

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η οντογένεση της ελαφριάς αλυσίδας  
της μυοσίνης 1 (MLC1) στο σκελετικό μυ  
του τελεόστεου, *Sparus aurata*

Καπέτα Σουλτάνα

Διπλωματική Εργασία



Λάρισα, 2004



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

Αριθ. Εισ.: 4061/1

Ημερ. Εισ.: 09-11-2004

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075124

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο CCMAR του πανεπιστημίου Algarve της Πορτογαλίας με επιβλέπουσα την αναπληρώτρια καθηγήτρια D. Power του τμήματος Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Algarve της Πορτογαλίας.

Η υπεύθυνη καθηγήτρια της διπλωματικής αυτής εργασίας είναι η επίκουρος καθηγήτρια Κ. Μούτου του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής είναι:

Z. Μαμούρης, Αναπληρωτής καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

K. Σταθόπουλος, Επίκουρος καθηγητής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτριά μου Κ. Μούτου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου την ευκαιρία να γνωρίσω ένα νέο εργαστηριακό χώρο, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και τις χρήσιμες παρατηρήσεις της στη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ τα άτομα του εργαστηρίου, με επικεφαλής την καθηγήτρια D. Power, που με δέχθηκαν στην ομάδα τους και με βοήθησαν στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους.

Καπέτα Σουλτάνα

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

|   |    |
|---|----|
| Περιεχόμενα.....  | 1  |
| Περίληψη.....   | 3  |
| 1. Εισαγωγή.....  | 5  |
| 1.1 Ο σκελετικός μυς.....   | 5  |
| 1.1.1 Χαρακτηριστικά του κόκκινου μύος.....                       | 5  |
| 1.1.2 Χαρακτηριστικά του λευκού μύος.....                         | 5  |
| 1.2 Οργάνωση του σκελετικού μύος.....                             | 6  |
| 1.2.1 Χαρακτηριστικά των μυομερών.....                            | 7  |
| 1.3 Δομή του σκελετικού μύος.....                                 | 7  |
| 1.4 Οι μυϊκές πρωτεΐνες.....                                      | 10 |
| 1.4.1 Η δομή της μυοσίνης.....                                    | 10 |
| 1.4.2 Η λειτουργία της μυοσίνης.....                              | 11 |
| 1.4.3 Κατάταξη των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης.....            | 13 |
| 1.5 Οντογένεση του σκελετικού μύος στους τελεόστεους ιχθείς ..... | 14 |
| 1.5.1 Πρόδρομα μυϊκά κύτταρα.....                                 | 16 |
| 1.5.2 Διαφοροποίηση κόκκινων και λευκών μυϊκών ινών.....          | 17 |
| 1.5.3 Ανάπτυξη του πλευρικού μύος.....                            | 18 |
| 1.5.4 Υπερπλασία.....   | 18 |
| 1.6 Η τσιπούρα, <i>Sparus aurata</i> .....                        | 19 |
| 1.6.1 Αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας.....                       | 19 |
| 1.7 Σκοπός της εργασίας.....                                      | 20 |
| 2. Υλικά και μέθοδοι.....   | 21 |
| 2.1 Χημικά και διαλύματα.....                                     | 21 |
| 2.2 Προνύμφες και ιχθύδια.....                                    | 21 |
| 2.2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων.....                      | 21 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών.....                 | 22 |
| 2.3 Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης .....                           | 22 |
| 2.4 Παραγωγή του ριβοανιχνευτή.....                             | 23 |
| 2.4.1 Βακτηριακός μετασχηματισμός και ενίσχυση του DNA.....     | 23 |
| 2.4.2 Απομόνωση DNA.....  | 23 |
| 2.4.3 Ευθυγράμμιση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA.....     | 24 |
| 2.4.4 Μεταγραφή <i>in vitro</i> .....                           | 25 |
| 2.4.5 Μεταγραφή <i>in vitro</i> και σήμανση με διοξigenίνη..... | 25 |
| 2.5 Υβριδοποίηση <i>in situ</i> .....                           | 26 |
| 3. Αποτελέσματα.....  | 27 |
| 3.1 Απομόνωση και καθορισμός του κλώνου MLC1.....               | 27 |
| 3.2 Έκφρασης της MLC1.....                                      | 29 |
| 4. Συζήτηση.....  | 36 |
| 5. Παραρτήματα.....   | 41 |
| Παράρτημα 1.....  | 41 |
| Παράρτημα 2.....  | 43 |
| Παράρτημα 3.....  | 50 |
| Αναφορές.....   | 51 |

## ABSTRACT

Myosin, the major component of striated muscle, is a complex molecule of heavy and light chains, which appear in different isoforms and are under continuous replacement to meet developmental and environmental demands. Isoforms expressed at early developmental stages are of special interest as they can offer information for the muscle formation and function early in life, and can act as markers for the study of prenatal events with effect on postnatal growth performance.

In this study, the spatial and temporal expression of embryonic myosin light chain 1 (MLC1) was studied in sea bream larvae post-hatchment by hybridization *in situ*. The expression pattern of the transcripts was studied in transverse sections (5µm) of whole larvae sampled 4, 8, 10, 15, 20, 25, 34, 51, 80 days post-hatch. Clone containing the 91% coding region of *Hippoglossus hippoglossus L.*, was used as template for synthesizing the antisense RNA probe.

MLC1 was expressed exclusively in white muscle and no expression was observed in the superficial red muscle monolayer. On day 4 the expression the transcript was strong throughout the epaxial and hypaxial musculature. By day 8, an increase in fiber diameter was observed, indicative of high hypertrophic activity. From day 10 onwards two distinct proliferation centers appeared in the dorsal and ventral side of the larvae, characterized by small diameter muscle fibers, while fiber diameter gradually increased from the proliferation centers towards the horizontal myoseptum. At the same time, MLC1's expression was restricted, at the periphery of the maturing muscle fibers and it was predominant at the proliferation centers. This pattern persisted up to day 51, when the proliferation centers disappeared and expression of MLC1 was observed only in cells situated between the mature white fibers, most probably satellite cells.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μυοσίνη, το κύριο συστατικό του μυός, είναι σύμπλοκο μορίων από βαριές και ελαφριές αλυσίδες, οι οποίες εμφανίζονται σε διαφορετικές ισομορφές και υπόκεινται σε συνεχή αντικατάσταση, η έκφραση των οποίων βρίσκεται υπό αναπτυξιακό και περιβαλλοντικό έλεγχο. Οι ισομορφές που εκφράζονται στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, διότι μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες για το σχηματισμό και τη λειτουργία του μυός, καθώς επίσης μπορούν να χρησιμεύσουν και ως δείκτες-μόρια για τη μελέτη διαφόρων γεγονότων κατά την εμβρυογένεση με σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη και την αύξηση του μυός.

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της εμβρυϊκής ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 1 (MLC1) στην τσιπούρα με την τεχνική της υβριδοποίησης *in situ*. Η έκφρασή της μελετήθηκε σε εγκάρσιες τομές (5μm) από δείγματα ολόκληρης προνύμφης που συλλέχθηκαν 4, 8, 10, 15, 20, 25, 34, 51, 80 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Ο κλώνος, για τη σύνθεση του αντινοσηματικού RNA ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε το 91% της κωδικοποιούσας περιοχής της MLC1 του ιππόγλωσσου *Hippoglossus hippoglossus* L.

Η έκφραση της MLC1 εντοπίστηκε αποκλειστικά και μόνο στο λευκό μυ και δεν ανιχνεύτηκε καθόλου στον κόκκινο μυ. Τη 4<sup>η</sup> ημέρα, η έκφραση ήταν έντονη και εξαπλώνονταν τόσο στους επαξόνιους όσο και στους υπαξόνιους μύες. Κατά την 8<sup>η</sup> ημέρα, παρατηρήθηκε μια αύξηση της διαμέτρου των μυϊκών ινών, ενδεικτική της υψηλής υπερτροφικής δραστηριότητας. Από τη 10<sup>η</sup> ημέρα και έπειτα, εμφανίστηκαν δύο διακριτά κέντρα πολλαπλασιασμού, στη ραχιαία και κοιλιακή πλευρά της προνύμφης. Τα κέντρα αυτά, χαρακτηρίζονταν από μυϊκές ίνες μικρής διαμέτρου, ενώ η διάμετρος των μυϊκών ινών αυξανόταν βαθμιαία από τα κέντρα πολλαπλασιασμού προς το οριζόντιο διάφραγμα. Την ίδια χρονική στιγμή, η έκφραση της MLC1 περιορίζεται στην περιφέρεια των ώριμων μυϊκών ινών. Αυτό το πρότυπο έκφρασης παρέμεινε αναλλοίωτο μέχρι την 51<sup>η</sup> ημέρα, όταν τα κέντρα πολλαπλασιασμού εξαφανίστηκαν και η έκφραση της MLC1 ανιχνεύτηκε μόνο σε κύτταρα τοποθετημένα ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, πιθανότατα δορυφορικά κύτταρα.

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 Ο σκελετικός μυς**

Ο μυς είναι ένας ιστός που γεννά και μεταδίδει ενέργεια. Σε όλα σχεδόν τα ψάρια, οι μύες του σώματος και της ουράς χρησιμοποιούνται για το κολύμπι και αποτελούν την κύρια μάζα του σώματος. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν και άλλες μικρότερες μυϊκές μάζες που συνδέονται με την κεφαλή και τα πτερύγια. Στα σπονδυλωτά υπάρχουν τρία κύρια είδη μυών: ο λείος μυς (μυς των σπλαχνικών οργάνων και των αιμοφόρων αγγείων), ο καρδιακός μυς (μόνο στην καρδιά) και ο σκελετικός μυς. Ο σκελετικός μυς διαχωρίζεται στον κόκκινο και στο λευκό μυ.

#### **1.1.1 Χαρακτηριστικά του κόκκινου μύος**

Ο κόκκινος μυς είναι αρκετά διαφορετικός από το λευκό μυ (Bone et al., 1995). Ο κόκκινος (αργός) μυς είναι εφοδιασμένος με πολλά τριχοειδή αγγεία. Το κόκκινο χρώμα του οφείλεται στην έντονη παρουσία της αιμογλοβίνης και η ενέργειά του προέρχεται αερόβια (παρουσία οξυγόνου). Τα κύρια καύσιμα για τον αερόβιο μεταβολισμό είναι τα λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται από τους λιπώδεις ιστούς, η γλυκόζη, η οποία προέρχεται από το ήπαρ και το αποθηκευμένο γλυκογόνο του μύος. Τα παραπάνω υποστρώματα υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες και παρέχουν μεγάλα ποσά ενέργειας (ATP) κατά τη διάσπασή τους. Αυτό, τα καθιστά ιδανικά υποστρώματα για να παρέχουν την ενέργεια που απαιτείται για την εκτέλεση συνεχόμενων αργών κινήσεων, όπως είναι το κολύμπι (Jobling, 1995).

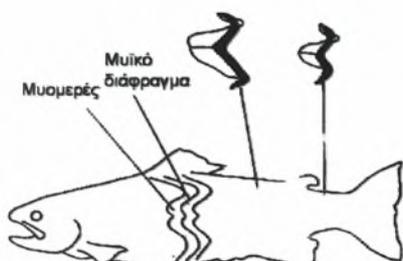
#### **1.1.2 Χαρακτηριστικά του λευκού μύος**

Ο λευκός (γρήγορος) μυς αποτελείται από λευκές μυϊκές ίνες, οι οποίες είναι μεγαλύτερης διαμέτρου από τις κόκκινες ίνες. Οι ίνες του λευκού μύος δεν εφοδιάζονται με μεγάλα ποσά αίματος και δεν περιέχουν επαρκή ποσότητα οξυγόνου, με αποτέλεσμα η παραγωγή ενέργειας στο λευκό μυ να γίνεται αναερόβια. Συγκεκριμένα, η ενέργεια που καταναλώνει ο λευκός μυς προέρχεται από την υδρόλυση της φωσφοκρεατίνης. Η ποσότητα της αποθηκευμένης φωσφοκρεατίνης περιορίζεται σημαντικά, με αποτέλεσμα η ενέργεια, στη συνέχεια, να παρέχεται από την ενεργοποίηση της αναερόβιας γλυκογονόλυσης. Το γλυκογόνο, που είναι αποθηκευμένο στο μυ, χρησιμοποιείται σαν

πηγή ενέργειας, με αποτέλεσμα την παραγωγή γαλακτικού οξέος. Αυτή η μέθοδος είναι ανεπαρκής, διότι ο αναερόβιος μεταβολισμός προσφέρει μόλις το 5% της ενέργειας που παράγεται από το αερόβιο μονοπάτι. Κάποια ποσότητα γλυκογόνου μπορεί να ανασυντεθεί μέσω της επανοξειδωσης του γαλακτικού οξέος. Η φωσφοκρεατίνη και το γλυκογόνο που είναι αποθηκευμένα, εξαντλούνται γρήγορα όταν ο μυς συστέλλεται κάτω από αναερόβιες συνθήκες, με αποτέλεσμα τα ψάρια να έχουν χαμηλής διάρκειας αντοχή σε υψηλές ταχύτητες κολύμβησης. Για τον παραπάνω λόγο, ο λευκός μυς είναι πιο δυνατός από τον κόκκινο, αλλά οι λευκές μυϊκές ίνες κουράζονται πιο εύκολα. Ο λευκός μυς χρησιμοποιείται για σύντομες και γρήγορες κινήσεις (Jobling, 1995).

### 1.2. Οργάνωση του σκελετικού μυός

Ο σκελετικός μυς των τελεόστεων ιχθύων αποτελείται κυρίως από τους λευκούς μύες του κύριου σώματος και της ουράς. Οι μύες του κύριου σώματος αποτελούνται από μια σειρά μυϊκών τμημάτων, που ονομάζονται μυομερή, τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους με λεπτά στρώματα συνδετικού ιστού, τα μυϊκά διαφράγματα (Εικ.1). Ένας κάθετος άξονας διαχωρίζει τους μύες στο αριστερό και στο δεξί ημισφαίριο και ένα οριζόντιο διάφραγμα τους διαιρεί στους επαξόνιους και στους υπαξόνιους μύες. Κάτω ακριβώς από το δέρμα επεκτείνεται ένα στρώμα επιφανειακών πλευρικών ινών το οποίο έχει συνήθως σκούρο χρώμα και ονομάζονται «κόκκινος» μυς (Bone et al., 1995)(Εικ.2).



Εικόνα 1. Σχηματικό διάγραμμα που απεικονίζει τον τρόπο οργάνωσης του μυός (Jobling, 1995).



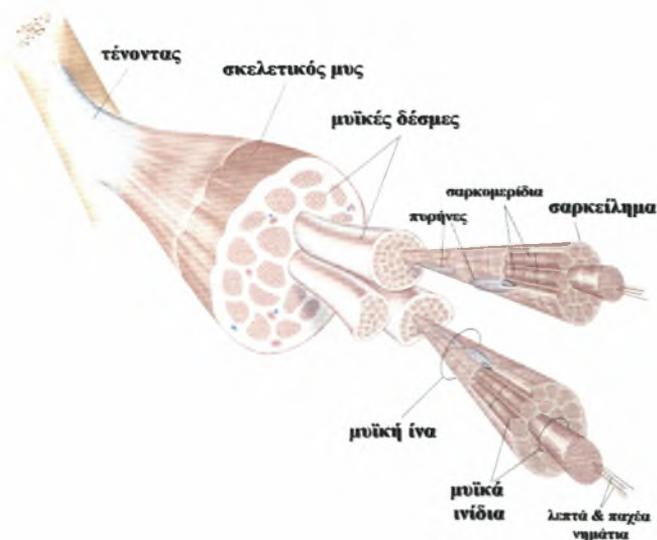
Εικόνα 2. Αριστερά: Εγκάρσια τομή ενός τελεόστεου ιχθύος. Απεικονίζεται η οργάνωση του λευκού και του κόκκινου μυός. Δεξιά: Η περιοχή της ενδιάμεσης ζώνης σε μεγέθυνση (Stroiber et al., 1999).

### 1.2.1 Χαρακτηριστικά των μυομερών

Τα μυομερή των ιχθύων έχουν αρκετά πολύπλοκο σχήμα. Σε όλους τους ενήλικους ιχθείς, εκτός του αμφίοξου, το περίγραμμα των μυομερών έχει το σχήμα του γράμματος W, ενώ στην αρχή της οντογένεσης έχουν το σχήμα του γράμματος V. Το δίπλωμα και η τοποθέτηση των μυομερών είναι τέτοια ώστε να σχηματίζουν ένα σύνολο από κώνους. Το σχήμα δεν είναι το μόνο χαρακτηριστικό των μυομερών. Η κατάταξη των μυϊκών ινών, είναι ένα άλλο εξίσου σημαντικό χαρακτηριστικό. Στα ανώτερα ψάρια, όπως οι τελεόστεοι ιχθείς μόνο οι επιφανειακές μυϊκές ίνες, που βρίσκονται ακριβώς κάτω από το δέρμα, είναι σε θέση παράλληλη του επιμήκη άξονα (Bone et al., 1995). Οι βαθύτερες ίνες διατάσσονται στα μυομερή έτσι ώστε να σχηματίζουν ένα είδος έλικας (σπирάλ), με τέτοιο τρόπο όπου κάθε μυϊκή ίνα να σχηματίζει διαφορετική γωνία. Κάποιες μυϊκές ίνες σχηματίζουν γωνία με τον επιμήκη άξονα του σώματος, μεγαλύτερη των 40° (Jobling, 1995).

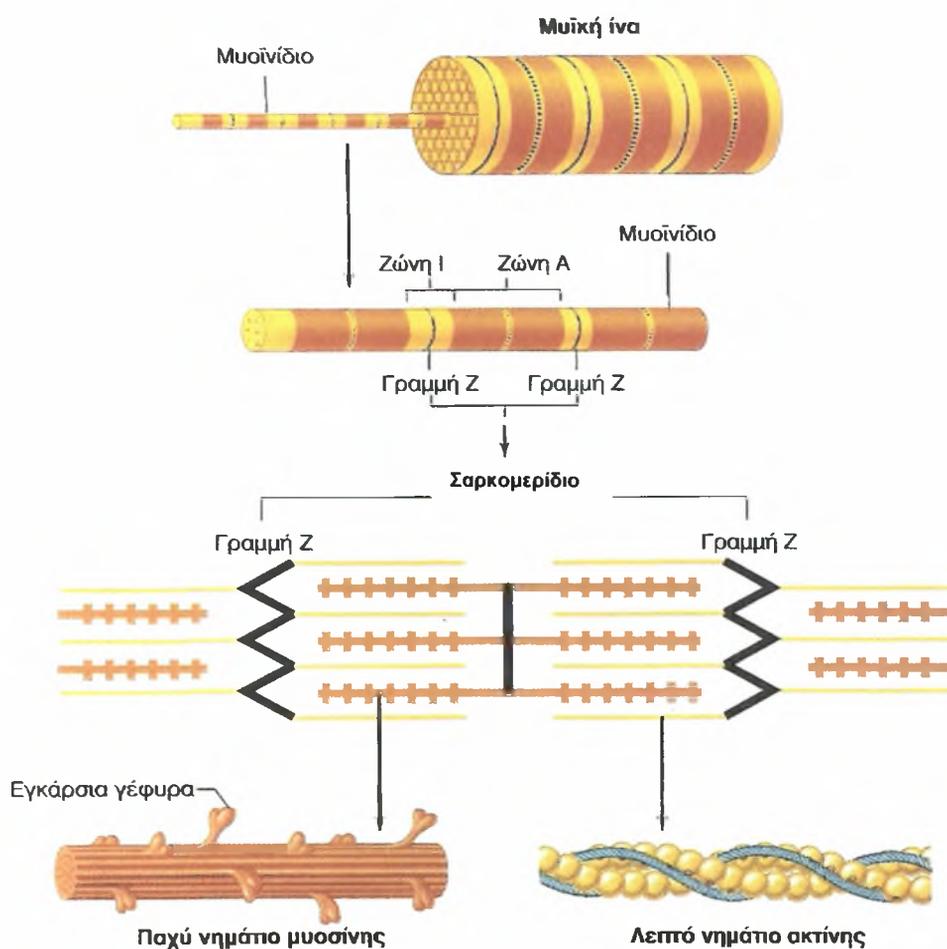
### 1.3. Δομή του σκελετικού μυός

Ο σκελετικός μυς (Εικ.3) αποτελείται από ένα μεγάλο αριθμό μυϊκών ινών, διαμέτρου 0,1-0,001mm και μήκους ορισμένων εκατοστών. Πρόκειται για μεγάλα, πολυπύρηννα κύτταρα τα οποία σχηματίζονται από τη σύντηξη πολλών κυττάρων (Εικ.4). Κάθε ίνα περιβάλλεται από μια ηλεκτρικά διεγέρσιμη κυτταρική μεμβράνη, η οποία ονομάζεται σαρκείλημα. Μια μυϊκή ίνα αποτελείται, με τη σειρά της, από πολλά μυϊκά ινίδια, το κάθε από τα οποία έχει διάμετρο 1μm περίπου. Τα μυϊκά ινίδια είναι διατεταγμένα κατά συγκεκριμένο πρότυπο μέσα στο κυτταρόπλασμα, που σ' αυτή την περίπτωση ονομάζεται σαρκόπλασμα (Stryer, 1997).



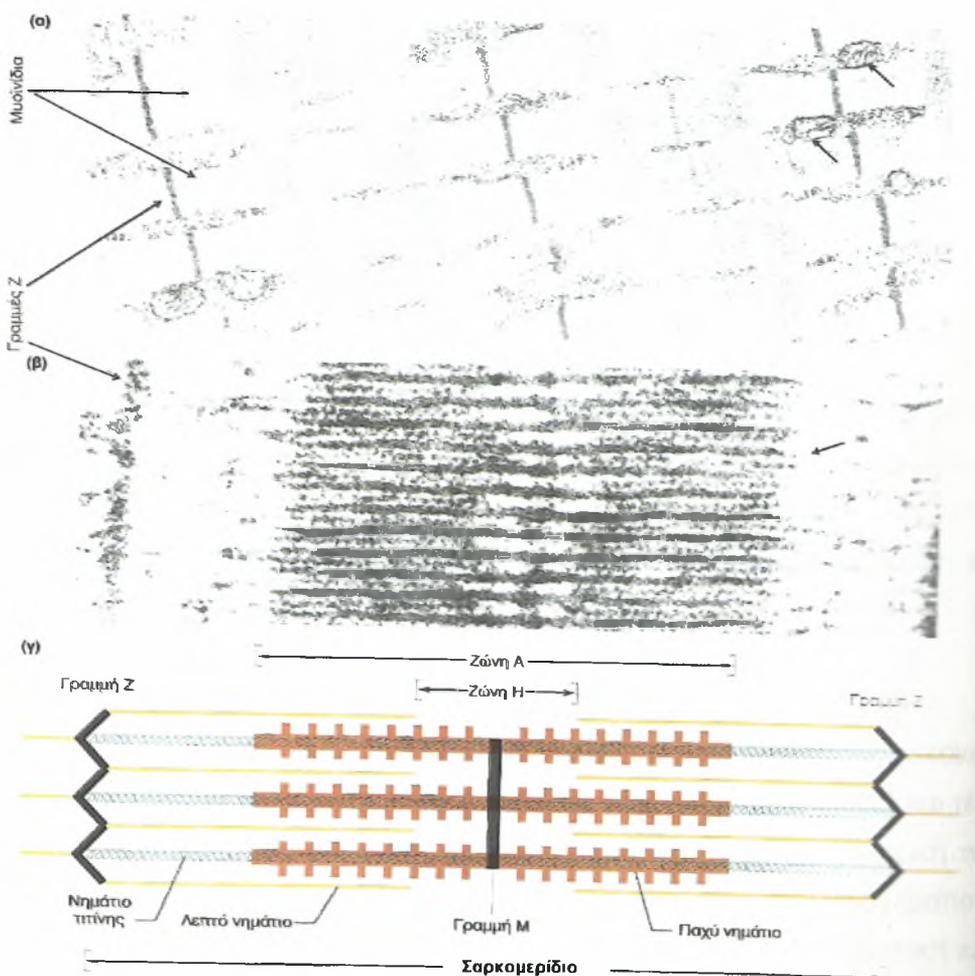
Εικόνα 3. Δομή του σκελετικού μυός.

Κάθε μυϊκό ινίδιο συνθέτεται από παχιά και λεπτά νημάτια τοποθετημένα σε επαναλαμβανόμενο σχέδιο κατά μήκος του (Εικ.5). Η βασική μονάδα αυτού του επαναλαμβανόμενου σχεδίου ονομάζεται **σαρκομερίδιο** (Εικ.4). Τα παχιά νημάτια αποτελούνται σχεδόν ολοκληρωτικά από **μυοσίνη**, την κύρια πρωτεΐνη συστολής. Τα λεπτά νημάτια, με μισή περίπου διάμετρο από αυτή των παχέων νηματίων, δομούνται από μια άλλη πρωτεΐνη συστολής, την **ακτίνη** και από άλλες δύο ακόμη πρωτεΐνες, την **τροπονίνη** και την **τροπομυοσίνη**, οι οποίες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στη ρύθμιση της μυϊκής συστολής.



Εικόνα 4. Διευθέτηση νηματίων μιας σκελετικής μυϊκής ίνας, τα οποία δημιουργούν ένα σχέδιο γραμμωτών περιοχών (Vander et al., 2001).

Τα παχιά νημάτια είναι τοποθετημένα στο μέσο κάθε σαρκομεριδίου όπου η σε τάξη παράλληλη διεύθεσή τους παράγει μια πλατιά, σκούρα λωρίδα γνωστή ως ζώνη Α (Εικ. 4). Κάθε σαρκομερίδιο περιέχει δύο σειρές λεπτών νημάτων, μια σε κάθε άκρο. Η μια άκρη κάθε λεπτού νηματίου και των δύο σειρών είναι προσδεμένη σε ένα δίκτυο αλληλοσυνδεδεμένων πρωτεϊνών γνωστό ως γραμμή ή δίσκος Ζ, ενώ η άλλη άκρη συμπλέκεται εν μέρει με τα παχιά νημάτια. Δυο επακόλουθες γραμμές Ζ ορίζουν τα όρια ενός σαρκομεριδίου. Έτσι, τα λεπτά νημάτια από δύο γειτονικά σαρκομερίδια αγκυροβολούν σε κάθε γραμμή Ζ (Εικ. 5).



**Εικόνα 5.** α) Πολλαπλά μυϊκά ινίδια σε μια μονή μωσκελετική ίνα (τα βέλη στη πάνω δεξιά εικόνα δείχνουν μιτοχόνδρια τοποθετημένα μεταξύ των μυϊκών ινιδίων). β) Υψηλή μεγέθυνση ενός σαρκομεριδίου μέσα σε ένα μυϊκό ινίδιο (το βέλος στα δεξιά μιας ζώνης Α δείχνει το τέλος ενός παχέος νηματίου). γ) Διεύθεση παχέων και λεπτών νημάτων σ' ένα σαρκομερίδιο (Vander et al., 2001).

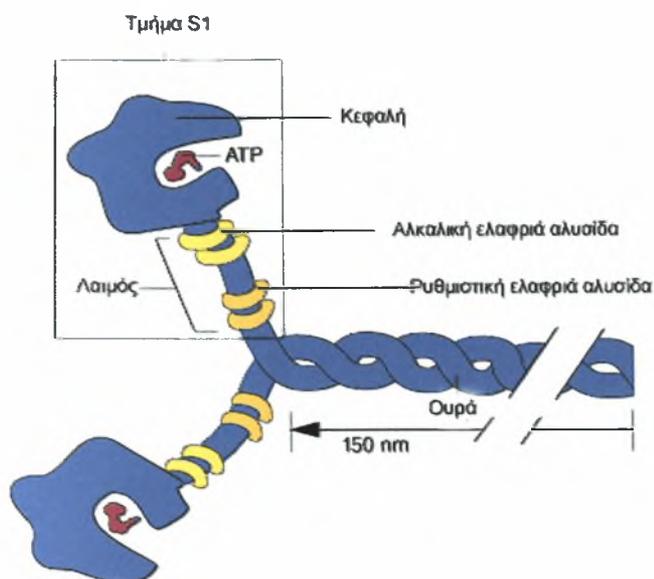
Η φωτεινή λωρίδα γνωστή ως ζώνη I (Εικ.4) βρίσκεται μεταξύ δύο ζωνών A γειτονικών σαρκομεριδίων και περιέχει το κομμάτι των λεπτών νηματίων, τα οποία δε συμπλέκονται με τα παχιά νημάτια. Η ζώνη I διατέμνεται από τη γραμμή Z. Δύο ακόμα λωρίδες παρουσιάζονται σε μια ζώνη A κάθε σαρκομεριδίου (Εικ.5). Η ζώνη H είναι μια σχετικά φωτεινή λωρίδα στο κέντρο της ζώνης A. Αντιστοιχεί στο διάστημα που ορίζουν οι άκρες δύο σειρών λεπτών νηματίων σε κάθε σαρκομερίδιο όπου δηλαδή, εμπεριέχονται μόνο παχιά νημάτια, ειδικά το κεντρικό τους μέρος. Η στενή σκούρα λωρίδα στο κέντρο της ζώνης H είναι γνωστή ως γραμμή M και αντιστοιχεί σε πρωτεΐνες οι οποίες συγκρατούν το κεντρικό μέρος των παχέων νηματίων μαζί. Συμπερασματικά, ούτε τα παχιά ούτε τα λεπτά νημάτια επιπλέουν ελεύθερα, αφού τα λεπτά νημάτια είναι αγκυροβολημένα στις γραμμές Z και τα παχιά νημάτια είναι ενωμένα μεταξύ τους από τη γραμμή M και δεμένα με τη γραμμή Z μέσω των νηματίων της τινίνης (Vander et al., 2001).

#### 1.4 Οι μυϊκές πρωτεΐνες

Οι κυριότερες πρωτεΐνες του μυός είναι η μυοσίνη, από την οποία αποτελούνται τα παχιά μυϊκά ινίδια και η ακτίνη, η τροπομυοσίνη, η τροπονίνη, που απαντούν στα λεπτά μυϊκά ινίδια. Οι πρωτεΐνες, τροπονίνη και τροπομυοσίνη παίζουν ρυθμιστικό ρόλο στην αλληλεπίδραση ακτίνης και μυοσίνης, που είναι το κύριο γεγονός που χαρακτηρίζει το μηχανισμό της σύσπασης και της χαλάρωσης του μυός. Άλλες πρωτεΐνες που απαντούν στα μυϊκά ινίδια είναι η α-ακτινίνη, η β-ακτινίνη, η κρεατικινάση, η τινίνη, η φιλαμίνη και η c-πρωτεΐνη (Σμοκοβίτης, 1999).

##### 1.4.1 Η δομή της μυοσίνης

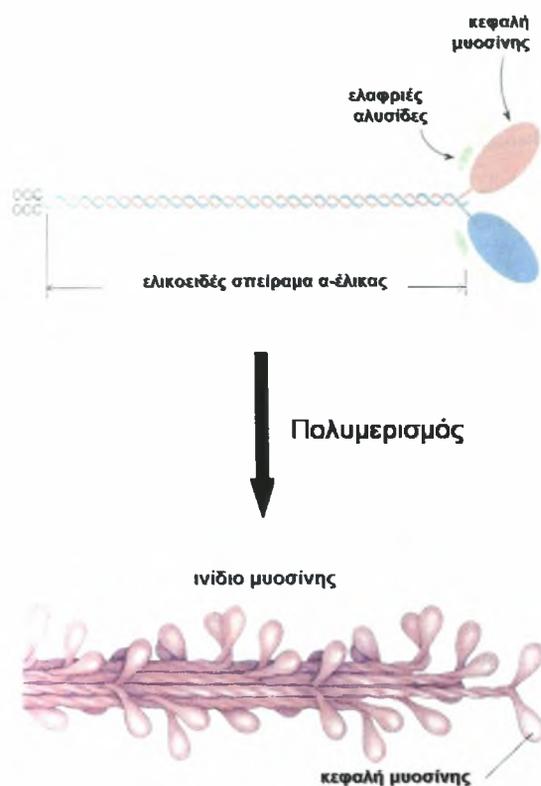
Η μυοσίνη (Εικ.6) είναι ένα μεγάλο μόριο μοριακού βάρους 540kd που σχηματίζεται από έξι πεπτιδικές αλυσίδες: δύο όμοιες βαριές αλυσίδες (MHC) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLC). Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή (τμήμα S1) η οποία συνδέεται με μια μακριά ουρά. Στο σχηματισμό της δομής της κεφαλής εμπλέκονται τα N-τελικά άκρα των δύο MHCs, μια ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα (RLC) και μια αλκαλική ελαφριά αλυσίδα (ELC) (Lowey, 1994). Η ουρά είναι μια διπλή α-έλικα που σχηματίζεται από τα C-τελικά άκρα των βαρέων αλυσίδων και είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό των παχέων νηματίων (Hirayama et al., 1998). Στην κεφαλή εντοπίζεται η δράση της ATPάσης.



Εικόνα 6. Αναπαράσταση ενός μορίου μωσίνης(fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/neuro/myosin.jpg).

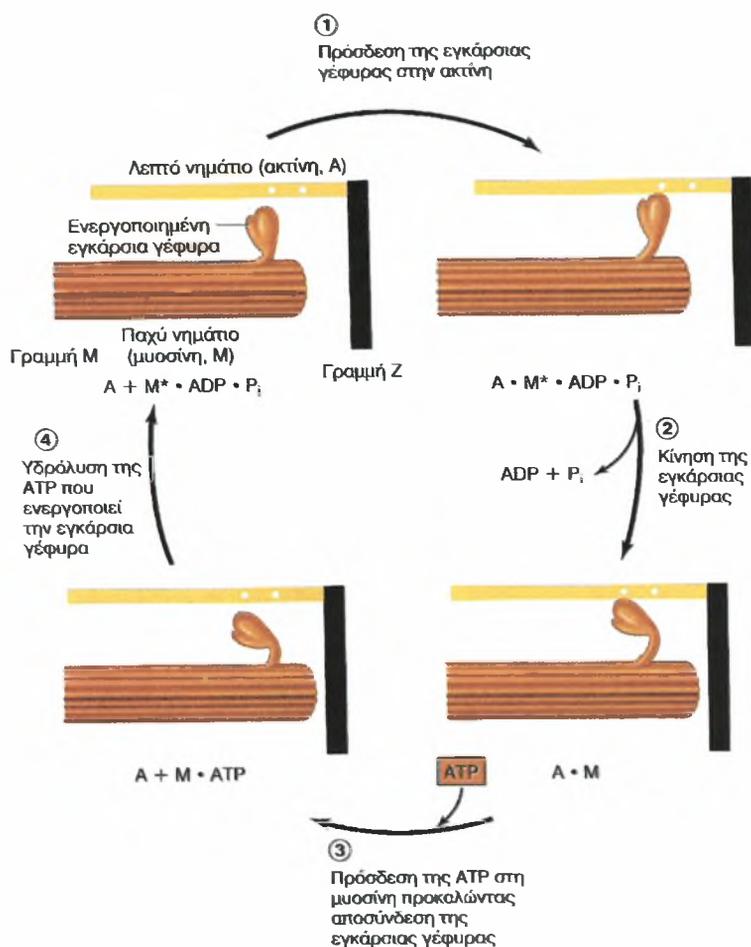
#### 1.4.2 Η λειτουργία της μωσίνης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η μωσίνη, η κύρια πρωτεΐνη του μυϊκού ιστού, είναι το υπεύθυνο μόριο για το σχηματισμό των παχέων νηματίων. Τα μόρια της μωσίνης, όταν βρεθούν σε ένα διάλυμα με φυσιολογική ιοντική ισχύ και pH, συγκροτούνται σε νημάτια (Εικ.7). Το νημάτιο της μωσίνης είναι πολικό και μοιάζει σαν βέλος με δύο αιχμές, όπου οι δύο ομάδες των κεφαλών προσανατολίζονται προς αντίθετες διευθύνσεις μακριά από το κέντρο. Η μία ομάδα των κεφαλών συνδέεται με την πολυμερισμένη μορφή της ακτίνης με έναν προσανατολισμό και τα μετακινεί προς μια κατεύθυνση, ενώ η άλλη ομάδα των κεφαλών προσδένεται σε άλλα νημάτια ακτίνης με αντίθετο προσανατολισμό και τα μετακινεί προς την αντίθετη κατεύθυνση. Το συνολικό αποτέλεσμα είναι η ολίσθηση αντίθετα προσανατολισμένων νηματίων μεταξύ τους (Alberts, 2000). Η αλληλεπίδραση αυτή παίζει βασικό ρόλο στη δημιουργία της δύναμης η οποία είναι υπεύθυνη για τη σχετική κίνηση παχέων και λεπτών νηματίων.



Εικόνα 7. Σχηματικό διάγραμμα ενός ινιδίου μυοσίνης μετά από τον πολυμερισμό μορίων μυοσίνης (Stryer, 1997).

Ο Vladimir Engelhardt και η Militsa Lyubimova ανακάλυψαν το 1939 ότι η μυοσίνη έχει δράση ATPάσης (υδρολύει το ATP για την παραγωγή ενέργειας) (Stryer, 1997). Η δράση της ATPάσης εντοπίζεται στις κεφαλές της μυοσίνης. Συγκεκριμένα, ένα μόριο ATP προσδέεται στο πίσω μέρος της κεφαλής και αμέσως προκαλεί μια μικρή αλλαγή της διαμόρφωσης των περιοχών που προσδέονται στην ακτίνη. Αυτό μειώνει τη συγγένεια της κεφαλής για την ακτίνη και της επιτρέπει να κινηθεί κατά μήκος του νηματίου. Το ATP υδρολύεται, αλλά το ADP και το P που παράγονται παραμένουν προσδεδμένα στην πρωτεΐνη. Η ασθενής πρόσδεση της κεφαλής της μυοσίνης στη νέα θέση πάνω στο νηματίο της ακτίνης προκαλεί απελευθέρωση του ανόργανου φωσφορικού και παραγωγή ενέργειας που δίνει την ώθηση για την αλλαγή της διαμόρφωσης και την κίνηση (Εικ.8).



Εικόνα 8. Χημικές και μηχανικές αλλαγές κατά τη διάρκεια ενός κύκλου της εγκάρσιας γέφυρας. Σε μια μυϊκή ίνα σε ηρεμία, η συστολή αρχίζει με την πρόσδεση της εγκάρσιας γέφυρας στο λεπτό νημάτιο της ακτίνης (στάδιο 1).  $M^*$ , παριστάνει μια ενεργοποιημένη εγκάρσια γέφυρα μυοσίνης. (Vander et al., 2001).

### 1.4.3 Κατάταξη των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης

Οι ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης ανήκουν στην οικογένεια των γονιδίων της τροπονίνης C, η οποία περιλαμβάνει πρωτεΐνες που περιέχουν στο μόριό τους θέσεις σύνδεσης του ασβεστίου, όπως είναι η καλμοδουλίνη και η παραλβουμίνη (Periasamy et al., 1984). Οι ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης κατατάσσονται σε δυο τάξεις: στην ελαφριά αλυσίδα, η οποία έχει ρυθμιστική λειτουργία και γι' αυτό αναφέρεται και ως ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα (RLC) και στη δεύτερη τάξη, η οποία χαρακτηρίζεται ως αλκαλική (ELC) διότι ο διαχωρισμός τους είναι αρκετά δύσκολος και συχνά για τη μετουσίωσή τους απαιτείται κάποια ουσία όπως ουρία ή άλκαλι (Lowey & Trybus, 1995).

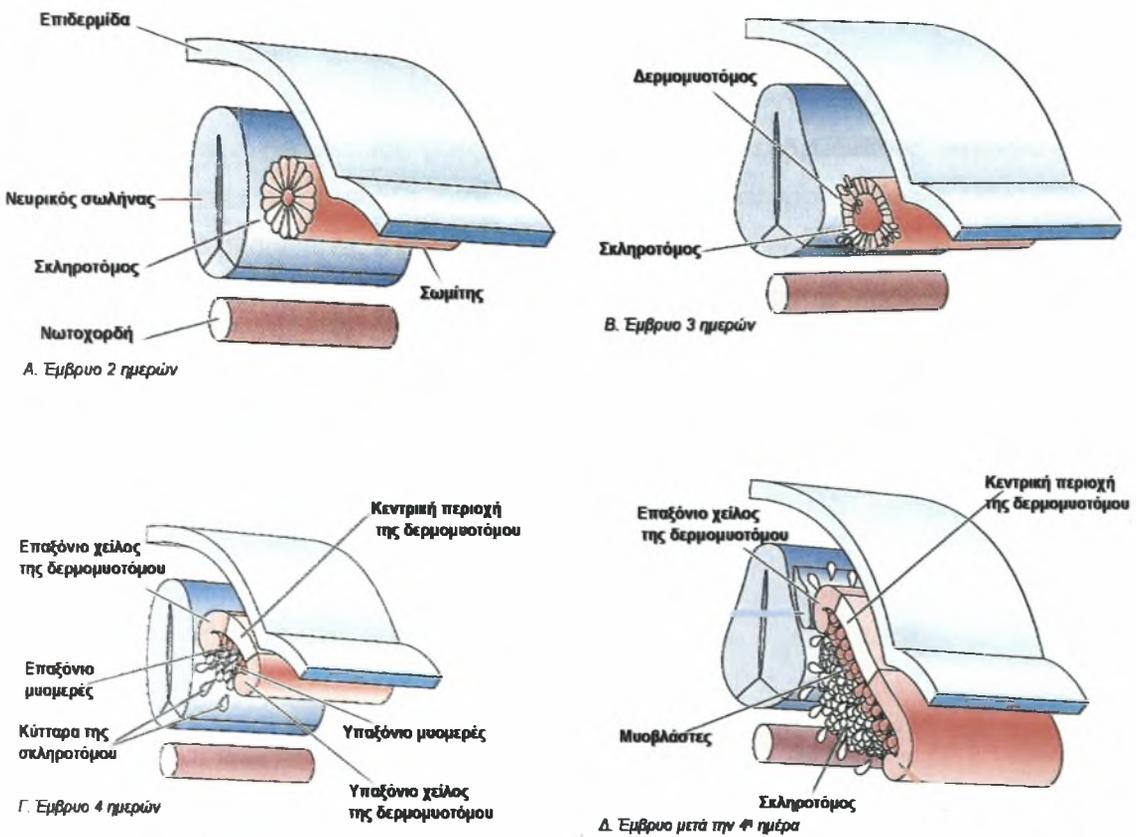
Στο σκελετικό λευκό μυ, οι ELC υπάρχουν σε δύο ισομορφές, η μακριά MLC1 και η κοντή MLC3. Οι δύο αλκαλικές ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης του σκελετικού μύος των σπονδυλωτών αποτελούνται περίπου από 190 και 150 αμινοξέα αντίστοιχα (Weeds & Lowey, 1971). Η ανάλυση της αλληλουχίας των MLC1 και MLC3 του λαγού (Frank & Weeds, 1974) και του κοτόπουλου (Matsuda et al., 1981a,b) απέδειξε ότι έχουν όμοια τη C-τελική ακολουθία που αποτελείται από 141 αμινοξέα, αλλά διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μήκος και την αλληλουχία των αμινοτελικών τμημάτων. Επιπλέον, ανάλυση της αλληλουχίας του DNA των MLC1 και MLC3 από κοτόπουλο (Nabeshima et al., 1984), ποντίκι (Robert, 1984) και αρουραίο (Periasamy et al., 1984), απέδειξαν ότι οι αλυσίδες αυτές κωδικοποιούνται από ένα απλό γονίδιο με δυο διαφορετικούς τρόπους εναλλακτικού ματίσματος. Αντίθετα με τα άλλα σπονδυλωτά, στα ψάρια, έχει βρεθεί ότι οι δυο αλκαλικές αλυσίδες της μυοσίνης MLC1 και MLC3 προέρχονται από δύο διαφορετικά γονίδια (Dalla Libera et al., 1991; Hirayama et al., 1997).

Πολλαπλές ισομορφές των ελαφριών αλλά και των βαρέων αλυσίδων παρουσιάζουν ιστοειδική ή/ και εξαρτώμενη από το στάδιο ανάπτυξης κατανομή. Η έκφρασή τους υπόκεινται σε περιβαλλοντικό και ορμονικό έλεγχο (Whalen et al., 1981; Gauthier et al., 1982; Izumo et al., 1986; Yamano et al., 1994; Hill et al., 2000; Moutou et al., 2001). Στο ποντίκι, η MLC1 και η MLC3 παρουσιάζουν έναν ανεξάρτητο τύπο έκφρασης κατά την εμβρυονική ανάπτυξη του μύος και δεν ανιχνεύονται πριν το σχηματισμό των σωματιών. Στο *Xenopus* παρατηρείται μια ασύγχρονη έκφραση των mRNAs (MLC1, MLC3), η οποία ξεκινάει πριν το μεταμερισμό του ραχιαίου μεσοδέρματος σε σωμίτες (Theze et al., 1995). Σύμφωνα, με την παραπάνω παρατήρηση, η μυογένεση ξενικά σε διαφορετικές χρονικές περιόδους μεταξύ των θηλαστικών και των αμφιβίων. Όσον αναφορά στα ψάρια, λίγα είναι γνωστά για την έκφραση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σκελετικού μύος.

### 1.5 Οντογένεση του σκελετικού μύος στους τελεόστεους ιχθείς

Ο σκελετικός μυς των σπονδυλωτών προέρχεται από τους σωμίτες, εκτός από κάποιους μύες της κεφαλής που προέρχονται από το κεφαλικό μεσόδερμα (Firulli & Olson, 1997). Οι σωμίτες είναι τμήματα παραξονικού μεσοδέρματος τα οποία είναι τοποθετημένα σε ζευγάρια εκατέρωθεν του νευρικού σωλήνα (Christ & Ordahl, 1995). Αρχικά οι σωμίτες είναι επιθηλιακές σφαίρες που πλαισιώνουν το κεντρικό κοίλωμα των μεσεγχυματικών κυττάρων. Αυτοί οριοθετούνται από μια βασική μεμβράνη, η οποία τα διαχωρίζει από

άλλες δομές, όπως είναι ο νευρικός σωλήνας, η νωτοχορδή, το ραχιαίο εξώδερμα και το πλευρικό μεσόδερμα. Ο πρώτος σωμίτης σχηματίζεται μετά το τέλος της γαστριδιοποίησης, ενώ στο τέλος της πρώτης ημέρας ο σχηματισμός των σωμιτών έχει σχεδόν ολοκληρωθεί, στο *Danio rerio* (Stickney, 2000). Οι σωμίτες σχηματίζονται με κατεύθυνση από το πρόσθιο προς το οπίσθιο τμήμα και γρήγορα διαφοροποιούνται ραχιαία σε επιθηλιακά κύτταρα της δερμομυοτόμου και κοιλιακά σε επιθηλιακά κύτταρα της σκληροτόμου. Η σκληροτόμος δίνει γένεση στους χόνδρους του νευρικού σωλήνα και στα πλευρά, ενώ η δερμομυοτόμος είναι η πηγή των πρόδρομων μυϊκών κυττάρων και κυττάρων τα οποία συνεισφέρουν στο σχηματισμό των άλλων ιστών (Εικ.9).

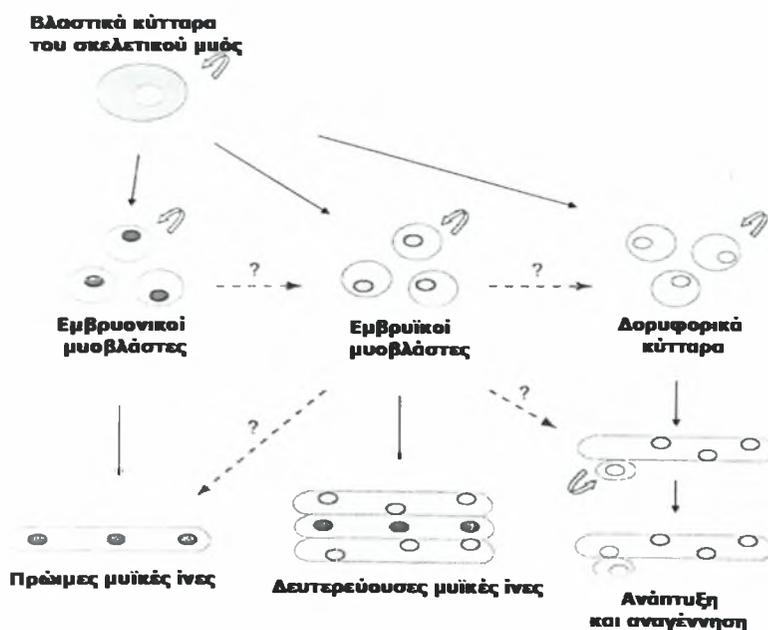


Εικόνα 9. Διάγραμμα μιας εγκάρσιας τομής σε έμβryo κοτόπουλου. (Α) Την 2<sup>η</sup> ημέρα, τα κύτταρα της σκληροτόμου μπορούν να διακριθούν από τον υπόλοιπο σωμίτη. (Β) Την 3<sup>η</sup> ημέρα, τα κύτταρα της σκληροτόμου, παύουν να έρχονται σε επαφή μεταξύ τους και μεταναστεύουν προς το νευρικό σωλήνα. (Γ) Τη 4<sup>η</sup> ημέρα, τα κύτταρα της σκληροτόμου που απέμειναν διαιρούνται. Τα κύτταρα που βρίσκονται στο κέντρο σχηματίζουν ένα επαξόνιο μυομερές κάτω από τη δερμομυοτόμο, ενώ τα κύτταρα που βρίσκονται πλευρικά σχηματίζουν ένα υπαξόνιο μυομερές. (Δ) Ένα στρώμα από πρόδρομα μυϊκά κύτταρα σχηματίζεται κάτω από τη δερμομυοτόμο (Gilbert, 2003).

Κύτταρα από το μεσοραχιαίο τμήμα των σωματίων, που είναι προσκολλημένα στο νευρικό σωλήνα, μεταναστεύουν κάτω από τη δερμομυοτόμο για να σχηματίσουν τα μυομερή. Τα κύτταρα αυτά γρήγορα γίνονται μετα-μιτωτικά και αποτελούν τα πρώτα διαφοροποιημένα σκελετικά μυϊκά κύτταρα του εμβρύου. Το ραχιαίο μυομερές, αργότερα, συνεισφέρει στη δημιουργία των άνω μυών, που αναφέρονται ως επαξόνιοι, ενώ κύτταρα που προέρχονται από τη πλευρική περιοχή της δερμομυοτόμου μεταναστεύουν στα άκρα, ή σχηματίζουν τους υπαξόνιους μύες. Ο συνδετικός ιστός των μυών και της δερμίδας, από την οποία καλύπτονται, προέρχεται επίσης από κύτταρα της δερμομυοτόμου (Cossu et al., 1996) (Εικ.9).

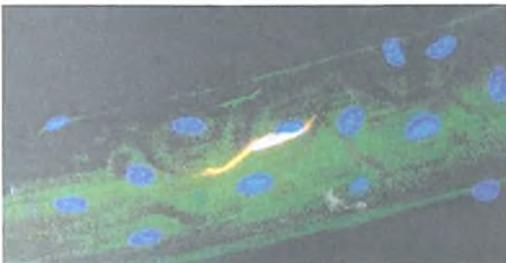
### 1.5.1 Πρόδρομα μυϊκά κύτταρα

Τα πρόδρομα μυϊκά κύτταρα, τα οποία προέρχονται από τη δερμομυοτόμο, σχηματίζουν τους σκελετικούς μύες απελευθερώνοντας εμβρυονικούς (embryonic) και εμβρυϊκούς (foetal) μυοβλάστες, καθώς και δορυφορικά κύτταρα (satellite cells) (Εικ.10). Οι εμβρυονικοί μυοβλάστες σχηματίζουν τις πρώιμες ίνες, οι οποίες λειτουργούν ως ένα στήριγμα γύρω από το οποίο θα σχηματιστούν οι εμβρυϊκοί μυοβλάστες και οι μυϊκές ίνες. Μετά τη γένεση, το σύνολο των σκελετικών μυών συντίθενται από τις δευτερεύουσες ίνες (Tajbakhsh, 2003).



Εικόνα 10. Τα πρόδρομα μυϊκά κύτταρα τα οποία βρίσκονται στους σωματίες και στο κεφάλι εξασφαλίζουν τον τοπικό και περιφερειακό σχηματισμό των σκελετικών μυών, απελευθερώνοντας εμβρυονικούς, εμβρυϊκούς μυοβλάστες και δορυφορικά κύτταρα. Οι πρώιμες ίνες εξυπηρετούν σαν ένα στήριγμα γύρω από τις οποίες οι εμβρυϊκοί μυοβλάστες και ίνες (δευτερογενείς ίνες) θα σχηματιστούν (Seale, 2000).

Τα δορυφορικά κύτταρα, τέλος, είναι μια μυογενετική σειρά κυττάρων, υπεύθυνη για την ανάπτυξη, την ανανέωση και τη διατήρηση των σκελετικών μυών σε όλη τη διάρκεια της ζωής των σπονδυλωτών (Bischoff, 1994). Είναι ανενεργά μονοπύρηνια μυογενετικά κύτταρα, τοποθετημένα ανάμεσα στο σαρκόπλασμα και στη βασική μεμβράνη των διαφοροποιημένων μυϊκών ινών (Εικ.11). Ο ανενεργός αυτός κυτταρικός πληθυσμός ενεργοποιείται μετά από κάποιο μυϊκό τραυματισμό ή κατά την ανάπτυξη του μυός. Η ενεργοποίησή τους έχει ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους και τη γένεση περισσότερων δορυφορικών κυττάρων, τα οποία διαφοροποιούνται για την αντικατάσταση της τραυματισμένης μυϊκής ίνας. (Morgan & Partridge, 2003).

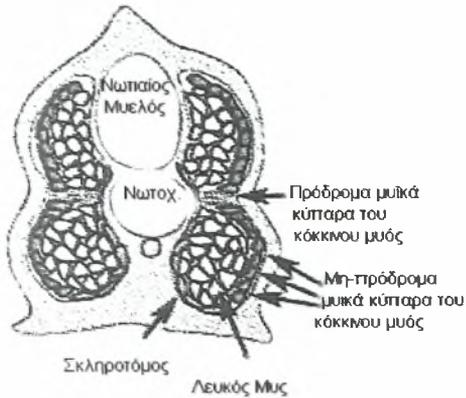


**Εικόνα 11.** Ένα δορυφορικό κύτταρο, σε μια απομονωμένη μυϊκή ίνα. Η ίνα είναι χρωματισμένη με το αντίσωμα ενάντια στην M-καντερίνη (κόκκινο) και στη δεσμίνη (πράσινο), ενώ με μπλε χρώμα είναι βαμμένοι οι πυρήνες (Morgan & Partridge, 2003).

### 1.5.2 Διαφοροποίηση κόκκινων και λευκών μυϊκών ινών

Η μυογένεση περιλαμβάνει τρία στάδια: την επαγωγή, τον καθορισμό και τη διαφοροποίηση. Η επαγωγή και ο καθορισμός των κυττάρων ελέγχονται από μορφογενετικά σήματα που εκκρίνονται από τη νωτοχορδή και το νευρικό σωλήνα, με την έκφραση γονιδίων των οικογενειών Sonic Hedgehog (Shh) και Wnt, αντίστοιχα (Ozernyuk, 2004). Στους ιχθείς, η διαφοροποίηση των μυοβλαστών δίνει γένεση σε δομικά και λειτουργικά διαφορετικούς τύπους ινών (αργές-κόκκινες, γρήγορες-άσπρες). Οι κόκκινες ίνες επεκτείνονται σαν ένα λεπτό στρώμα ακριβώς κάτω από το δέρμα και καλύπτουν το κύριο μέρος του μυομερούς, το οποίο αποτελείται από λευκές ίνες. Κάθε είδος μυϊκής ίνας προέρχεται από διαφορετικούς πληθυσμούς μυοβλαστών (Εικ.12). Οι λευκές (ταχείες) μυϊκές ίνες προέρχονται από μυοβλάστες του πλευρικού μεσοδέρματος και δημιουργούνται με τη συγχώνευση αρκετών μυοβλαστών για να δημιουργήσουν τους πολυπύρηνους μυοσωληνίσκους (Devoto et al., 1996). Οι κόκκινες (αργές) μυϊκές ίνες προέρχονται από έναν πληθυσμό αξονικών μυοκυττάρων (adaxial) στο επίπεδο

μεταμερισμού υπό την επίδραση του Shh που εκκρίνεται από τη νωτοχορδή (Blagden et al., 1997; Van Raamsdonk et al., 1978, 1982 a, b, c).



**Εικόνα 12.** Σχηματική αναπαράσταση μιας επιμήρους τομής, που απεικονίζει τις θέσεις των τεσσάρων χαρακτηριστικών τύπων μυϊκών κυττάρων. Ο κόκκινος μύς σχηματίζει ένα επιφανειακό στρώμα ενώ ο λευκός μύς βρίσκεται στο εσωτερικό (Stickney et al., 2000).

### 1.5.3 Ανάπτυξη του πλευρικού μύος

Η ανάπτυξη του πλευρικού μύος στους ιχθείς και συγκεκριμένα στην τσιπούρα είναι αποτέλεσμα ενός συνδυασμού των διαδικασιών της υπερτροφίας και της υπερπλασίας. Η υπερπλασία συμμετέχει κατά το στάδιο της προνύμφης αλλά και στη μετέπειτα ζωή του ψαριού. Αντιθέτως, η υπερτροφία των μυϊκών ινών λαμβάνει χώρα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, αλλά κυρίως στην νεανική και ενήλικη ζωή του ψαριού (Rowlerson et al., 1995). Αυτές οι διαδικασίες, χρησιμοποιώντας όρους της ανατομίας, δίνουν γένεση σε οργανωμένα μυομερή του πλευρικού μύος στα οποία οι αρχικές δομές με σχήμα V, αντικαθιστούνται από πιο πολύπλοκες δομές, με σχήμα W. Από πλευράς ιστολογίας, οι διαδικασίες της υπερτροφίας και της υπερπλασίας δίνουν γένεση σε μυϊκές ίνες διαφορετικής διαμέτρου και γι' αυτό το λόγο πολλές φορές ο λευκός μύς αναφέρεται ότι παρουσιάζει μωσαϊκά χαρακτηριστικά (Patruno et al, 1998).

### 1.5.4 Υπερπλασία

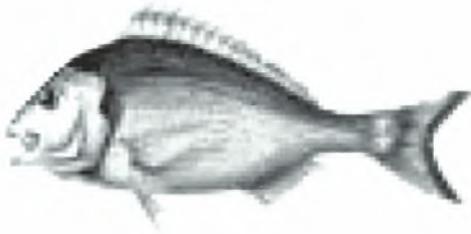
Η υπερπλασία μπορεί να κατηγοριοποιηθεί σε δύο φάσεις (Rowlerson & Vegetti, 1999). Αρχικά έχουμε, τη φάση έναρξης που λαμβάνει χώρα σε επίπεδο εμβρύου και νεαρής προνύμφης. Στη φάση αυτή, τα μυομερή παραλαμβάνουν νέες λευκές μυϊκές ίνες πλευρικά, σχηματίζοντας στις κορυφές τις υπερπλαστικές ζώνες ανάπτυξης (ζώνες πολλαπλασιασμού) (Rowlerson et al., 1995; Stoiber & Sanger, 1996; Patruno et al., 1998). Οι νέες κόκκινες μυϊκές ίνες, προσθέτονται πλευρικά στο επιφανειακό στρώμα δίπλα στο οριζόντιο διάφραγμα (Matsuoka & Iwai, 1984; Scapolo et al., 1988; Ramirez-Zarzosa et

al., 1995) καθώς επίσης ραχιαία και κοιλιακά στο τέλος αυτού του επιφανειακού στρώματος. Αμέσως μετά έρχεται η φάση της μωσαϊκής ανάπτυξης, η οποία ξεκινά στο στάδιο της προνύμφης, προσθέτοντας νέες μικρές μυϊκές ίνες σε όλες τις περιοχές του κάθε μυομερούς.

### 1.6 Η τσιπούρα, *Sparus aurata*

Η τσιπούρα (Εικ. 13), *Sparus aurata*, είναι ένας τελεόστεος, μέλος της οικογένειας Sparidae, το οποίο ανήκει στη τάξη Perciformes και στη κλάση των ακτινοπτερύγιων. Το περιβάλλον που ζει μπορεί να είναι βενθοπελαγικό, υφάλμυρο, θαλάσσιο, γλυκό και συναντάται σε βάθος 1-150m. Η κατανομή του εντοπίζεται στον Ατλαντικό ωκεανό (ανατολικά) και στη Μεσόγειο θάλασσα (<http://www.fishbase.org>).

Είναι ένα πρώτανδρο ερμαφρόδιτο ψάρι το μήκος του οποίου μπορεί να φτάσει τα 70 cm και το βάρος του τα 5 κιλά, ενώ η μέγιστη αναφερόμενη ηλικία είναι 11 χρόνια. Η σεξουαλική του ωρίμανση (ως αρσενικά) φτάνει στην ηλικία των 12-18 μηνών. Στο τέλος του δεύτερου έτους της ζωής του, περίπου το 80% των ψαριών γίνονται θηλυκά (Mascarello et al., 1995).



Εικόνα 13. Η τσιπούρα, *Sparus aurata* (<http://www.fishbase.org>).

#### 1.6.1 Αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας

Τέσσερις ώρες μετά τη δημιουργία του ζυγωτού ολοκληρώνεται η αυλάκωση στο στάδιο των 64 κυττάρων και μέσα στις 5 επόμενες ώρες ολοκληρώνεται η δημιουργία του βλαστιδίου. Αμέσως μετά ακολουθεί η γαστριδιοποίηση και η σωματογένεση. Η εμβρυονική ζωή της τσιπούρας (από τη γονιμοποίηση στην εκκόλαψη) διαρκεί περίπου 40 ώρες, σε θερμοκρασία 19°C.

Την πρώτη ημέρα μετά την εκκόλαψη η προνύμφη (μήκους 2,6 mm, 21 σωματίτες) δεν έχει καλά σχηματισμένο κεφάλι και έχει ένα μεγάλο λεκιθικό σάκο στον οποίο βασίζεται

για τη θρέψη. Κατά την 6<sup>η</sup>-9<sup>η</sup> μέρα μετά την εκκόλαψη, η κεφαλική περιοχή είναι πιο αναπτυγμένη από τα προηγούμενα στάδια, το στόμα είναι ανοιχτό και ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί. Γύρω από τη νωτοχορδή σχηματίζεται το περίγραμμα της σπονδυλικής στήλης. Τα λέπια και τα πτερύγια αρχίζουν να παίρνουν σχήμα. Η προνύμφη (μήκους 3,5-3,7 mm, 23-24 σωμαίτες) έχει πιο αναπτυγμένους και οργανωμένους μύες (Patruno et al., 1998).

Στο στάδιο της 15<sup>ης</sup>-20<sup>ης</sup> ημέρας η προνύμφη, μήκους 4mm, αποτελείται από 24 σωμαίτες. Ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί πλήρως, ενώ βρίσκονται σε εξέλιξη, η ανάπτυξη της σπονδυλικής στήλης, του πεπτικού σωλήνα και των αδένων του. Η συνολική μάζα των μυϊκών κυττάρων είναι πιο αναπτυγμένη, ομοιογενής και συμπαγής από τα προηγούμενα στάδια. Στο στάδιο της προ-μεταμόρφωσης (30-40 ημέρες μετά την εκκόλαψη) η προνύμφη έχει καλά αναπτυγμένα όλα τα όργανα και όλους τους ιστούς. Μετά την 60<sup>η</sup> ημέρα χάνονται τα τυπικά χαρακτηριστικά της προνύμφης και έχουν ήδη εμφανιστεί τα πρώτα χαρακτηριστικά της μεταμόρφωσης. Σ' αυτό το στάδιο η τσιπούρα έχει μήκος 14-20 mm και αποτελείται από 25 σωμαίτες. Από τη 150<sup>η</sup> ημέρα και μετά, το ψάρι έχει όλα τα χαρακτηριστικά του ενήλικου ψαριού (Patruno et al., 1998).

### 1.7 Σκοπός της εργασίας

Η ανάπτυξη του σκελετικού μυός παρουσιάζει ενδιαφέρον, διότι επιτελείται με τις διαδικασίες της υπερτροφίας και της υπερπλασίας των μυϊκών ινών. Στα θηλαστικά, η υπερπλασία είναι περιορισμένη στα στάδια πριν και λίγο μετά τη γέννηση (Stingle 1972; Schultz 1974; Stickland 1983; Johnston et al., 1998). Στους τελεόστεους ιχθείς, και οι δύο διαδικασίες (υπερτροφία και υπερπλασία) συμμετέχουν στην ανάπτυξη του μυός καθ' όλη τη διάρκεια ζωής του ψαριού και ρυθμίζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Για τον παραπάνω λόγο, οι τελεόστεοι παρέχουν ένα καλό μοντέλο για να μελετηθεί η ανάπτυξη του μυός και οι μηχανισμοί που τη διέπουν. Επιπλέον, η τσιπούρα (*Sparus aurata*), είναι ένα σημαντικό μεσογειακό είδος με μεγάλη εμπορική αξία. Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκε το αναπτυξιακό πρότυπο έκφρασης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης 1 (MLC1) στην τσιπούρα, με την τεχνική της υβριδοποίησης *in situ*. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η έκφραση της MLC1 σε προνύμφες και ιχθύδια των 4, 8, 10, 15, 20, 25, 34, 51 και 80 ημερών. Για κάθε στάδιο ανάπτυξης τα πρότυπα έκφρασης συσχετίστηκαν με σημαντικές φυσιολογικές μεταβολές.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Χημικά και διαλύματα

Η προέλευση όλων των χημικών αναλώσιμων και η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων παρουσιάζονται αναλυτικά στα Παραρτήματα 1 και 2 αντίστοιχα.

### 2.2 Προνύμφες και ιχθύδια

Τα ιχθύδια και οι προνύμφες τσιπούρας (*Sparus aurata*), που χρησιμοποιήθηκαν, προήλθαν από την πειραματική μονάδα του Πανεπιστημίου Algarve της Πορτογαλίας. Γονιμοποιημένα αυγά συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε αεριζόμενες δεξαμενές, χωρητικότητας 200l, οι οποίες εφοδιάζονταν συνεχώς με θαλασσινό νερό. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και αλατότητας, που επικρατούσαν μέσα στις δεξαμενές, ήταν  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  και 36o/oo, αντίστοιχα, και η φωτοπερίοδος 12hr φως και 12hr σκοτάδι. Σ' αυτές τις συνθήκες η εκκόλαψη των αυγών πραγματοποιήθηκε σε 48-56hr μετά τη γονιμοποίηση, η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου σε 4-5 ημέρες μετά την εκκόλαψη και το άνοιγμα του στόματος και η έναρξη λήψης τροφής περίπου την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά την εκκόλαψή του. Με την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, η διατροφή των προνυμφών βασίστηκε αποκλειστικά στο τροχόζωο *Brachionus plicatilis* (5 άτομα/ml νερού). Η τροφή προσφέρονταν το πρωί και αμέσως μετά το μεσημέρι, έτσι ώστε να είναι διαθέσιμη πάνω από 10hr την ημέρα, και ανανεώνονταν κάθε βράδυ. Από την 9η έως τη 40η ημέρα μετά την εκκόλαψη, στις προνύμφες προσφέρθηκε *Artemia* sp., ενώ μετά τη 40<sup>η</sup> ημέρα η διατροφή τους περιείχε μόνο ξηρά τροφή.

#### 2.2.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Δείγματα συλλέχθηκαν τις ημέρες 4, 8, 10, 15, 20, 25, 34, 51 και 80 μετά την εκκόλαψη. Τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα παραφορμαλδεύδης 4% (PFA), όπου παρέμειναν όλο το βράδυ, στους 4°C. Την επόμενη μέρα ακολούθησαν 3 πλύσεις με αποστειρωμένο διάλυμα PBS, διάρκειας 15min καθεμία και έπειτα μια πλύση με αποστειρωμένο νερό για 15min. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 70%, στους 4° C. Επιπλέον, τα δείγματα των 34, 51 και 80 ημερών, υποβλήθηκαν σε διαδικασία αποασβεστοποίησης, προκειμένου να καταστεί δυνατή η τομή τους. Συγκεκριμένα, τα

αποθηκευμένα σε 70% αιθανόλη δείγματα, πλύθηκαν επί 3 φορές με DEPC νερό (νερό απαλλαγμένο από RNAάσες), για 10min κάθε φορά. Έπειτα μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένο διάλυμα EDTA 0,5M, pH 8 και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 7 ημέρες, με καθημερινή αλλαγή του διαλύματος EDTA. Μετά την αποασβεστοποίηση, τα δείγματα πλύθηκαν με DEPC νερό για 2hr και αποθηκεύτηκαν σε 70% αιθανόλη.

Τη μονιμοποίηση των δειγμάτων ακολούθησε, η αφυδάτωση σε διάλυμα αιθανόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης και εγκλεισμός σε παραφίνη. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε κασέτες βιοψίας και η όλη διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός επεξεργαστή ιστών. Συγκεκριμένα, τα βήματα που ακολουθήθηκαν ήταν τα εξής: 70% αιθανόλη για 10min, 95% αιθανόλη για 30min, 95% αιθανόλη για 30min, 100% αιθανόλη για 60min, 100% αιθανόλη για 60min, διάλυμα αιθανόλης:ξυλένιου (1:1) για 60min, ξυλένιο για 60min, ξυλένιο για 90min, διάλυμα ξυλένιου:παραφίνης (1:1) για 120min, και τέλος παραφίνη για 120 min. Μετά την ψύξη, ετοιμάστηκαν πολύ λεπτές τομές (5μm) των δειγμάτων, με τη βοήθεια του μικροτόμου, οι οποίες τοποθετήθηκαν σε ειδικά προετοιμασμένες αντικειμενοφόρους πλάκες.

### **2.2.2 Προετοιμασία αντικειμενοφόρων πλακών**

Οι αντικειμενοφόρες πλάκες που χρησιμοποιήθηκαν, είχαν προηγουμένως υποστεί τη διαδικασία APES, προκειμένου να καθαρίσουν και να γίνουν πιο κολλώδεις. Αρχικά, οι αντικειμενοφόρες πλάκες βυθίστηκαν σε διάλυμα που περιείχε 1%(v/v) HCl και 70% αιθανόλη, για 30min. Στη συνέχεια, ξεπλύθηκαν διαδοχικά με νερό βρύσης και με απεσταγμένο νερό. Αφού στέγνωσαν, βυθίστηκαν σε ακετόνη για 30min και έπειτα σε ακετόνη που περιέχει 2%(v/v) APES, για 5min. Τέλος, πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό 2 φορές και αφέθηκαν να στεγνώσουν, πριν χρησιμοποιηθούν.

### **2.3 Χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης**

Για την ιστολογική παρατήρηση των τομών πριν την περαιτέρω χρήση τους χρησιμοποιήθηκε η ταυτόχρονη χρώση αιματοξυλίνης-εωσίνης, κατά την οποία η αιματοξυλίνη χρωματίζει τους πυρήνες μοβ και η εωσίνη χρωματίζει το κυτταρόπλασμα ροζ. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: ενυδάτωση των ιστών με πλύσεις, 2x15min με ξυλένιο, 2x5min με 100% αιθανόλη, 1x5min με 95% αιθανόλη, 1x5min με 70% αιθανόλη, 1x5min με απεσταγμένο νερό. Χρώση σε διάλυμα αιματοξυλίνης για 30sec. Πλύση με νερό βρύσης, το οποίο περιέχει λίγες σταγόνες αμμωνίας 4M και στη συνέχεια πλύση με καθαρό

νερό. Χρώση σε διάλυμα εωσίνης για 30sec. Πλύση με απεσταγμένο νερό το οποίο περιέχει λίγες σταγόνες οξικού οξέος και στη συνέχεια πλύση με απεσταγμένο νερό. Αφυδάτωση με διαδοχική βύθιση των δειγμάτων σε: 70%, 95% και 100% αιθανόλη, για 5min στο κάθε διάλυμα και τέλος σε διάλυμα K-Clear, τουλάχιστον για 5min. Προετοιμασία για παρατήρηση με 2 πλύσεις σε διάλυμα ξυλένιου, διάρκειας 15min, η καθεμία και μονιμοποίηση με DPX.

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΗΣ MLC1

Η μελέτη των προτύπων έκφρασης της MLC1 στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας έγινε με τη τεχνική της υβριδοποίησης *in situ* και ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε ένα συνθετικό μόριο RNA, σημασμένο με διοξigenίνη.

### 2.4 Παραγωγή του ριβοανιχνευτή

Για την παραγωγή του ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε απομονωμένος πλασμιδιακός φορέας pGemT-Easy, ο οποίος περιείχε ένα τμήμα της cDNA αλληλουχίας της MLC1 μήκους 500bp, που είχε απομονωθεί από προνυμφικά στάδια του ιππόγλωσσου, *Hippoglossus hippoglossus* L.. (Παράρτημα 3).

#### 2.4.1 Βακτηριακός μετασχηματισμός και ενίσχυση του DNA

Δεκτικά βακτήρια *Escherichia coli* (XLB1) που ήταν αποθηκευμένα στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , αφού ξεπάγωσαν, μετασχηματίστηκαν με τον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy ο οποίος περιείχε την αλληλουχία της MLC1. Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκε 1μl απομονωμένου πλασμιδιακού φορέα, ο οποίος επωάστηκε σε πάγο μαζί με βακτηριακά κύτταρα για 30min. Ακολούθησε μια σύντομη (45-90sec) έκθεση στους  $42^{\circ}\text{C}$  και τα βακτήρια επιστρώθηκαν σε τριβλία με Luria-Bertani (LB) άγαρ που περιείχε IPTG (0,5mM), X-Gal (80μg/ml) και αμπικιλίνη (100μg/ml) και επωάστηκαν όλη τη νύχτα, στους  $37^{\circ}\text{C}$ . Στη διάρκεια της επώασης λευκές αποικίες αναπτύχθηκαν από τα μετασχηματισμένα βακτήρια.

#### 2.4.2 Απομόνωση DNA

Μια μετασχηματισμένη (λευκή) αποικία μεταφέρθηκε, κάτω από ασηπτικές συνθήκες, σε σωλήνα που περιείχε περίπου 4ml αποστειρωμένου υγρού μέσου καλλιέργειας LB Broth και επωάστηκε όλη τη νύχτα στους  $37^{\circ}\text{C}$ , στις 250 rpm. Την επόμενη μέρα, η συλλογή των βακτηρίων έγινε σε αποστειρωμένους σωλήνες *erpendorf* χωρητικότητας 2ml, με διαδοχικές

φυγοκεντρήσεις στις 10000 rpm, για 5 min η καθεμία. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρήθηκε σε 200ml διαλύματος GTE και προστέθηκαν 2ml RN<sub>ASE</sub>A. Μετά από επώαση 10min, σε θερμοκρασία δωματίου, προστέθηκαν 400ml διαλύματος 0,2M NaOH/ 1%SDS και ακολούθησε ψύξη στον πάγο για 5min. Ακολούθησε προσθήκη 300ml διαλύματος οξικού καλίου 3M και ψύξη στον πάγο για άλλα 45min. Το πλασμιδιακό DNA που απελευθερώθηκε με τη λύση των βακτηρίων συλλέχθηκε στο υπερκείμενο μετά από φυγοκέντρηση στις 10.000 rpm για 10min, μεταφέρθηκε σε καθαρό αποστειρωμένο σωλήνα *eppendorf* που περιείχε 1ml παγωμένης 100% αιθανόλης και παρέμεινε όλη τη νύχτα στους -20°C. Την επόμενη ημέρα το πλασμιδιακό DNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 10000 rpm για 20min και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500ml παγωμένης 100% αιθανόλης και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις για 10min στις 10.000 rpm. Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για λίγα λεπτά και επαναιωρήθηκε σε 50ml αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες. Η ποιότητα του απομονωμένου πλασμιδιακού DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης 1%.

#### 2.4.3 Ευθυγράμμιση και καθαρισμός του πλασμιδιακού DNA

Η ευθυγράμμιση του πλασμιδιακού DNA έγινε με το ένζυμο περιορισμού NcoI, το οποίο έκοψε το πλασμίδιο μόνο σε ένα σημείο, ακριβώς μετά το τέλος της εισερχόμενης αλληλουχίας. Η αντίδραση ευθυγράμμισης περιείχε, 1ml ενζύμου περιορισμού NcoI, 2ml ρυθμιστικού διαλύματος, 8ml απομονωμένου πλασμιδίου και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20ml. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 1,5hr. Μετά το τέλος της αντίδρασης, 1ml αποθηκεύεται, για να εξεταστεί η ποιότητα του με ηλεκτροφόρηση, την επόμενη ημέρα μαζί με το καθαρό DNA.

Στον υπόλοιπο όγκο της αντίδρασης προστέθηκε αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml και 100ml φαινόλης (pH 8), και αφέθηκαν για επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 35min. Την επώαση ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15min στις 10000 rpm, σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε και μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα *eppendorf*, που περιείχε οξικό νάτριο (AcNa) 3M pH 5,2 όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου της υπερκείμενης φάσης και παγωμένη 100% αιθανόλη όγκου ίσου με 2,5 φορές της υπερκείμενης φάσης. Το διάλυμα παρέμεινε όλη τη νύχτα στους -20°C.

Την επόμενη ημέρα, το DNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση για 10min, στους 4°C, στις 10000 rpm και ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500ml παγωμένης 75% αιθανόλης, και ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις στις 10000 rpm στους 4°C. Μετά το τέλος της δεύτερης

φυγοκέντρωσης, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει για λίγα λεπτά και επαναιωρήθηκε σε 20μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένου από νουκλεάσες, για 5min στους 60°C. Η ποιότητα του ευθύγραμμου DNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%.

#### 2.4.4 Μεταγραφή *in vitro*

Σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα *ependorf* προστέθηκαν, 4μl ρυθμιστικού διαλύματος μεταγραφής 5x, 1μl DTT 100Mm, 5μl NTP's mix [1μl από κάθε νουκλεοτίδιο (10Mm) και 1μl H<sub>2</sub>O<sub>s</sub>], 0,2μl BSA 10mg/ml, 0,5μl RNA guard, 1μl SP6 RNA πολυμεράση και χμL ευθυγραμμισμένου DNA. Συγκεκριμένα, η παραπάνω διαδικασία έγινε για 2 διαφορετικές ποσότητες DNA (x=2μl και 4μl). Τέλος προστέθηκε αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20μl. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 37°C, για 90min. Έπειτα, το διάλυμα τοποθετήθηκε στον πάγο για 2min, αφού είχαν προστεθεί 2μl EDTA 0,2M (DEPC). Στη συνέχεια, στο διάλυμα προστέθηκαν 2,5μl διαλύματος χλωριούχου λιθίου 4M και 75μl παγωμένης 100% αιθανόλης. Η αντίδραση διακόπηκε με επώαση στους -20°C για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη ημέρα το μόριο του RNA συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση στις 12000rpm, στους 4°C για 10min. Ακολούθησαν δύο πλύσεις με 500μl 75% αιθανόλης, απαλλαγμένη από νουκλεάσες και ενδιάμεσα φυγοκεντρήσεις στις 12000 rpm, στους 4°C για 10min. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρωση, το ίζημα αφέθηκε να στεγνώσει στον πάγο και επαναιωρήθηκε με 25μl αποστειρωμένου απεσταγμένου νερού απαλλαγμένο από νουκλεάσες. Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% και επιλέχθηκε η καταλληλότερη ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη σύνθεση του ανιχνευτή σημασμένου με διοξigenίνη.

#### 2.4.5 Μεταγραφή *in vitro* και σήμανση με διοξigenίνη

Η διαδικασία της μεταγραφής *in vitro* επαναλήφθηκε όπως περιγράφεται πιο πάνω με μόνη διαφορά την αντικατάσταση των 5μl NTP's mix με 1μl DIG mix (Roche). Από τη σύγκριση των δύο διαφορετικών ποσοτήτων DNA (Παράρτημα 1), προέκυψε ότι η καταλληλότερη ποσότητα του DNA, η οποία και χρησιμοποιήθηκε ήταν 3μl.

## 2.5 Υβριδοποίηση *in situ*

Οι ιστοί εμβαπτίστηκαν σε ξυλένιο, 2x5min και ακολούθησε η ενυδάτωσή τους με 100% αιθανόλη 2x5min, 95% αιθανόλη (DEPC) για 5min, 70% αιθανόλη (DEPC) για 5min, PTW για 10min. Οι ιστοί καλύφθηκαν με διάλυμα υβριδοποίησης (HM) και αφέθηκαν για επώαση στους 56°C για 2-4hr. Στη συνέχεια, οι ιστοί καλύφθηκαν με το διάλυμα του ριβοανιχνευτή, σε κάθε αντικειμενοφόρο πλάκα προστέθηκαν 75ml του παραπάνω διαλύματος, και ακριβώς επάνω από τους ιστούς τοποθετήθηκε ένα μικρό κομμάτι parafilm. Στη συνέχεια επώαστηκαν στους 56°C για όλη τη νύχτα.

Την επόμενη ημέρα, το parafilm απομακρύνθηκε με προθερμασμένο διάλυμα 2xSSC και ακολούθησαν πλύσεις, 2 φορές με 2xSSC και 2 φορές με 1xSSC, διάρκειας 5min η καθεμία στους 56°C. Στη συνέχεια ακολούθησαν πλύσεις με 2x5 min με διάλυμα 2xSSC/0,12% CHAPS, 1x5min με διάλυμα 2xSSC/PTW (1/1, v/v) και 1x5min με διάλυμα PTW, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, οι ιστοί καλύφθηκαν με διάλυμα 2% blocking solution που περιείχε 10% ορό προβάτου (sheep serum). Για κάθε τομή χρησιμοποιήθηκαν 35ml διαλύματος και ακολούθησε επώαση για 2hr σε θερμοκρασία δωματίου. Οι ιστοί καλύφθηκαν με επαρκή ποσότητα διαλύματος που περιέχει το αντίσωμα (1ml αντισώματος σε 600ml blocking solution) και αφέθηκαν για επώαση όλη τη νύχτα στους 4°C.

Την επόμενη μέρα ακολούθησαν δύο πλύσεις διάρκειας 5min με διάλυμα Tris-NaCl (pH7,5) προκειμένου ν' αποδομηθούν τα λάθος υβρίδια. Στη συνέχεια, οι ιστοί βυθίστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος για 10 min, πριν βυθιστούν σε διάλυμα χρώσης που περιείχε NBT και BCIP, στο σκοτάδι στους 37-38°C για 1hr. Η αντίδραση χρώσης διακόπηκε με διάλυμα 1XPBS 2x5min. Για την παρατήρησή τους, οι ιστοί βυθίστηκαν σε PFA 4% για 15min, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησαν οι πλύσεις: 2x5min με διάλυμα 1XPBS και 2x5 min με απεσταγμένο νερό. Οι ιστοί μονιμοποιήθηκαν σε προθερμασμένη ζελατίνη. Για την παρατήρηση χρησιμοποιήθηκε οπτικό μικροσκόπιο Olympus BH2 εφοδιασμένο με κάμερα (Sony 3CCD DXP-930P), η οποία συνδέονταν με ηλεκτρονικό υπολογιστή για την ψηφιακή ανάλυση των φωτογραφιών.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Απομόνωση και καθορισμός του κλώνου της MLC1

Το cDNA απομονώθηκε από cDNA βιβλιοθήκη που κατασκευάστηκε από προνυμφικά στάδια ιππόγλωσσου, *Hippoglossus hippoglossus* L., ήταν μήκους 500bp και αντιπροσώπευε το 91% της κωδικοποιητικής περιοχής της πρωτεΐνης MLC1 (Εικ.14). Η πολλαπλή ομοπαράθεση (Εικ. 15) της αλληλουχίας των αμινοξέων έγινε με τη χρήση του προγράμματος Clustal W (Thompson et al., 1994).

Στο λευκό σκελετικό μυ, οι ELCs συναντώνται με δύο ισομορφές, τη μακριά MLC1 και τη κοντή MLC3. Σε όλα τα σπονδυλωτά, συμπεριλαμβανομένων και των ψαριών, οι ELCs περιέχουν ένα κοινό, καλά συντηρημένο καρβοξυ-τελικό (C-τελικό) άκρο που αποτελείται από 140-141 αμινοξέα (aa, αμινοξέα) ενώ στο αμινο-τελικό (N-τελικό) τους άκρο περιέχουν ένα επιπλέον τμήμα αμινοξέων. Το μήκος αυτού του τμήματος ποικίλλει από 49-57aa στην MLC1 και 10-32aa στην MLC3. Τα πρώτα 11 κατάλοιπα του N-τελικού άκρου είναι υπεύθυνα για την αλληλεπίδραση των ELCs με το C-τελικό άκρο της ακτίνης (Timson et al., 1998). Όσο αφορά στην MLC1 του υπόγλωσσου *Hippoglossus hippoglossus* L., το επιπλέον τμήμα αμινοξέων στο N-τελικό άκρο αποτελείται από 52aa.

```

5' - TAAATGGCACCCCAAGAAGGACCCCTAAGGCTGCCGTC AAGAAGGCCGAGCCCGCAGCAGCTCCAGCCCCGGTAGCTGCACCCGGAAGCC
      M A P K K D P K A A V K K A E P A A A P A P V A A P E A

CGCACCTCCCGCAGCAGCTCCCGCTGTGACCTGTCCGCGTCAAGGTGGAATTCAGCGCAGACCAGATTGATGACTACAGGGAGGCCTTCGGT
R T P A A A P A V D L S A V K V E F S A D Q I D D Y R E A F G

CTGTTTCGACAGGGTGGGTGACAGCAAGGTGGCTTACAACCAGATCGCCGACATCATGCGCGCTCTGGGACAGAACCCCAACAAGGAGGGCGAAC
L F D R V G D S K V A Y N Q I A D I M R A L G Q N P T N K E A N

AAACTGCTGGGAAGCCCTCCGCTGATGACATGGTCAACAAGAGAGTAGACTTCGAGGGTTTCCTGCCCATGCTCCAGACCATCATCAACAGCCCA
K L L G S P S A D D M V N K R V D F E G F L P M L Q T I I N S P

AACCAAGGCCGGATTTCGAGGACTACGTTGAGGGTCTGCGCGTCTTCGACAAGGAGGGCAACGGCACAGTGTGGGTGCTGAGCTGCGTATTGTCCTG
N K A G F E D Y V E G L R V F D K E G N G T V M G A E L R I V L

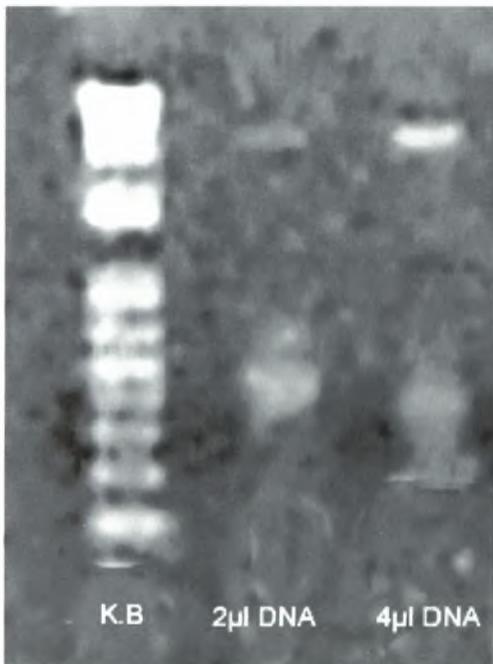
TCAACACTGGGAGAGAAGATGACTGAGTCTGAGATCGATTCTCTCATGGTAGGACAGGAGGACGAGAATGGA -3'
S T L G E K M T E S E I D S L M V G Q E D E N G
    
```

**Εικόνα 14.** Νουκλεοτιδική αλληλουχία του cDNA μορίου της MLC1 του υπόγλωσσου, *Hippoglossus hippoglossus* L. και αντίστοιχα η αλληλουχία των αμινοξέων. Η νουκλεοτιδική αλυσίδα περιέχει το κωδικόνιο έναρξης (έντονα γράμματα) αλλά το κωδικόνιο λήξης μαζί μ' ένα κομμάτι από το C-τελικό άκρο, λείπει.



### 3.2 Έκφραση της MLC1

Η μελέτη της έκφρασης της MLC1, όπως αναφέρθηκε, πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική της υβριδοποίησης *in situ*. Ο ανιχνευτής (μόριο RNA) παράχθηκε μετά από μεταγραφή *in vitro* του ευθυγραμμισμένου πλασμιδιακού DNA. Αρχικά, η μεταγραφή *in vitro* έγινε χωρίς τα νουκλεοτίδια να είναι σημασμένα με διοξigenίνη, για 2 διαφορετικές ποσότητες DNA (2μl και 4μl). Η ποιότητα και η ποσότητα του RNA ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (Εικ.16) και επιλέχθηκε η καταλληλότερη ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια για τη σύνθεση του ανιχνευτή σημασμένου με διοξigenίνη. Με την υβριδοποίηση *in situ*, το mRNA της MLC1 εντοπίζεται πάνω στον ιστό με μοβ χρώμα, όπου είναι εύκολη η παρατήρησή του με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Η ένταση του χρώματος είναι ανάλογη του ποσού της έκφρασης της MLC1. Συνεπώς η παρατήρηση της διακύμανσης του χρώματος και της έντασης του, στο μυϊκό ιστό των τομών που μελετήθηκαν, έδωσαν πληροφορίες για τα σημεία έκφρασης της MLC1 στο κάθε αναπτυξιακό στάδιο της τσιπούρας.

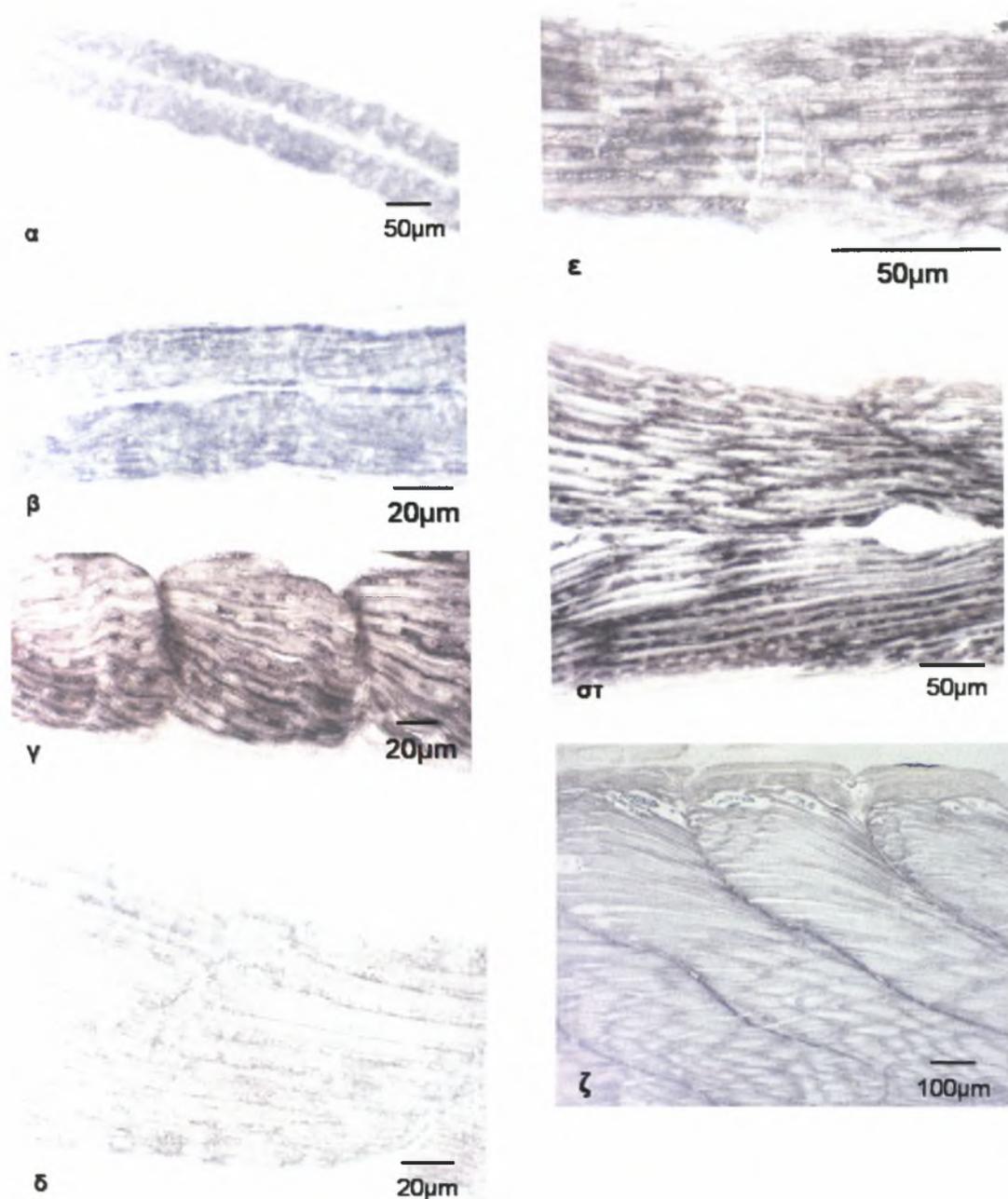


Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1%, των RNA ανιχνευτών, οι οποίοι δεν ήταν σημασμένοι με διοξigenίνη. Η μεταγραφή *in vitro* πραγματοποιήθηκε για δύο διαφορετικές ποσότητες του DNA. Από την εικόνα προκύπτει ότι η καταλληλότερη ποσότητα του DNA, η οποία και χρησιμοποιήθηκε είναι 3μl. (Κ.Β, κλίμακα μεγέθους DNA).

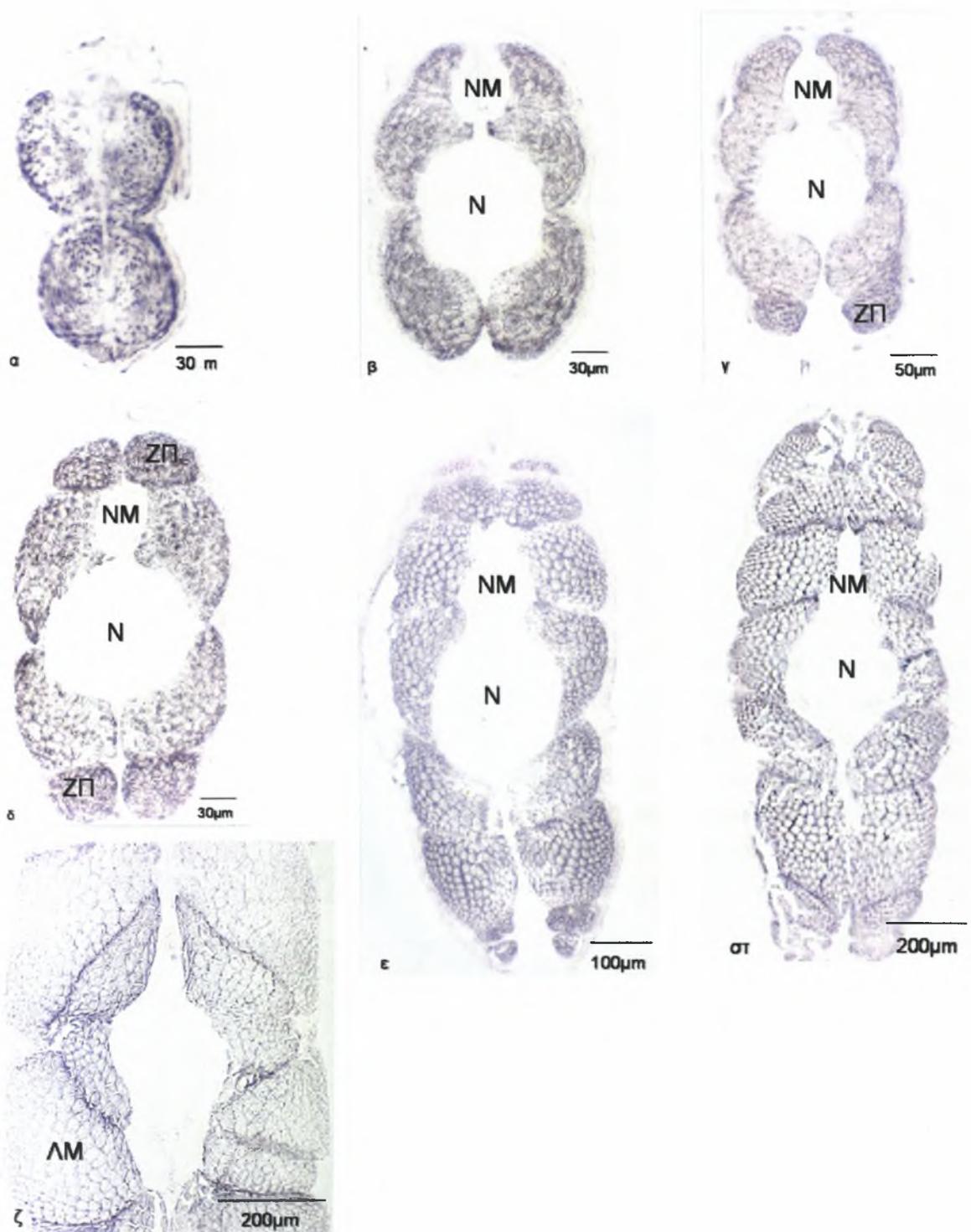
Η έκφραση της MLC1 ακολούθησε το ίδιο τύπο έκφρασης σε όλο το μήκος της προνύμφης (Εικ.17). Από την εικόνα 17, μπορούμε να παρατηρήσουμε τις αλλαγές στην έκφραση της MLC1 καθώς επίσης και μορφολογία των μυϊκών ινών.

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης (4-25 ημερών) (Εικ.18α-ε) παρατηρήσαμε ότι η έκφραση της MLC1 ήταν αρκετά έντονη στους επαξόνιους και υπαξόνιους μύες και το σήμα υβριδοποίησης ήταν εντονότερο στην περιφέρεια, στη περιοχή που βρίσκεται η πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού. Τα επίπεδα της έκφρασης παρέμειναν υψηλά μέχρι τη 10<sup>η</sup> ημέρα, όπου άρχισαν να εμφανίζονται οι υπερπλαστικές ζώνες ανάπτυξης (ζώνες πολλαπλασιασμού), ραχιαία και κοιλιακά, οι οποίες δίνουν γένεση σε νέα μυϊκά κύτταρα (Εικ.18β-ε) Σ' αυτές τις ζώνες ανάπτυξης, η MLC1 παρουσίασε τη μεγαλύτερη έκφραση από οποιαδήποτε άλλο σημείο του μυός της προνύμφης. Στο στάδιο των 15 ημερών (Εικ.18γ), το σήμα υβριδοποίησης ήταν αρκετά έντονο στις ζώνες πολλαπλασιασμού καθώς επίσης και στο πλευρικό μυ στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος. Από τη 15<sup>η</sup> ημέρα, η διαφορά ανάμεσα στις ίνες των υπερπλαστικών ζωνών ανάπτυξης και αυτών των βαθύτερων στρωμάτων, έγινε εμφανής. Οι υπερπλαστικές ζώνες ανάπτυξης (Εικ.19) χαρακτηρίζονταν από μυοβλάστες μικρής διαμέτρου με υψηλά επίπεδα έκφρασης MLC1, ενώ ο εσωτερικός μυς αποτελούνταν από πολυγωνικές, μεγάλης διαμέτρου μυϊκές ίνες, οι οποίες δεν παρουσίαζαν έκφραση της MLC1 (Εικ.19).

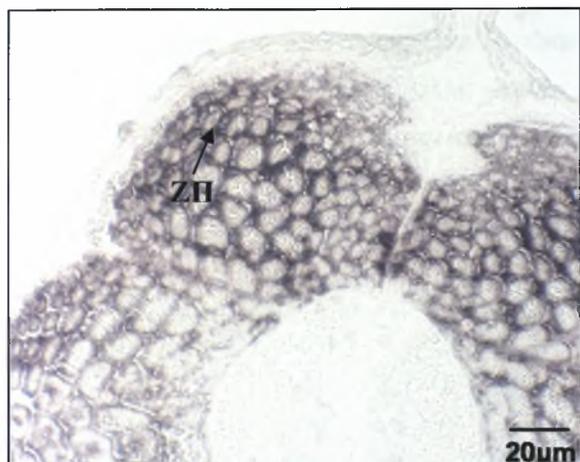
Στα επόμενα στάδια ανάπτυξης (34, 51, 80 ημερών), όπου η σωματογένεση είχε ήδη ολοκληρωθεί από τη 30<sup>η</sup> ημέρα, η έκφραση της MLC1 παρουσιάστηκε μειωμένη έως και μηδαμινή (στο στάδιο των 80 ημερών, Εικ.21). Συγκρίνοντας με τα προηγούμενα στάδια, η ένταση μειώθηκε αρκετά στην πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού, ενώ η ραχιαία και κοιλιακή ζώνη πολλαπλασιασμού εξαφανίστηκαν (Εικ.18στ, ζ). Αντιθέτως, η έκφραση της MLC1 περιορίστηκε σε μικρά κύτταρα, που ήταν τοποθετημένα ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες (Εικ.20,21).



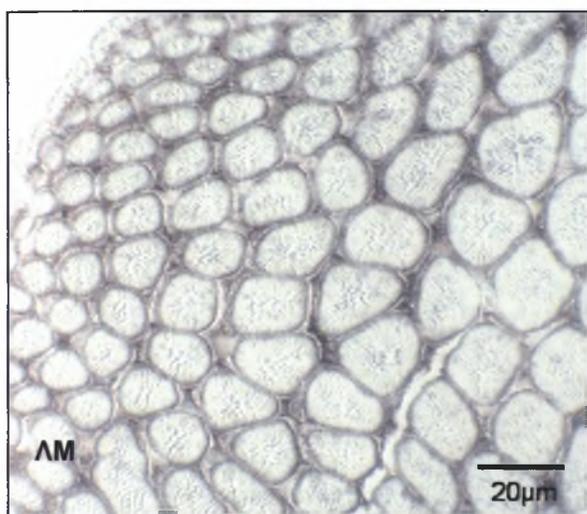
Εικόνα 17. Έκφραση της MLC1 με υβριδοποίηση *in situ*, σε επιμήκεις τομές από προνύμφες και ιχθύδια τσιπούρας (τμήματα της ουράς) σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Είναι εμφανής η διαφορά στη τοποθέτηση των μυϊκών ινών καθώς επίσης και η αλλαγή τους σε επίπεδο μεγέθους. Γενικά σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια η MLC1 ακολουθεί τον ίδιο τύπο έκφρασης σε όλο το μήκος της προνύμφης. Το σήμα της υβριδοποίησης είναι έντονο στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και κυρίως στη περιφέρεια. Μετά την 34<sup>η</sup> ημέρα, η έκφραση της MLC1 μειώνεται σημαντικά. α, προνύμφη 4 ημερών; β, προνύμφη 10 ημερών; γ, προνύμφη 15 ημερών; δ, προνύμφη 20 ημερών; ε, προνύμφη 25ημερών; στ, προνύμφη 34 ημερών; ζ, προνύμφη 51 ημερών.



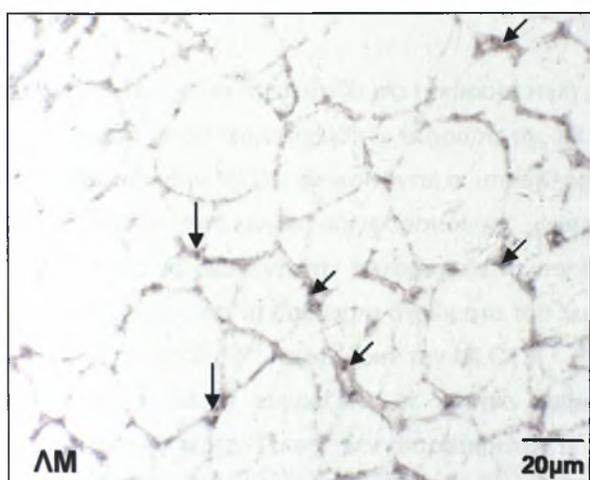
**Εικόνα 18.** Έκφραση της *MLC1* με τη τεχνική της υβριδοποίησης *in situ*, σε εγκάρσιες τομές από προνύμφες τσιπούρας. α, προνύμφη 4 ημερών; β, προνύμφη 10 ημερών; γ, προνύμφη 15 ημερών; δ, προνύμφη 20 ημερών; ε, προνύμφη 25 ημερών; στ, προνύμφη 34 ημερών; ζ, προνύμφη 51 ημερών. (N, νωτοχορδή; NM, νωτιαίος μυελός; ZΠ, ζώνη πολλαπλασιασμού; ΛΜ, λευκός μυς).



**Εικόνα 19.** Η έκφραση της MLC1 σε προνύμφη 25 ημερών. Μεγέθυνση της ραχιαίας ζώνης πολλαπλασιασμού. Απεικονίζεται η διαφορά στην έκφραση της MLC1 ανάμεσα στα 1<sup>α</sup> μομερή, που αποτελούν τις υπερπλαστικές ζώνες πολλαπλασιασμού, και στα βαθύτερα στρώματα του λευκού μυ (βέλος), (ΖΠ, Ζώνη πολλαπλασιασμού).

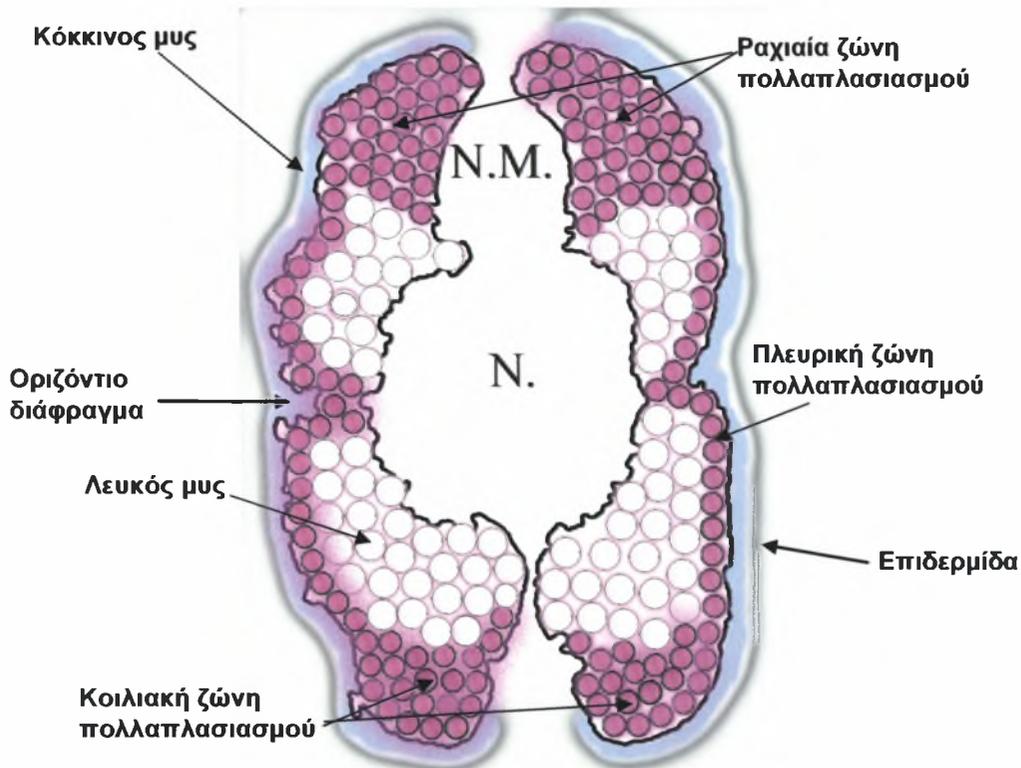


**Εικόνα 20.** Η έκφραση της MLC1 σε προνύμφη 34 ημερών. Τμήμα από λευκό μυ του ραχιαίου τμήματος. Οι μυϊκές ίνες στα βαθύτερα στρώματα έχουν πια ωριμάσει και δεν εκφράζουν MLC1. Αντιθέτως η έκφρασή της εντοπίζεται ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, (ΛΜ, λευκός μυς).



**Εικόνα 21.** Η έκφραση της MLC1 σε ιχθύδιο 80 ημερών. Τμήμα του λευκού μύς από εγκάρσια τομή. Διακρίνονται οι ώριμες, πολυγωνικές, μεγάλης διαμέτρου λευκές μυϊκές ίνες. Η έκφρασή της εντοπίζεται μόνο σε μικρά κύτταρα (βέλη) που βρίσκονται ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες και πιθανώς είναι τα δορυφορικά κύτταρα (ΛΜ, λευκός μυς).

Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι η έκφραση της MLC1 εντοπίζεται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης της προνύμφης και σταδιακά μειώνεται. Αρχικά, η MLC1 εκφράζεται σε όλο το σύνολο του λευκού μύος, αλλά κυρίως στην πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού. Στη συνέχεια, καθώς αυξάνεται η έκφραση της, εντοπίζεται στις περιοχές όπου παρατηρείται μυογένεση (Εικ.22).



**Εικόνα 22.** Το σχήμα απεικονίζει μια εγκάρσια τομή ενός ιχθυοδίου, την οργάνωση του σκελετικού μύος και τα σημεία όπου παρατηρήθηκε έκφραση της MLC1. Με ροζ χρώμα (■) είναι περιοχές του μύος που εκφράζουν την MLC1. Διακρίνονται οι υπερπλαστικές ζώνες ανάπτυξης, ραχιαία και κοιλιακά, που χαρακτηρίζονται από μικρές αδιαφοροποίητες μυϊκές ίνες με έντονη έκφραση της MLC1 (●). Επίσης μπορεί κανείς να διακρίνει την πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού που παρουσιάζει έντονη έκφραση της MLC1, καθώς και τα βαθύτερα στρώματα του λευκού μύος, τα οποία χαρακτηρίζονται από ώριμες μυϊκές ίνες, οι οποίες δεν εκφράζουν την MLC1 (○). Ακόμη, παρατηρήθηκε ότι ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, η MLC1 εκφράζεται σε κάποιο βαθμό, στην περιοχή αυτή πιθανώς βρίσκονται τα δορυφορικά κύτταρα. Τέλος, δεν παρατηρείται η έκφραση της MLC1 στο κόκκινο μυ (■), [N, Νωτοχορδή; NM, Νωτιαίος μυελός;(■), επιδερμίδα].

Τέτοιες περιοχές είναι η ραχιαία, η κοιλιακή ζώνη πολλαπλασιασμού και η περιοχή του πλευρικού μυός στο επίπεδο του οριζόντιου διαφράγματος. Καθώς η έκφρασή της αυξάνεται, στις παραπάνω περιοχές, παράλληλα μειώνεται στον εσωτερικό λευκό μυ. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, μετά το στάδιο των 25 ημερών, η έκφραση της MLC1 μειώνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα στην ηλικία των 51 ημερών (Εικ. 16ζ) η MLC1 να εντοπίζεται μόνο ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, στη περιοχή που ίσως βρίσκονται τα δορυφορικά κύτταρα.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε, απομονώθηκε από προνυμφικά στάδια του ιππόγλωσσου *Hippoglossus hippoglossus* L. Από την πολλαπλή ομοπαράθεση (Εικ.15) της αλληλουχίας των αμινοξέων παρατηρούμε ότι η MLC1 παρουσιάζει υψηλή συντήρηση, στα ψάρια σε όλο το μήκος της αλληλουχίας με εξαίρεση το N-τελικό άκρο. Το N-τελικό άκρο δεν είναι συντηρημένο για το λόγο ότι είναι η περιοχή η οποία εξειδικεύει κάθε MLC1 και τη διαφοροποιεί από την MLC3.

### Στάδιο 4 ημερών

Κατά την εκκόλαψη, ο μυς σε προνύμφες τσιπούρας αποτελείται από 21 σωμίτες και από μυομερή, τα οποία αποτελούνται ήδη από δύο διακριτά μέρη: ένα λεπτό και καλά αναπτυγμένο στρώμα από εσωτερικές λευκές μυϊκές ίνες και από ένα λεπτό επιφανειακό στρώμα ινών που επεκτείνονται προς το ραχιαίο και κοιλιακό άκρο (Patruno et al., 1998). Στο στάδιο των 4 ημερών (νεαρή προνύμφη) το μεγαλύτερο μέρος του λεκιθικού σάκου έχει απορροφηθεί, το στόμα είναι ανοιχτό, χωρίς να είναι σε θέση να προσλαμβάνει εξωτερική τροφή, και έχουν σχηματιστεί 22-23 σωμίτες.

Ο εσωτερικός λευκός μυς αυξάνεται με την υπερτροφία των υπαρχόντων ινών, αλλά και με την προσθήκη νέων ινών (Mascarello et al., 1994). Οι νέες ίνες προέρχονται από τις ζώνες αύξησης (ραχιαία και κοιλιακά) και από τα μυογενετικά κύτταρα που βρίσκονται στην πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού (Koumans & Akster, 1995).

### Στάδιο 8,10 ημερών

Στο στάδιο των 8-10 ημερών, η κεφαλική περιοχή είναι πιο αναπτυγμένη και ο πεπτικός σωλήνας και οι αδένες του αναπτύσσονται (Alessio & Gandolfi, 1975). Τα λέπια και τα πτερύγια έχουν αρχίσει να παίρνουν σχήμα. Επίσης, μπορεί να διακριθεί και το οριζόντιο διάφραγμα το οποίο διαχωρίζει του επαξόνιους από τους υπαξόνιους μύες. Η κατανομή των μυομερών διαφέρει σημαντικά από το στάδιο της εκκολαπτόμενης προνύμφης, η απλή δομή σχήματος V έχει χαθεί και έχει δώσει τη θέση της σε μια πιο πολύπλοκη δομή σχήματος W. Όσον αφορά στο προσανατολισμό των ινών, μόνο οι επιφανειακές ίνες των μυομερών είναι παράλληλες με τον επιμήκη άξονα του σώματος, ενώ οι βαθύτερες ίνες τείνουν να

παίρνουν μια τυπική πλάγια κατεύθυνση (Partuno et al., 1998). Οι εσωτερικές ίνες φαίνονται να είναι μεγαλύτερες και πιο ώριμες από τις επιφανειακές. Σ' αυτό το στάδιο, λαμβάνει χώρα μια 2<sup>η</sup> φάση ανάπτυξης (Matsuoka, 1984). Οι κόκκινες ίνες αναπτύσσονται, ενώ στο λευκό μυ μια νέα φάση υπερπλασίας ξεκινάει. Σ' αυτό το σημείο, εμφανίζονται οι βλαστικές ζώνες (ζώνες πολλαπλασιασμού), ραχιαία και κοιλιακά. Οι βλαστικές αυτές ζώνες είχαν προηγουμένως παρατηρηθεί στην τσιπούρα (Rowlerson et al., 1995), και βρέθηκαν επίσης στο λαβράκι *Dicentrarchus labrax* (Veggetti et al., 1990) και στη γλώσσα *Pleuronectes platessa* (Brooks & Johnston, 1993). Αυτή η φάση υπερπλασίας συμπίπτει με την αυξημένη έκφραση της MLC1, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.

#### Στάδιο 15, 20, 25 ημερών

Καθώς η προνύμφη αναπτύσσεται, (15, 20, 25 ημερών) η αύξηση του μεγέθους της οφείλεται κυρίως στην υπερπλαστική ανάπτυξη του εσωτερικού μύος (Partuno et al., 1998). Ο λευκός μυς είναι πιο ομογενής και συμπαγής από το προηγούμενο στάδιο και μπορεί να διακριθεί εύκολα από το κόκκινο μυ. Ο εσωτερικός μυς αποτελείται από πολυγωνικές, μεγάλης διαμέτρου μυϊκές ίνες που εμφανίζουν όλα τα χαρακτηριστικά των πλήρως διαφοροποιημένων μυϊκών ινών. Υπάρχουν όμως και ανώριμες μυϊκές ίνες που βρίσκονται σε διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης και εντοπίζονται στις βλαστικές ζώνες πολλαπλασιασμού.

Ο εσωτερικός λευκός μυς αυξάνεται με την υπερτροφία των υπαρχόντων ινών, αλλά και με την προσθήκη νέων ινών (Mascarello et al., 1994). Οι νέες ίνες προέρχονται από τις ζώνες αύξησης (ραχιαία και κοιλιακά) και από τα μυογενετικά κύτταρα που βρίσκονται στην πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού (Koumans & Akster, 1995). Η έκφραση της MLC1 περιορίζεται σε περιοχές που παρατηρείται μυογένεση. Τέτοιες περιοχές είναι: i) το επιφανειακό στρώμα του λευκού μύος, το οποίο αποτελεί την πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού, από την οποία προέρχονται οι νέες λευκές μυϊκές ίνες (Ramirez-Zarzosa et al., 1995) και ii) οι βλαστικές ζώνες, στα άκρα (ραχιαία και κοιλιακά) των μυομερών.

Όπως αναφέρθηκε, στα βαθύτερα στρώματα του λευκού μύος όπου βρίσκονται οι ώριμες μυϊκές ίνες δεν εντοπίστηκε η έκφραση της MLC1. Προφανώς, τη χρονική περίοδο 10,15 ημερών, τα υπερτροφικά φαινόμενα κυριαρχούν στα βαθύτερα στρώματα, οδηγώντας βαθμιαία στο σχηματισμό των ώριμων μυϊκών ινών και στην αντικατάσταση των εμβρυϊκών MLC ισομορφών. Το παραπάνω έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μορφολογικές και δομικές παρατηρήσεις σε προνύμφες τσιπούρας, οι οποίες αναφέρουν ότι ο εσωτερικός λευκός μυς αποτελείται από ορισμένα στρώματα διαφοροποιημένων ώριμων λευκών μυϊκών ινών (Partuno et al.,

1998). Αυτές οι αλλαγές στη δομή του μυός ίσως συνδέονται με αλλαγές στη φυσιολογία της προνύμφης που λαμβάνουν χώρα σ' αυτό το αναπτυξιακό στάδιο, όπως είναι η έναρξη ενεργής πρόσληψης τροφής (περίπου τη 10<sup>η</sup> ημέρα), η ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος και των αδένων του και η αύξηση της ενεργητικής κολύμβησης (Patruno et al., 1998). Συγχρόνως, σ' αυτά τα προνυμφικά στάδια, λαμβάνει χώρα μια φάση ανάπτυξης των οστών και των χόνδρων. Συγκεκριμένα, σχηματίζονται και οστεοποιούνται τα περισσότερα πτερύγια, οδηγώντας στην μετάβαση της προνύμφης σε ιχθύδιο (Faustino & Power, 1999). Δηλαδή, η φάση της υπερτροφίας των βαθύτερων λευκών μυϊκών ινών συμπίπτει με οστεολογικές και φυσιολογικές αλλαγές στη ζωή της προνύμφης. Αυτό ίσως οφείλεται στις ανάγκες της προνύμφης για την περαιτέρω ανάπτυξή της (ικανή για ενεργό κολύμπι), στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Μπορεί κανείς να υποστηρίξει ότι, η πρόσληψη τροφής, η οποία είναι ανάλογη με την ικανότητα της προνύμφης να κολυμπάει ελεύθερα, παρέχει την ενέργεια για τη στήριξη της υπερτροφίας.

#### Στάδιο 34. 51 ημερών

Η παρουσία των ζωνών πολλαπλασιασμού ραχιαία και κοιλιακά, καθώς και η έκφραση της MLC1 σ' αυτές, διήρκησε μέχρι και τη 34<sup>η</sup> ημέρα. Στην ηλικία των 34 ημερών, προ-μεταμορφωτικό στάδιο (5,5-8mm μήκος, 25 σωματίτες) (Patruno et al., 1998) το νευρο-μυϊκο-σκελετικό σύστημα έχει πλήρως αναπτυχθεί (η σωματογένεση έχει ήδη ολοκληρωθεί από τη 30<sup>η</sup> ημέρα). Ο πλευρικός μυς σχηματίζεται από δύο άνω και δύο κάτω μάζες, συμμετρικά τοποθετημένες γύρω από τη σπονδυλική στήλη και το νωτιαίο μυελό. Η κατάταξη των μυομερών (ο τύπος του σχήματος W) έχει ήδη ολοκληρωθεί, και ο προσανατολισμός των ινών ακολουθεί το κοινό τύπο των τελεόστεων ιχθύων, δηλαδή οι επιφανειακές ίνες είναι σε παράλληλη θέση με τον επιμήκη άξονα του σώματος ενώ οι βαθύτερες ίνες σχηματίζουν γωνία περίπου 35° (Alexander 1992). Στη συγκεκριμένη φάση ανάπτυξης του ιχθυδίου, έχουμε την έναρξη της οστεοπλασίας, αφού έχει ήδη ολοκληρωθεί η χονδρογένεση της σπονδυλικής στήλης (Faustino & Power, 1998). Όσον αφορά στη φυσιολογία του ιχθυδίου, βρισκόμαστε στο στάδιο όπου έχει ολοκληρωθεί η ανάπτυξη της ουράς (Faustino & Power, 1999), και έτσι το ιχθύδιο μπορεί πια να κολυμπά ενεργά και να κατευθύνεται σε μια συνεχή αναζήτηση τροφής. Στο παραπάνω ίσως να στηρίζεται η αύξηση της μυϊκής μάζας, αλλά επίσης και να υποστηρίζει την υψηλή υπερτροφική δραστηριότητα που παρατηρείται στα εσωτερικά στρώματα του λευκού μυός.

Στάδιο 80 ημερών

Η ηλικία των 80 ημερών αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό μεταμορφωτικό στάδιο. Το ιχθύδιο (περίπου 14-20mm μήκος) έχει χάσει πια τα τυπικά χαρακτηριστικά της προνύμφης. Με την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης, ο λευκός μυς αποτελούνταν μόνο από ίνες μεγάλης διαμέτρου, στις οποίες δεν παρατηρήθηκε έκφραση της MLC1. Η έκφραση της MLC1, πια είχε περιοριστεί στα κύτταρα που βρίσκονται στο χώρο ανάμεσα στις μυϊκές ίνες, πιθανότητα στα δορυφορικά κύτταρα.

Συμπερασματικά, η έκφραση της MLC1 περιορίζεται στο λευκό μυ. Το πρότυπο της έκφρασης της MLC1 ακολούθησε την ανάπτυξη του λευκού μυός, η οποία χαρακτηρίζεται από τις βλαστικές ζώνες ανάπτυξης και από τις νεοσχηματιζόμενες λευκές μυϊκές ίνες, στην πλευρική ζώνη πολλαπλασιασμού. Προηγούμενη μελέτη, έχει αποδείξει ότι η υπερπλασία σε προνύμφη τσιπούρας, όσο αναφορά τις λευκές μυϊκές ίνες, λαμβάνει χώρα στις άκρες των μυομερών ακριβώς κάτω από το επιφανειακό στρώμα (Rowlerson et al., 1995). Η χωρική έκφραση της MLC1 χαρακτήρισε αυτές τις ζώνες υπερπλαστικής δραστηριότητας.

Η ανάπτυξη του μυός των ιχθυοειδών διαφέρει σημαντικά από τα άλλα σπονδυλωτά. Στα θηλαστικά, για παράδειγμα, η ανάπτυξη του μυός μέσω της υπερπλασίας, σαν μια πηγή νέων μυϊκών ινών, συνήθως σταματά μετά τη γέννηση (Stingle 1972; Schultz 1974; Stickland 1983), ενώ στα περισσότερα είδη τελεόστεων, η υπερπλασία δεν είναι μόνο σημαντική κατά προνυμφική ζωή, αλλά και στη μετέπειτα ζωή, και έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, τη διατροφή και την άσκηση (Carpene & Veggetti 1981; Stickland 1983; Rowlerson et al., 1985). Προηγούμενες μελέτες πάνω στην τσιπούρα, επικεντρώθηκαν στο ζήτημα κατά πόσο η κάθε μία διαδικασία ανάπτυξης του μυός (υπερπλασία και υπερτροφία) συνεισφέρει στην ανάπτυξη του πλευρικού μυός. Από την άλλη πλευρά, η λεπτομερής γνώση της ανάπτυξης του μυός σε μεσογειακά είδη με εμπορικό ενδιαφέρον, όπως η τσιπούρα, μπορεί να έχει και πρακτική αξία.

Ο αυξανόμενος ρυθμός σωματικής ανάπτυξης έχει συσχετιστεί με την αυξανόμενη συνεισφορά της υπερπλασίας του μυός σε προνύμφες και ιχθύδια, σε αρκετά είδη τελεόστεων (Weatherley & Gill, 1987; Akster et al., 1995; Alami-Durante et al., 1997; Johnston et al., 1998). Παράλληλα, έχει αναφερθεί ότι, η υπερτροφία επηρεάζεται από το ρυθμό σωματικής ανάπτυξης σε ορισμένα είδη ψαριών (Hanel et al., 1996; Alami-Durante et al., 1997; Johnston et al., 1998). Η ανάπτυξη των μυϊκών ινών παρουσιάζει μια ειδο-εξειδίκευση, είναι γενετικά προγραμματισμένη και

ρυθμίζεται από ένα σύνολο μηχανισμών σε μοριακό επίπεδο (Weatherley & Grill, 1987; Weatherley, 1990; Olson, 1992; Johnston, 1994). Πάνω στα παραπάνω βασίζεται η γενετική, στοχεύοντας να παράγει διαγονιδιακά ψάρια με κύριο χαρακτηριστικό τους, τη γρήγορη ανάπτυξη. Από την άλλη πλευρά, οι διαφορές στην ανάπτυξη των μυϊκών ινών, δημιουργούν και άλλες ενδιαφέρουσες προοπτικές, όπως είναι η σχέση ανάμεσα στην ανάπτυξη και στη λειτουργική απόδοση, π.χ. οι ιδιότητες των διαφορετικών μυϊκών ινών (Goldsprink, 1980). Ειδικότερα, η συσχέτιση ανάμεσα στην ανάπτυξη του μυός και στην αλλαγή της κολυμβητική συμπεριφοράς, στο επίπεδο της προνύμφης, παρουσιάζει ενδιαφέρον διότι, σχετίζεται με οικονομικοφυσιολογικές προοπτικές καθώς επίσης, μπορεί να έχει και πρακτικό ενδιαφέρον στις υδατοκαλλιέργειες.

Η έκφραση της MLC1 χαρακτηρίζει την υπερπλαστική δραστηριότητα του λευκού μυός. Μετά το στάδιο της προνύμφης, η ανάπτυξη του πλευρικού μυός στην τσιπούρα, εξελίσσεται με την υπερτροφία και την υπερπλασία, όπου η υπερπλασία εμπλέκει κυρίως το λευκό μυ. Η μελέτη της Rowlerston και των συνεργατών της (1995) απέδειξε ότι, σ' αυτήν την ηλικία νέες και πολύ μικρές ίνες σχηματίζονται μέσα στο λευκό μυ, οι οποίες δεν περιορίζονται σε ζώνες όπως στα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης. Έχει βρεθεί ότι, τα δορυφορικά κύτταρα είναι ορατά δίπλα σε πολύ μικρές μυϊκές ίνες (Patruno et al., 1998). Θα μπορούσαμε, λοιπόν να ισχυριστούμε, ότι η έκφραση της MLC1 που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις ώριμες μυϊκές ίνες, συμπίπτει με τις περιοχές που βρίσκονται τα δορυφορικά κύτταρα. Ο τύπος έκφρασης των MLCs στα μυογενετικά κύτταρα και στις νεοσχηματιζόμενες λευκές ίνες πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω, έτσι ώστε να καθοριστούν επακριβώς οι κυτταρικοί πληθυσμοί στους οποίους εκφράζονται οι MLCs, οι φάσεις της μυογένεσης που τους χαρακτηρίζει, καθώς επίσης και η ρύθμιση της έκφρασής τους από μυογενετικούς παράγοντες.

## 5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

| ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟ                 | ΟΝΟΜΑΣΙΑ   | ΕΤΑΙΡΙΑ | ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΑΤΑΛΟΓΟΥ |
|-------------------------------|--|---------|-------------------|
| Acetic acid                   |  | Sigma   | A8976             |
| Acetone                       |  | Merck   | 100142511         |
| AcK                           | Potassium acetate  | Sigma   | P-1190            |
| AcNa                          | Sodium acetate   | Sigma   | S-2889            |
| Agar                          |  | Sigma   | A-5054            |
| Agarose                       |  | Sigma   | A9539             |
| AMP                           | Ampicillin   | Sigma   | A9393             |
| Anti-Digoxigenin-AP Fragments |  | Roche   | 1093274           |
| APES                          | Aminopropyltriethoxysilane   | Sigma   | A3648             |
| BCIP                          | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4toluidine salt  | Roche   | 1383221           |
| BSA                           | Bovine Serum Albumin   | Promega | R3961             |
| Boric acid                    |  | Sigma   | B7901             |
| Buffer D                      |  | Promega | R9921             |
| Chaps                         | 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamminio]-1-propanesulfonate (C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S) | Sigma   | C3023             |
| DIG mix                       | Digoxigenin RNA labeling mix   | Roche   | 1277073           |
| DPX                           |  | Fluka   | 52897             |
| DTT                           | Threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol  | Promega | P1171             |
| EDTA                          | Ethylenediaminetetraacetic acid  | USB     | US15701           |
| Eosin Y                       | C <sub>20</sub> H <sub>6</sub> Br <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | Merck   | 15935             |
| Ethanol                       | C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH   | Merck   | 1009832511        |
| Ethidium bromide              |  | Sigma   | E-1510            |
| Formamide                     | CH <sub>3</sub> NO   | Sigma   | F-7508            |
| Glacial acetic acid           |  | Merck   | 100063            |
| Glycerol gelatin              |  | Sigma   | GG-1              |
| Hematoxylin                   |  | Sigma   | HHS-32            |
| heparin                       |  | Sigma   | H-6279            |
| HCl                           |  | Trisma  | T-7149            |
| KCl                           |  | Sigma   | P-8041            |
| K-Clear                       |  | Kaltek  | 2278              |
| LiCl                          |  | Sigma   | L-4408            |
| Malic acid                    |  | Sigma   | M-0375            |
| MgCl <sub>2</sub>             |  | Sigma   | M-9272            |
| NBT                           | Nitro Blue Tetrazolium Chloride  | Roche   | 1383213           |
| Nco I                         |  | Promega | R-6513            |
| NTP mix                       | rATP 10mM  | Promega | P-1132            |
|                               | rCTP 10mM  | Promega | P-1142            |
|                               | rGTP 10mM  | Promega | P-1152            |
|                               | rUTP 10mM  | Promega | P-1162            |
| NaCl                          | Sodium Chloride  | Sigma   | S-3014            |

|                         |  |                      |            |
|-------------------------|--|----------------------|------------|
| NaOH                    |  | Riedel-de Haen       | 1823       |
| PFA                     | Paraformaldehyde   | Agar Scientific LTD  | R-1018     |
| pGEM-T Easy system I    |  | Promega              | A-1360     |
| RNA guard               |  | Amersham Biosciences | 27-0815-01 |
| RNA polimerase SP6      |  | Promega              | P-1085     |
| RN <sub>ASE</sub> A     |  | Roche                | 109142     |
| SDS                     | Sodium Dodecul sulfate [CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> SO <sub>4</sub> Na] | USB                  | U575819    |
| Sheep serum             |  | Sigma                | S-2382     |
| Transcription buffer 5x |  | Promega              | P-1181     |
| T-RNA yeast             |  | Boehringer-Mannheim  | 109223     |
| TRIS                    | Hydroxymethyl-aminonethal  | Merck                | 1083820500 |
| Tween 20                | Polyoxyethylensorbitanmonolauratzyr  | Merck                |            |
| Xylene                  |  | Pronalab             | 1332       |

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### LB Agar

Για την παρασκευή 1l:

10g NaCl

5g εκχύλισμα ζύμης

10g tryptone

20g agar

Όλα τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 950ml αποστειρωμένου νερού και το pH ρυθμίζεται στο 7,0 με προσθήκη NaOH 5N. Προσθήκη αποστειρωμένου νερού, μέχρι τελικού όγκου 1l. Αποστείρωση.

### LB μέσο ανάπτυξης

Για 1l:

10g NaCl

5g yeast extract

10g tryptone

Όλα τα παραπάνω συστατικά διαλύονται σε 950ml απεσταγμένου νερού και το pH ρυθμίζεται στους 7,0 βαθμούς με προσθήκη NaOH 5N. Συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 1l. Αποστείρωση.

### GTE

Για 100ml:

1,125g glucose

2,5ml Tris 1M pH 8,0

2ml EDTA 0,5M pH 8,0

Συμπλήρωση με δισαπεσταγμένο νερό και αποστείρωση.

### Οξικό κάλιο (AcK)

Για 100ml:

60ml AcK 5M

11,5ml glacial acetic acid

Το pH πρέπει να είναι ανάμεσα στο 4,8-5,2. Εάν όχι, ρυθμίζεται με προσθήκη glacial acetic acid.

### Οξικό νάτριο (AcNa) 3M pH 5,2

Για 100ml:

24,6g AcNa

Πρόσθεση 80ml απεσταγμένου νερού. Ρύθμιση του pH στο 5,2 με HCl 37%, συμπλήρωση με απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 100ml. Αποστείρωση.

### 10X Tris- acetic borate- EDTA (TBE)

Για 1000ml:

108g Tris Base

55g boric acid

40ml EDTA, 0,5 M pH 8,0

Προσθήκη δισαπεσταγμένου νερού έως ο όγκος να γίνει 1l. Αποστείρωση.

### 1X Tris- acetic borate- EDTA (TBE)

Για 1l:

100ml 10x TBE

900ml απεσταγμένο νερού.

### Gel TBE/ αγαρόζη 1%

Για 25ml:

25ml TBE 1x

0,25g agarose (αγαρόζη)

Θέρμανση έως να διαλυθεί τελείως η αγαρόζη. Αφήνεται να κρυώσει και ακολουθεί προσθήκη 25μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου.

### "Loading buffer"

Για 100ml:

40g σακχαρόζης

0,25% μπλέ της βρωμοφαινόλης

Προσθήκη απεσταγμένου νερού τελικού όγκου 100ml. Διατήρηση στους 4° C.

### EDTA, 0,2M

Για 1l:

74,44g EDTA

Προσθέτονται σε 800ml δισαπεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 8,0 με προσθήκη NaOH. Προσθήκη απεσταγμένου μέχρι τελικού όγκου 1l. Αποστείρωση.

### EDTA, 0,5M

Για ένα 1l:

186,12g EDTA.Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

Προσθέτονται σε 600ml απεσταγμένου νερού. Το pH ρυθμίζεται στο 8,0 με προσθήκη NaOH. Ρύθμιση του τελικού όγκου στο 1l.

### 10X PBS

Για τη παρασκευή 1l:

75,97g NaCl

12,46g N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

4,80g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

Τα παραπάνω διαλύονται σε 800ml milliQ νερό.

Το pH ρυθμίζεται στους 7,0 βαθμούς. Συμπλήρωση με milliQ νερό μέχρι τελικού όγκου 1l. Αποστείρωση.

### PTW (1X)

Διάλυμα 10xPBS σε DEPC νερό. Προσθήκη 0,1% Tween 20

### Διάλυμα υβριδοποίησης (hybridization solution, "Hyd-Mix")

Για 40ml:

20 ml formamide

8ml 20xSSC

800μl 50x Denhardt's

800μl T-RNA yeast (50 mg/ml)

800μl 2% CHAPS

400μl Heparin (10 mg/mL)

Το pH ρυθμίζεται στους 6,0 βαθμούς.

Συμπλήρωση του όγκου έως 40ml με DEPC νερό.

### Διαλυμα του ριβοανιχνευτή

Σε κάθε 100μl HM προσθέτονται 2μl του ριβοανιχνευτή.

### Διάλυμα αντισώματος

Σε 600μl BS 1%, 1μl αντισώματος.

### Αντιδραστήριο Denhardt's

Stock 50x:

5g ficoll

5g polyvinylpyrrolidone

5g BSA

Απεσταγμένο νερό έως ο όγκος να γίνει 500ml.

Φιλτράρισμα και αποθήκευση στους -20° C.

### Διάλυμα 20XSSC

Για 1l:

175,3g NaCl

88,2g sodium citrate. Διαλύονται σε 800ml MilliQ νερό.

Το pH ρυθμίζεται στο 7,0. Πρόσθεση MilliQ νερό μέχρι τελικού όγκου 1l.

Αποστείρωση.

### Διάλυμα 2X SSC

Για 1l:

100ml 20X SSC

900ml milliQ νερό

### Διάλυμα 2X SSC/ 0,12% Chaps

Για 50ml:

3ml Chaps

47ml 2X SSC

### Blocking solution 2% (BS 2%)

1g of blocking reagent ζεσταίνεται και διαλύεται σε 50 ml ρυθμιστικού διαλύματος malic acid (μαλικό οξύ) στους 50-60°C, μέχρι να διαλυθεί τελείως.

### Malic acid buffer (Ρυθμιστικό διάλυμα μαλικού οξέος)

Για 500ml:

5,805g malic acid

4,3875g NaCl

Διαλύονται σε 400ml MilliQ νερό.

Το pH ρυθμίζεται στο 7,5.

Προσθήκη MilliQ νερού μέχρι τελικού όγκου 500ml

Αυτόκαυστο. Αφήνεται να κρυώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρόσθεση 500 μl Tween-20 .

### Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 7,5

Για 20ml:

2,4228g Tris

15ml illex νερό.

Ρύθμιση του pH στο 7,5 με προσθήκη HCl. Συμπλήρωση με νερό illex μέχρι τελικού όγκου 20ml.

### Διάλυμα Tris-HCl 1M pH 9,5

Για 20ml:

2,4228g Tris

15ml illex νερό.

Ρύθμιση του pH στο 9,5 με προσθήκη HCl. Συμπλήρωση με illex νερό μέχρι τελικού όγκου 20ml.

### Διάλυμα Tris-NaCl

5 ml Tris-HCl 1M pH 7,5

1,5ml NaCl 5M

Ο όγκος συμπληρώνεται έως 50 ml με illex νερό.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος (DB)**

5ml Tris-HCl 1M pH 9,5

1ml NaCl 5M

2,5 ml MgCl<sub>2</sub> 1M

Ο όγκος συμπληρώνεται έως 50 ml με illex νερό.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης χρώματος με NBT/BCIP**

Για 10ml:

45μl NBT

35μl BCIP

10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανάπτυξης χρώματος.

Χρησιμοποιείται φρέσκο και διατηρείται στο σκοτάδι.

#### **Διάλυμα 4% PFA solution**

Διάλυση φορμαλδεΐδης 37% με διάλυμα 1XPBS.

#### **Διάλυμα αιματοξυλίνης**

Για 500ml:

2,5g αιματοξυλίνης

50g potassium aluminium sulfate.12H<sub>2</sub>O

1,25g red HgO

20ml glacial acetic acid

25ml καθαρής αιθανόλης.

1. Η αιματοξυλίνη διαλύεται σε 25ml καθαρής αιθανόλης

2. Τα 50g potassium aluminium sulfate διαλύονται σε 500ml προ-θερμασμένου νερού
3. Ανάμιξη των δύο παραπάνω διαλυμάτων (1+2), θέρμανση του διαλύματος, αφήνοντας το να βράσει για 4min.
4. Απομάκρυνση του από τη φωτιά και πρόσθεση του HgO.
5. Το διάλυμα ξαναθερμαίνεται και αφήνεται να βράσει για 1min, μέχρι να πάρει ένα βαθύ μοβ χρώμα
6. Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει γρήγορα, κάτω από τρεχούμενο νερό
7. Πρόσθεση 20 ml glacial acetic acid
8. Φιλτράρισμα
9. Ακριβώς πριν τη χρήση, το διάλυμα διαλύεται σε αναλογία 50:50 με αιθανόλη, και τέλος ξαναφιλτράρεται. (Αποθήκευση σε μέρος όπου η αιθανόλη να μην μπορεί να εξατμιστεί).

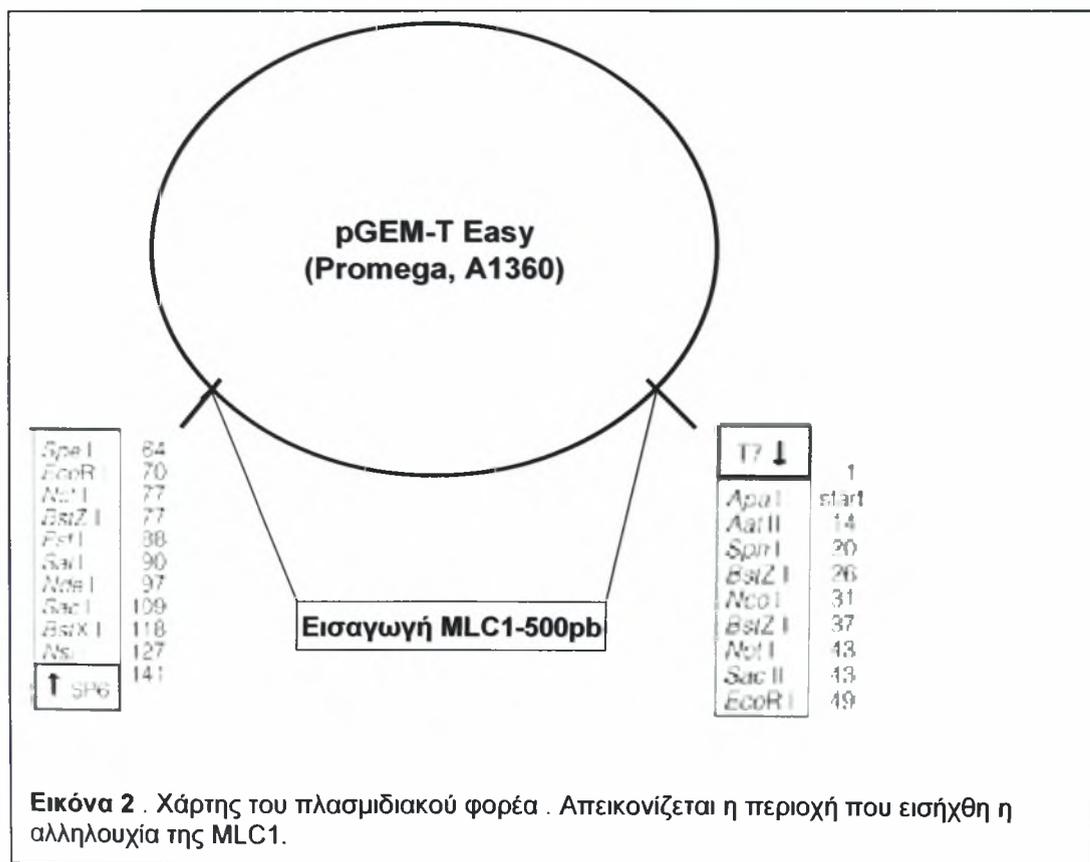
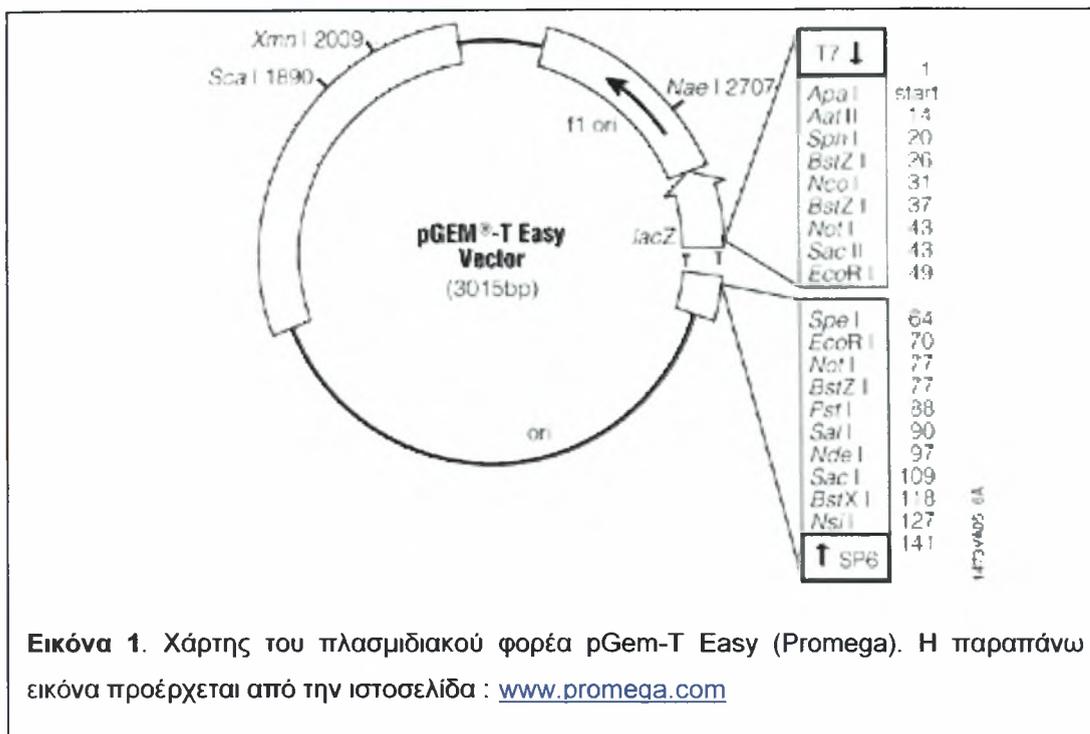
#### Διάλυμα εωσίνης (Eosin Y)

Για 100ml:

1g eosin Y

100ml απεσταγμένο νερό.

**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3**



## ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Akster H.A., Verreth J.A.J., Spierts I.L.Y., Bebner T., Schmidbauer M. & Osse J.M.W., (1995). Muscle growth and swimming in larvae of *Clarias gariepinus* (Burchell). *ICES Marine Science Symp.* 201: 45-50.
- Alami-Durante H., Fauconneau B., Rouel M., Escaffre A.M. & Bergot P., (1997). Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. *Journal of Fish Biology*, 50: 1285-1302.
- Alesio G. & Gandolfi G., (1975). Riproduzione artificiale di Orata, *Sparus aurata* (L.) (Osteichthyes, Sparidae). IV Sviluppo embrionale e postnatale. Istituto Lombardo Accademia di Science e Lettere. *Memorie Sc Mat Fis Nat.* , 26:95-132.
- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P. (2000) Κυτταροσκελετός. Βασικές αρχές κυτταρικής Βιολογίας. Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης.
- Alexander RMcN., (1992). Exploring biomechanics. Animals in motion. In: Freeman WH et al. (eds) Scientific American Library, A Division of HPHLP New York Oxford.
- Bischoff R., (1994). The satellite cell and muscle regeneration. In: AG Engel, C Franzini-Armostrong (Eds.), *Myology* (pp 97-118). New York: McGraw-Hill.
- Blagden CS, Currie PD, Ingham PW, Hughes SM. (1997). Notochord induction of zebrafish slow muscle mediated by Sonic hedgehog. *Genes and Development.* 11: 2163-2175.
- Bone Q., Marshall NB., Blaxter JHS, (1995). Locomotion. In: Biology of fishes, 2<sup>nd</sup> edition, Chapman and Hall London Weinheim New York.
- Brooks S. & Johnston I.A., (1993). Influence of development and rearing temperature on the distribution, ultrastructure and myosin sub-unit composition of

- myotomal muscle-fibre types in the plaice *Pleuronectes platessa*. *Marine Biology*, 117: 501–513.
- Carpene E. & Veggetti A., (1981). Increase in muscle fibers in the lateralis muscle (white portion of Mugilidae) (Pisces. Teleostei). *Experientia* 37:191-193.
- Christ B. & Ordahl CP., (1995). Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology* 191:381-396.
- Cossu G., Tajbakhsh S. & Buckingham M., (1996). How is myogenesis initiated in the embryo. *Trends in Genetics* 12 (6): 218-223.
- Dalla Libera L., Carpene E., Theibert J., Collins J.H., (1991). Fish myosin alkali light chains originate from two different genes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 12: 366-371.
- Devoto SH., Melancon E., Eisen JS., Westerfield M., (1996). Identification of separate slow and fast muscle precursor cells *in vivo*, prior to somite formation. *Development* 122: 3371-3380.
- Faustino M. & Power D.M., (1998). Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of fish biology*, 52: 11-22.
- Faustino M. & Power D.M., (1999). Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of fish biology*, 54: 1094-1110.
- Firulli A. & Olson E., (1997). Molecular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. *Trends In Genetics* 13 (9):364-369.
- Frank G. & Weeds A.G, (1974). The amino-acid sequences of the alkali light chains of rabbit skeletal-muscle myosin. *European Journal of Biochemistry* 44:317-334.
- Gauthier G.F., Lowey S., Benfield P.A., Hobbs A.W., (1982). Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Cell Biology* 92: 472-484.

- Gilbert S., (2003). Paraxial and intermediate mesoderm. In: *Developmental biology*. 7<sup>th</sup> edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Goldspink G., (1980). Growth of muscle. In: Goldspink DF (ed) *Development and specialization of skeletal muscle*. Cambridge University Press, Cambridge London New York, pp 19–35.
- Hanel R., Karjalainen J. & Wieser W., (1996). Growth of swimming muscles and its metabolic cost in larvae of whitefish at different temperatures. *Journal of Fish Biology* 48:937-951.
- Hirayama Y., Kanoh S., Nakaya M. & Watabe S., (1997). The two essential light chains of carp fast skeletal myosin, LC1 and LC3, are encoded by distinct genes and change their molar ratio following temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology* 200: 693-701.
- Hirayama Y., Kobiyama A., Ochiai Y. & Watabe S., (1998). Two types of mRNA encoding myosin regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 3' non-coding regions and expression patterns following temperature acclimation. *Journal of Experimental Biology* 201: 2815-2820.
- Hill J.A., Kiessling A., Devlin R.H., (2000). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences* 57: 939-950.
- Jobling M., (1995). Body form swimming and movement through the water. In: *Environmental Biology of fishes*. Chapman and Hall. 1<sup>st</sup> edition.
- Johnston I.A., (1994). Development and plasticity in fish muscle with growth. *Basic Applications of Myology*. 4: 353-364,
- Johnston I.A, Cole N.J., Abercromby M. & Vieira V.L.A., (1998). Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *Journal of Experimental Biology* 201: 623-646.

- Izumo S., Nadal-Ginard B. & Mahdani V., (1986). All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231:597-600.
- Koumans J.T.M. & Akster H.A., (1995). Myogenic cells in development and growth of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 110A(1): 3-20.
- Lowey S., (1994). The structure of vertebrate muscle myosin. In: *Myology* (ed. A.G. Engel and C. Franzini-Armstrong), pp 485-505. New York : McGraw-Hill Book Co.
- Lowey S. & Trybus K., (1995). Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains. *Biophysical Journal*, 68:120-127.
- Mascarello F., Rowlerson A. & Veggetti A., (1994). Hyperplasia of lateral muscle during normal growth of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 15:189.
- Mascarello F., Rowleson A., Radaelli G., Scapolo PA, Veggetti A., (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): I. Myosin expression and organization of fibres in lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16:213-222.
- Matsuda G., Maita T., Kato Y., Chen J.I., Umegane T., (1981a). Amino acid sequences of the cardiac L-2A, L-2B and gizzard 17000-Mr light chains of chicken muscle myosin. *Federation of European Biochemical Societies Lett* 135:232–236.
- Matsuda G., Maita T., Umegane Y. (1981b). The primary structure of L-1 light chain of chicken fast skeletal muscle myosin and its genetic implication. *Federation of European Biochemical Societies Lett.*, 126: 111–113.
- Matsuoka M. & Iwai T., (1984). Development of the myotomal musculature in the red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50:29-35.
- Morgan J. & Partridge T., (2003). Muscle satellite cells. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:1151-1156.

- Moutou K., Canario A., Mamuris Z. & Power D., (2001). Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *The Journal of Experimental Biology* 204:3009-318.
- Nabeshima Y., Fujil-Kuriyama Y., Muramats M., Ogata K., (1984). Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene. *Nature* 308: 333–338.
- Olson EN., (1992). Interplay between proliferation and differentiation with the myogenic lineage. *Developmental Biology* 154:261-272
- Ozernyuk N., Nareiko V.G., Smirnova Y.A., Zinoveva R.D., (2004). Pattern of Skeletal Muscle Differentiation in Fish: Molecular Biological Approaches. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90B: 347-353.
- Patruno M., Radaelli F., Mascarello M.D., Candia Carnevali, (1998). Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomy and Embryology* 198:487-504
- Periasamy M., Sterhler E., Garfinker L., Gubits R., Ruiz-Opazo N., Nadal-Ginard B., (1984). Fast skeletal muscle myosin light chain 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biological Chemistry* 259:13595-13604.
- Ramírez-Zarzosa G, Gil F., Latorre R., Ortega A., García-Alcaráz A., Abellán E., Vázquez JM., López-Albors O., Arencibia A. & Moreno F., (1995). The larval development of lateral musculature in gilthead sea bream *Sparus aurata* and sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Cell Tissue Research* 280:217-224.
- Robert B., Daubas P., Akimneko M.A., Cohen A., Garner I., Guenet J.L. & Buckingham M., (1984). A single locus in the mouse encodes both myosin light chains 1 and 3, a second locus corresponds to a related pseudogene. *Cell* 39:129–140.

- Rowlerson A., Scapolo P., Mascarello F., Carpena E. & Veggeti A., (1985). Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 6:601-640.
- Rowlerson A., Radaelli G., Mascarello F., Veggeti A., (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16:223-236.
- Rowlerson A. & Veggeti A., (1999). Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Fish Physiology. Farrell T. & Randall D.J., eds., in press. San Diego: Academic Press.
- Scapolo P.A., Veggeti A., Mascarello F. & Romanello M.G., (1988). Developmental transitions of myosin isomorphs and organization of the lateral muscle in the teleost *Dicentrarchus Labrax* (L.). *Anatomy and embryology*, 178: 287-295.
- Schultz E., (1974). A quantitative study of the satellite cell population in postnatal mouse lubrical muscle. *Anatomical Record*. 180:589-596.
- Seale P. & Rudnicki M.A. (2000) A new look at the origin, function and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Developmental Biology*, 218: 115-124.
- Stickland N.C., (1983). Growth and development of the muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Anatomy* 137:323-333.
- Stickney H., Baressi M. & Devoto S., (2000). Somite Development in Zebrafish. *Developmental dynamics* 219:287-303.
- Stingle J., (1972). Contribution to study of the postnatal development of skeletal muscle. *Folia Morphologica Praha* 20:121-123.
- Stoiber W. & Sanger A.M., (1996). An electron microscopic investigation into the possible source of new muscle fibres in teleost fish. *Anatomy and embryology* 194:569-579.

- Stroiber W., Haslett J.R. & Sanger A.M., (1999). Myogenic patterns in teleosts: what does the present evidence really suggest? *Journal of fish biology*, 55(A):84-99.
- Stryer L., (1997). Συστολή των μυών και κυτταρική κίνηση. Σε: Βιοχημεία II. 2<sup>η</sup> έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Σμοκοβίτη Αθ., (1999). Μυϊκό Σύστημα. Σε: Φυσιολογία, Εκδοτικός οίκος ΑΔΕΛΦΩΝ Κυριακίδη.
- Tajbakhsh S., (2003). Stem cells to tissue: molecular, cellular and anatomical heterogeneity in skeletal muscle. *Current Opinion in Genetics and Development*, 13:413-422.
- Theze N., Hardy S., Wilson R., Allo M.-R., Mohum T. & Thiebaud P., (1995). *Developmental Biology*, 171:351-362.
- Thompson JD., Higgins DJ. & Gibson TJ., (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680
- Timson DJ. & Trayer IP., (1998). The N-Terminus of A1-type myosin essential light chain binds actin and modulates myosin motor function. *European Journal of Biochemistry* 255:654-662.
- Van Raamsdonk W., Pool C.W. & te Kronnie G., (1978). Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*, the zebrafish. *Anatomy and Embryology* 153:137-155.
- Van Raamsdonk W., van't Veer L., Veeken K., Heyting C. & Ppool C.W., (1982). Differentiation of muscle fibre types in the teleost *Brachydanio rerio*, the zebrafish. Posthatching development. *Anatomy and Embryology* 164:51-62.
- Vander M.D., Sheramn Ph.D, Luciano Ph.D., Τσακόπουλος Μ., (2001). Μυς. Σε: Φυσιολογία του ανθρώπου I. 8<sup>η</sup> έκδοση. Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.

- Veggetti A., Mascarello F., Scapolo P.A. & Rowlerson A., (1990). Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle in *Dicentrarchus labrax* (L.). An ultrastructural and morphometric study. *Anatomy and Embryology* 182:1–10.
- Weatherley A.H., (1990). Approaches to understanding fish growth. *Transactions of American Fisheries Society* 119:662–672
- Weatherley A.H. & Gill H.S., (1987). *The biology of fish growth*. Academic Press, London, pp:443.
- Weeds A.G. & Lowey S., (1971). Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *Journal of Molecular Biology* 61:701–725.
- Whalen R.G., Sell S.M., Butler-Browne G.S., Schwartz K., Bouveret P. & Pinset-Harstrom, (1981). Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 292:805-809.
- Yamano K., Takano-Ohmuro H., Obinata T. & Inui Y., (1994). Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chains during flounder metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 93:321-326.