolism in liver and muscle of rainbow trout subjected to acute and chronic insulin treatments. *Domestic Anim. Endocrinol.* 39, 26–33. doi:10.1016/j.domaniend.2010.01.003
- 74) Sheridan, M. A. (1994). Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 107, 495–508. doi:10.1016/0305-0491(94)90176-7

- 75) Tocher,D.R.(2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. Rev.Fish.Sci. 11,107–184.doi:10.1080/713610925
- 76) Shearer,K.D.,Silverstein,J.,andPlisetskaya,E.M.(1997). Roleofadiposityinfood intake control of juvenile chinook salmon (*Oncorhynchustshawytscha*). *Comp. Biochem.Physiol.A.* 118,1209–1215.doi:10.1016/S0300-9629(97)86801-6
- 77) Johansen,S.J.S.,Ekli,M.,andJobling,M.(2002). Is there lipostatic regulation of feed intake in Atlanti csalmon *Salmosalar* L.? *Aquacult.Res.* 33,515–524. doi:10.1046/j.1365-2109.2002.00736.x
- 78) Johansen,S.J.S.,Sveier,H.,andJobling,M.(2003).Lipostatic regulation of feed intake in Atlantic salmon *Salmosalar* L. defending adiposity at the expense of growth? *Aquacult.Res.* 34,317–331.doi:10.1046/j.1365-2109.2003.00821.x
- 79) Polakof,S.,Mommsen,T.P.,andSoengas,J.L.(2011d). Glucosensing and glucose homeostasis from fish to mammals. *Comp.Biochem.Physiol.B.* 160,123–149. doi:10.1016/j.cbpb.2011.07.006
- 80) Soengas,J.L.(2014).Contribution of glucose-and fatty acid sensing systems to the regulation of food intake in fish . Areview. *Gen.Comp.Endocrinol.* 205,36–48. doi:10.1016/j.ygcen.2014.01.015
- 81) Kueh CS, Chan KY (1985) Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. *J Appl Bacteriol* 59(1):41–47
- 82) Kamalam, B. S., Medale, F., Kaushik, S., Polakof, S., Skiba-Cassy, S., & Panserat, S. (2012). Regulation of metabolism by dietary carbohydrates in two lines of rainbow trout divergently selected for muscle fat content. *Journal of Experimental Biology*, 215, 2567–2578. <https://doi.org/10.1242/jeb.070581>