

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ελένη Ν. Ψόχιου

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΕΥΡΥΑΛΟΥ
ΤΕΛΕΟΣΤΕΟΥ *Sparus aurata* : ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Ελένη Ν. Ψόχιου

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΕΥΡΥΑΛΟΥ
ΤΕΛΕΟΣΤΕΟΥ *Sparus aurata* : ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ
ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

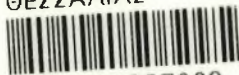
2006



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

Αριθ. Εισ.: 5803/1
Ημερ. Εισ.: 16-06-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
597
ΨΟΧ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087220

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ
ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΕΥΡΥΑΛΟΥ ΤΕΛΕΟΣΤΕΟΥ *Sparus aurata* :
ΑΛΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ
ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΘΗΚΕ ΑΠΟ ΤΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ
ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΕΠΕΑΕΚ ΙΙ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

A. ΜΟΥΤΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σ. ΠΑΠΟΥΤΣΟΓΛΟΥ

Καθηγητής Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας
Τμήμα Ζωικής Παραγωγής, Γ.Π.Α.

Z. ΣΚΟΥΡΑΣ

Καθηγητής Γενετικής
Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

K. ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΙΔΗΣ

Καθηγητής Γενετικής & Γενετικής Ανθρώπου
Τμήμα Βιολογίας, Α.Π.Θ.

Z. ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ

Αναπληρωτής Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

A. ΜΟΥΤΟΥ

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

K. ΣΤΑΘΟΠΟΥΛΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας με έμφαση στη μεταβολική ρύθμιση
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας Π.Θ.

Ελένη Ν. Ψόχτου

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΚΥΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΕΥΡΥΑΛΟΥ ΤΕΛΕΟΣΤΕΟΥ *Sparus*
aurata: ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

Ελένη Ν. Ψόχτου

2006

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ
ΚΥΡΙΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΣΕΡΙΝΗΣ ΤΟΥ ΕΥΡΥΑΛΟΥ ΤΕΛΕΟΣΤΕΟΥ *Sparus*
aurata: ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ
ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: IX

Συνολικός αριθμός σελίδων: 141

Αριθμός πινάκων: 14

Αριθμός σχημάτων: 35

Αριθμός παραρτημάτων: 2

Αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 180

ΣΥΝΟΨΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής, οι πλήρεις αλληλουχίες δύο κλώνων, που κωδικοποιούν για το χυμοθρυψινογόνο I (CHTRI: 1022bp, 261aa) και για το χυμοθρυψινογόνο II (CHTRII: 909bp, 277aa), καθώς και ενός κλώνου, που κωδικοποιεί για το θρυψινογόνο II (TRPII: 848bp, 241aa), απομονώθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη ήπατος τσιπούρας (*Sparus aurata*). Οι αμινοξικές αλληλουχίες των ζυμογόνων που απομονώθηκαν, περιέχουν όλα τα απαραίτητα αμινοξέα για την καταλυτική δράση και τη διατήρηση της τρισδιάστατης διαμόρφωσης των πρωτεασών της σερίνης. Η ανάλυση *in silico* που ακολούθησε, ανέδειξε μια έντονα συντηρημένη γονιδιακή οργάνωση ενώ το ιστοειδικό πρότυπο έκφρασης των ζυμογόνων ταυτίζεται με το πρότυπο κατανομής του παγκρεατικού ιστού.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η απόκριση των πεπτικών πρωτεασών, στην αιφνίδια μεταβολή της αλατότητας, από 33‰ σε 21‰ σε νεαρά άτομα τσιπούρας. Η μείωση της αλατότητας δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα των ολικών όξινων και αλκαλικών πρωτεασών κατά μήκος του πεπτικού σωλήνα, ούτε τις δραστηριότητες της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης, ενισχύοντας την υπόθεση ότι ο ευρύαλος χαρακτήρας του είδους *S. aurata* συγκροτείται από φυσιολογικές διαδικασίες - συμπεριλαμβανομένου του κύριου πεπτικού μηχανισμού - ανθεκτικές σε αιφνίδιες μεταβολές της αλατότητας. Όπως αναμενόταν, η πτώση της αλατότητας οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές στη δραστηριότητα δευτερευουσών πρωτεασών, της ελαστάσης και των καρβοξυπεπτιδασών A και B, που δρουν σε υψηλό pH και υψηλές συγκεντρώσεις δισθενών ιόντων, και οι μεταβολές αυτές εντοπίστηκαν σε τμήματα του πεπτικού σωλήνα με αναγνωρισμένο οσμωρυθμιστικό ρόλο.

Προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση των ζυμογόνων και την ενζυμική δραστηριότητα των κυριότερων πεπτικών πρωτεασών, διαφορετικές δόσεις ovineGH χορηγήθηκαν σε νεαρά άτομα τσιπούρας. Η αυξητική ορμόνη είχε σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης των CHTRI και TRPII στο ήπαρ, όχι όμως και στα πυλωρικά τυφλά, ενώ επηρέασε τη δραστηριότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι και των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου, όπου επίσης είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα χυμοθρυψίνης. Τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η πέψη των πρωτεϊνών μπορεί να τελεί υπό κεντρική ορμονική ρύθμιση καθώς και την ύπαρξη μηχανισμών διαφορικής ρύθμισης της έκφρασης των ζυμογόνων στους ιστούς που φιλοξενούν διάχυτα παγκρεατικά κύτταρα.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

... Έφτασε, λοιπόν, και το τέλος αυτής της διδακτορικής διατριβής. Μιας προσωπικής πορείας, η οποία όμως δε θα ολοκληρώνονταν ποτέ, χωρίς τη συμπαράσταση και την πολύτιμη βοήθεια συγκεκριμένων προσώπων. Μια διδακτορική διατριβή, πάνω απ' όλα αποτελεί μια ερευνητική δουλειά και η φύση της έρευνας προϋποθέτει τη συνεργασία και την υποστήριξη ενός συνόλου ατόμων.

Ένα θερμό ευχαριστώ στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ζήση Μαμούρη, που με τίμησε δεχόμενος να συνεργαστεί μαζί μου - ως Επιβλέπων αυτής της διδακτορικής διατριβής - με υποστήριξε και μου προσέφερε ένα ασφαλές περιβάλλον εργασίας, αναλαμβάνοντας όλες τις καθημερινές γραφειοκρατικές διαδικασίες.

Ένα ιδιαίτερα θερμό ευχαριστώ στην Επίκουρο Καθηγήτρια Κατερίνα Μούτου. Χωρίς τη δική της έμπνευση, υποστήριξη και συμπαράσταση, αυτή η διατριβή δε θα τελείωνε ποτέ. Για να είμαι ακριβής, δε θα ξεκινούσε καν. Την ευχαριστώ που με επέλεξε, με εμπιστεύτηκε, με στήριξε και με κατέθυνε. Με βάση τις αυξημένες απαιτήσεις της και τις εύστοχες υποδείξεις της, προσπάθησα να δουλέψω μεθοδικά και αποτελεσματικά. Την ευχαριστώ για την πρόθυμη καθημερινή βοήθεια, την αμέριστη και πολύπλευρη συμπαράσταση, αλλά και τις ουσιαστικές συμβουλές της.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω, επίσης, στον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτρη Κουρέτα, τόσο για τη συμβολή του στην περάτωση αυτής της διδακτορικής διατριβής, όσο και για τις «βάσεις» που μου έδωσε ως διδάσκοντας μου στα προπτυχιακά χρόνια των σπουδών μου.

Ένα θερμό ευχαριστώ, επίσης, στον Επίκουρο Καθηγητή Κώστα Σταθόπουλο, για τη βοήθεια και την εμπύχωση που μου παρείχε σ' αυτήν την προσπάθεια.

Ευχαριστώ θερμά τους Καθηγητές Σωφρόνη Παπουτσόγλου, Κων/νο Τριανταφυλλίδη και Ζαχαρία Σκούρα, που με τίμησαν δεχόμενοι να συμμετάσχουν στην Εξεταστική Επιτροπή αυτής της διδακτορικής διατριβής και με τις εύστοχες παρατηρήσεις τους βοήθησαν στην ολοκλήρωση της.

Δεν θα παραλείψω να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα κ Κώστα Σταμάτη, για την φιλία που αναπτύξαμε όντας στον ίδιο χώρο και μοιραζόμενοι κοινές ανησυχίες. Γιατί ήταν πάντα «εκεί», τόσο στις δύσκολες όσο και στις χαρούμενες στιγμές.

Επίσης, ένα θερμό ευχαριστώ στη Λέκτορα Μίλυ Ζίφα, στον κ Γιάννη Ζαρκάδα, αλλά και στους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν αυτά τα χρόνια από το εργαστήριο και δώσανε μια ευχάριστη νότα στην καθημερινή πολύωρη δουλειά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Dr Έλενα Σαρροπούλου για την πολύτιμη βοήθεια της, την άψογη συνεργασία μας και τις συμβουλές της.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ, επίσης, στην Επίκουρο Καθηγήτρια Γιώτα Παναγιωτάκη, για τη συνολική υποστήριξη της στην πορεία ολοκλήρωσης αυτής της διδακτορικής διατριβής. Για τις συμβουλές και τα ενθαρρυντικά λόγια της, τις προτροπές και τις ουσιαστικές παρατηρήσεις της.

Ένα θερμό ευχαριστώ στους Καθηγητές Deborah Power και Adelino Canario (Universidade do Algarve), που με δεχθήκανε στο εργαστήριο τους και μου παρείχαν κάθε δυνατή βοήθεια για την περάτωση της εργασίας μου. Από τους «φίλους» στην Πορτογαλία, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ, στους Dr Joao Cardoso, Dr Pedro Guerreiro και Isabel Morgado, για τη συμπαράσταση και τη φιλία τους.

Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και την οικογένεια μου. Στους φίλους γιατί παρέμειναν «φίλοι» και στην οικογένεια μου γιατί ποτέ δεν έπαψαν να πιστεύουν σε μένα, να υποστηρίζουν τις προσπάθειες μου, να κάνουν υπομονή και να δείχνουν κατανόηση.

Στη Γιώτα και την Κατερίνα...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1 Γενική εισαγωγή	1
Κεφάλαιο 2 Υλικά και μέθοδοι	27
Κεφάλαιο 3 Μοριακή κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός των μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου	47
Κεφάλαιο 4 Η απόκριση των πεπτικών πρωτεασών της τσιπούρας στην αιφνίδια μείωση της αλατότητας	70
Κεφάλαιο 5 Η επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση και τη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών στην τσιπούρα	91
Κεφάλαιο 6 Γενική συζήτηση	108
Abstract	112
Βιβλιογραφία	115
Παράρτημα I	128
Παράρτημα II	131

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 *Sparus aurata* L., ΤΣΙΠΟΥΡΑ

ΚΛΑΣΗ: Ακτινοπτερύγιοι

ΥΠΕΡΤΑΞΗ: Ακανθοπτερύγιοι

ΤΑΞΗ: Perciformes

ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ: Sparidae

Η τσιπούρα αποτελεί ένα είδος ευρύαλο και ευρύθερμο που συναντάται σε όλη την εύκρατη ζώνη του ανατολικού Ατλαντικού, στις λιμνοθάλασσες, τα εκβολικά και παράκτια οικοσυστήματα της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας, και εμφανίζει ταχύτερους ρυθμούς αύξησης σε θερμοκρασία 25 °C (Girin, 1983; Barnabé, 1990). Ο βιολογικός του κύκλος χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός πρώτανδρου ερμαφροδιτιτισμού και η αλλαγή φύλου εμφανίζεται ανάμεσα στο 2^ο και 3^ο έτος της ηλικίας των ψαριών. Το χειμώνα τα ώριμα άτομα μεταναστεύουν και φωτοκοούν στην ανοιχτή θάλασσα, ενώ τους εαρινούς μήνες επιστρέφουν προς πρόσληψη τροφής και αύξηση στις λιμνοθάλασσες (Tandler et al., 1995). Οι διατροφικές προτιμήσεις της τσιπούρας στο φυσικό της περιβάλλον περιλαμβάνουν κυρίως πολύχαιτους, καρκινοειδή, μύδια, γαστερόποδα και εχινόδερμα, ενώ μεταβάλλονται με την ηλικία, καθώς τα μεγαλύτερα ψάρια καταναλώνουν μεγαλύτερη λεία με ισχυρότερα κελύφη (Barnabé, 1990).

Πρόκειται για ένα είδος μεγάλης οικονομικής σημασίας, που εκτρέφεται εντατικά σε όλες σχεδόν τις χώρες της Μεσογείου. Η Ελλάδα είναι η πρώτη παραγωγός χώρα, με 309 μονάδες εκτροφής τσιπούρας – λαβρακίου σε λειτουργία το 2004, 38 ιχθυογεννητικούς σταθμούς και συνολική παραγωγή 64.784tn εμπορεύσιμων προϊόντων αξίας 345.050.000 € (δικτυακός τόπος Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, <http://www.minagric.gr>).

1.2 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΘΡΕΨΗΣ ΙΧΘΥΩΝ

Τα ψάρια έχουν την ικανότητα να προσαρμόζουν την διαίτα τους σε μια μεγάλη διατροφική ποικιλία, προσπαθώντας κάθε φορά να εκμεταλλευτούν με τον αποτελεσματικότερο τρόπο τη διαθέσιμη τροφή στο ενδίαίτημα τους (Moyle & Cech, 1982). Είναι δε χαρακτηριστική η παρουσία των περισσότερων πεπτικών ενζύμων

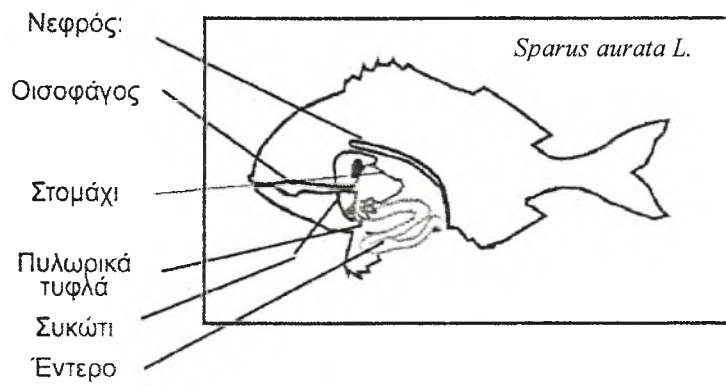
(Πίνακας 1.1) σε όλα τα είδη ψαριών, ανεξάρτητα των διατροφικών τους συνθηθειών (Chakrabarti et al., 1995; Hidalgo et al., 1999). Παρόλα αυτά, όπως και τα υπόλοιπα σπονδυλωτά, τα ψάρια κατατάσσονται σε φυτοφάγα, σαρκοφάγα, παμφάγα και νεκροφάγα με βάση τις ευρύτερες διατροφικές τους συνήθειες και κάθε ομάδα παρουσιάζει ορισμένα γενικά χαρακτηριστικά. Π.χ. τα σαρκοφάγα ψάρια φέρουν ένα κοντό έντερο, το οποίο συχνά έχει τη μορφή ενός ευθύ σωλήνα, που συνδέει το στομάχι με την έδρα, ενώ τα φυτοφάγα είδη έχουν σαφώς μακρύτερο πεπτικό σωλήνα για την καλύτερη αξιοποίηση των φυτικών τροφών που καταναλώνουν (Karoor et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Ferraris & Ahearn, 1984; Halver, 1989; Buddington et al., 1997).

Στα ψάρια, ο πεπτικός σωλήνας αρχίζει από το στόμα και τη στοματική κοιλότητα, συνεχίζει στο φάρυγγα και τον οισοφάγο, το στομάχι, τα πλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο, για να καταλήξει στην έδρα (Σχήμα 1.1). Το επιθήλιο του πεπτικού σωλήνα αντιπροσωπεύει μια σημαντική επιφάνεια επαφής ανάμεσα στο εξωτερικό και το εσωτερικό περιβάλλον, και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην πέψη και απορρόφηση των τροφών, την οσμωρύθμιση και τις ανοσιακές αποκρίσεις (Buddington et al., 1997; Buddington & Krogdahl, 2004). Πολλά είδη ψαριών δε διαθέτουν σαφώς διαμορφωμένο στομάχι, ενώ εμφανίζουν χαρακτηριστικές για κάποια είδη δομές, όπως είναι τα φαρυγγικά δόντια (Karoor et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989). Στην ιδιαίτερη δομή των πλωρικών τυφλών, που συναντάται στα ψάρια, έχουν αποδοθεί διάφοροι ρόλοι με κυριότερους i) την αποθήκευση της τροφής, μέχρι την εξουδετέρωση μέσω των παγκρεατικών εκκρίσεων του προερχόμενου από τη στομαχική πέψη όξινου pH (Karoor et al., 1975; Alarcón et al., 1998), ii) την πέψη των τροφών, καθώς σ' αυτή την περιοχή του εντέρου ενεργοποιούνται και δρουν τα πεπτικά ένζυμα του παγκρέατος (Kurakawa & Suzuki, 1995), iii) την απορρόφηση των θρεπτικών (Bakke-McKeller et al., 2000), καθώς και iv) τη συμμετοχή τους στη διαδικασία της οσμωρύθμισης (Veillette et al., 2005).

Η διαδικασία της πέψης αρχίζει από το στόμα και το φάρυγγα, με τη μηχανική διάσπαση των τροφών και συνεχίζεται στον οισοφάγο με την παραγωγή βλέννας. Στα παραπάνω τμήματα του πεπτικού σωλήνα δεν έχει διαπιστωθεί μέχρι σήμερα καμία έκκριση πεπτικών ενζύμων. Στα ψάρια που φέρουν ευκρινές στομάχι η πέψη συνεχίζεται με τις περισταλτικές κινήσεις των τοιχωμάτων του και τις στομαχικές εκκρίσεις, ενώ ολοκληρώνεται στην περιοχή των πλωρικών τυφλών και

Πίνακας 1.1. Τα πεπτικά ένζυμα των ψαριών, η προέλευση, το υπόστρωμα και το τελικό προϊόν τους

	Προέλευση	Περιοχή δράσης	Υπόστρωμα	Τελικό προϊόν
Πεψίνες	στομάχι	στομάχι	πρωτεΐνες	πεπτίδια
Θρυψίνη	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/ πεπτίδια	πεπτίδια
Χυμοθρυψίνη	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/ πεπτίδια	πεπτίδια
Καρβοξυπεπτιδάσες	πάγκρεας	έντερο	πρωτεΐνες/ πεπτίδια	αμινοξέα
Αμινοπεπτιδάσες	έντερο	έντερο	πρωτεΐνες/ πεπτίδια	πεπτίδια/ αμινοξέα
Δι-, Τρι- πεπτιδάσες	έντερο	έντερο	δι-, τρι- πεπτίδια	αμινοξέα
Λιπάσες	πάγκρεας	έντερο	τριγλυκερίδια	λιπαρά οξέα/ μονογλυκερίδια
Εστεράσες	πάγκρεας	έντερο	εστέρες	αλκοόλες/ λιπαρά οξέα
Αμυλάσες	πάγκρεας	έντερο	άμυλο	δισακχαρίτες
Δι-, Τρι- σακχαριδάσες	έντερο	έντερο	δισακχαρίτες	μονοσακχαρίτες
Χιτινάσες	πάγκρεας	έντερο	χιτίνη	N-ακετυλ-γλυκοσαμίνη
Κοταρρινάση	εντερική χλωρίδα εντερική χλωρίδα	έντερο	κοταρίνη	σάκχαρα



Σχήμα 1.1. Ανατομία του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας.

του εντέρου κυρίως μέσω της ενζυμικής διαδικασίας. Η ενζυμική πέψη ξεκινά από το στομάχι με τη δράση της πεψίνης σε όξινο περιβάλλον. Στους γαστρικούς αδένες των ψαριών, έχει εντοπισθεί μόνο ένας κυτταρικός τύπος, που παράγει υδροχλωρικό οξύ και πρωτεολυτικά ένζυμα (πεψίνη)· ως αντίδραση στην παρουσία τροφής στο στομάχι, ενώ δεν έχει εντοπισθεί ρύθμιση των στομαχικών εκκρίσεων από τη δράση ορμόνης αντίστοιχης της γαστρίνης των ανώτερων σπονδυλωτών (Moyle & Cech, 1982; Lovell, 1989). Το μεγαλύτερο μέρος της ενζυμικής πέψης πραγματοποιείται καθώς η τροφή περνά από τα πυλωρικά τυφλά και κατά μήκος του εντερικού αυλού. Τα ένζυμα που συμμετέχουν σ' αυτή προέρχονται κυρίως από το πάγκρεας, τα εκκριτικά κύτταρα του εντερικού επιθηλίου, αλλά και από την εντερική χλωρίδα (Karoor et al., 1975). Το πάγκρεας παράγει τη μεγαλύτερη ποικιλία και ποσότητα πεπτικών ενζύμων (πρωτεάσες, αμυλάσες, λιπάσες), ενώ βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο φυσιολογικών διαδικασιών που συνδέονται με το διατροφικό καθεστώς, το εξωτερικό περιβάλλον, το φύλο και την ηλικία. Οι παγκρεατικές εκκρίσεις περιέχουν επίσης δικαρβονικά ιόντα, τα οποία σε συνεργασία με τα χολικά υγρά, δρουν προς εξουδετέρωση των οξέων που προέρχονται από το στομάχι (Karoor et al., 1975; Kurakawa & Suzuki, 1995). Η διάσπαση της τροφής ολοκληρώνεται με τη δράση των πεπτικών ενζύμων, που εκκρίνονται από το εντερικό επιθήλιο και συγκεντρώνονται κυρίως στην περιοχή των λαχνών, δίνοντας τα τελικά προϊόντα της πέψης (δισακχαρίτες, δι- και τρι- πεπτίδια, μονοσακχαρίτες, αμινοξέα, λιπαρά οξέα) που απορροφούνται και μεταφέρονται στην κυκλοφορία του αίματος μέσω των εντεροκυττάρων (Karoor et al., 1975; Moyle & Cech, 1982; Halver, 1989).

Η ανατομία του γαστρεντερικού σωλήνα της τσιπούρας, ακολουθεί το τυπικό πρότυπο των σαρκοφάγων ψαριών. Η στοματική κοιλότητα περιλαμβάνει μια δυνατή οδοντοστοιχία για την αποτελεσματικότερη διάσπαση των τροφών και ακολουθεί ένας σχετικά μικρού μήκους οισοφάγος, του οποίου τα ιστολογικά χαρακτηριστικά συνηγορούν στον οσμωρυθμιστικό του ρόλο. Το καλά διαμορφωμένο στομάχι έχει σχήμα Υ και είναι εφοδιασμένο με γαστρικούς αδένες. Η πυλωρική περιοχή χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη τεσσάρων πυλωρικών τυφλών, ενώ το έντερο - το οποίο καλύπτεται από επιθηλιακά και βλεννογόνα κύτταρα - είναι κοντό με σχετικό μήκος 0,5-0,6 ως προς το συνολικό μήκος του πεπτικού σωλήνα. Ο παγκρεατικός ιστός εμφανίζεται έντονα διαχυτός εντός του ήπατος και γύρω από την πυλωρική περιοχή (Cataldi et al., 1987; Elbal & Agulleiro, 1986). Στην τσιπούρα, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη ενός αριθμού πεπτικών ενζύμων, όπως η αμυλάση (Munilla-

Morán & Sabonino-Rey, 1996a; Hidalgo et al., 1999; Deguara et al., 2003), η πεψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η θρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η χυμοθρυψίνη (Alarcón et al., 1998; Deguara et al., 2003), η καρβοξυπεπτιδάση Α (Deguara et al., 2003) και η καρβοξυπεπτιδάση Β (Deguara et al., 2003), ενώ έχει επίσης μετρηθεί η δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών (Munilla-Morán & Sabonino-Rey, 1996b; Alarcón et al., 1998; Hidalgo et al., 1999).

Το εντερικό επιθήλιο έρχεται σε επαφή με το περιεχόμενο του εντερικού αυλού και είναι υπεύθυνο για την απορρόφηση και μεταφορά των περιεχόμενων σ' αυτό θρεπτικών, ιόντων και νερού (Ferraris & Ahearn, 1984). Η απορρόφηση των θρεπτικών από τα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου πραγματοποιείται μέσω διαφόρων οδών όπως i) η παθητική διάχυση, ii) η ενεργητική - μη εξαρτώμενη από την παρουσία ιόντων - μεταφορά, iii) η ενεργητική - εξαρτώμενη από την ύπαρξη βαθμίδωσης ιόντων - μεταφορά, iv) η ενδοκύτωση και v) η παρακυτταρική κυκλοφορία (Bakke-McKeller et al., 2000). Όσον αφορά την πέψη των πρωτεϊνών, εξακολουθεί να υπάρχει το ερώτημα, εάν το μεγαλύτερο μέρος των απορροφούμενων θρεπτικών - όπως και στα θηλαστικά - αποτελείται από δι- και τρι- πεπτίδια (Georgoroulou et al., 1986), καθώς σύγχρονα αποτελέσματα υποστηρίζουν την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη απορρόφηση των απλών αμινοξέων (Bakke-McKeller et al., 2000). Μελέτες, ωστόσο, σε διάφορα είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας, έχουν δείξει ότι διεξάγεται ιδιαίτερα σημαντική πρόσληψη από το εντερικό επιθήλιο - ιδιαίτερα από το τελικό τμήμα του εντέρου - ολόκληρων πρωτεϊνικών μορίων, μέσω πινοκύτωσης (Dabrowski & Dabrowska, 1981; Stroband & Van der Veen, 1981; Elbal & Agulleiro, 1986; Georgoroulou et al., 1986; Cataldi et al., 1987; Buddington et al., 1997; Bakke-McKeller et al., 2000).

Το έντερο των ψαριών δεν παρουσιάζει επιμέρους διακριτά τμήματα (Ferraris & Ahearn, 1984; Buddington et al., 1997). Η παραπάνω έλλειψη συγκεκριμένης ζώνωσης, η οποία αφορά τόσο την έκφραση (Murray et al., 2004) και την δραστικότητα των πεπτικών ενζύμων (Chakrabarti et al., 1995; Deguara et al., 2003), όσο και την ικανότητα απορρόφησης των θρεπτικών (Dabrowski & Dabrowska, 1981; Bakke-McKeller et al., 2000), είναι πιθανό να απορρέει από την προσαρμοστικότητα των ψαριών σε μια μεγάλη ποικιλία τροφών που καταναλώνουν στο φυσικό τους περιβάλλον, επιτρέποντας έτσι την αποτελεσματικότερη αξιοποίηση των

διατιθέμενων διατροφικών πηγών. Η εξελικτική άποψη που προτείνεται από τους Chakrabarti et al. (1995), υποστηρίζει ότι το έντερο των ψαριών βρίσκεται ακόμη στο εξελικτικό στάδιο όπου τα επιμέρους τμήματα του δεν εμφανίζουν κάποια λειτουργική εξειδίκευση, όπως αυτή συναντάται στα ανώτερα θηλαστικά. Επιπλέον, στα ψάρια το πάγκρεας - που παράγει την πλειονότητα των πεπτικών ενζύμων - αποτελεί ένα έντονα διάχυτο όργανο που κατανέμεται κατά μήκος του φλεβικού συστήματος· από το σκώτι στο στομάχι, το σπλήνα, τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο (Fraisie et al., 1981; Kurakawa & Suzuki, 1995).

Κατά τη διάρκεια των πρώτων αναπτυξιακών σταδίων των ψαριών, το πεπτικό σύστημα εμφανίζεται εξαιρετικά ανώριμο (Kolkovski, 2001). Κατά την εκκόλαψη, ο πεπτικός σωλήνας αποτελεί έναν ευθύ σωλήνα, κλειστό στην περιοχή του στόματος και ιστολογικά αδιαφοροποίητο σε όλο το μήκος του. Παραμένει, δε, σχεδόν στην ίδια κατάσταση για το διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα στο άνοιγμα του στόματος και την πλήρη απορρόφηση του λεκιθικού σάκου, οπότε και διαιρείται στον οισοφάγο, το πρόσθιο, το μέσο και το οπίσθιο έντερο. Η περίοδος του ατελούς ιχθυδίου ολοκληρώνεται με την ανάπτυξη του στομάχου, των γαστρικών αδένων και των πυλωρικών τυφλών. Το σκώτι και το πάγκρεας αναπτύσσονται κατά την εκκόλαψη και είναι πλήρως λειτουργικά την ημέρα πρώτης τροφοληψίας. Είναι χαρακτηριστικό, ότι η πέψη των πρωτεϊνών σ' αυτά πρώτα στάδια ανάπτυξης, επαφίεται αποκλειστικά στη δράση των πρωτεολυτικών ενζύμων που εκκρίνονται από το πάγκρεας (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Kolkovski, 2001; Srivastava et al., 2002). Σημαντική συσχέτιση έχει αναφερθεί ανάμεσα στη δραστικότητα θρυψίνης και τον ειδικό ρυθμό αύξησης για το *Salmo salar* (Sunde et al., 2001), ενώ στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του *Paralichthys olivaceus* η μεταγραφή του θρυψινογόνου προηγείται της πρώτης τροφοληψίας (Srivastava et al., 2002). Επιπλέον, η δραστικότητα της θρυψίνης έχει προταθεί ως ένας αξιόπιστος και εύχρηστος δείκτης της θρεπτικής κατάστασης των ατελών ιχθυδίων, καθώς σχετίζεται με την ηλικία τους, το μήκος τους, των αριθμό των ημερών περιορισμένης τροφοληψίας και το χρόνο χορήγησης της τροφής (Ueberschar, 1995). Επιπλέον, στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ψαριών είναι συχνή η απορρόφηση από το εντερικό επιθήλιο άθικτων διατροφικών πρωτεϊνικών μορίων, προκειμένου να αντισταθμιστεί η μειωμένη πρωτεολυτική δραστικότητα εξαιτίας της απουσίας πεψίνης (Georgopoulou et al., 1986; Sarasquete et al., 1993; Elbal et al., 2004).

Στην τσιπούρα, η ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα περιλαμβάνει πέντε επιμέρους φάσεις: I (ημέρα 0), ο λεκιθικός σάκος εμφανίζεται μεγάλος και ο πεπτικός σωλήνας αδιαφοροποιήτος, II (ημέρα 2-3), ανοίγει η έδρα και διαφοροποιούνται ο οισοφάγος, το στομάχι και το έντερο, εμφανίζεται δραστικότητα θρυψίνης, ενώ η τροφοληψία εξακολουθεί να είναι αποκλειστικά ενδογενής, III (ημέρα 4-7), ανοίγει το στόμα, αρχίζει η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και το έντερο διαιρείται σε δύο επιμέρους περιοχές, IV (ημέρα 8-59), ο λεκιθικός σάκος έχει απορροφηθεί και η τροφοληψία είναι πλέον αποκλειστικά εξωγενής, V (ημέρα 60-69), διαφοροποιούνται τα πλωρικά τυφλά και οι γαστρικοί αδένες (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Kolkovski, 2001; Elbal et al., 2004).

1.3 ΠΕΠΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΑΣΕΣ

Με βάση το γενικό μηχανισμό κατάλυσης που ακολουθούν, οι πεπτικές πρωτεάσες διακρίνονται σε δύο ομάδες: i) αυτές που σχηματίζουν ομοιοπολικά σύμπλοκα, π.χ. οι πρωτεάσες της σερίνης και ii) αυτές που δεν σχηματίζουν ομοιοπολικά σύμπλοκα, π.χ. οι μεταλλοπρωτεάσες και οι πρωτεάσες του ασπαραγινικού (García-Carreño & Del Toro, 1997; Barrett et al., 2004; Polgar, 2005). Όπως προαναφέρθηκε, η πλειονότητα των πεπτικών πρωτεασών παράγεται στα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος και μέσω του παγκρεατικού αγωγού απελευθερώνεται στον εντερικό αυλό (Kurakawa & Suzuki, 1995). Ο κυριότερος μηχανισμός ρύθμισης της δραστικότητας των πεπτικών πρωτεασών είναι η ενεργοποίηση των ζυμογόνων τους, των ανενεργών μορίων που εκκρίνονται από το πάγκρεας και αποτελούν τα προϊόντα της μεταγραφής και μετάφρασης συγκεκριμένων γονιδίων, ενώ η έκφραση τους βρίσκεται υπό διατροφικό και αναπτυξιακό έλεγχο σε επίπεδο i) γονιδιακής μεταγραφής, ii) κυτταροπλασματικής σταθερότητας ή μεταφραστικής αποτελεσματικότητας και iii) σταθερότητας της μεταφραζόμενης πρωτεΐνης (Pérez et al., 1998; Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

Οι πεπτικές πρωτεάσες χαρακτηρίζονται από έλλειψη εκλεκτικότητας ως προς ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, ενώ αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αμινοξύ που συμμετέχει στον υπό διάσπαση πεπτιδικό δεσμό. Έτσι, δεν έχουν την ικανότητα να αναγνωρίσουν εάν αυτός ο δεσμός είναι μέρος μιας πρωτεΐνης ή όχι και η δραστικότητα τους μελετάται με τη χρήση συνθετικών υποστρωμάτων (García-Carreño & Del Toro, 1997). Επιπλέον, η μελέτη των πεπτικών πρωτεασών μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω εκλεκτικών αναστολέων που δρουν στο ενεργό κέντρο των

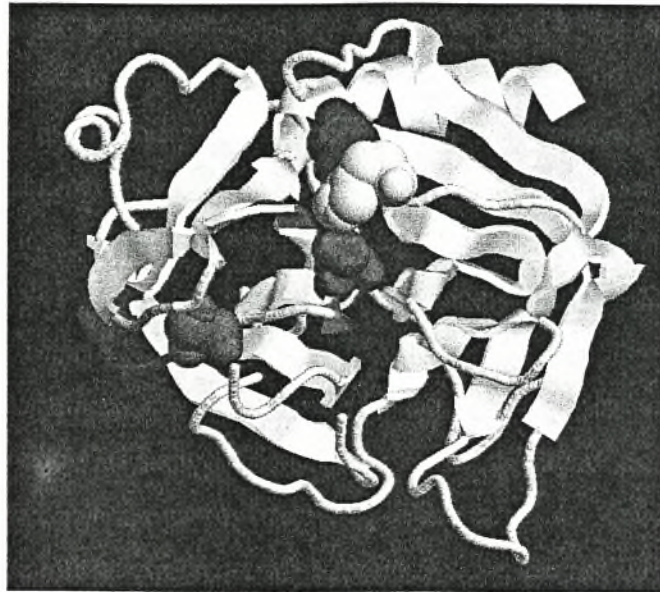
ενζύμων και ανήκουν σε δύο ομάδες: i) τους εκλεκτικούς και μικρού μοριακού βάρους αναστολείς που προσδένονται μη αντιστρεπτά και τροποποιούν ένα αμινοξύ στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και ii) τους φυσικούς αναστολείς που αποτελούν ψευδοϋποστρώματα ή/και διάφορους χηλικούς παράγοντες (Shoellmann & Shaw, 1963; Garcia-Carreño & Del Toro, 1997; Berg et al., 2002).

Πρωτεάσες της σερίνης (EC 3.4.21)

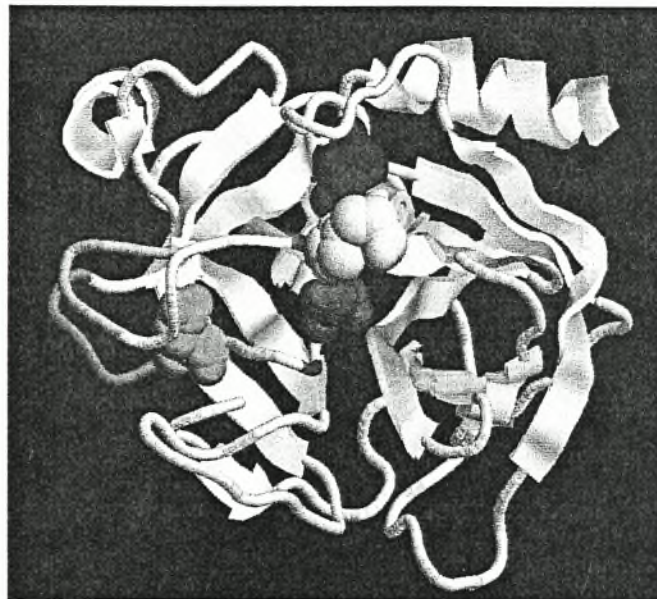
Οι πρωτεάσες της σερίνης βρίσκονται μεταξύ των πρώτων καλά μελετημένων ενζύμων και αποτελούν ενδοπρωτεάσες που φέρουν το αμινοξύ της σερίνης στο ενεργό κέντρο τους. Τρία από τα σημαντικότερα πεπτικά ένζυμα, η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση, ανήκουν στην οικογένεια S1 της ομάδας PA (πρώην SA) των πρωτεασών, η οποία αντιστοιχεί στις πρωτεάσες της σερίνης και οι οποίες προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο. Εμφανίζουν, δε, έναν μηχανισμό δράσης που στηρίζεται στην ύπαρξη μιας καταλυτικής τριάδας (His57 - Asp102- Ser195), αλλά και στην παρουσία συγκεκριμένων αμινοξέων στην επιφάνεια των ενζύμων (Hartley, 1964; Neurath, 1984; Barrett et al., 2004; Polgar, 2005).

Οι πρωτεάσες της σερίνης αποτελούνται από δύο κύριες υπομονάδες παρόμοιας δομής, οι οποίες φαίνεται να προήλθαν από διπλασιασμό ενός αρχικού γονιδίου και απόκλιση, ενώ βρίσκονται σε ασύμμετρες θέσεις μεταξύ τους, με την καταλυτική τριάδα να είναι τοποθετημένη ανάμεσα τους (Σχήμα 1.2). Κάθε υπομονάδα αποτελείται από δύο επαναλήψεις ενός μοτίβου, που φέρει τρεις κλάδους β-πτυχωτού φύλλου συνδεδεμένους με δύο «φουρκέτες» (Lesk & Fordham, 1996; Perona & Craik, 1997).

Η υδρόλυση των εστερικών και πεπτιδικών δεσμών από τις πρωτεάσες της σερίνης ακολουθεί ένα γενικά αποδεκτό πλέον μηχανισμό (Σχήμα 1.3)· η προσβολή του καρβονυλικού ατόμου άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού πραγματοποιείται από το άτομο οξυγόνου της υδροξυλομάδας της σερίνης της καταλυτικής τριάδας του ενζύμου, η οποία εμφανίζει έναν εξαιρετικά νουκλεόφιλο χαρακτήρα εξαιτίας της παρακείμενης ιστιδίνης που δρα ως γενική βάση. Η απόδοση ενός πρωτονίου από την ιστιδίνη στη νεοσχηματιζόμενη αλκοολική ή αμιδική ομάδα στη συνέχεια και ο σχηματισμός ενός ομοιοπολικού ακετυλο-ενζύμου, έχουν ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση του πρώτου προϊόντος. Η αντίδραση αποακυλίωσης

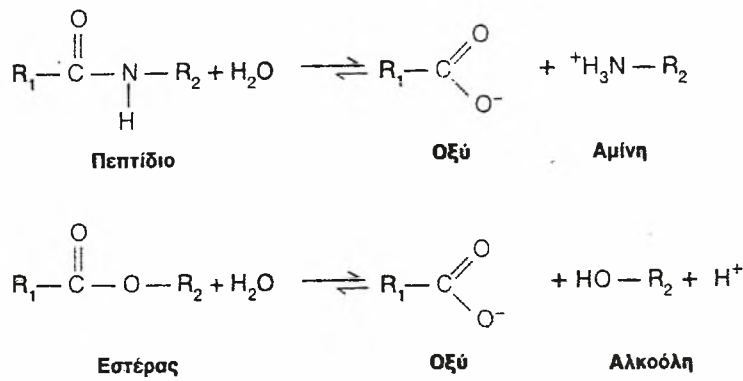


(A) Θρυψίνη

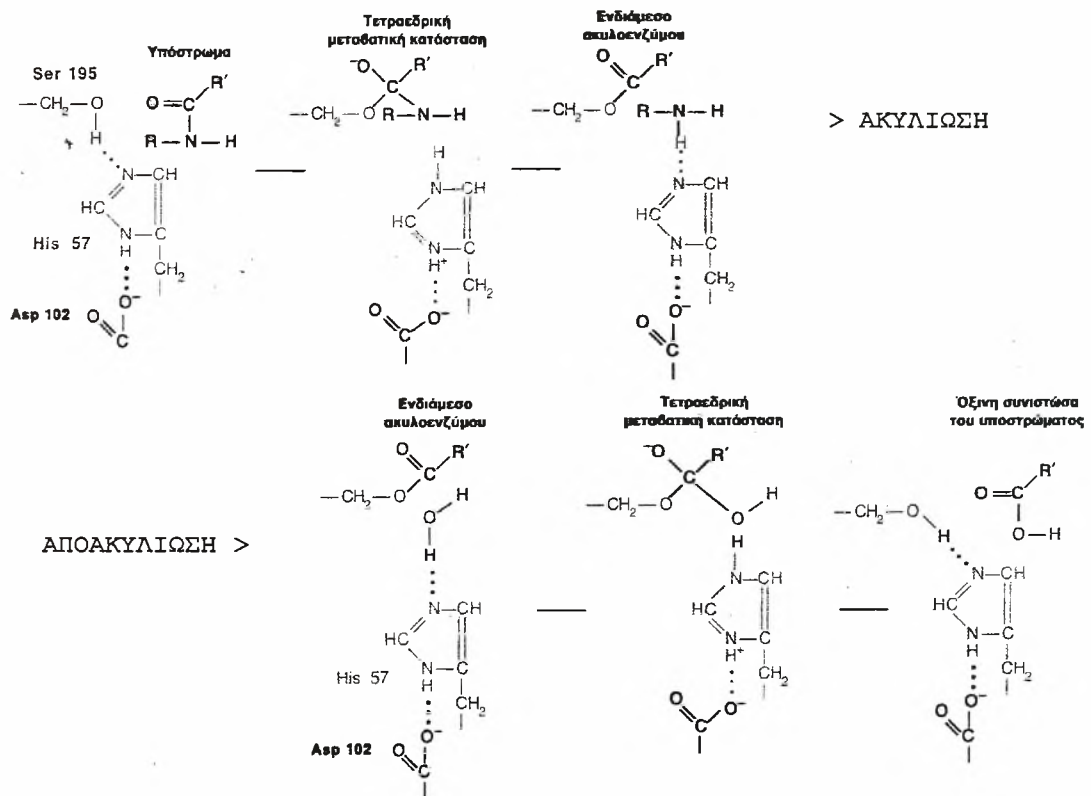


(B) Χυμοθρυψίνη

Σχήμα 1.2. Η παρούσα απεικόνιση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των δομών (A) 2BYA[1].pdb και (B) 1VGC[1].pdb, για τη θρυψίνη και τη χυμοθρυψίνη αντίστοιχα, ενώ η επεξεργασία τους έγινε μέσω του προγράμματος RasMol, έκδοση 2.7.1.1.. Έχουν τονισθεί τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας, His57: μπλέ, Asp102: κίτρινο, Ser195: κόκκινο, το αμινοξύ στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (189): πράσινο, τα αμινοξέα που σχηματίζουν την κοιλότητα του οξυανιόντος Gly193 και Ser214: ροζ, ο επιφανειακός βρόγχος 1: πορτοκαλί και ο επιφανειακός βρόγχος 2: μωβ.



(Α) Οι πρωτεάσες της σερίνης καταλύουν την υδρόλυση εστερικών και πεπτιδικών δεσμών.

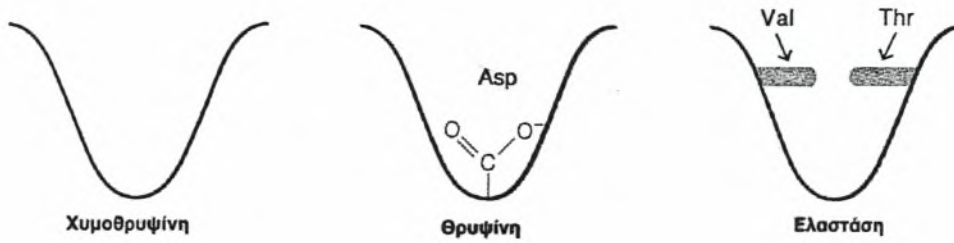


(Β) Η υδρόλυση των πεπτιδικών δεσμών από τις πρωτεάσες της σερίνης περιλαμβάνει το στάδιο της ακυλίωσης και της αποακυλίωσης, με τη δημιουργία ενός ενδιάμεσου ακυλοενζύμου.

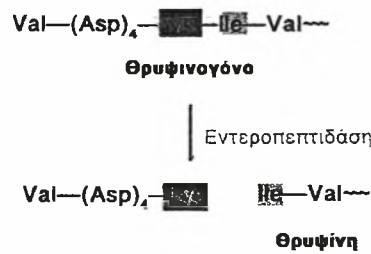
Σχήμα 1.3. Προϊόντα και μηχανισμός δράσης των πρωτεασών της σερίνης (Berg et al, 2002).

πραγματοποιείται μέσω του ίδιου μηχανισμού, με το επιτιθέμενο νουκλεόφιλο να παρέχεται από ένα μόριο νερού. Κάθε στάδιο εξελίσσεται μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου, που προσομοιάζει την υψηλής ενέργειας μεταβατική κατάσταση και των δύο αντιδράσεων. Ο σχηματισμός του τετραεδρικού ενδιάμεσου κατά την αντίδραση της ακυλίωσης ελέγχει και την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης συνολικά (Scheiner & Lipscomb, 1976; Daggett et al., 1991; Perona & Craik, 1995; Perona & Craik, 1997; Náray-Szabo, 2000; Barrett et al., 2004; Polgar, 2005). Ο ισχυρός δεσμός υδρογόνου ανάμεσα στη σερίνη και την ιστιδίνη της καταλυτικής τριάδας, ο οποίος είναι απαραίτητος για τη μεταφορά του πρωτονίου, εμφανίζεται μόνο μετά την πρόσδεση του υποστρώματος (Perona & Craik, 1995). Μια θέση πρόσδεσης του οξυανιόντος του τετραεδρικού ενδιάμεσου (κοιλότητα οξυ-ανιόντος) δημιουργείται από τα αμιδικά άτομα αζώτου των Gly193 και Ser195 του ενζύμου (Perona & Craik, 1995; Barrett et al., 2004; Polgar, 2005). Στο παρελθόν υπήρξαν διαφωνίες σχετικά με το ρόλο του τρίτου αμινοξέος της καταλυτικής τριάδας, του μακριά από την επιφάνεια βρισκόμενου Asp102. Αρχικά είχε υιοθετηθεί το μοντέλο της μεταφοράς δύο πρωτονίων και η δημιουργία ενός συστήματος μεταφοράς φορτίου. Σήμερα, γνωρίζουμε ότι ο σπουδαίος ρόλος αυτού του αμινοξέος έγκειται στη σταθεροποίηση της κατεύθυνσης του απαιτούμενου ταυτομερούς της ιστιδίνης, ενώ παράλληλα αντισταθμίζει το θετικό φορτίο που αναπτύσσεται από την πρόσληψη του -προερχόμενου από τη σερίνη - πρωτονίου από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της (Barrett et al., 2004; Polgar, 2005).

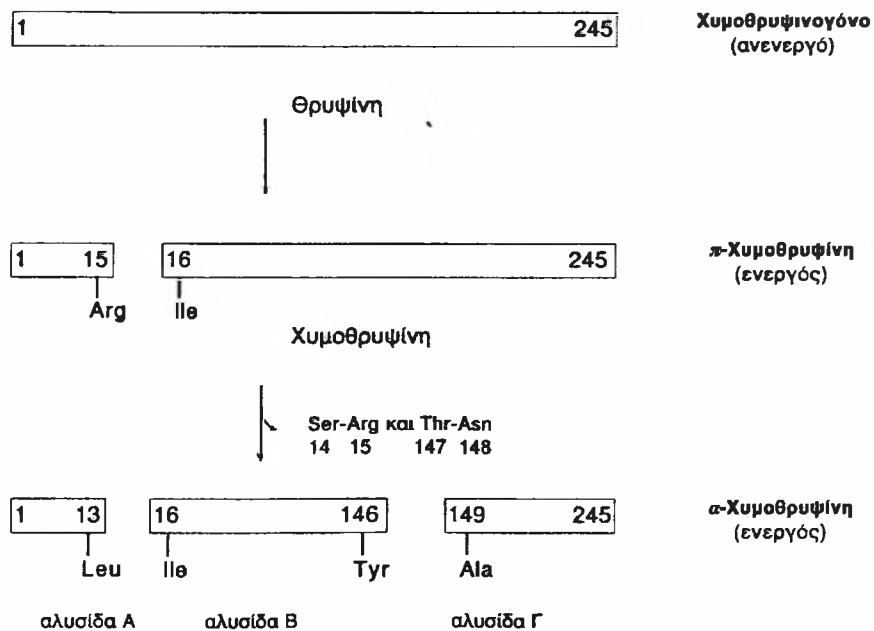
Η θρυψίνη, η χυμοθρυψίνη και η ελαστάση παρουσιάζουν παρόμοια τρισδιάστατη δομή και αλληλουχία αμινοξέων, καθώς προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο και έχουν εξελιχθεί μέσω μιας διαδικασίας διπλασιασμού και μετάλλαξης των γονιδίων (Perona & Craik, 1997; Suzuki et al., 2002; Barrett et al., 2004). Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των τριών ενζύμων παρατηρείται ως προς την εξειδίκευση του υποστρώματος και οφείλεται στην ύπαρξη μικρών διαφορών στην περιοχή πρόσδεσής του (Σχήμα 1.4). Η θρυψίνη διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη, η χυμοθρυψίνη σε αμινοξέα με αρωματική ή ογκώδη μη πολική πλευρική αλυσίδα, ενώ η εξειδίκευση της ελαστάσης κατευθύνεται προς μικρότερες αφόρτιστες πλευρικές αλυσίδες. Στη χυμοθρυψίνη η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελείται από μια μη πολική κοιλότητα, ενώ στη θρυψίνη η Ser189 έχει αντικατασταθεί από το Asp102 που σχηματίζει έναν ισχυρό ηλεκτροστατικό δεσμό με τη θετικά φορτισμένη Lys ή Arg. Στην ελαστάση, δύο



Σχήμα 1.4. Απλοποιημένη αναπαράσταση της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος των τριών κυριότερων πρωτεασών της σερίνης (Berg et al, 2002).



(Α) Ενεργοποίηση θρυψινογόνου.



(Β) Ενεργοποίηση χυμοθρυψινογόνου.

Σχήμα 1.5. Πρωτεολυτική ενεργοποίηση θρυψινογόνου και χυμοθρυψινογόνου (Berg et al, 2002).

αμινοξέα γλυκίνης, που υπάρχουν στη χυμοθρυψίνη, έχουν αντικατασταθεί από τα πιο ογκώδη βαλίνη και θρεονίνη (Perona & Craik, 1997; Berg et al., 2002; Suzuki et al. 2002; Barrett et al., 2004).

Οι πεπτικές πρωτεάσες της σερίνης απελευθερώνονται από το πάγκρεας ως ανενεργά ζυμογόνα, των οποίων η μεγαλύτερη διαφορά με το ενεργό ένζυμο φαίνεται ότι είναι η μη ύπαρξη της κοιλότητας οξυ-ανιόντος (Berg et al., 2002). Η θρυψίνη ενεργοποιείται από την εντεροκινάση ή αυτοενεργοποιείται με την απομάκρυνση ενός μικρού μήκους πεπτιδίου ενεργοποίησης (Σχήμα 1.5^A). Η χυμοθρυψίνη ενεργοποιείται όταν ο δεσμός μεταξύ Arg15 και Ile16 διασπάται από τη θρυψίνη, οπότε προκύπτει η ενεργός π -χυμοθρυψίνη, η οποία δρα σε μια άλλη π -χυμοθρυψίνη και με την απομάκρυνση δύο διπεπτιδίων προκύπτει η σταθερή ενζυμική μορφή, α -χυμοθρυψίνη (Σχήμα 1.5^B). Η ελασάση, όπως οι περισσότερες παγκρεατικές πρωτεάσες, ενεργοποιείται υπό τη δράση της θρυψίνης (Daggett et al., 1991; Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

Οι αμινοξικές ή/και οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες πολλών ισομορφών χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου έχουν καθοριστεί για ένα μεγάλο αριθμό σπονδυλωτών. Οι διαφορετικές ισομορφές παρουσιάζουν διαφορετικές κινητικές ιδιότητες και υπάγονται σε δύο ομάδες ανάλογα με τη γενωμική τους θέση (Roach et al, 1997), ενώ τα ένζυμα της θρυψίνης συχνά χαρακτηρίζονται ως κατιονικά ή ανιονικά με βάση το φορτίο τους σε συνθήκες ουδέτερου pH (Roach, 2002). Επιπλέον, η ύπαρξη ενός ξεχωριστού ταχέως εξελισσόμενου κλάδου θρυψινογόνων στα ψάρια που έχουν προσαρμοστεί και διαβιών σε ψυχρά περιβάλλοντα, έχει οδηγήσει τη σύγχρονη έρευνα στη μελέτη της δράσης και των μηχανισμών προσαρμογής των πρωτεασών σε περιβάλλοντα χαμηλής θερμοκρασίας (Roach, 2002; Gudmundsdottir & Palsdottir, 2005).

Μεταλλοπρωτεάσες (EC 3.4.17)

Ο καταλυτικός μηχανισμός των μεταλλοπρωτεασών περιλαμβάνει αμινοξέα συνδεδεμένα με ένα ή δύο μεταλλικά ιόντα, τα οποία με τη σειρά τους βρίσκονται συνδεδεμένα με ένα ενεργό μόριο νερού και το οποίο τελικά επιτίθεται - ως νουκλεόφιλο - στον υπό διάσπαση πεπτιδικό δεσμό (Barrett et al., 2004).

Οι καρβοξυπεπτιδάσες του πεπτικού συστήματος, αποτελούν εξωπεπτιδάσες, οι οποίες φέρουν ένα καταλυτικό ιόν ψευδαργύρου τετραεδρικά συνδεδεμένο με ένα μόριο νερού, δύο ιστιδίνες και ένα γλουταμινικό. Ο μηχανισμός δράσης τους

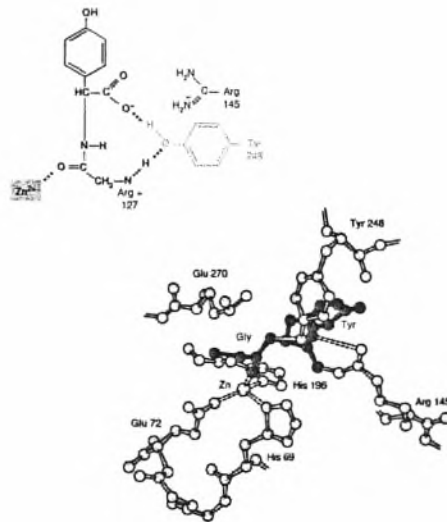
περιλαμβάνει, εκτός από το ιόν ψευδαργύρου, την His69, το Glu72 και την His196, ακόμα δύο αμινοξέα: την Arg127 που δρα ηλεκτρόφιλα σταθεροποιώντας την κουλότητα του οξυανιόντος και το Glu270 που πιστεύεται ότι αποτελεί την απαιτούμενη για την κατάλυση γενική βάση και συνδέεται με το καρβονυλικό άτομο άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού (Σχήμα 1.6). Το ιόν ψευδαργύρου επιδεικνύει μια απaráμιλλη πλαστικότητα και μπορεί να δράσει είτε ως οξύ κατά Lewis, είτε ως βάση ή νουκλεόφιλο όταν το νερό που βρίσκεται συνδεδεμένο μετατραπεί σε υδροξείδιο. Έτσι, τελικά, οι καρβοξυπεπτιδάσες εμφανίζουν έναν καταλυτικό μηχανισμό που επάγει τη στρέβλωση των δεσμών του προσδεδεμένου υποστρώματος (Dewar & Storch, 1985; Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

Η καρβοξυπεπτιδάση Α εμφανίζει εκλεκτικότητα σε αμινοξέα με αρωματική ή ογκώδη μη πολική πλευρική αλυσίδα, ενώ η καρβοξυπεπτιδάση Β διασπά πεπτιδικούς δεσμούς στα αμινοξέα λυσίνη και αργινίνη. Επιπλέον, εκκρίνονται από το πάγκρεας ως ανενεργά ζυμογόνα, που ενεργοποιούνται υπό τη δράση της θρυψίνης και την απομάκρυνση ενός πεπτιδίου (~ 90 aa) από το N-τελικό άκρο τους (Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

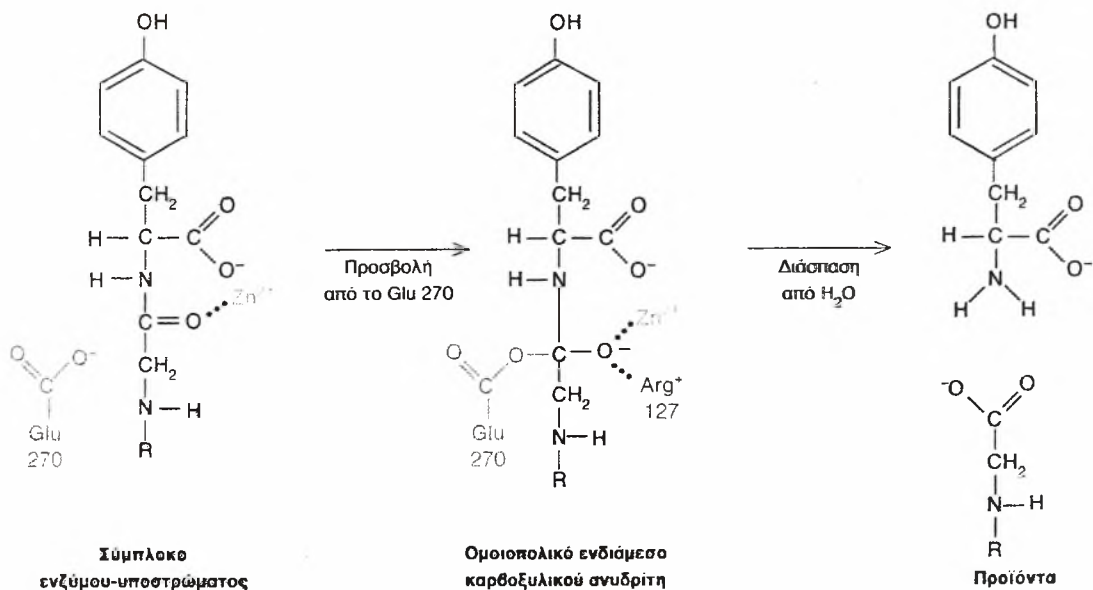
Πρωτεάσες του ασπαραγινικού (EC 3.4.23)

Οι πρωτεάσες του ασπαραγινικού, αποτελούν ενδοπεπτιδάσες, στις οποίες δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού (Asp32 και Asp215) δρουν συνεργατικά, συνδέονται και ενεργοποιούν ένα καταλυτικό μόριο νερού (Σχήμα 1.7). Για την εμφάνιση καταλυτικής δραστηριότητας απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί· το ένα αμινοξύ να βρίσκεται στη μορφή $-COOH$, ενώ το άλλο στη μορφή $-COO^-$ (Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

Η πεψίνη αποτελεί την κυριότερη πρωτεάση του ασπαραγινικού στο στομάχι των σπονδυλωτών. Δεν παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τους υπό διάσπαση πεπτιδικούς δεσμούς και δρα σε ιδιαίτερα χαμηλές συνθήκες pH (~ 2). Το πεψινογόνο περιέχει ένα μικρού μήκους πεπτίδιο στο N-τελικό άκρο του, το οποίο απομακρύνεται πρωτεολυτικά. Η παραπάνω ενεργοποίηση πραγματοποιείται αυτόματα σε συνθήκες pH < 5 και αποτελεί μια ενδομοριακή διεργασία (Dykes & Kay, 1976; Berg et al., 2002; Barrett et al., 2004).

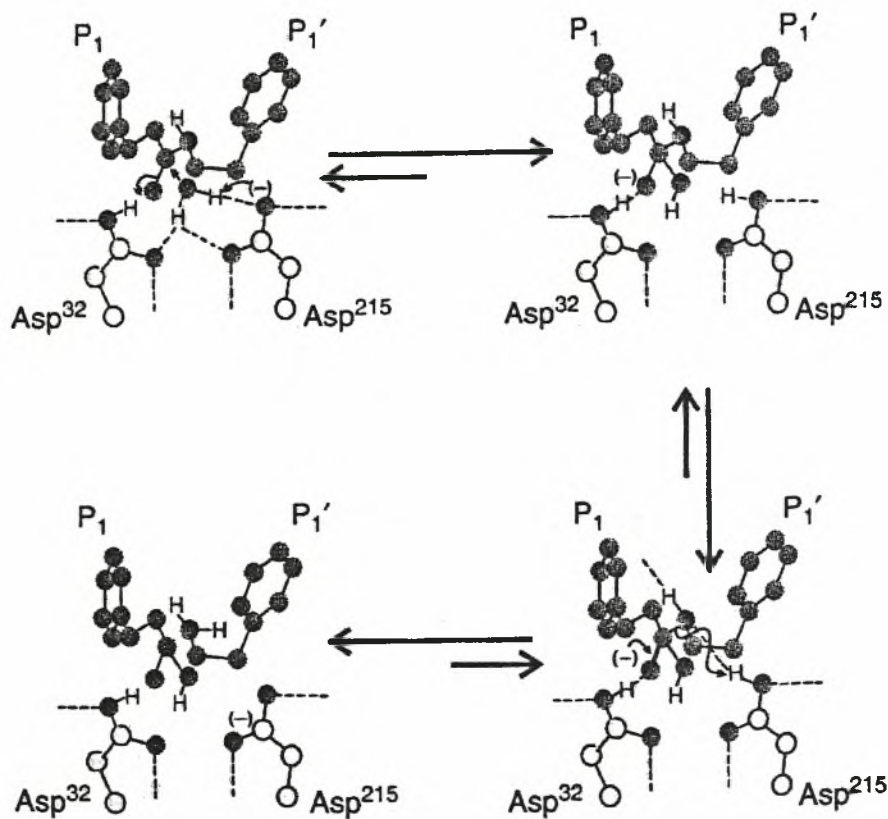


(A) Πρόσδεση υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της καρβοξυπεπτιδάσης A.



(B) Ο μηχανισμός δράσης των πεπτικών καρβοξυπεπτιδασών περιλαμβάνει την απευθείας προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα του υπό διάσπαση δεσμού από το Glu270.

Σχήμα 1.6. Πρόσδεση του υποστρώματος και μηχανισμός δράσης των πεπτικών καρβοξυπεπτιδασών (Berg et al, 2002).



Σχήμα 1.7. Μηχανισμός δράσης των πρωτεασών του ασπαραγινικού, με τη συνεργασία δύο καταλοίπων ασπαραγινικού. Το υπόστρωμα εμφανίζει ένα Phe- Phe διπεπτιδίο στις P₁ και P₁' υποπεριοχές, συνδεδεμένο με το άζωτο και το οξυγόνο του πεπτιδικού δεσμού (Barrett et al., 2004).

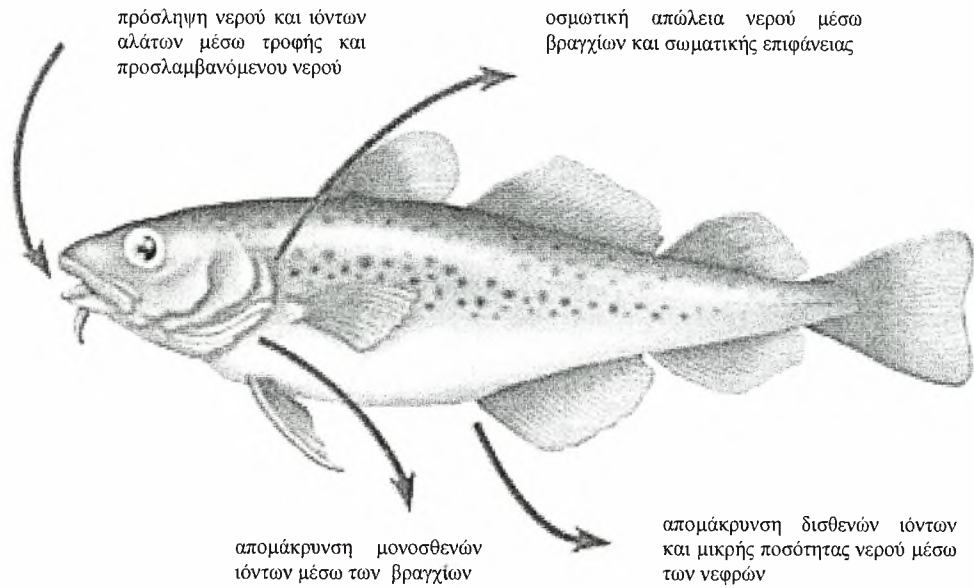
1.4 ΑΛΑΤΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΟΣΜΩΡΥΘΜΙΣΗ

Τόσο η ανάπτυξη, όσο και η αύξηση των ψαριών βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο εσωτερικών και εξωτερικών παραγόντων. Οι οικολογικοί παράγοντες που δρουν και επηρεάζουν τις φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών κατατάσσονται σε δύο κυρίως κατηγορίες: i) τους καθοριστικούς (θερμοκρασία, αλατότητα, φωτοπερίοδος), που δρουν άμεσα μέσω ειδικών υποδοχέων και ii) τους περιοριστικούς, που επηρεάζουν δυσμενώς στον οργανισμό όταν βρίσκονται πάνω (αμμωνία), κάτω (διαλυμένο οξυγόνο) ή εκτός ορισμένων ορίων (pH). Από τους παραπάνω παράγοντες, μόνο η αλατότητα είναι εκείνη που συναντάται αποκλειστικά στο υδάτινο περιβάλλον και οι οργανισμοί που ανταποκρίνονται σε μεγάλο εύρος αλλαγές της χαρακτηρίζονται ως ευρύαλοι (Boeuf & Payan, 2001).

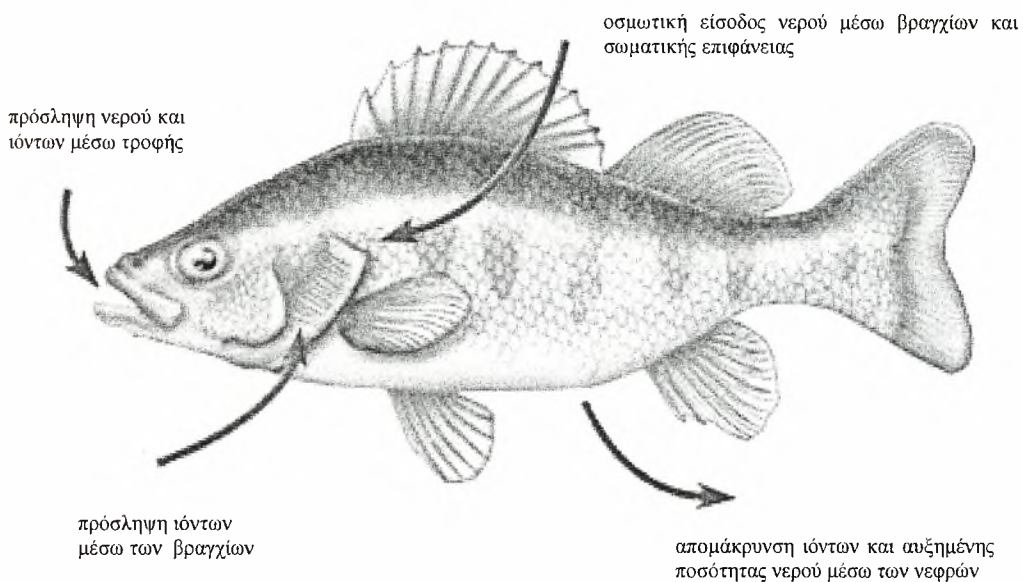
Η αλατότητα οφείλεται στην παρουσία διαλυμένων αλάτων στο νερό. Τα ιόντα Cl^- και Na^+ , αποτελούν τα σημαντικότερα συστατικά του θαλασσινού νερού (35‰, 1050 mOsm l^{-1}), το οποίο περιέχει 78% NaCl και 11% MgCl_2 . Αντίθετα με το θαλασσινό νερό, όπου κυριαρχούν τα ιόντα χλωρίου και νατρίου, στο γλυκό νερό (0,3‰, ~10 mOsm l^{-1}) - του οποίου η μέση σύσταση είναι δύσκολο να προσδιοριστεί - επικρατούν τα καρβονικά και δικαρβονικά ιόντα (Tchernia, 1969).

Τα είδη των τελεόστεων που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον, προσλαμβάνουν νερό προκειμένου να αντισταθμίσουν την παθητική απώλεια του - κυρίως μέσω των βραγχίων τους - λόγω οσμωρύθμισης (Σχήμα 1.8^A). Αντίθετα, τα ψάρια του γλυκού νερού, προκειμένου να αντισταθμίσουν την οσμωτική απώλεια ιόντων και την παθητική είσοδο νερού, προσλαμβάνουν ιόντα μέσω των βραγχίων τους (Σχήμα 1.8^B) και αποβάλλουν μεγάλες ποσότητες αμμωνίας (Smith, 1930; Hoar & Randall, 1969; Moyle & Cech, 1982; Boeuf & Payan, 2001). Σε κάθε περίπτωση, τελικός σκοπός είναι η εξισορρόπηση της οσμωτικής διαφοράς ανάμεσα στο *milieu interieur* του οργανισμού και το εξωτερικό περιβάλλον. Η γενική εικόνα της οσμωρύθμισης έχει διαμορφωθεί, καθώς έχει αναγνωριστεί ο ρόλος των οργάνων και των ιστών που συμμετέχουν σ' αυτή και είναι: τα βράγχια, ο πεπτικός σωλήνας, οι νεφροί, η ουροδόχος κύστη και το συκώτι στα είδη που εκκρίνουν ουρία (Boeuf & Payan, 2001).

Στο θαλάσσιο περιβάλλον, ο ρόλος του πεπτικού σωλήνα στην απομάκρυνση των αλάτων του προσλαμβανόμενου νερού, έχει αποτελέσει αντικείμενο μιας σειράς μελετών οι οποίες έχουν καταλήξει σε ένα γενικά αποδεκτό μοντέλο · η απορρόφηση των μονοσθενών ιόντων (Na^+ , Cl^- , K^+) λαμβάνει χώρα κυρίως στον



(A) Οσμωρύθμιση σε ψάρια που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον.



(B) Οσμωρύθμιση σε ψάρια που διαβιούν στο γλυκό νερό.

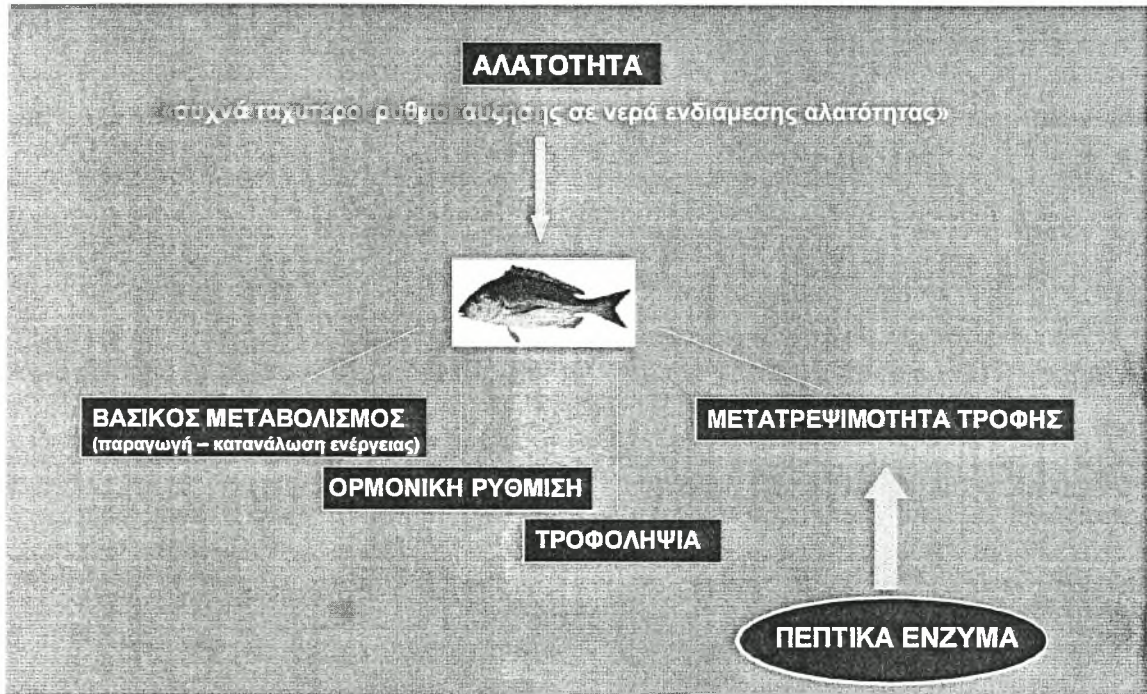
Σχήμα 1.8. Οσμωρύθμιση στους τελεόστεους.

οισοφάγο, το στομάχι συμπληρώνει τη δράση του οισοφάγου, το εντερικό επιθήλιο απομακρύνει ενεργά τα εναπομείναντα μονοσθενή ιόντα και έτσι το νερό στον εντερικό αυλό εμφανίζεται εμπλουτισμένο σε μαγνήσιο και θείο. Τα μονοσθενή ιόντα και το νερό που απορροφούνται από τα επιθηλιακά κύτταρα του πεπτικού σωλήνα αποβάλλονται στο εξωτερικό περιβάλλον μέσω των βραγχίων και της επιδερμίδας, ενώ τα δισθενή ιόντα μέσω των νεφρών (Smith, 1930; Shehadeh & Gordon, 1969; Smith et al., 1975; Kirsch & Meister, 1982; Cataldi et al., 1987; Movileanu et al., 1998; Ando et al., 2003).

Συχνά ταχύτερη ανάπτυξη και αύξηση των ψαριών παρατηρείται σε περιβάλλοντα ενδιάμεσης αλατότητας. Μεγάλος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι, τα θαλάσσια είδη παρουσιάζουν ταχύτερη ανάπτυξη ή/και αύξηση σε χαμηλότερες τιμές αλατότητας, ενώ τα είδη του γλυκού νερού σε μεγαλύτερες. Η πλειονότητα των ψαριών - τουλάχιστον σε κάποιο στάδιο της ζωής τους - προτιμούν τη διαβίωση σε συνθήκες ενδιάμεσης αλατότητας και έτσι συναντώνται σε λιμνοθάλασσες, εκβολικά και παράκτια οικοσυστήματα. Παρόλα αυτά, οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τις παραπάνω παρατηρήσεις (Σχήμα 1.9), αποτελούν ακόμη σήμερα θέμα συζήτησης και αντιπαραθέσεων, ενώ δεν αποκλείεται η ύπαρξη μιας πολλαπλής αιτιολογίας (Wu & Woo, 1983; McCormick et al., 1989; Lambert et al., 1994; Woo & Kelly, 1995; Claireaux & Lagardère, 1999; Boeuf & Payan, 2001; Le François et al., 2004).

Μέχρι πρόσφατα, επικρατούσε η άποψη ότι το ενεργειακό κόστος της οσμωρύθμισης ήταν σημαντικά μικρότερο σε συνθήκες ενδιάμεσης αλατότητας, εξαιτίας της ελάχιστης διαφοράς ανάμεσα στην οσμωτική πίεση του αίματος των ψαριών (300 mOsm l^{-1}) και το εξωτερικό περιβάλλον, ενώ η οσμωρύθμιση στο θαλασσινό νερό θεωρούνταν ως η πλέον ακριβή ενεργειακά διαδικασία (Boeuf & Payan, 2001). Πιο σύγχρονα αποτελέσματα, παρόλα αυτά, έδειξαν ότι το ενεργειακό κόστος της οσμωρύθμισης δε ξεπερνά το 10% του πάγιου τυπικού μεταβολισμού, ενώ είναι πιθανότερη μία αναδιάρθρωση του ενεργειακού μεταβολισμού τόσο στα οσμωρυθμιστικά όσο και στα μη οσμωρυθμιστικά όργανα (Boeuf & Payan, 2001; Sangiao-Alvarellos et al., 2003). Σήμερα, οι έρευνες - επικεντρωμένες κυρίως στη μελέτη της μεταφοράς NaCl από τα κύτταρα χλωρίου (chloride cells) των βραγχίων - έχουν να επιδείξουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Boeuf & Payan, 2001; Sampaio & Bianchini, 2002; Lin et al., 2004).

Επιπλέον, οι ταχύτεροι ρυθμοί αύξησης σε ενδιάμεσες τιμές αλατότητας έχουν αποδοθεί από πολλούς ερευνητές στην αυξημένη πρόσληψη τροφής, αλλά και στην



Σχήμα 1.9. Πιθανοί υπεύθυνοι μηχανισμοί για την εμφάνιση ταχύτερων ρυθμών αύξησης σε περιβάλλοντα ενδιάμεσης αλατότητας.

αποτελεσματικότερη μετατρεψιμότητα της (Ferraris et al., 1986; Boeuf & Payan, 2001). Παρόλα αυτά, ένας αριθμός ορμονών εμπλέκεται τόσο στην αύξηση όσο και στην οσμωρύθμιση των ψαριών (Boeuf & Payan, 2001). Η αυξητική ορμόνη - μέσω του GH/IGF-I άξονα - συμμετέχει στον εγκλιματισμό των ψαριών στο θαλάσσιο περιβάλλον, ενώ η προλακτίνη ελέγχει την προσαρμογή τους στο γλυκό νερό. Μια ακόμη ορμόνη που συμμετέχει στην οσμωρύθμιση είναι η κορτιζόλη, για την οποία όμως τα αποτελέσματα είναι επίσης αντιφατικά και μέσω της συνεργατικής δράσης της τόσο με την αυξητική ορμόνη όσο και με την προλακτίνη συμμετέχει στον εγκλιματισμό των ψαριών και στα δύο περιβάλλοντα, επιδεικνύοντας ένα διττό οσμωρυθμιστικό ρόλο (Mancera & McCormick, 1998; Boeuf & Payan, 2001; McCormick, 2001). Άλλες ορμόνες που εμπλέκονται στη διαδικασία της οσμωρύθμισης είναι οι ορμόνες του θυροειδούς, T₃ και T₄ (Boeuf & Payan, 2001).

Στην τσιπούρα, μεγάλος όγκος ερευνητικής δουλειάς έχει αφιερωθεί στη μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στα κύτταρα της αδενούπόφυσης (Mancera et al., 1993b, 1995), στα κύτταρα της αυξητικής ορμόνης (Mancera et al., 1995), στο περιεχόμενο και την όσμωση στο πλάσμα αίματος (Mancera et al., 1993a, 1994; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Laiz-Carrion et al., 2005), στον ενεργειακό μεταβολισμό (Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Laiz-Carrion et al., 2005), στην πρόσληψη τροφής και τη μετατρεψιμότητα της (Klaoudatos & Conides, 1996), στην αύξηση (Klaoudatos & Conides, 1996; Laiz-Carrion et al., 2005) και στην επιβίωση των ατελών ιχθυδίων (Tandler et al., 1995; Koven et al., 2003) επιβεβαιώνοντας τον ισχυρό ευρύαλο χαρακτήρα του είδους. Οι Klaoudatos & Conides (1996) ανέφεραν την 28% ως βέλτιστη αλατότητα για την τσιπούρα (1,9 g) βασιζόμενοι στην υψηλή πρόσληψη τροφής και την αποδοτικότερη μετατρεψιμότητα της. Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη (Laiz-Carrion et al., 2005), ταχύτεροι ρυθμοί αύξησης ατόμων τσιπούρας 20 g παρατηρήθηκαν σε αλατότητα 12% - χωρίς αυτό να αποδίδεται σε μειωμένους μεταβολικούς ρυθμούς - σε σύγκριση με το θαλασσινό νερό.

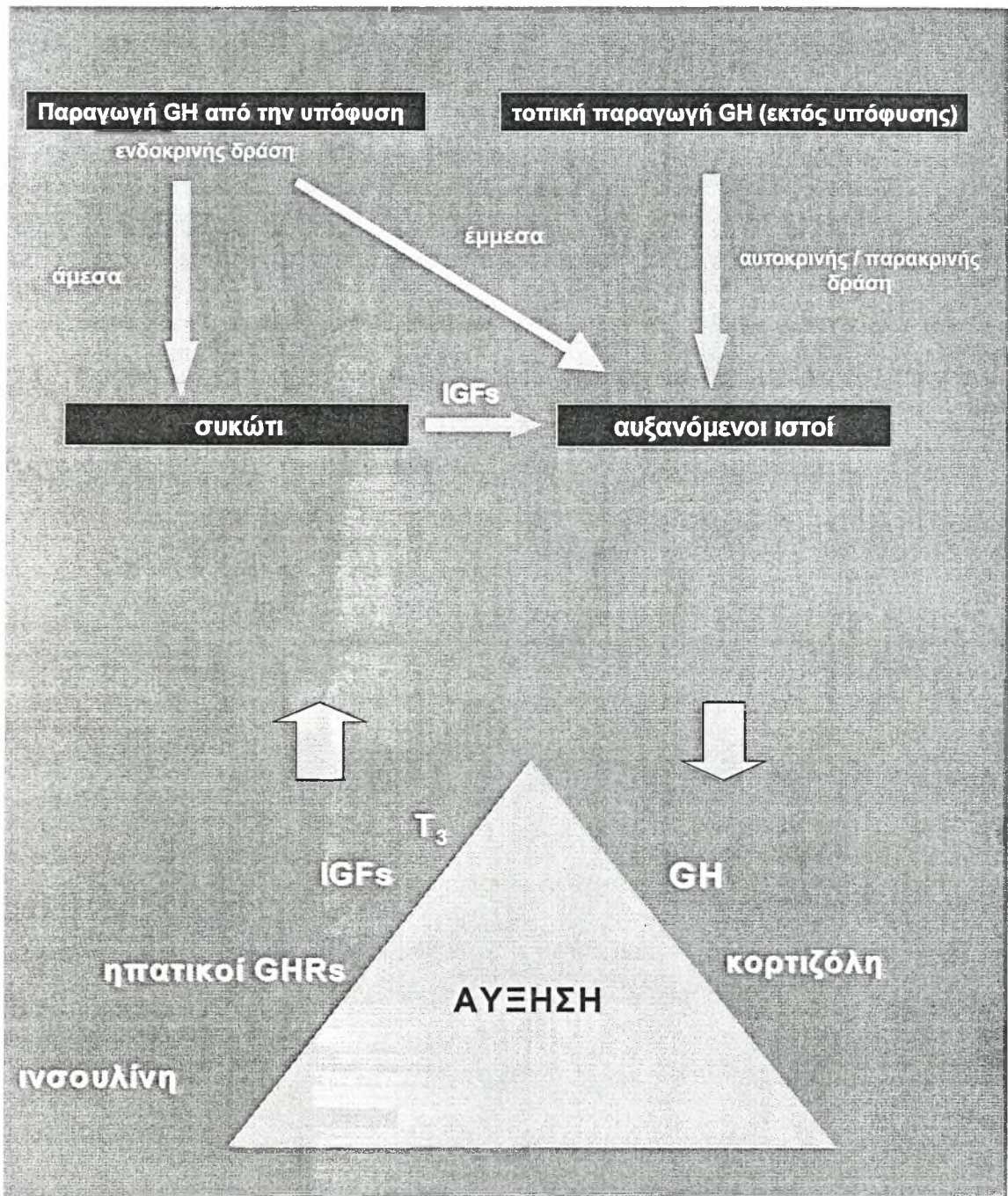
Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα αντικρουόμενα αποτελέσματα των ερευνών - όσον αφορά τους μηχανισμούς που ελέγχουν τον εγκλιματισμό των ψαριών σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας - μπορούν να αποδοθούν στις διαφορετικές πειραματικές συνθήκες και τα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών, ενώ είναι πιθανή η αλληλεπίδραση της αλατότητας με άλλες παραμέτρους - όπως είναι η θερμοκρασία και η διατροφή (Klaoudatos & Conides, 1996; Nordrum et al., 2000; Boeuf & Payan, 2001; Imsland et al., 2001; Krogdahl et al., 2004). Επιπλέον, στις εργασίες που

περιλαμβάνουν αφνίδια μεταφορά των ψαριών από το ένα περιβάλλον στο άλλο, είναι δύσκολος ο διαχωρισμός των παρατηρούμενων φυσιολογικών αλλαγών ανάμεσα σε αυτές που αποτελούν στρεσσική αντίδραση και αυτές που αποτελούν καθαρό αποτέλεσμα της μεταβολής της αλατότητας, ιδιαίτερα καθώς η περίοδος προσαρμογής του οργανισμού στο νέο περιβάλλον διαρκεί μόνο λίγες μέρες ή ακόμη ώρες (Franklin et al., 1992; Mancera et al., 1993b; Kelly & Woo, 1999; Marshall et al., 1999).

1.5 ΟΡΜΟΝΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ: ΑΥΞΗΤΙΚΗ ΟΡΜΟΝΗ ΚΑΙ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗ

Η επικοινωνία και η συνεργασία μεταξύ των οργάνων και των ιστών, αλλά και η μεταφορά των ερεθισμάτων από το εξωτερικό περιβάλλον, επιτυγχάνονται με τη λειτουργία του νευρικού και ενδοκρινικού συστήματος, τα οποία με τη σειρά τους συνεργάζονται και αλληλεπιδρούν. Από τους σημαντικότερους αντιπροσώπους του ενδοκρινικού συστήματος είναι η αυξητική ή σωματοτρόπος ορμόνη (GH) και η κορτιζόλη, δύο ορμόνες που επιδεικνύουν πολυδύναμη δράση και διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο σε μια σειρά φυσιολογικών λειτουργιών (Hoar & Randall, 1969; Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999; McCormick, 2001).

Η αυξητική ορμόνη εκκρίνεται από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης - μετά τη δράση του εκλυτικού της παράγοντα (GHRF) - και δρα, κυρίως στο ήπαρ, μέσω της σύνδεσης της στους εκλεκτικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς της (GHR). Υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης έχουν εντοπισθεί σε όλους τους ιστούς που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα, συμπεριλαμβανομένων του εντέρου και των βραγχίων (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999; Björnsson et al., 2002). Η σωματοτρόπος δράση της αυξητικής ορμόνης πραγματοποιείται με τη διαμεσολάβηση της ηπατικής παραγωγής του ενδοκρινούς IGF-I, αυξητικού παράγοντα παρόμοιου της ινσουλίνης, δημιουργώντας έτσι τον λεγόμενο σωματοτροπικό άξονα GH/IGF-I (Σχήμα 1.10). Η μείωση των ηπατικών υποδοχέων της αυξητικής ορμόνης και της συγκέντρωσης IGF-I στο κυκλοφορικό σύστημα είναι χαρακτηριστικά καταβολικών καταστάσεων, τα οποία αυξάνουν τη συγκέντρωση της στο αίμα, πιθανόν λόγω της έλλειψης αρνητικής ανάδρασης από τον IGF-I στην έκκριση της από την υπόφυση ή/και την αύξηση της πρόσδεσης της στις ειδικές πρωτεΐνες-φορείς της αυξητικής ορμόνης (GHBP), οι οποίες βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος. Η ανθεκτικότητα της αυξητικής ορμόνης (υψηλά επίπεδα στο πλάσμα αίματος) αποτελεί ένα μηχανισμό προσαρμογής του οργανισμού σε συνθήκες αστίας, προσφέροντας διαθέσιμα μεταβολικά καύσιμα, ενώ



Σχήμα 1.10. Αύξηση, ενδοκρινής και παρακρινής δράση της αυξητικής ορμόνης.

ταυτόχρονα προστατεύει τα ενεργά διατρεφόμενα ψάρια από τη συσσώρευση λίπους (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999; Pérez-Sanchez, 2000; Company et al., 2001; Björnsson et al., 2002; Pierce et al., 2005; Reinecke et al., 2005). Πιο σύγχρονες μελέτες, παρόλα αυτά, έχουν δείξει ότι η αυξητική ορμόνη μπορεί να επιδρά άμεσα στους αυξανόμενους ιστούς οδηγώντας στην τοπική παραγωγή και δράση του IGF-I (Σχήμα 1.10), ιδιαίτερα στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια των ψαριών (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999). Επιπλέον, στην αυξητική ορμόνη των ψαριών έχει αποδοθεί ένας πιο σύνθετος και πολυδιάστατος ρόλος, καθώς συμμετέχει σε πολλές μη σωματοτροπικές διαδικασίες, όπως είναι η οσμωρύθμιση, ο μεταβολισμός των πρωτεϊνών, των λιπιδίων και των υδατανθράκων, η αναπαραγωγή και η ανοσοποιητική δράση, ενώ ταυτόχρονα επηρεάζει πολλές πτυχές της συμπεριφοράς των ψαριών, όπως είναι η όρεξη και η επιθετικότητα (Bern & Madsen, 1992; Björnsson et al., 2002; Reinecke et al., 2005).

Η κορτιζόλη εκκρίνεται από το διανεφρικό ιστό των ψαριών και δρα τόσο ως γλυκοκορτικοειδές όσο και ως αλατοκορτικοειδές. Άμεσα ή/και έμμεσα διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στον ενδιάμεσο μεταβολισμό, την ιοντική και οσμωτική ρύθμιση, το στρες, την αύξηση, και την ανοσοποιητική δράση (Laiz-Carrion et al., 2002). Ως γλυκοκορτικοειδές i) αυξάνει τη γλυκονεογένεση, ii) μειώνει τη χρήση γλυκόζης, iii) ανταγωνίζεται τη δράση της ινσουλίνης, iv) κινητοποιεί το αποθηκευμένο λίπος, v) αυξάνει τον καταβολισμό των πρωτεϊνών και vi) έχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Ως αλατοκορτικοειδές συμμετέχει στη ρύθμιση της ισορροπίας ιόντων νατρίου, χλωρίου, καλίου, ασβεστίου και φωσφόρου στον οργανισμό (Hoar & Randall, 1969). Επιπλέον, η κορτιζόλη δρα σε πολλά οσμωρυθμιστικά όργανα όπως τα βράγχια, το έντερο, οι νεφροί και η ουροδόχος κύστη, διατηρώντας - όπως προαναφέρθηκε - ένα διττό οσμωρυθμιστικό ρόλο σε συνεργασία με την αυξητική ορμόνη ή την προλακτίνη (Franklin et al., 1992; Marshall et al., 1999; McCormick, 2001; Koven et al., 2003; Laiz-Carrion et al., 2002; Laiz-Carrion et al., 2003). Πολλοί ερευνητές, ακόμη, χρησιμοποιούν τη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα του αίματος των ψαριών ως δείκτη στρεσοκικής κατάστασης (McCormick, 2001).

Αξίζει να αναφερθεί, ότι η σύγχρονη έρευνα έχει επικεντρωθεί στη μελέτη της επίδρασης μιας σειράς εξωγενών και ανασυνδιασμένων μορφών ορμονών σε διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών, κυρίως όσον αφορά το μεταβολισμό και την αύξηση, προσπαθώντας να ανιχνεύσει και να ερμηνεύσει την ύπαρξη

πιθανών μηχανισμών δράσης και αλληλεπίδρασης (*rbGH*, *bGH*, *oGH*: Leedom et al., 2002; κορτιζόλη - *Sparus aurata*: Laiz-Carrion et al., 2003; *bGH*: Peterson et al., 2004; *oGH* - *Sparus aurata*: Sangiao-Alvarellos et al., 2005). Όσον αφορά την αυξητική ορμόνη, η χορήγηση αυξημένων δόσεων και η αύξηση της συγκέντρωσης της στην περιφερειακή κυκλοφορία, επιδρά θετικά στην όρεξη (Jönsson et al., 2003), την πρόσληψη τροφής (Silverstein et al., 1999; Peterson et al., 2004; *Sparus aurata*: Vega-Rubin de Celis et al., 2004), την απορρόφηση των αμινοξέων από το εντερικό επιθήλιο (Collie & Stevens, 1985; Sun & Farmanfarmaian, 1992), τη μετατρεψιμότητα της τροφής (Sun & Farmanfarmaian, 1992) και την πρωτεϊνοσύνθεση (Foster et al., 1991).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι :

- ✓ η ανάπτυξη κατάλληλων μοριακών εργαλείων μέσω της απομόνωσης και κλωνοποίησης των μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, την *in silico* περιγραφή των αντιστοίχων γονιδίων τους, τη μελέτη της έκφρασής τους κατά την ανάπτυξη και την ιστοειδική κατανομή τους
- ✓ η μελέτη της επίδρασης της αλατότητας στη δραστικότητα και τη σχετική παρουσία μιας σειράς πεπτικών πρωτεασών στα διαφορετικά τμήματα του πεπτικού σωλήνα
- ✓ η μελέτη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στη σχετική έκφραση και τη δραστικότητα των κυριότερων πεπτικών πρωτεασών
- ✓ η συσχέτιση των επιπέδων κορτιζόλης με διαφορετικά καθεστώτα αυξητικής ορμόνης και τα επίπεδα έκφρασης των κύριων πεπτικών ενζύμων στο ευρύαλο τελεόστεο είδος *Sparus aurata* (κοινώς τσιπούρα).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η πραγματοποίηση της παρούσας διατριβής περιέλαβε τέσσερις εργαστηριακές ενότητες (i) την κλωνοποίηση και το χαρακτηρισμό των μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, (ii) τον έλεγχο της έκφρασης τους, (iii) τη μελέτη της ενζυμικής δραστηρότητας τους και (iv) τη μέτρηση κορτιζόλης στο αίμα των ψαριών.

2.1 ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΩΝ ΖΥΜΟΓΟΝΩΝ

Απομόνωση μεταγράφων

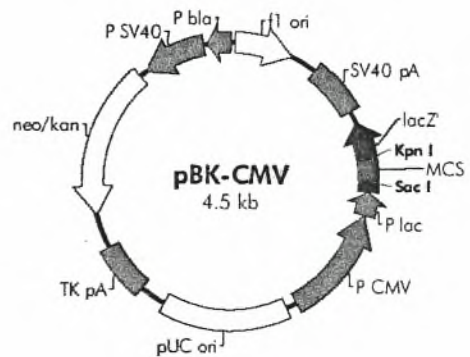
cDNA τσιπούρας για μορφές χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, προήλθε από βιβλιοθήκη cDNA ήπατος, που κατασκευάστηκε στα πλαίσια ενός EST προγράμματος (Sarroroulou et al., 2005). Εν συντομία: μια βιβλιοθήκη cDNA δημιουργήθηκε από 5 µg mRNA ήπατος ώριμου ψαριού σύμφωνα με τις οδηγίες που συνοδεύουν το εμπορικό προϊόν Lambda Uni-ZAP XR cloning kit (Stratagene, La Jolla, USA). Οι αποικίες απομονώθηκαν με εκτομή και η εξαγωγή των κοσμιδίων πραγματοποιήθηκε με ρομποτικό σύστημα (BIOMEK 2000), με τη χρήση του QIAprep 96 Turbo BioRobot Kit. Η αλληλούχηση των 5' UTR και 3' UTR άκρων έγινε χρησιμοποιώντας τους εκκινητές T7 και T3 που προτείνονται για τον φορέα pBK-CMV (Σχήμα 2.1) .

Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων

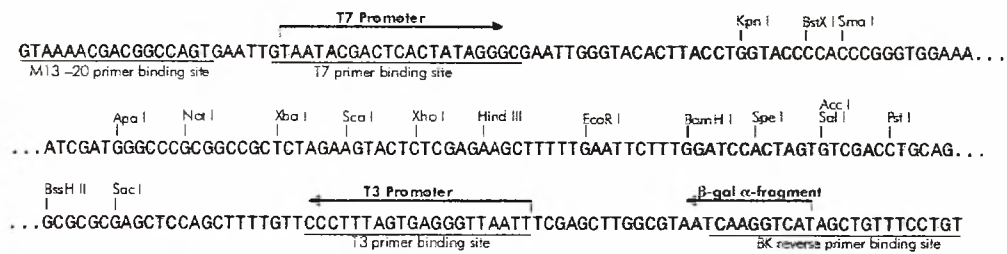
Με τη διαδικασία της κλωνοποίησης γίνεται δυνατή η εισαγωγή τμημάτων DNA, οποιασδήποτε πηγής, σε ειδικούς φορείς κλωνοποίησης (πλασμίδια, βακτηριοφάγους, κοσμίδια ή τεχνητά χρωμοσώματα ζυμομύκητα) και η ανάπτυξη τους σε κύτταρα βακτηρίων ή ζύμης, ώστε να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων του εισαγόμενου DNA. Στην παρούσα εργασία, ως φορέας του εισαγόμενου cDNA χρησιμοποιήθηκε το κοσμίδιο pBK-CMV (Stratagene, La Jolla, USA) και η εισαγωγή και πολλαπλασιασμός του σε βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRF' περιγράφεται παρακάτω:

- Δημιουργία αρχικής υγρής καλλιέργειας 5 ml σε LB Broth με επώαση στους 37 °C για 16 h.

f1 origin 24–330
SV40 polyA 469–750
β-galactosidase α-fragment 812–1183
multiple cloning site 1015–1122
lac promoter 1184–1305
CMV promoter 1306–1895
pUC origin 1954–2621
HSV-TK polyA 2760–3031
neomycin/kanamycin resistance ORF 3209–4000
SV40 promoter 4035–4373
bla promoter 4392–4518



pBK-CMV Multiple Cloning Site Region
(sequence shown 952–1196)



Σχήμα 2.1. Ο φορέας pBK-CMV. Η πλήρης αλληλουχία καθώς και οι θέσεις περιορισμού είναι διαθέσιμα στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.stratagene.com>.

- Τα μητρικά κύτταρα διατηρούνταν σε καλλιέργειες LB Agar που περιείχαν 12,5 µg/ml τετρακυκλίνης στους 4 °C, καθώς και σε αντίστοιχα αποθέματα γλυκερόλης στους -80 °C.

- ✓ Ανανέωση της υγρής καλλιέργειας με επιμόλυνση 5 ml LB Broth με 200 µl κυττάρων της αρχικής καλλιέργειας και λήψη των κυττάρων στην εκθετική φάση αύξησης τους μετά από 3-4 h επώασης στους 37 °C.
- ✓ Συλλογή των κυττάρων με φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 min στους 4 °C.
- ✓ Επαναιώρηση των κυττάρων σε 2,5 ml CaCl₂ 0,1 M και επώαση τους για 30 min στους 0-4 °C. Το CaCl₂ συντελεί στη διάρρηξη των βακτηριακών τοιχωμάτων ώστε να εισέλθει ο ανασυνδυασμένος φορέας. .
- ✓ Συλλογή κυττάρων με φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 5 min στους 4 °C.
- ✓ Επαναιώρηση των κυττάρων σε 0,5 ml CaCl₂ 0,1 M και επώαση τους για 1 h στους 0-4 °C.
- ✓ Ανάμιξη 200 µl κυττάρων με 3 µl ανασυνδυασμένου φορέα και επώαση τους για 35 min σε πάγο.
- ✓ Θερμικό σοκ στους 42 °C για 2 min.
- ✓ Επίστρωση σε στρόγγυλα τριβλία που περιείχαν LB Agar, 0,5 mM IPTG, 80 µg/ml X-Gal και 50 µg/ml καναμυκίνη κι επώαση για 16 h στους 37 °C. Η χρήση των IPTG και X-Gal βοηθά στη διάκριση κυττάρων που έχουν προσλάβει τον ανασυνδυασμένο φορέα και τα οποία είναι επιλεκτικά ανθεκτικά στο αντιβιοτικό καναμυκίνη. Τα επιτυχώς μετασηματισμένα κύτταρα δεν παράγουν τη β-γαλακτοσιδάση, με αποτέλεσμα να μην αντιδρούν με την άχρωμη ουσία X-Gal δίνοντας λευκές αποικίες -έναντι κυανών που δίνουν τα κύτταρα τα οποία δεν περιέχουν τον ανασυνδυασμένο φορέα.
- ✓ Απομόνωση λευκών βακτηριακών αποικιών με αποστειρωμένο ρύγχος και επιμόλυνση 5 ml LB Broth περιεκτικότητας 50 µl/ml σε καναμυκίνη.
- ✓ Επώαση στους 37 °C για 16 h για την παρασκευή minipreps.

Προετοιμασία minipreps

Για την παρασκευή minipreps, χρησιμοποιήθηκε το εμπορικό προϊόν FastPlasmid Mini kit (Eppendorf, Hamburg, Germany) με τεχνολογία που επιτρέπει τη χρήση ενός μόνο διαλύματος για την επαναιώρηση των κυττάρων, τη λύση τους και τη δέσμευση του DNA σε στερεή φάση. Το δεσμευμένο DNA ξεπλένονταν με ρυθμιστικό διάλυμα ισοπροπανόλης και εκλούονταν με ένα χαμηλής περιεκτικότητας

σε άλατα διάλυμα, ώστε να είναι άμεσα διαθέσιμο για την ενίσχυση του με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ή την αλληλούχιση του.

Αλληλούχιση τμημάτων cDNA

Η αλληλούχιση κάθε επιλεγμένου κλώνου (mini-prep) πραγματοποιούνταν επί πέντε φορές και από τις δύο κατευθύνσεις του υπό μελέτη τμήματος cDNA (ABI 3730 XL, Macrogen Inc). Οι πλήρεις αλληλουχίες των μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για την αναζήτηση νέων πληροφοριών στις υπάρχουσες βάσεις δεδομένων και την κατασκευή δενδρογραμμάτων.

Αναζήτηση σε βάσεις δεδομένων και *in silico* ανάλυση

Το γονιδίωμα του *Tetraodon nigroviridis* ([http://www.genoscope.cns.fr/released February 2004](http://www.genoscope.cns.fr/released%20February%202004)), του *Takifugu rubripes* ([http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/scaffolds released 17/05/02](http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk/scaffolds%20released%2017/05/02)), του *Danio rerio* (<http://www.sanger.ac.uk>), του *Oryzia latipes* (<http://mbase.bioweb.ne.jp/>), του *Salmo salar* (<http://www.salmongenome.no>), καθώς και της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (<http://est.molgen.mpg.de/FishShellfish>, Marine Genomics unpublished), εξερευνήθηκαν με το πρόγραμμα TBLASTX, χρησιμοποιώντας τις προκύπτουσες πλήρεις αλληλουχίες χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου τσιπούρας, με σκοπό την αναγνώριση και ταυτοποίηση των θεωρούμενων ομόλογων γονιδίων. Τα ικριώματα, που αναγνωρίστηκαν, ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων και η κωδικοποιούσα περιοχή των ταυτοποιημένων γονιδίων εντοπίστηκε με τη βοήθεια κοινών (consensus) αλληλουχιών ματίσματος AG/GT, που χαρακτηρίζουν τα όρια ιντρονίων/εξονίων. Οι αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και αμινοξέων, που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση συγκριτικών και φυλογενετικών αναλύσεων, μαζί με προηγούμενα δημοσιευμένες αντίστοιχες αλληλουχίες χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου (Πίνακας 2.1) που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Συγκριτική και φυλογενετική ανάλυση

Η σύγκριση με τη γονιδιακή οργάνωση του *Takifugu* και του Ανθρώπου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος «Human Synteny Map», της

Πίνακας 2.1^Α. Κατάλογος των αριθμών εισόδου για τα γονίδια θρυψινογόνου που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (NCBI)

	Αριθμός εισόδου	Κλάση	Βιβλιογραφική αναφορά
Ιχθύες			
<i>Petromyzon marinus</i> A1	AF011352	Petromyzontiformes	Roach et al. (1997)
<i>Anguilla japonica</i>	AB070720	Anguilliformes	Kurokawa et al. (2002)
<i>Engraulis japonicus</i>	AB041929	Clupeiformes	Ahsan et al. (2001)
<i>Engraulis japonicus</i> II	AB041930	Clupeiformes	Ahsan et al. (2001)
<i>Pangasius hypophthalmus</i>	AY316360	Siluriformes	Moreau et al. (2003) Direct submission
<i>Salmo salar</i> I	X70075	Salmoniformes	Male et al. (1995)
<i>Salmo salar</i> II	X70073	Salmoniformes	Male et al. (1995)
<i>Salmo salar</i> III	X70074	Salmoniformes	Male et al. (1995)
<i>Gadus morhua</i> I	X76886	Gadiformes	Gudmundsdottir et al. (1993)
<i>Gadus morhua</i> X	X76887	Gadiformes	Gudmundsdottir et al. (1993)
<i>Gadus morhua</i> Y	AJ459311	Gadiformes	Spilliaert & Gudmundsdottir (1999)
<i>Tautogolabrus adspersus</i>	AY496969	Perciformes	Macouzet et al. (2003)
<i>Paranotothenia magellanica</i>	X82223	Perciformes	Genicot et al. (1996)
<i>Dissostichus mawsoni</i>	U58945	Perciformes	Chen et al. (1997)
<i>Notothenia coriiceps</i>	AF134323	Perciformes	Cheng & Chen (1999)
<i>Paralichthys olivaceus</i> 1	AB029750	Pleuronectiformes	Suzuki et al. (2002)
<i>Paralichthys olivaceus</i> 2	AB029751	Pleuronectiformes	Suzuki et al. (2002)
<i>Paralichthys olivaceus</i> 3	AB029752	Pleuronectiformes	Suzuki et al. (2002)
<i>Pleuronectes platessa</i>	X56744	Pleuronectiformes	Leaver (1990) Direct submission
<i>Pleuronectes americanus</i> 1	AF012462	Pleuronectiformes	Douglas & Gallant (1998)
<i>Pleuronectes americanus</i> 2	AF012463	Pleuronectiformes	Douglas & Gallant (1998)
<i>Takifugu rubripes</i>	U25747	Tetraodontiformes	Wang et al. (1995) Direct submission
Αμφίβια			
<i>Xenopus laevis</i>	U72330	Anure	Wang et al. (1996) Direct submission
Πτηνά			
<i>Gallus gallus</i> 2	U15157	Galliformes	Wang et al. (1995)

	Αριθμός εισόδου	Κλάση	Βιβλιογραφική αναφορά
Θηλαστικά			
<i>Rattus norvegicus</i> I	L00130	Rodentia	McDonald et al. (1982)
<i>Rattus norvegicus</i> II	L00131	Rodentia	McDonald et al. (1982)
<i>Rattus norvegicus</i> cationic	NM173127	Rodentia	Fletcher et al. (1987)
<i>Mus musculus</i> 3	NM011645	Rodentia	Stevenson et al. (1986)
<i>Mus musculus</i> 10	NM001003664	Rodentia	Puente et al. (2003)
<i>Bos taurus</i> anionic	X54703	Ruminantia	Le Huerou et al. (1990)
<i>Canis sp</i> anionic	M11589	Carnivora	Pinsky et al. (1985)
<i>Canis sp</i> cationic	M11590	Carnivora	Pinsky et al. (1985)
<i>Homo sapiens</i> 1	NM002769	Primates	Honey et al. (1984)
<i>Homo sapiens</i> 2	NM002770	Primates	Figarella et al. (1975)
<i>Homo sapiens</i> 3	NM002771	Primates	Rinderknecht et al. (1984)

Πίνακας 2.1^B. Κατάλογος των αριθμών εισόδου για τα γονίδια χυμοθρυψινογόνου που ανακτήθηκαν από τη βάση δεδομένων GenBank (NCBI)

	αριθμός εισόδου	κλάση	βιβλιογραφική αναφορά
Ιχθύες			
<i>Danio rerio</i> B1	BC055574	Cypriniformes	Strausberg et al. (2002)
<i>Gadus morhua</i>	X78490	Gadiformes	Gudmundsdottir et al. (1994)
<i>Gadus morhua</i> B	AJ242521	Gadiformes	Spilliaert & Gudmundsdottir (2000)
<i>Paralichthys olivaceus</i> 1	AB029753	Pleuronectiformes	Suzuki et al. (2002)
<i>Paralichthys olivaceus</i> 2	AB029754	Pleuronectiformes	Suzuki et al. (2002)
Αμφίβια			
<i>Xenopus laevis</i> 2	BC056849	Anura	Klein et al. (2002)
Θηλαστικά			
<i>Rattus norvegicus</i> B	NM012536	Rodentia	Bell et al. (1984)
<i>Mus musculus</i> B1	NM025583	Rodentia	Watanabe & Tomita (1974)
<i>Canis lupus</i>	K01173	Carnivora	Pinsky et al. (1983)
<i>Homo sapiens</i> B1	NM001906	Primates	Geuze et al. (1979)

βάσης δεδομένων του *Takifugu* (<http://fugu.hgmp.mrc.ac.uk>), ενώ τα γονίδια που περιέχονται στα χρωμοσώματα του ανθρώπου μελετήθηκαν μέσω του προγράμματος «MapView» της βάσης δεδομένων NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Οι προκύπτουσες και συναγόμενες αλληλουχίες αμινοξέων ομοπαράτέθηκαν με τη χρήση του προγράμματος Clustal W (Thompson et al., 1997) και το ποσοστό ταύτισης τους υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος GeneDoc (www.psc.edu/biomed/genedoc).

Η φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο UPGMA χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα MEGA 3.1 (Kumar et al., 2004). Για τον καθορισμό των ορίων εμπιστοσύνης έγινε χρήση της μεθόδου bootstrap, η οποία υπολογίζει τα επίπεδα αξιοπιστίας στους κλάδους του φυλογενετικού δένδρου, κατασκευάζοντας μια σειρά από νέες μητρες δεδομένων επιλέγοντας N τυχαία δεδομένα από την αρχική μήτρα.

2.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Ο έλεγχος της έκφρασης των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Northern Blot, η οποία βασίζεται στη μεταφορά τμημάτων RNA από μία πηκτή σε μία στερεή φάση, μέσω τριχοειδών κινήσεων. Η ακριβής εκτίμηση του μεγέθους των μεταγράφων επιτυγχάνεται διατηρώντας το RNA σε πλήρως αποδιαταγμένη κατάσταση κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε μηχανικά, από δείγματα ιστών ή ολόκληρων προνυμφών, τα οποία διατηρήθηκαν σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (*RNAlater*) που εξασφαλίζει για 24 h τουλάχιστον τη μη αποικοδόμηση του ευαίσθητου RNA σε θερμοκρασία δωματίου. Η απομόνωση έγινε με τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος TRI Reagent, ενός φαινολικού διαλύματος για την απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση χλωροφορμίου και ισοπροπανόλης. Τα δείγματα RNA που προέκυψαν διατηρήθηκαν στους -80 °C.

Για την εξασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας RNA, όλη η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων και ηλεκτροφόρησης, που ακολούθησε, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διπλά αποστειρωμένων υλικών και DEPC ddH₂O για την καταστροφή των υπαρχόντων νουκλεασών.

Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων RNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 1,5% και ρυθμιστικό διάλυμα 1x MOPS, ενώ προηγούνταν «τρέξιμο» της πηκτής για 1 h στα 3 Volts/cm. Η κύρια ηλεκτροφόρηση πραγματοποιούνταν για 3-4 h στα 4 Volts/cm, έτσι ώστε να μην αλλοιωθεί η ποιότητα του RNA.

Πριν την τοποθέτηση του αποδιαταγμένου RNA στην πηκτή, λάμβανε χώρα ανάδευση του ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης, καθώς η φορμαλδεΰδη προκαλεί βαθμιδώσεις που δυσχεραίνουν την ομαλή κίνηση των δειγμάτων.

Σε κάθε διαδικασία ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνταν κατάλληλος μάρτυρας (RNA Marker) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των μεταγράφων.

Αποδιάταξη δειγμάτων RNA

Η απαιτούμενη πλήρης αποδιάταξη του RNA επιτυγχάνονταν με τη χρήση φορμαλδεΰδης όπως αναφέρεται παρακάτω:

- ✦ Φυγοκέντριση των δειγμάτων ολικού RNA στις 12000 rpm για 15 min στους 4 °C, διάλυση σε κατάλληλο όγκο DEPC ddH₂O και προσδιορισμό της περιεκτικότητας σε RNA με φωτομέτρηση.
- ✦ Λήψη όγκου δείγματος που περιείχε 5 μg RNA και προσαρμογή στα 5 μl με την προσθήκη DEPC ddH₂O.
- ✦ Πρόσθεση σε κάθε δείγμα 15 μl αποδιατακτικού διαλύματος και επώαση στους 65 °C για 10 min.
- ✦ Μεταφορά στους 0-4 °C για 2 min και ταχεία φυγοκέντριση.
- ✦ Πρόσθεση σε κάθε δείγμα 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος πλήρωσης (6x) και ταχεία φυγοκέντριση για απόληψη όλου του υλικού.

Διαδικασία τριχοειδούς μεταφοράς RNA (blotting)

Τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης ακολουθούσε η μεταφορά του RNA από την πηκτή στη μεμβράνη υβριδισμού, όπως περιγράφεται παρακάτω:

- ✦ Φωτογράφιση της πηκτής και έλεγχος της ποιότητας των δειγμάτων · καθώς το σήμα 28S RNA : 18S RNA πρέπει να είναι περίπου 2:1.
- ✦ Ξέπλυμα της πηκτής με DEPC ddH₂O για απομάκρυνση της φορμαλδεΰδης.
- ✦ Εξισορρόπηση της πηκτής για 10 min σε διάλυμα αλάτων 10x SSC, το οποίο αποτελεί το μέσο κίνησης του RNA από την πηκτή στη μεμβράνη υβριδισμού.

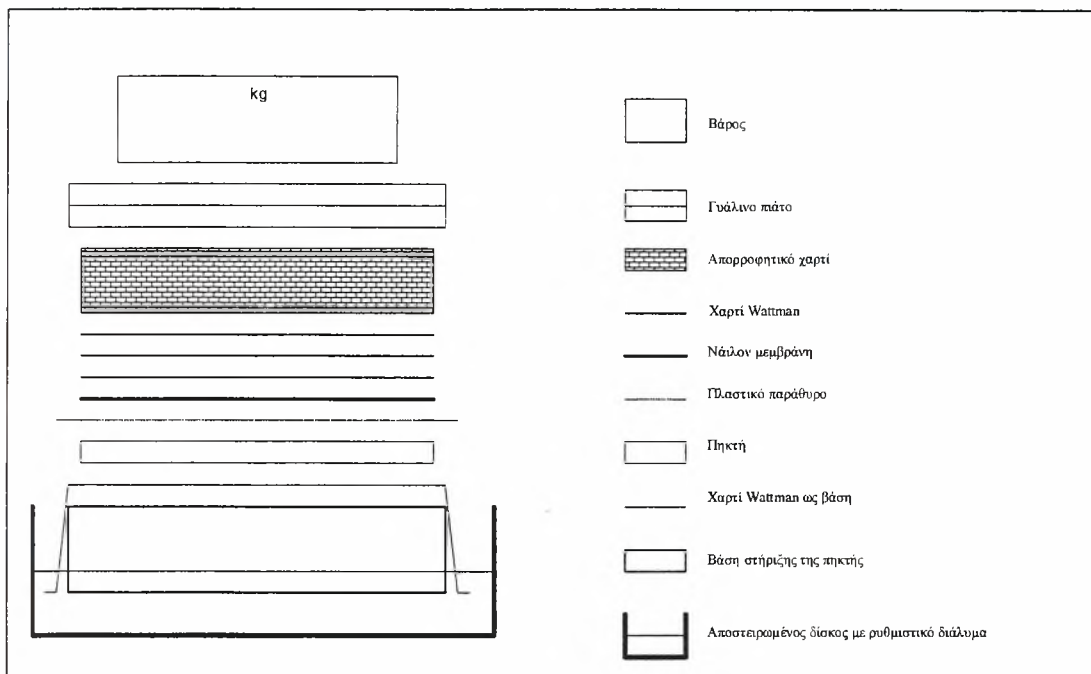
- Σε ένα δίσκο, που περιείχε διάλυμα 10x SSC, και πάνω σε μια βάση με χαρτί Watman στηρίζονταν η πηκτική, σε ανάστροφη θέση. Επάνω τοποθετούνταν το λεγόμενο «πλαστικό παράθυρο», προκειμένου να αποφευχθεί κίνηση του RNA από τα πλάγια, και στη συνέχεια η νάλον μεμβράνη Hybond-N (Amersham Biosciences, Freiberg, Germany), η οποία αποτελεί και τη στερεή φάση προσκόλλησης του. Μετά την τοποθέτηση τριών χαρτιών Watman, επάνω από τη μεμβράνη, προσθέτονταν απορροφητικό χαρτί και εφαρμόζονταν βάρος περίπου 1 kg (Σχήμα 2.2). Σε όλη τη διαδικασία αποφεύγονταν η ύπαρξη αέριων φυσαλίδων ανάμεσα στα υλικά, καθώς αυτή θα εμπόδιζε την τριχοειδή κίνηση του RNA.
- Η μεταφορά του RNA ολοκληρώνονταν σε 16-20 h και στη η σταθεροποίηση του στη μεμβράνη πραγματοποιούνταν με θέρμανση στους 80 °C για 2 h.

Προετοιμασία μορίων-ανιχνευτών

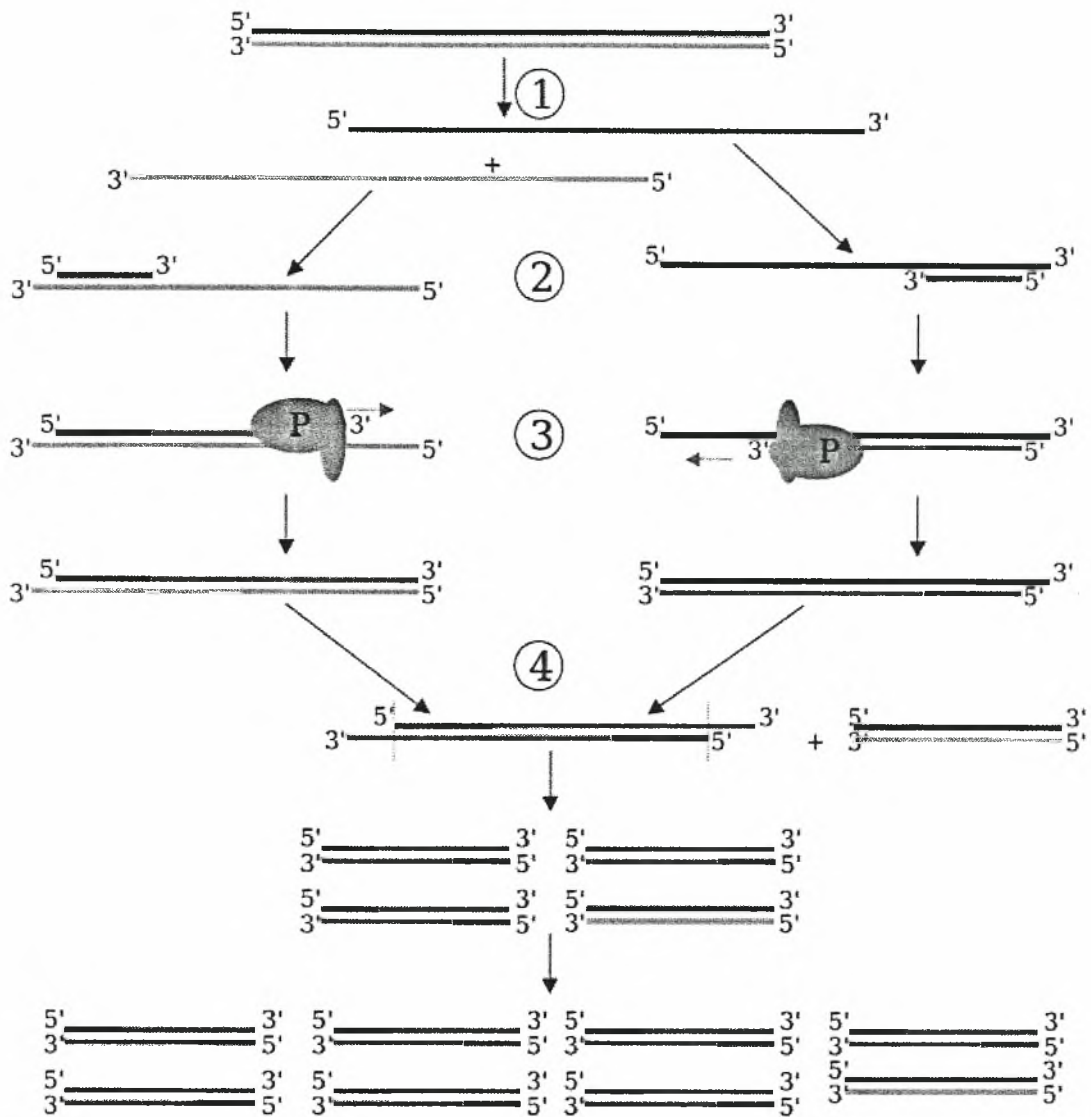
Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων τμημάτων DNA, με τη χρήση δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, οι οποίοι δρουν ως εκκινητές και οριοθετούν τα άκρα του τελικού ενισχυμένου τμήματος (Σχήμα 2.3). Στην παρούσα εργασία, για τον πολλαπλασιασμό των εισαγόμενων τμημάτων cDNA, χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα οι εκκινητές T7 και T3 που αναφέρονται για το φορέα pBK-CMV (Σχήμα 2.1).

Οι βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των εισαγόμενων τμημάτων cDNA, που αντιστοιχούσαν στην πλήρη αλληλουχία μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, παρουσιάζονται στον πίνακα 2.2, ενώ στον πίνακα 2.3 δίνονται οι παράμετροι του προγράμματος που χρησιμοποιήθηκε.

Σε περιπτώσεις, που απαιτούνταν, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των ενισχυμένων τμημάτων cDNA από ζώνες TAE πηκτικής αγαρόζης, με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham Biosciences, Freiberg, Germany), το οποίο συντελεί στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, τη διάλυση της αγαρόζης και τη δέσμευση του δίκλωνου DNA σε γυάλινη ινώδη μήτρα. Μετά τη δέσμευση του DNA, τα υπάρχοντα άλατα και πρωτεΐνες ξεπλένονταν και το καθαρό προϊόν, που λαμβάνονταν με ένα χαμηλής ιονικής ισχύος ρυθμιστικό διάλυμα, μπορούσε άμεσα να αναλυθεί περαιτέρω με αλληλούχιση και να χρησιμοποιηθεί ως μόριο ανιχνευτής.



Σχήμα 2.2. Συσκευή τριχοειδούς μεταφοράς RNA (northern blotting).



Σχήμα 2.3. Σχηματική αναπαράσταση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. (1) Αποδιάταξη (2) Πρόσδεση εκκινήτων (3) Επιμήκυνση (P = πολυμεράση) (4) ολοκλήρωση του πρώτου κύκλου. Οι δύο παραγόμενοι κλώνοι DNA αποτελούν τη μήτρα για τον επόμενο κύκλο διπλασιάζοντας την προς διπλασιασμό ποσότητα DNA σε κάθε κύκλο.

Πίνακας 2.2. Βέλτιστες συνθήκες ενίσχυσης των υπό μελέτη εισαγόμενων τμημάτων cDNA με τη χρήση Taq DNA πολυμεράσης

	Αρχική συγκέντρωση	μl / σωλ.
Ρυθμιστικό διάλυμα	x 10	5
MgCl ₂	25 mM	6
dNTP's	10 mM	1
Εκκινητές	100 pmol/μl	1
Ποσότητα miniprep		3
Πολυμεράση	5 U/μl	0,2
Συνολικός όγκος αντίδρασης		50

Πίνακας 2.3. Πρόγραμμα ενίσχυσης των υπό μελέτη εισαγόμενων τμημάτων cDNA με τη χρήση Taq DNA πολυμεράσης

	Θερμοκρασία (°C)	Χρονική διάρκεια
Αρχική αποδιάταξη	96	4 min
Αποδιάταξη	96	1 min
Πρόσδεση εκκινητών	48	1 min
Επέκταση	72	1 min
Τελική επέκταση	72	5 min
Αριθμός κύκλων		30

Υβριδοποίηση

Ο υβριδισμός των μεμβρανών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση [α - 32 P] dCTP-σημασμένων μορίων ανιχνευτών, οι οποίοι αντιστοιχούσαν στην πλήρη αλληλουχία των γονιδίων των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου, με σκοπό την επίτευξη υψηλής εκλεκτικότητας. Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μεταγράφων, προσδιορίστηκε με αναφορά στη σταθερή έκφραση των γονιδίων β-ακτίνης και γαλακτικής αφυδρογονάσης, με τη χρήση του προγράμματος Kodak 1D, version 3.5.

Η μέθοδος υβριδισμού που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

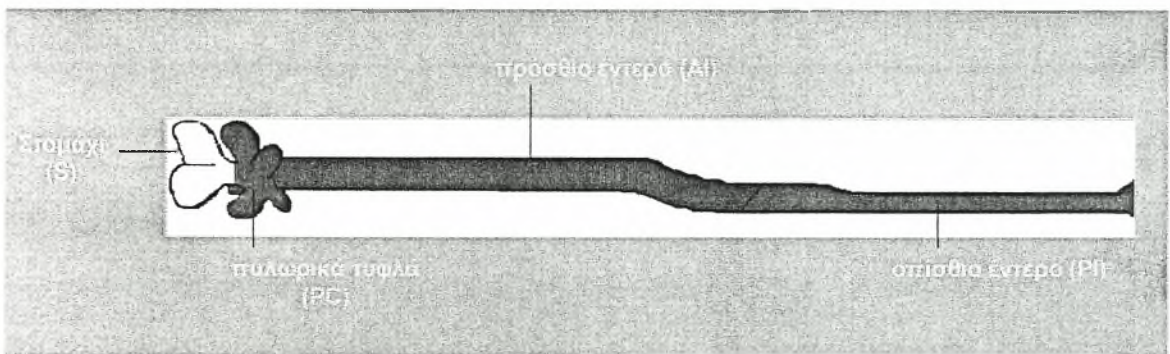
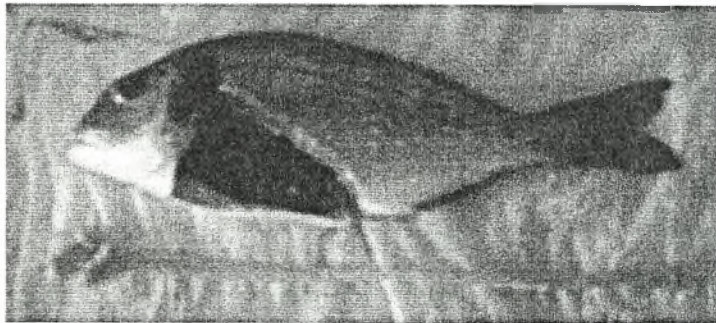
- ✓ Προθέρμανση του διαλύματος υβριδισμού (Church-Gilbert) στους 42 °C
- ✓ Εξισορρόπηση των μεμβρανών με διαπότιση τους σε διάλυμα 5x SSC.
- ✓ Προϋβριδισμός των μεμβρανών στους 42 °C για τουλάχιστον 4 h και ραδιενεργός σήμανση των μορίων ανιχνευτών με τη χρήση του εμπορικού προϊόντος NEBlot kit (New England BioLabs, Beverly, USA), με σκοπό την παρασκευή υψηλής ειδικής δραστηριότητας DNA ανιχνευτών με τη χρήση τυχαίων εκκινητών.
- ✓ Υβριδισμός των μεμβρανών με τον κάθε σημασμένο ανιχνευτή για 18 h.
- ✓ Επιλεκτικό πλύσιμο των υβριδισμένων μεμβρανών στους 42 °C, 55 °C και 65 °C με διάλυμα 1x SSC, που περιείχε 0,1% SDS, και τοποθέτηση τους σε ειδικές κασέτες για ενίσχυση του ραδιενεργού σήματος.
- ✓ Έκθεση του φιλμ για 16-24 h και εμφάνισή του σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

2.3 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ

Η σύνθεση και η ενζυμική δραστηριότητα των υπό μελέτη πρωτεασών μετρήθηκε στα πλαίσια δύο πειραμάτων που σκοπό είχαν τον προσδιορισμό της επίδρασης (i) της αλατότητας και (ii) της αυξητικής ορμόνης στα επίπεδα δραστηριότητας των πεπτικών πρωτεασών. Ο σχεδιασμός και οι συνθήκες εκπόνησης κάθε πειράματος αναλύονται διεξοδικά στα αντίστοιχα κεφάλαια.

Στα πλαίσια κάθε πειραματικής διαδικασίας ελήφθησαν δείγματα (Σχήμα 2.4):

- στομάχου (S)
- πυλωρικών τυφλών (PC, γύρω από τον πυλωρικό σφιγκτήρα)
- πρόσθιου εντέρου (AI, από τη βάση των πυλωρικών τυφλών μέχρι το σημείο ένωσης με το οπίσθιο έντερο όπως διακρίνεται λόγω της αυξημένης διαμέτρου)



Σχήμα 2.4. Σχηματική απεικόνιση των επιμέρους περιοχών του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας από τις οποίες πραγματοποιήθηκε λήψη δειγμάτων.

- οπίσθιου εντέρου (PI)

και απομονώθηκαν τα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα τους.

Δεν πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός των ενζυμικών εκχυλισμάτων, καθώς ο εντοπισμός των πεπτικών πρωτεασών στους συγκεκριμένους ιστούς είναι ιδιαίτερα αυξημένος.

Λήψη ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων

Τη λήψη των δειγμάτων στομάχου, πυλωρικών τυφλών, οπίσθιου και πρόσθιου εντέρου, ακολουθούσε απομάκρυνση του λιπώδη και συνδετικού ιστού, που τα περιέλαβε, εμβάπτιση σε υγρό άζωτο και αποθήκευση τους στους -80°C .

Τα δείγματα στομάχου ομογενοποιήθηκαν μηχανικά (1:10 w/v) σε ddH₂O, ενώ τα αλκαλικά τμήματα του εντέρου (100 mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=7,5. Το υπερκείμενο στρώμα απομονώθηκε μετά από φυγοκέντρηση στις 16000 rpm για 30 min στους 4°C και αποθηκεύθηκε στους -80°C , για περαιτέρω ενζυμική ανάλυση. Όλη η διαδικασία προετοιμασίας των ενζυμικών εκχυλισμάτων, πραγματοποιούνταν αυστηρά στους $0-4^{\circ}\text{C}$, ώστε να αποφευχθούν τυχόν απώλειες της ενζυμικής δραστηριότητας.

Η συγκέντρωση ολικής διαλυτής πρωτεΐνης των ενζυμικών εκχυλισμάτων, προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951), που στηρίζεται στο σχεδιασμό πρότυπης καμπύλης με τη χρήση αλβουμίνης από ορό βοδινού (BSA).

Μέτρηση ενζυμικής δραστηριότητας

Η μέτρηση της δραστηριότητας των ολικών όξινων πρωτεασών του στομάχου, έγινε σύμφωνα με τον Anson (1938), με χρήση 0,5% αιμοσφαιρίνης ως υπόστρωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 mM glycine-HCl, pH=2,0. Η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών μετρήθηκε σύμφωνα με τον Garcia-Carreño (1992), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα 1,5% αζοκαζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=9,0. Η απορρόφηση του υπερκείμενου πραγματοποιούνταν στα 405nm και η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστηριότητας, ορίστηκε ως 1 μg τυροσίνης που απελευθερώνονταν κάθε min, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 1280/M/cm.

Η μέτρηση των επιμέρους πρωτεασών της σερίνης, καθώς και των μεταλλοπρωτεασών, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων,

εξειδικευμένων για κάθε πεπτική πρωτεάση, όπως αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Πρωτεάσες της σερίνης

Η αμιδική δραστικότητα της θρυψίνης μετρήθηκε σύμφωνα με τους Bernard et al. (1961), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα Na-Benzoyl-L-arginine-4-nitroanilide (μητρικό διάλυμα 5 mM σε DMSO) σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH=8,2 που περιείχε 10 mM CaCl₂ στα 405nm. Η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστικότητας, ορίστηκε ως 1 nmol p-νιτροανιλίδης που παράγονταν ανά min, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 8800/cm/M.

Ο φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός της δραστικότητας χυμοθρυψίνης, πραγματοποιήθηκε με βάση τους Asgeirsson & Bjarnason (1991), παρακολουθώντας την υδρόλυση N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (μητρικό διάλυμα 20 mM σε 50% μεθανόλη w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα 44,4 mM Tris-HCl, pH=7,8 περιεκτικότητας 55,5 mM CaCl₂, στα 256nm. Η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστικότητας, ορίστηκε ως 1 nmol BTEE που υδρολύονταν κάθε min, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 964 /cm/ M.

Η δραστικότητα ελαστάσης μετρήθηκε σύμφωνα με τους Bieth et al. (1974), παρακολουθώντας την υδρόλυση N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (5 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,1 M Tris-HCl, pH=8,3 που περιείχε 0,01% NaN₃, στα 410nm. Η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστικότητας, ορίστηκε ως 1 pmol p-νιτροανιλίδης που παράγονταν ανά min, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 8,8/mM/cm. Αξίζει να αναφερθεί, ότι από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά μέτρησης της δραστικότητας ελαστάσης σε ένα ψάρι της οικογένειας Sparidae.

Μεταλλοπρωτεάσες

Η δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης A μετρήθηκε σύμφωνα με τους Folk & Schirmer (1963), παρακολουθώντας την υδρόλυση hippuryl-L-phenylalanine (0,01 M) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,025 M Tris-HCl, pH=7,5 περιεκτικότητας 0,5 M NaCl, στα 254nm. Η δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης B, υπολογίστηκε σύμφωνα με τους Folk et al. (1960), παρακολουθώντας την υδρόλυση hippuryl-L-arginine (0,01 M) σε ρυθμιστικό διάλυμα 0,025 M Tris-HCl, pH= 7,65 που περιείχε 0,1 M NaCl, στα 254nm. Η μονάδα (unit) ενζυμικής δραστικότητας, ορίστηκε ως 1 pmol ιππουρικού οξέος που

παράγονταν κάθε min, με τη χρήση ενός ειδικού συντελεστή απορρόφησης 0,36/mM/cm.

Για κάθε μέθοδο μέτρησης ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικοί έλεγχοι σε τρεις επαναλήψεις έκαστος με σκοπό τον καθορισμό (i) της συγκέντρωσης υποστρώματος, (ii) του προστιθέμενου όγκου ακατέργαστου ενζυμικού εκχυλίσματος και (iii) της χρονικής διάρκειας της αντίδρασης για κάθε ιστό και για τα αντίστοιχα πειράματα. Οι παράμετροι που προέκυψαν, χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις μετρήσεις, για τα δείγματα του αντίστοιχου πειράματος.

Το σύνολο των μετρήσεων ενζυμικής δραστηριότητας πραγματοποιήθηκε σε τρεις επαναλήψεις, στους 25 °C, που θεωρείται η βέλτιστη θερμοκρασία περιβάλλοντος για την τσιπούρα. Η ειδική ενζυμική δραστηριότητα εκφράστηκε ως U/mg protein.

Ενζυμογράμματα πρωτεασών

Για την αναγνώριση και το χαρακτηρισμό των ομάδων των πεπτικών πρωτεασών, που περιέχονταν στα ενζυμικά εκχυλίσματα, χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι, ανάλογα με τις συνθήκες pH που επικρατούν κατά τη δράση τους στα επιμέρους τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα.

Για τα ενζυμικά εκχυλίσματα, που προέρχονταν από δείγματα του αλκαλικού τμήματος του εντέρου, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SDS-PAGE όπως περιγράφεται από τον Laemmli (1970), με τη χρήση 11% πηκτής πολυακρυλαμίδης (8 x 10 x 0,075 cm) και ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης 1,5 M Tris-HCl, pH=8,8 που περιείχε 0,5% SDS. Κάθε πηκτή περιελάμβανε 10 μl κατάλληλου μάρτυρα (MWM RPN800V) για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ομάδων πρωτεασών. Η προετοιμασία των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους Garcia-Carreño et al. (1993), και σε κάθε περίπτωση στη πηκτή «φορτωνόταν» 10 μg πρωτεϊνικού περιεχομένου. Η ηλεκτροφόρηση λάμβανε χώρα στους 4 °C στα 100 V για περίπου 3 h. Στη συνέχεια ακολουθούσε ανάδειξη των ομάδων των πεπτικών πρωτεασών και βάψιμο της πηκτής όπως περιγράφεται παρακάτω:

- Πλούσιμο της πηκτής με το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης 50 mM Tris-HCl, pH=9,0.

- ✓ Επώαση της πηκτής με διάλυμα αντίδρασης περιεκτικότητας 0,5% σε καζεΐνη στους 4 °C για 30 min, με συνεχή ανάδευση, ώστε η καζεΐνη να διαχυθεί σε όλη την επιφάνεια της πηκτής.
- ✓ Επώαση της πηκτής στο ίδιο διάλυμα στους 25 °C για 90 min, χωρίς ανάδευση, ώστε οι καθηλωμένες στην πηκτική πρωτεάσες να δράσουν επί του υποστρώματος καζεΐνης.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος καζεΐνης και πλύση με 12% TCA για κατακρήμνιση των υπαρχόντων πρωτεϊνών.
- ✓ Πλύση με ddH₂O για αλλαγή της τιμής pH.
- ✓ Επώαση με 0,1% Coomassie (R-250) διαλυμένο σε μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O (40 : 10 : 50) στους 25 °C για 2 h, προκειμένου να σημανθούν οι πρωτεΐνες στην επιφάνεια της πηκτής. Τα σημεία που αντιστοιχούν στην ύπαρξη πρωτεασών, εμφανίζονται λευκά, καθώς η καζεΐνη - που αποτελεί το υπόστρωμα δράσης τους - έχει εξαφανιστεί.
- ✓ Απομάκρυνση της περίσσειας χρωστικής με μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O (35 : 10 : 55) στους 25 °C για 3-4 h.

Η ηλεκτροφόρηση των όξινων πρωτεασών του στομάχου έγινε με χρήση μη διαχωριστικής ασυνεχούς τεχνικής PAGE (Alarcón et al., 1998), η οποία αποτελείται από ανώτερο στρώμα 3,5% πηκτής πολυακρυλαμίδης (stacking gel) σε 0,1 M Tris-H₃PO₄, pH=5,5 και 13% αποδιατακτική πηκτική πολυακρυλαμίδης με 0,07 M Tris-HCl, pH=7,5. Για κάθε δείγμα στη πηκτική φορτωνόταν 10 μg πρωτεϊνικού περιεχομένου και η ηλεκτροφόρηση λάμβανε χώρα στους 4 °C στα 100 V για περίπου 3 h. Στη συνέχεια ακολουθούσε ανάδειξη των ομάδων όξινων πρωτεασών και βάψιμο της πηκτής:

- ✓ Πλύσιμο της πηκτής με διάλυμα 0,1 M HCl, pH=2,0 για μείωση του pH.
- ✓ Επώαση της πηκτής με διάλυμα 0,1 M Gly-HCl, pH=2,0 περιεκτικότητας 0,25% σε αιμοσφαιρίνη στους 4 °C για 30 min, με συνεχή ανάδευση.
- ✓ Επώαση της πηκτής σε φρέσκο διάλυμα 0,1 M Gly-HCl, pH=2,0 περιεκτικότητας 0,25% σε αιμοσφαιρίνη στους 25 °C για 90 min, με ήπια ανάδευση.
- ✓ Πλύση με ddH₂O και επώαση με 12% TCA για 15 min, με συνεχή ανάδευση.
- ✓ Βάψιμο των πρωτεϊνών στην επιφάνεια της πηκτής με 0,1% Coomassie (R-250) διαλυμένο σε μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O (50 : 20 : 50) στους 25 °C για 2 h.
- ✓ Εξεβάψιμο με μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O (30 : 10 : 60) στους 25 °C για 3-4 h.

Χαρακτηρισμός των πρωτεασών

Ο χαρακτηρισμός των πρωτεασών έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο Garcia-Carreño (1992) χρησιμοποιώντας ειδικούς εκλεκτικούς αναστολείς:

- TLCK (10 mM σε 1 mM HCl)
- PMSF (100 mM σε αιθανόλη)
- SBTI (250 μM σε ddH₂O)
- chymostatin (2,5 mg/ ml σε DMSO)
- pepstatin A (10 μM σε DMSO)
- EDTA ως χηλικό παράγοντα (0,5 M σε ddH₂O).

Τα ενζυμικά εκχυλίσματα επωάζονταν για 1 h στους 25 °C και χρησιμοποιούνταν για τη μέτρηση ενζυμικών δραστηριοτήτων ή/και την παρασκευή ενζυμογραμμάτων, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Η εκάστοτε μέθοδος περιείχε μάρτυρες για την ανίχνευση τυχόν αναστολής από τους διαλύτες ή τα ακατέργαστα ενζυμικά εκχυλίσματα.

2.4 ΜΕΤΡΗΣΗ ΚΟΡΤΙΖΟΛΗΣ

Η μέθοδος μέτρησης της συγκέντρωσης κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος των ψαριών έχει περιγραφεί από τους Rotllant et al. (2005).

Κατά τη διάρκεια των δειγματοληψιών κάθε πειράματος λαμβάνονταν, μετά από αναισθησία των ψαριών, 0,5 ml αίματος από την ουραία φλέβα, με τη χρήση ηπαρινωμένων σπριγγών και φυγοκεντρούνταν στις 10000 rpm για 10 min. Λαμβάνονταν το υπερκείμενο στρώμα - που αντιστοιχούσε στο πλάσμα - και αποθηκεύονταν στους -20 °C.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης κορτιζόλης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αντισώματος σχεδιασμένο έναντι της κορτιζόλης κουνελιού (Fitzgerald Cat#20-CR50) και το οποίο αντιδρά 100% με την κορτιζόλη της τσιπούρας, όπως έχει αποδειχθεί σε προηγούμενα πειράματα με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Διάλυση 50 μl πλάσματος αίματος με 950 μl ρυθμιστικού διαλύματος ζελατίνης και αποδιάταξη στους 70°C για 30 min, ώστε η κορτιζόλη που περιέχονταν στα δείγματα να είναι άμεσα προσπελάσιμη από το χρησιμοποιούμενο αντίσωμα.
- Δημιουργία πρότυπης καμπύλης με χρήση εννέα διαδοχικών αραιώσεων γνωστής συγκέντρωσης [³H]-κορτιζόλης (4P-11B17α,21-triol-13,20dione, μητρικό διάλυμα 0,5 mg/ ml αιθανόλη) και των πρότυπων δειγμάτων:

T (ολικό), το οποίο αντιστοιχούσε στην πιθανή μέγιστη μέτρηση, καθώς περιείχε μόνο σημασμένη ορμόνη.

M (μέγιστο), το οποίο αντιστοιχούσε στη μέγιστη πιθανότητα δέσμευσης της σημασμένης κορτιζόλης με το αντίσωμα, καθώς δεν περιείχε μη σημασμένη ορμόνη.

B (μάρτυρας), το οποίο αντιστοιχούσε στη δραστικότητα που απέμενε λόγω μη εκλεκτικής δέσμευσης, καθώς περιείχε μόνο σημασμένη ορμόνη και διάλυμα άνθρακα.

- ✓ Προσθήκη 100 μl διαλύματος [³H]-κορτιζόλης/αντισώματος σε 100 μl δείγματος σε ρυθμιστικό διάλυμα ζελατινής και επώαση για 16 h στους 4 °C.
- ✓ Προσθήκη 250 μl διαλύματος άνθρακα σε όλα τα δείγματα -εκτός από αυτό που αντιστοιχούσε στη μέγιστη δυνατή μέτρηση (T)- και φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 12 min στους 4 °C.
- ✓ Προσθήκη 4 ml διαλύματος σπινθηρισμού σε κάθε δείγμα και μέτρηση της μείωσης [³H].

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Όλοι οι μέσοι όροι δίνονται με το τυπικό σφάλμα τους (μέσος όρος ± τυπ. σφάλμα). Πριν τη στατιστική ανάλυση των ποσοστιαίων δεδομένων και προκειμένου να ακολουθήσουν κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκε μετατροπή τους με τη μέθοδο arcsin (Zar, 1984). Η ανάλυση παραλλακτικότητας δύο παραγόντων (two-way ANOVA), χρησιμοποιήθηκε για να συγκριθούν οι μέσοι όροι των μετρούμενων παραμέτρων μεταξύ των μεταχειρίσεων και των ημερών δειγματοληψίας, ενώ η μετά-ανάλυση έγινε με τη χρήση του Tukey test (Zar, 1984). Η συσχέτιση μεταξύ των μελετούμενων παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης Spearman (Zar, 1984). Τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικά σημαντικά στο επίπεδο $P < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΧΥΜΟΘΡΥΨΙΝΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΘΡΥΨΙΝΟΓΟΝΟΥ

3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μεταξύ των σπονδυλωτών, η μελέτη των αμινοξικών ή/και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των πρωτεασών της σερίνης των οστεϊχθύων, χαίρει ιδιαίτερης προσοχής, τόσο λόγω της δομικής και λειτουργικής προσαρμογής τους σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Roach, 2002; Gudmundsdottir & Palsdottir, 2005), όσο και εξαιτίας της οικονομικής σημασίας που παρουσιάζουν για τη βιομηχανία της εκτροφής ιχθύων (Gudmundsdottir & Palsdottir, 2005).

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα είδη της Μεσογειακής εκτροφής ιχθύων. Η παραγωγικότητα των μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας εξαρτάται, σε μεγάλο βαθμό, από τη δημιουργία συνθετικών τροφών με υψηλό δείκτη πρωτεϊνικής απορρόφησης και αφομοίωσης, οι οποίες μπορούν να αντικαταστήσουν τη ζωντανή τροφή που χορηγείται στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ψαριών. Η χυμοθρυψίνη και η θρυψίνη παίζουν σημαντικό ρόλο, τόσο στην πέψη, όσο και στη διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών, ενώ η δραστηριότητα της θρυψίνης έχει προταθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης της θρεπτικής κατάστασης των ατελών ιχθυδίων (Ueberschar, 1995). Δεδομένης, λοιπόν, της σημασίας των πρωτεασών της σερίνης, είναι αναγκαία η συγκέντρωση πληροφοριών σχετικά με την εμφάνιση τους στην αναπτυξιακή πορεία, την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς, τη ρύθμιση και το συντονισμό τους σε επίπεδο έκφρασης, προκειμένου να κατανοήσουμε και να χειριστούμε αποτελεσματικότερα τη φυσιολογία θρέψης σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και αύξησης των ψαριών.

Σε αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζεται η μοριακή κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου της τσιπούρας, ως απαραίτητα εργαλεία για τη μελέτη της φυσιολογίας θρέψης αυτού του σημαντικού εκτρεφόμενου είδους. Το πρότυπο έκφρασης τους σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και διαφορετικούς ιστούς παρουσιάζεται παράλληλα με τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων τους με ομόλογα μόρια στα σπονδυλωτά.

3.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός των κλώνων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου

cDNA τσιπούρας για το χυμοθρυψινογόνο I (CHTRI), το χυμοθρυψινογόνο II (CHTRII) και το θρυψινογόνο II (TRPII) ανακτήθηκαν από βιβλιοθήκη cDNA ήπατος, η οποία κατασκευάστηκε στα πλαίσια προηγούμενου EST ερευνητικού προγράμματος (Sarroroulou et al., 2005). Κάθε κλώνος, που προέκυψε από το πρόγραμμα EST, αλληλουχήθηκε πλήρως πέντε φορές και προς τις δύο κατευθύνσεις (ABI 3730 XL, Macrogen Inc), ενώ οι προκύπτουσες ενημερωμένες αλληλουχίες υποβλήθηκαν στη βάση δεδομένων NCBI με αριθμούς πρόσβασης DQ443541, DQ443542 και DQ443543.

Η συγκριτική και φυλογενετική ανάλυση πραγματοποιήθηκε για τη μελέτη των σχέσεων μεταξύ των CHTRI, CHTRII και TRPII και των ομολόγων τους σε άλλα είδη σπονδυλωτών, όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ» της παρούσας διατριβής.

Έκφραση των γονιδίων (ανάλυση Northern blot)

Για τη μελέτη της έκφρασης των CHTRI, CHTRII και TRPII πραγματοποιήθηκε ανάλυση Northern blot (Κεφάλαιο 2) σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια τσιπούρας. Ολικό RNA (5 μg) αφού διαχωρίστηκε σε πηκτή φορμαλδεΐδης, μεταφέρθηκε σε νάυλον Hybond-N μεμβράνη και σταθεροποιήθηκε στους 80 °C για 2 h. Η υβριδοποίηση έγινε στους 42 °C, με χρήση [α - 32 P] dCTP-σημασμένων πλήρους αλληλουχίας CHTRI, CHTRII και TRPII μορίων-ανιχνευτών αντίστοιχα. Τα απαιτούμενα επιλεκτικά πλοσίματα πραγματοποιήθηκαν στους 42 °C, 55 °C και 65 °C, με 1x SSC που περιείχε 0,1 % SDS. Το μέγεθος των μεταγράφων προσδιορίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος KODAK 1D, έκδοση 3.5.

3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομόνωση και χαρακτηρισμός των κλώνων χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου

Δύο διαφορετικοί κλώνοι χυμοθρυψινογόνου (CHTR) και ένας κλώνος θρυψινογόνου (TRP) απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν. Οι συναγόμενες αμινοξικές αλληλουχίες των μορφών που απομονώθηκαν, περιέχουν υψηλά συντηρημένα αμινοξέα, απαραίτητα για την καταλυτική δράση των πρωτεασών της

σερίνης και τη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους. Μεταξύ αυτών είναι τα Ser195, His57 και Asp102 που αποτελούν την καταλυτική τριάδα των ενζύμων, ενώ επίσης διατηρούν τις οκτώ κοινές μεταξύ CHTR και TRP κυστεΐνες, στις θέσεις 42, 58, 136, 168, 182, 191, 201 και 220.

Ο πρώτος κλώνος χυμοθρυψινογόνου (CHTRI) έχει μήκος 1022 bp, με ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που ξεκινά στο πρώτο κωδικόνιο ATG του κλώνου στην 5' τερματική περιοχή και καταλήγει σε ένα κωδικόνιο λήξης TAA (Σχήμα 3.1). Η 3' αμετάφραστη περιοχή έχει μήκος 236 bp και περιέχει ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA), έξι νουκλεοτίδια πριν την πολυ(A) ουρά. Η συναγόμενη αλληλουχία έχει μήκος 261 aa και κωδικοποιεί για το χυμοθρυψινογόνο I (Σχήμα 3.1).

Ο δεύτερος κλώνος χυμοθρυψινογόνου (CHTRII) έχει μήκος 909 bp, με ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που ξεκινά πάλι στο πρώτο κωδικόνιο ATG του κλώνου στην 5' τερματική περιοχή και καταλήγει σε ένα κωδικόνιο λήξης TGA (Σχήμα 3.2). Η 3' αμετάφραστη περιοχή έχει μήκος μόνο 75 bp και περιέχει ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA), έντεκα νουκλεοτίδια πριν την πολυ(A) ουρά. Η συναγόμενη αλληλουχία έχει μήκος 277 aa και κωδικοποιεί για το χυμοθρυψινογόνο II (Σχήμα 3.2).

Οι CHTRI και CHTRII εμφανίζουν ποσοστό ταύτισης 61% (Σχήμα 3.3), το οποίο βρίσκεται στο ίδιο επίπεδο με το ποσοστό ταύτισης που παρατηρείται μεταξύ των δύο αντίστοιχων μορφών στο *Paralichthys olivaceus* (Suzuki et al., 2002) και στο *Gadus morhua* (Spilliaert & Gudmundsdottir, 2000). Το CHTRII της τσιπούρας φαίνεται ότι είναι το μακρύτερο από όλα τα γνωστά χυμοθρυψινογόνα, που έχουν μελετηθεί στους τελεόστεους, με 16 επιπλέον αμινοξέα (Σχήμα 3.3), και όπως το χυμοθρυψινογόνο 2 του *Paralichthys olivaceus* και το χυμοθρυψινογόνο B του *Gadus morhua* περιέχει μεγαλύτερο αριθμό μεθειονινών από το CHTRI (Πίνακας 3.1, Spilliaert & Gudmundsdottir, 2000; Suzuki et al., 2002). Η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των χυμοθρυψινογόνων των τελεόστεων που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank, έδειξε ότι το συνολικό ποσοστό ταύτισης μεταξύ τους είναι 47%, ενώ η ισομορφή I εμφανίζει υψηλότερο ποσοστό ταύτισης (89%) από την ισομορφή II (89%) (Σχήμα 3.3).

Ο κλώνος του θρυψινογόνου έχει μήκος 848 bp, με ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης που ξεκινά στο πρώτο κωδικόνιο ATG του κλώνου στην 5' τερματική περιοχή και καταλήγει σε ένα κωδικόνιο λήξης TAA (Σχήμα 3.4). Η 3' αμετάφραστη περιοχή έχει μήκος 122 bp και περιέχει ένα τροποποιημένο σήμα πολυαδενυλίωσης

ATG	TTC	TTG	CTT	GTC	AGC	TGT	TTT	GCC	CTT	GTG	GCC	TCA	GCG	CTG		
M	F	L	L	V	S	C	F	A	L	V	A	S	A	L	15	
GGG	TGT	GGA	ACA	CCT	GCG	ATC	AGG	CCC	CAA	GTG	AGT	GGA	TAC	AAC		
G	C	G	T	P	A	I	R	P	Q	V	S	G	Y	N	30	
AAG	ATT	GTA	AAC	GGG	GAG	AAT	GCT	GTG	TCT	GGG	TCT	TGG	CCG	TGG		
K	I	V	N	G	E	N	A	V	S	G	S	W	P	W	45	
CAG	GTG	TCA	CTT	CAG	GAT	TAT	AGT	GGA	TTC	CAC	TTC	TGT	GGA	GGA		
Q	V	S	L	Q	D	Y	S	G	F	H	F	C	G	G	60	
TCA	CTG	ATC	AAC	CAG	TAC	TGG	GTT	GTC	ACT	GCT	GCT	CAT	TGC	CGT		
S	L	I	N	Q	Y	W	V	V	T	A	A	H	C	R	75	
GTG	TCT	CCT	AGA	AGC	CAC	CGT	GTT	ATC	CTG	GGA	GAA	CAT	GAT	CGT		
V	S	P	R	S	H	R	V	I	L	G	E	H	D	R	90	
CAG	TAC	AAC	AGT	GAG	CCA	ATT	CAG	GTC	ATG	TCA	ATT	TCC	AAG	GCC		
Q	Y	N	S	E	P	I	Q	V	M	S	I	S	K	A	105	
ATA	TCT	CAC	CCC	TAC	TAC	AAC	TCC	CAG	AAC	TTC	AAC	AAT	GAC	ATC		
I	S	H	P	Y	Y	N	S	Q	N	F	N	N	D	I	120	
ACC	CTT	CTG	AAG	CTG	TCT	TCC	CCA	GTG	CAG	ATC	AAC	AGC	CGT	GTG		
T	L	L	K	L	S	S	P	V	Q	I	N	S	R	V	135	
TCT	CCT	GTG	TGC	CTG	GCC	TCC	TCC	AGC	ACC	AGC	GTC	CCC	TCT	GGA		
S	P	V	C	L	A	S	S	S	T	S	V	P	S	G	150	
ACC	ACA	TGT	GTC	ACC	ACT	GGG	TGG	GGC	AGG	ACG	GGC	CAA	ACC	TCA		
T	T	C	T	T	T	G	W	G	R	T	G	Q	T	S	165	
AGC	CCC	CGC	TAC	CTC	CAG	ACT	GCC	CTG	CCC	CTG	CTC	AGC	CCG			
S	P	R	Y	L	Q	Q	T	A	L	P	L	L	S	P	180	
GCT	CAG	TGC	AAG	CAG	TAT	TGG	GGT	TAT	AAC	AGA	ATC	ACT	GAT	GCC		
A	Q	C	K	Q	Y	W	G	Y	N	R	I	T	D	A	195	
ATG	ATC	TGT	GCT	GGT	GCT	TCT	GGA	GTG	TCT	TCC	TGT	CAG	GGT	GAC		
M	I	C	A	G	A	S	G	V	S	S	C	Q	G	D	210	
TCT	GGT	GGT	CCT	CTG	GTC	TGT	GAG	AGG	AGT	GGA	GCG	TGG	TAC	CAA		
S	G	G	P	L	V	C	E	R	S	G	A	W	Y	Q	225	
GTG	GGT	ATT	GTG	TCC	TGG	GGC	ACA	TCT	AAC	TGC	AAT	GTG	CGA	GCC		
V	G	I	V	S	W	G	T	S	N	C	N	V	R	A	240	
CCT	GCC	GTG	TAC	GCC	CGT	GTG	TCC	TAC	CTG	CGC	AGC	TGG	ATC	GAC		
P	A	V	Y	A	R	V	S	Y	L	R	S	W	I	D	255	
CAG	ATT	GTT	GCT	TCC	AAC	TAA	CCT	TGC	AAA	CAC	AAA	ACC	TGC	AAT		
Q	I	V	A	S	N	*									261	
ATG	CAT	GTG	CTT	TGC	CCC	ACA	CTT	CGT	CAC	CCT	GCT	CCT	CAC	TGT		
GAT	CAA	CAA	CTG	ATT	CTC	TTC	AGC	ATC	GAT	ATC	AGC	CGT	CAC	AAG		
GAT	GTC	ACA	TGT	TCT	TTT	GAC	TCT	GAA	TGG	TAG	CAA	TCA	CTC	AGT		
GTA	CTT	CTG	TGT	TTG	GTG	CAT	TTG	TGA	GAA	ATC	AAG	CAT	<u>AAA</u>	<u>ATA</u>		
<u>AAA</u>	CTC	CCA	AAA	ACA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA							

Σχήμα 3.1. Νουκλεοτιδική και συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία του χυμοθρυψινογόνου I της τοπιούρας. Το κωδικόνιο έναρξης και το σήμα πολυαδενυλίωσης εμφανίζονται υπογραμμισμένα. Τα έντονα σύμβολα αντιστοιχούν στα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας.

ATG	CGC	GCT	GCA	GGT	CGA	ACT	AGT	GGA	TCC	AAA	GAA	TTC	GGC	ACG	
M	R	A	A	G	R	T	S	G	S	K	E	F	G	T	15
AGG	TTC	CTG	TGG	ATC	CTC	TCC	TGC	CTC	GCC	TTT	GTC	GGC	GCC	GCC	
R	F	L	W	I	L	S	C	L	A	F	V	G	A	A	30
TAC	GGC	TGT	GGC	ACT	CCC	GCC	ATC	AGT	CCC	GTC	ATC	ACC	GGT	TAC	
Y	G	C	G	T	P	A	I	S	P	V	I	T	G	Y	45
TCT	CGT	ATT	GTG	AAC	GGT	GAG	GAG	GCG	GTG	CCT	CAC	TCC	TGG	CCC	
S	R	I	V	N	G	E	A	V	P	H	S	W	P		60
TGG	CAG	GTG	TCC	CTG	CAG	GAT	TAC	ACC	GGC	TTC	CAC	TTC	TGT	GGC	
W	Q	V	S	L	Q	D	Y	T	G	F	H	F	C	G	75
GGC	TCT	CTC	ATC	AAC	GAG	AAC	TGG	GTG	GTG	ACA	GCC	GCT	CAC	TGC	
G	S	L	I	N	E	N	W	V	V	T	A	A	H	C	90
AAC	GTC	AGG	ACA	TCC	CAC	CGT	GTG	ATC	CTC	GGA	GAA	CAC	GAC	CGC	
N	V	R	T	S	H	R	V	I	L	G	E	H	D	R	105
TCC	TCC	AAC	GCT	GAG	GCC	ATC	CAG	GTC	ATG	AAG	GTC	GGA	AAG	GTT	
S	S	N	A	E	A	I	Q	V	M	K	V	G	K	V	120
TTC	AAG	CAC	CCC	AAC	TAC	AAC	GGC	TAC	ACC	ATC	AAC	AAC	GAC	ATC	
F	K	H	P	N	Y	N	G	Y	T	I	N	N	D	I	135
CTG	CTC	ATC	AAG	CTG	GCC	AGC	CCC	GCT	CAG	ATG	GGC	ATG	CGT	GTT	
L	L	I	K	L	A	S	P	A	Q	M	G	M	R	V	150
TCC	CCG	GTG	TGT	GTG	GCT	GAG	ACC	GCT	GAC	AAC	TTC	CCC	GGA	GGC	
S	P	V	C	V	A	E	T	A	D	N	F	P	G	G	165
ATG	AGG	TGT	GTG	ACC	AGC	GGC	TGG	GGC	CTG	ACC	CGC	TAC	AAC	GCT	
M	R	C	V	T	S	G	W	G	L	T	R	Y	N	A	180
CCT	GAC	ACC	CCC	GCC	CTG	CTG	CAG	CAG	GCC	TCC	CTC	CCC	CTG	TTG	
P	D	T	P	A	L	L	Q	Q	A	S	L	P	L	L	195
ACC	AAT	GAG	CAG	TGC	CGT	CAG	TAC	TGG	GGC	AGC	AAG	ATC	AGC	AAC	
T	N	E	Q	C	R	Q	Y	W	G	S	K	I	S	N	210
CTG	ATG	ATC	TGT	GCT	GGA	GCC	TCC	GGA	GCC	TCC	TCC	TGC	ATG	GGC	
L	M	I	C	A	G	A	S	G	A	S	S	C	M	G	225
GAC	TCT	GGC	GGT	CCT	CTG	GTC	TGT	GAG	AAG	GCC	GGA	GCC	TGG	ACT	
D	S	G	G	P	L	V	C	E	K	A	G	A	W	T	240
CTG	GTT	GGT	ATC	GTG	TCT	TGG	GGC	AGT	GGA	ACC	TGC	ACT	CCC	ACC	
L	V	G	I	V	S	W	G	S	G	T	C	T	P	T	255
ATG	CCC	GGC	GTG	TAC	GCC	CGC	GTC	ACC	GAG	CTC	CGC	GCC	TGG	ATG	
M	P	G	V	Y	A	R	V	T	E	L	R	A	W	M	270
GAT	CAG	ATC	ATC	GCT	GCC	AAC	TGA	GCA	TGT	CCG	ACA	GGA	CAG	CTT	
D	Q	I	I	A	A	N	*								277
CCA	GTT	TGA	AGC	AGA	TCA	<u>TCA</u>	<u>ATA</u>	<u>AAA</u>	CAC	AGA	AAC	CAA	AAA	AAA	
AAA	AAA	AAA													

Σχήμα 3.2. Νουκλεοτιδική και συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία του χυμοθρυψινογόνου II της τσιπούρας. Το κωδικόνιο έναρξης και το σήμα πολυαδενυλίωσης εμφανίζονται υπογραμμισμένα. Τα έντονα σύμβολα αντιστοιχούν στα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας.

<i>S. aurata</i> I	-----	-----MFL	VSCFALVASA	LGCCTPAIRP	QVSGYNKIVN
<i>S. aurata</i> II	MRAAGRTSGS	KEFGTRFLWI	LSCLAFVGA	YCGCTPAISP	VITGYSRIVN
<i>D. rerio</i>	-----	-----MAFLWI	LSCLAFFGAA	YCGGIPAIPP	VVTGYARIVN
<i>G. morhua</i> I	-----	--MGHEVDSV	LPGLFRR--T	YCGGRPAISP	VITGYSRIVN
<i>G. morhua</i> II	-----	-----MGHE	VSCFAFISAA	YCGGSPAIIQ	QVTGYARIVN
<i>P. olivaceus</i> I	-----	-----MLLF	ISCFALVASA	LGCGVPSIKP	QVSGYNKIVN
<i>P. olivaceus</i> II	-----	-----MGI	LSCLAFAGAA	YCGGSPAIPP	VITGYSRIVN
Clustal Conse			:: :	: *** *:* *	::** :***
(57)					
<i>S. aurata</i> I	GENAVSGSWP	WQVSLQDYSG	FHFCGGSLIN	QYVWVTA AHC	RVSPRSHRVI
<i>S. aurata</i> II	GEEAVPHSWP	WQVSLQDYTG	FHFCGGSLIN	ENWVWTA AHC	NVR-TSHRVI
<i>D. rerio</i>	GEEARPHSWP	WQVSLQDSTG	FHFCGGSLIN	ENWVWTA AHC	NVR-TSHRVI
<i>G. morhua</i> I	GEEAVPHSWS	WQVSLQDQTG	FHFCGGSLIN	ENWVWTA AHC	NVK-NYHRVV
<i>G. morhua</i> II	GEEAVPHSWP	WQVSLQDSNG	FHFCGGSLIN	ENWVWTA AHC	NVR-TYHRVI
<i>P. olivaceus</i> I	GETAVSGSWP	WQVSLQDGRG	FHFCGGSLIS	PYVWVTA AHC	TVSPRNHRVI
<i>P. olivaceus</i> II	GEEALPHSWP	WQVSLQDYTG	FHFCGGSLIN	ENWVWTA AHC	NVR-TSHRVI
Clustal Conse	** * . **	*****: *	*****.	***** * ***:	
(102)					
<i>S. aurata</i> I	LGEHDRQ-YN	SEPIQVMSIS	KAISHPYYS	QNFNDITLL	KLSSPVQINS
<i>S. aurata</i> II	LGEHDRS-SN	AEAIQVMKVG	KVFKHPNYNG	YTINNDILLI	KLASPAQMG
<i>D. rerio</i>	LGEHDRS-SN	AEAIQTIAVG	KSLKHPNYNS	FTINNDILLI	KLATPAKINT
<i>G. morhua</i> I	LGEHDRS-SN	SEGQVMTVG	QVFKHPRYNG	FTINNDILLV	KLATPATLNM
<i>G. morhua</i> II	VGEHDKSRAS	DENIQILKPS	MVFTHPKWS	RTINNDISLI	KLSSPAVLGT
<i>P. olivaceus</i> I	LGEHDRQ-YN	NEPIQVMSIA	RAITHPYYS	QNFNDITLL	KLSSPVQMTS
<i>P. olivaceus</i> II	LGEHDRS-SS	AEDIQVMKVG	KVFKHPRYNG	YTINNDILLI	KLAAPAQMNM
Clustal Conse	:****:. .	*:* :	::** ::	..**** *:	:*:. . :
<i>S. aurata</i> I	RVSPVCLASS	STSVPSGTT	VTGSGWRTGQ	TS--SPRYLQ	QTALPLLSPA
<i>S. aurata</i> II	RVSPVCLAET	ADNFPGMRC	VTSGWGLTRY	NAPDTPALLQ	QASLPLLTNE
<i>D. rerio</i>	HVSPVCLAET	NDNFPGGMKC	VTSGWGLTRY	NAPDTPALLQ	QAALPLLTND
<i>G. morhua</i> I	RVSPVCLAET	DDVFEGMKC	VTSGWGLTRY	NAADTPALLQ	QAALPLLTNE
<i>G. morhua</i> II	NVSPVCLGES	SDVFAPGMKC	VTSGWGLTRY	NAPGTPNKLQ	QAALPLMSNE
<i>P. olivaceus</i> I	RVSPVCLASS	STSI PSG T KC	VTTGSGWRTGQ	TS--SPRYLQ	QTS L PLLS PA
<i>P. olivaceus</i> II	RVSPVCLAET	SDNFAGMKC	VTSGWGLTRH	NAPDTPALLQ	QAALPLLTND
Clustal Conse	.****:..:	. * *	**.*** *	..: * **	*:****:.
(195)					
<i>S. aurata</i> I	QCKQYWGYNR	ITDAMICAG A	S GVSSCQ G DS	GGPLVCERSG	AWYQVGIVSW
<i>S. aurata</i> II	QCRQYWG-SK	ISNLMICAG A	S GASSCM G DS	GGPLVCEKAG	AWTLVGIVSW
<i>D. rerio</i>	DCKRYWG-TN	ITDLMICAG A	S GVSSCM G DS	GGPLVCENNR	VWTLVGIVSW
<i>G. morhua</i> I	QCKKEWG-NK	ISDLMICAG A	A GASSCM G DS	GGPLVCQKAG	SWTLVGIVSW
<i>G. morhua</i> II	ECSQTWGNM	ISDVMICAG A	A GATSCM G DS	GGPLVCQKDN	VWTLVGIVSW
<i>P. olivaceus</i> I	QCKQYWGYNR	ITDAMICAG A	S GVSSCQ G DS	GGPLVCEKSG	AWFLTGIVSW
<i>P. olivaceus</i> II	DCRRYWG-NK	ISNLMICAG A	S GASSCM G DS	GGPLVCQKAG	AWTLVGIVSW
Clustal Conse	:* : ** .	*: : *****	:* : ** ***	*****: .	* *****
<i>S. aurata</i> I	GTSNCNVR AP	AVYARVSYLR	SWIDQIVASN		
<i>S. aurata</i> II	GSGTCTP TMP	GVYARVTELR	AWMDQIIAAN		
<i>D. rerio</i>	GSSTCST STP	AVYARVTKLR	AWVDQTIASN		
<i>G. morhua</i> I	GSGTCTP TMP	GVYARVTELR	AWVDQTIASN		
<i>G. morhua</i> II	GSSRC SVTTP	AVYARVTELR	GWVDQIIAAN		
<i>P. olivaceus</i> I	GTSNCNVR TP	AVYARVSYLR	SWIDQTIASN		
<i>P. olivaceus</i> II	GSGTCTP TMP	GVYARVTELR	AWMDQTIANN		
Clustal Conse	*: . * . *	*****: **	*:* ** :* *		

Σχήμα 3.3. Ομοπαράθεση των συναγόμενων αμινοξικών αλληλουχιών των χυμοθρυψινογόνων των τελεόστεων, που ανιχνεύτηκαν στην GenBank, ως πλήρεις. Τα συντηρημένα αμινοξέα δηλώνονται με αστερίσκο, ενώ οι συντηρημένες διαφορές με τελεία. Τα έντονα σύμβολα αντιστοιχούν στα κατάλοιπα κυστεΐνης και τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας. .,: βρόχος 1; _,: βρόχος 2. Οι εντός παρενθέσεως αριθμοί αντιστοιχούν στο σύστημα αρίθμησης της χυμοθρυψίνης στο *Bos Taurus* (Hartley, 1970). Οι βιβλιογραφικές αναφορές και οι αριθμοί πρόσβασης περιγράφονται στο κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής.

Πίνακας 3.1. Σύγκριση της αμινοξικής σύνθεσης των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου στην τσιπούρα. Πολικά αμινοξέα: Q+N+C+S+T+Y+R+K+H+D+E+G; Υδροφοβικά αμινοξέα: A+I+L+F+W+V+P+M; Αρωματικά αμινοξέα: F+W+Y

	CHTRI	CHTRII
Pro	14	14
Met	4	9
Trp	8	9
Tyr	12	8
Ser	37	23
Πολικά αμινοξέα	157	157
Υδροφοβικά αμινοξέα	106	121
Αρωματικά αμινοξέα	25	24
<i>Εκτιμώμενο μοριακό βάρος</i>	28kD	29kD

ATG	AAG	AGT	CTC	GTC	TTC	GTT	CTG	CTC	ATC	GGA	GCT	GCC	TTT	GCC		
M	K	S	L	V	F	V	L	L	I	G	A	A	F	A	15	
CTG	GAT	GAC	GAC	AAG	ATC	GTC	GGA	GGG	TAT	GAG	TGC	CAG	GCC	CAC		
L	D	D	D	K	I	V	G	G	Y	E	C	Q	A	H	30	
TCC	CAG	CCC	CAT	CAG	GTG	TCT	CTA	AAC	TCT	GGC	TAC	CAC	TTC	TGT		
S	Q	P	H	Q	V	S	L	N	S	G	Y	H	F	C	45	
GGT	GGC	TCC	CTG	GTC	AAT	GAG	AAC	TGG	GTT	GTG	TCT	GCT	GCT	CAC		
G	G	S	L	V	N	E	N	W	V	V	S	A	A	H	60	
TGC	TAC	AAG	TCC	CGT	GTT	GAG	GTG	CGT	CTT	GGA	GAG	CAT	GAC	ATC		
C	Y	K	S	R	V	E	V	R	L	G	E	H	D	I	75	
TAC	CGC	AAC	GAG	GGC	ACC	GAG	CAG	TTC	ATC	TCC	TCC	TCC	CGT	GTC		
Y	R	N	E	G	T	E	Q	F	I	S	S	S	R	V	90	
ATC	CGC	CAC	CCC	AAC	TAC	AAC	TCC	TGG	AAC	ATC	GAC	AAC	GAC	ATC		
I	R	H	P	N	Y	N	S	W	N	I	D	N	D	I	105	
ATG	CTG	ATC	AAG	CTG	AGC	AAG	CCC	GCC	ACC	CTC	AAC	TCA	TAC	GTG		
M	L	I	K	L	S	K	P	A	T	L	N	S	Y	V	120	
CAG	CCT	GTG	GCT	CTG	CCC	ACC	AGC	TGT	GCT	CCC	GCT	GGC	ACC	ATG		
Q	P	V	A	L	P	T	S	C	A	P	A	G	T	M	135	
TGC	AGA	GTC	TCT	GGC	TGG	GGC	AAC	ACC	ATG	AGC	TCT	GTT	AGC	GGC		
C	R	V	S	G	W	G	N	T	M	S	S	V	S	G	150	
GAC	CAG	CTG	CAG	TGC	CTG	GAG	ATC	CCC	ATC	CTG	TCT	ACC	AGG	GAC		
D	Q	L	Q	C	L	E	I	P	I	L	S	T	R	D	165	
TGT	GAG	AAC	TCC	TAC	CCT	GGC	ATG	ATC	ACT	GAT	GCC	ATG	TTC	TGC		
C	E	N	S	Y	P	G	M	I	T	D	A	M	F	C	180	
GCT	GGA	TAC	CTG	GAG	GGT	GGC	AAG	GAC	TCT	TGC	CAG	GGT	GAC	TCT		
A	G	Y	L	E	G	G	K	D	S	C	Q	G	D	S	195	
GGT	GGC	CCC	GTT	GTG	TGC	AAC	GGT	CAG	CTG	CAG	GGT	GTT	GTG	TCC		
G	G	P	V	V	C	N	G	Q	L	Q	G	V	V	S	210	
TGG	GGC	TAC	GGA	TGT	GCT	GAG	AGG	GAC	CAC	CCT	GGT	GTC	TAC	GCC		
W	G	Y	G	C	A	E	R	D	H	P	G	V	Y	A	225	
AAG	GTC	TGC	ATC	TTC	AAC	GAC	TGG	CTG	GAG	ACC	ACC	ATG	GCC	AGC		
K	V	C	I	F	N	D	W	L	E	T	T	M	A	S	240	
TAT	TAA	GCC	TGA	TCC	AAA	TGA	CAA	GTC	CAG	TGA	AGC	AGC	ACG	TCA		
Y	*														241	
TCT	TTT	ACT	GTT	TAT	GTT	TCA	TCT	TCT	GTA	TTG	GAC	TAT	ATG	AAA		
AAT	TAA	ACA	ATT	AAA	AGC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA					

Σχήμα 3.4. Νουκλεοτιδική και συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία του θρυψινογόνου II της τσιπούρας. Το κωδικόνιο έναρξης και το σήμα πολυαδενυλίωσης εμφανίζονται υπογραμμισμένα. . . . : πεπτίδιο αναγνώρισης; _ : πεπτίδιο ενεργοποίησης. Τα έντονα σύμβολα αντιστοιχούν στα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας.

(AATTA), έντεκα αμινοξέα πριν την πολυ(A) ουρά. Η συναγόμενη αλληλουχία έχει μήκος 241 aa και κωδικοποιεί για το θρυψινογόνο II (Σχήμα 3.4). Το TRPII φέρει ένα πεπτιδίο αναγνώρισης δεκατριών αμινοξέων, MKSLV FVLLIGAA, ένα πεπτιδίο ενεργοποίησης επτά αμινοξέων, FALDDDK και περιέχει συνολικά δώδεκα κυστεΐνες. Σε αντίθεση με τις δύο μορφές χυμοθρυψινογόνου, που φέρουν Ser189 στη βάση της περιοχής πρόσδεσης του υποστρώματος, το TRPII εμφανίζει ένα Asp189 και έχει χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο (4,95), που το κάνει ανιονικό σε συνθήκες ουδέτερου pH.

Η ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών των θρυψινογόνων των τελεόστεων, που έχουν κατατεθεί στη βάση δεδομένων GenBank, παρουσιάζεται στο σχήμα 3.5. Παρά τα γεγονότα ότι, όλα τα θρυψινογόνα των ψαριών διατηρούν τα απαραίτητα αμινοξέα για την καταλυτική δράση τους και τη διατήρηση της ενεργά σταθερής διαμόρφωσης τους, το ποσοστό ταύτισης τους είναι μόλις 34%. Το παραπάνω οφείλεται, κυρίως, στην ύπαρξη εντός των τελεόστεων, μιας τρίτης ταχέως εξελισσόμενης ομάδας, που αφορά στα θρυψινογόνα των ψυχρόφιλων ειδών, καθώς το ποσοστό ταύτισης των κλασικών ομάδων I και II (Roach et al., 1997) των ψαριών βρίσκεται σε περίπου ίδιο επίπεδο με αυτό των χυμοθρυψινογόνων (57%).

Οργάνωση των γονιδίων

Στα σχήματα 3.6 και 3.7 παρουσιάζεται η συγκριτική εικόνα της οργάνωσης των γονιδίων CHTR και TRP, ανάμεσα στον Άνθρωπο και το *Takifugu*, καθώς και η υποτιθέμενη οργάνωση των ομόλογων γονιδίων για την τσιπούρα. Η δομή των γονιδίων εμφανίζεται πολύ καλά συντηρημένη μεταξύ των σπονδυλωτών. Οι δύο μορφές χυμοθρυψινογόνου κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια και αποτελούνται από επτά εξόνια, ενώ το θρυψινογόνο από πέντε. Τα γονίδια CHTRI και CHTRII διαφέρουν μόνο στο μέγεθος του πρώτου εξονίου και η μεγαλύτερη ισομορφία CHTRII φαίνεται να είναι αποτέλεσμα μεγαλύτερου εξονίου 1. Οι κωδικοποιητικές περιοχές των δύο μορφών διακόπτονται ακριβώς στα ίδια σημεία και τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας His57, Ser195, Asp102 κωδικοποιούνται από τα εξόνια 3, 5, και 7 αντίστοιχα (Σχήμα 3.6). Το εξόνιο 1 του γονιδίου του θρυψινογόνου κωδικοποιεί για το μεγαλύτερο τμήμα του πεπτιδίου αναγνώρισης. Το εξόνιο 2 κωδικοποιεί για το υπόλοιπο πεπτιδίο αναγνώρισης, το πεπτιδίο ενεργοποίησης και το αμινοξύ της ιστιδίνης της καταλυτικής τριάδας. Τα άλλα δύο αμινοξέα αυτής κωδικοποιούνται από τα εξόνια 3 και 5 αντίστοιχα (Σχήμα 3.7)

S. aurata	<u>MKSLVFLVLLI</u>	<u>G--AAFALDD</u>	<u>DKIVGGYECQ</u>	AHSQPHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>P. americanusII</i>	MRLSLVFLVLLI	G--AAFALED	DKIVGGYECT	PHSQAHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>T. adspersus</i>	MRLSLVFLVLLI	G--AAFALDD	DKIVGGYECT	PHSQPHTVSL	QSGYHFCGGS
<i>S. salarIA</i>	MISLVLVFLVLLI	G--AAFATED	DKIVGGYECQ	AYSQAHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>S. salarI</i>	MISLVLVFLVLLI	G--AAFATED	DKIVGGYECQ	AYSQTHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>P. magellanica</i>	MRLSLVFLVLLI	G--AAFATEE	DKIVGGKECS	PYSQPHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>P. olivaceusI</i>	MRLSLVFLVLLI	G--AAFAMED	DKIVGGYECT	PYSQPHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>E. japonicusII</i>	MRLSLVFLVLLI	G--AAFAD-D	DKIVGGYECQ	PYSQPHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>E. japonicusI</i>	MRPLVFLVLLI	G--AAFAD-D	DKIVGGYECQ	AHSQPHQVSL	NSGYHFCGGS
<i>A. japonicus</i>	MRLSLVFLVLLI	G--VAVALDD	DKIVGGYECQ	PHSQPWQASL	NAGYHFCGGS
<i>P. hypophthalmus</i>	MRLSLVFLVLLI	G--ACFALED	DKIVGGYECT	PYSQPWQVSL	NVGYHFCGGS
<i>P. americanusI</i>	MNLLALLLMV	GAAVAVPRED	GRIIGGHECA	AHSRPFMASL	NYGYHFCGGV
<i>P. platessa</i>	MRLLLALLLMV	GAAVAVPRED	GRIIGGHECA	AHSRPFMASL	NYGYHFCGGV
<i>N. coriiceps</i>	MTLLALLLLI	GAAAAPRED	GRIVGGYEC	PHSRPFMASL	NYGYHFCGGV
<i>D. mawsoni</i>	MTLLALLLLI	GAAAAPRED	GRIIGGHECA	PHSRPFMASL	NYGYHFCGGV
<i>G. morhuaY</i>	MIGLALLMLL	GAAAAPRED	GRIIGGQDCE	PRSRPFMASL	NYGYHFCGGV
<i>P. olivaceusIII</i>	MIGLIVLALL	GAAAAPD	-RIVGGYEC	QHSQPWQVSL	NLGYHFCGGS
Clustal Consens	* * .: .:	* . . . :	:*:** :*	*:. .**	: *****

(57)

S. aurata	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRLGEHDIY	RNEGTEQFIS	SSRVIRHPNY
<i>P. americanusII</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRMGEHKIR	VNEGTEQFVS	SSRVIRHPNY
<i>T. adspersus</i>	LVNEDWVSA	AHCYKS--RI	QVRLGEHHIR	VNEGTEQIIS	SSRVIRHPNY
<i>S. salarIA</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRLGEHNIK	VTEGSEQFIS	SSRVIRHPNY
<i>S. salarI</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRLGEHNIK	VTEGSEQFIS	SSRVIRHPNY
<i>P. magellanica</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRMGEHHIR	VTEGKEQFIS	SSRVIRHPNY
<i>P. olivaceusI</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRMGEHHIK	INEGTEQFIS	SERVIRHPNY
<i>E. japonicusII</i>	LVSDSWVSA	AHCYKS--RV	EVRMGEHHIG	MTEGNEQFID	SSRVIRHPQY
<i>E. japonicusI</i>	LVNENWVSA	AHCYKS--RV	EVRLGEHHIG	QNEGTEQFID	SSRVIRHPQY
<i>A. japonicus</i>	LVNENWVSA	AHCYKSPSRL	EVRLGEHHIG	LNEGTEQFIG	ASHVIRHPNY
<i>P. hypophthalmus</i>	LINQNWVSA	AHCYQS--RI	EVRLGEHNIQ	INEGTEQFIS	SSRVIRHPNY
<i>P. americanusI</i>	LINNQWVLSV	AHCWYNPYAM	QVMLGEHNL	VFEGTEQLMK	TDTIIWHPNY
<i>P. platessa</i>	LINNQWVLSV	AHCWYNPYAM	QVMLGEHDLR	KFEGTEQLMK	TDTIIWHPNY
<i>N. coriiceps</i>	LINNQWVLSV	AHCWYNPYM	QVILGDHNL	VFEGTEQLMK	TDTIIWHPNY
<i>D. mawsoni</i>	LINNQWVLSV	AHCWYNPYM	QVILGDHNL	VFEGTEQLMK	TNTIIWHPNY
<i>G. morhuaY</i>	LINDQWVLSV	AHCWYNPYM	QVMLGEHDLR	VFEGTEQLVK	TNTIFWHEQY
<i>P. olivaceusIII</i>	LINDQWVLSV	AHCWYNPYM	QVMLGEHDLR	VFEGTEQLVK	TNTIFWHEQY
Clustal Consens	*:..*::*	***: .	. :*:**:	*..** :	. : : *

(102)

S. aurata	NSWNIDNDIM	LIKLSKPATL	NSYVQPVALP	TSCAPAGTMC	RVSGWGNTMS
<i>P. americanusII</i>	DSWNIDNDIM	LIKLSKPATL	NQYVKTVALP	SSCAPAGTMC	KVSGWGNTMS
<i>T. adspersus</i>	SSYNIDNDIM	LIKLSQATL	NQYVKTVALP	TSCAPAGTMC	KVAGWGNTMS
<i>S. salarIA</i>	SSYNIDNDIM	LIKLSKPATL	NTYVQPVALP	TSCAPAGTMC	TVSGWGNTMS
<i>S. salarI</i>	SSYNIDNDIM	LIKLSKPATL	NTYVQPVALP	TSCAPAGTMC	TVSGWGNTMS
<i>P. magellanica</i>	SSYNIDNDIM	LIKLSKPATL	NQYVQVALP	SSCAPAGTMC	TVSGWGNTMS
<i>P. olivaceusI</i>	SSYNINNDIM	LIKLRPATL	NQYVQPVALP	TSCAPAGTMC	TVSGWGNTMS
<i>E. japonicusII</i>	DSYNIDNDIM	LIKLSKPATL	NQYVQTVALP	SSCAPAGTMC	LVSGWGNTMS
<i>E. japonicusI</i>	SSYNIDNDIM	LIKLSKPATL	NQYVQPVALP	SSCAPAGTMC	LVAGWGNTMS
<i>A. japonicus</i>	NSWDLSDIM	LIKLSKPATL	NSYVQPVALP	TRCAPAGTMC	RVTGWGNTMN
<i>P. hypophthalmus</i>	NSWTIDNDIM	LIKLSQSASV	NNYVQPVALP	SSCPAGTWC	IVSGWGNTMS
<i>P. americanusI</i>	DYQTLDFDIM	LIKLYHPVEV	TEAVAPISLP	SSCPVGGTPC	SVSGWGNTAR
<i>P. platessa</i>	DYQTLDFDIM	LIKLYHPVEV	SHAVGPIPLP	TSCPVAGTPC	SVSGWGNTAR
<i>N. coriiceps</i>	DYQTLDFDIM	LIKLYHPVEV	TEAVAPISLP	TRCPYGGTSC	SVSGWGNTNL
<i>D. mawsoni</i>	DYQTLDFDIM	LIKLYHPVEV	TEAVAPISLP	TSCPYGGTSC	SVSGWGNTAKL
<i>G. morhuaY</i>	DYQTLDFDIM	MIKLYHPVEV	TQSVAPISLP	TGPPDGGMLC	SVSGWGNTMAM
<i>P. olivaceusIII</i>	DYQTLDFDIM	MIKLYHPVEV	TQSVAPISLP	TGPPDGGMLC	SVSGWGNTMAM
Clustal Consens	. :*:**	::** . . :	. * .:.*	. . . * *	*:***

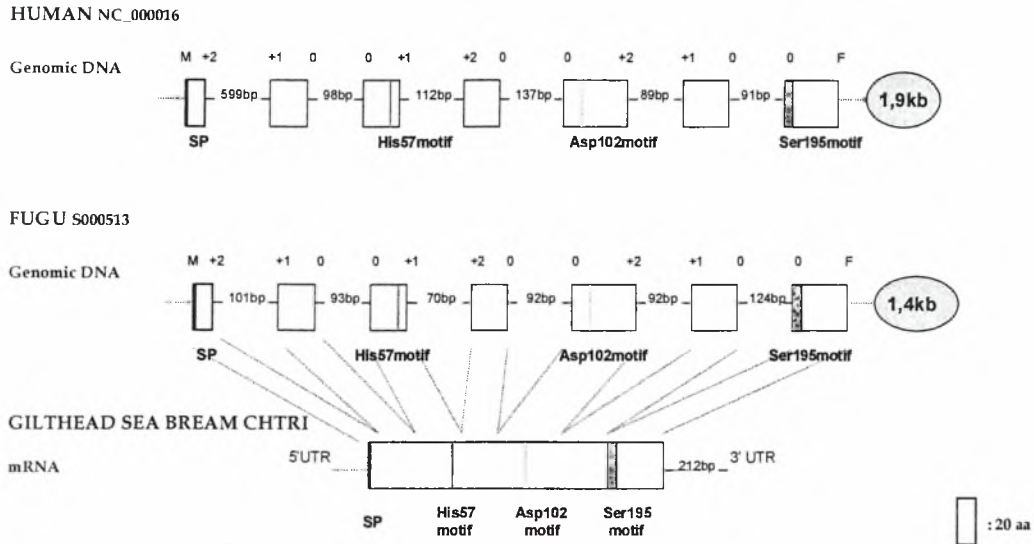
Σχήμα 3.5. συνεχίζεται...

<i>S. aurata</i>	SV---S-GDQ	LQCLEIPILS	TRDCENSYPG	MITDAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>P. americanusII</i>	SA---DNGDL	LQCLDIPILS	FSDCNNAYPG	MITDSMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>T. adspersus</i>	SS---ADGDK	LQCLNIPILS	ERDCDNSYPG	MITDAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>S. salarIA</i>	ST---ADSNK	LQCLNIPILS	YSDCNSYPG	MITNAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>S. salarI</i>	ST---ADSNK	LQCLNIPILS	YSDCNSYPG	MITNAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>P. magellanica</i>	SS---ADGNK	LQCLNIPILS	DRDCDNSYPG	MITDAMFCAG	YLOGGKDSQ
<i>P. olivaceusI</i>	ST---ANRDM	LQCLDLPIILS	DRDCENSYPG	MITPAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>E. japonicusII</i>	NV---S-GDK	LQCLQIPILS	DRDCKNSYPG	MITESMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>E. japonicusI</i>	NV---S-GDK	LQCLQIPILS	DRDCDNSYPG	MITDAMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>A. japonicus</i>	PA---VSGDK	LQCLEIPILS	ESDCNSYPG	MITSTMFCAG	YLEGGKDSQ
<i>P. hypophthalmus</i>	ST---ADRNK	LQCVVPIILS	DEDCNSYPG	MITKAMFCAG	FLEGGKDSQ
<i>P. americanusI</i>	DGDDVYMPTL	LQCMDVPIID	EEQCMKSYPG	MISPRMVCAG	FMDGSRDACN
<i>P. platessa</i>	DGDEVYLPPTL	LQCMDVPIVD	EEQCMKSYPD	MISPRMVCAG	FMDGSRDACN
<i>N. coriiceps</i>	GG-EVYMPTL	LQCLNVPIVD	LQVCENAYPG	MISPRMVCAG	YMEGGKDACN
<i>D. mawsoni</i>	GG-EAYMPTL	LQCLNVPIVD	QQVCENTYPG	LISTMVMCAG	YMEGGKDACN
<i>G. morhuaY</i>	GE-EVNLPTL	LQCLDVPIVE	TVDCEAAYPG	MISPRMVCAG	YMDGGRDACN
<i>P. olivaceusIII</i>	DQ--VFNPEN	LQCVKVPILS	NVECEGSYPG	MITDRMVCAG	YLEGGKDACQ
Clustal Consens		***:..*:*:	* :**	::: *.***	:::*.::*:*:

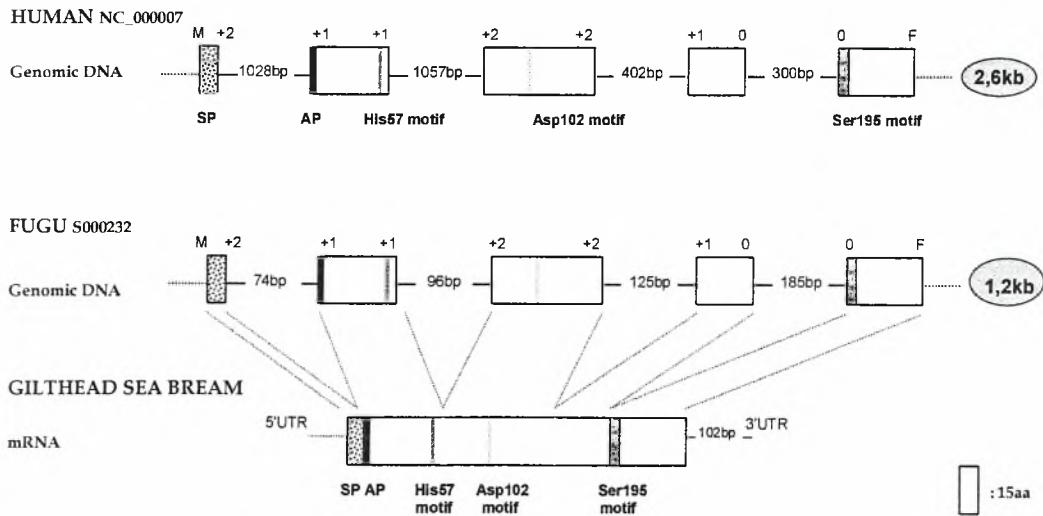
(195)

<i>S. aurata</i>	GDSGGPVVCN	GQLQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVCI	FND	WLETTMASY-
<i>P. americanusII</i>	GDSGGPVICN	GELQGVVSWG	YGCAERGNPG	VYAKVCL	FND	WLESTMASY-
<i>T. adspersus</i>	GDSGGPVVCN	GQLQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVCL	FND	WLESTMASN-
<i>S. salarIA</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAEPGNPG	VYAKVCI	FND	WLTSTMASY-
<i>S. salarI</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAEPGNPG	VYAKVCI	FND	WLTSTMASY-
<i>P. magellanica</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVCL	FND	WLETSMANY-
<i>P. olivaceusI</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVIC	IFID	WLETTMASY-
<i>E. japonicusII</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVCL	FND	WIDSTMAQYN
<i>E. japonicusI</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAERDHPG	VYAKVCI	FTD	WLQSTMASN-
<i>A. japonicus</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAEQNHPG	VYPKVCM	FSD	WLRTTMAS-
<i>P. hypophthalmus</i>	GDSGGPVVCN	GELQGVVSWG	YGCAEKNHPG	VYTKVIC	IFD	WIAQTIASN-
<i>P. americanusI</i>	GDSGSPLVCR	GEVTLGLVSWG	QGCAQPNYPG	VYVKLCE	FHA	WIENLAAYP
<i>P. platessa</i>	GDSGSPLVCR	GEVYGLVSWG	QGCAQPNYPG	VYVKLCE	FLG	WIERTLEAYP
<i>N. coriiceps</i>	GDSGSPLVCD	GEVQGLVSWG	QGCAEPNYPG	VYVKLCE	FHS	WFEEVLAAYP
<i>D. mawsoni</i>	GDSGSPLVCD	GEVQGLVSWG	QGCAEPNYPG	VYVKLCE	FHS	WFEEVLAANP
<i>G. morhuaY</i>	GDSGSPLVCE	GVLTGLVSWG	QGCAEPNYPG	VYVKVYE	YLS	WIQTTLNANP
<i>P. olivaceusIII</i>	GDSGGPLVCN	GELHGVVSWG	QGCAQPNYPG	VYTKVCS	LIP	WIDSILSING
Clustal Consens	****.*::*	* : *:*:****	*** . **	** ::		*: :

Σχήμα 3.5. Ομοπαράθεση των συναγόμενων αμινοξικών αλληλουχιών των θρυψινογόνων των τελεόστεων, που ανιχνεύτηκαν στην GenBank, ως πλήρεις. Τα συντηρημένα αμινοξέα δηλώνονται με αστερίσκο, ενώ οι συντηρημένες διαφορές με τελεία. Τα έντονα σύμβολα αντιστοιχούν στα κατάλοιπα κυστεΐνης και τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας. _: πεπτιδίο αναγνώρισης; __: πεπτιδίο ενεργοποίησης;...: βρόχος 1; __: βρόχος 2. Οι εντός παρενθέσεως αριθμοί αντιστοιχούν στο σύστημα αρίθμησης της χυμοθρυψίνης στο *Bos Taurus* (Hartley, 1970). Οι βιβλιογραφικές αναφορές και οι αριθμοί πρόσβασης περιγράφονται στο κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής.



Σχήμα 3.6. Σύγκριση της γονιδιακής οργάνωσης του χυμοθρυψινογόνου ανάμεσα στον Άνθρωπο (HUMAN), το *Takifugu* (FUGU) και τα ομόλογα γονίδια της τσιπούρας. Τα εξόνια εμφανίζονται ως λευκά τετράγωνα, τα ιντρόνια ως γραμμές και αναγράφεται το μήκος κάθε ιντρονίου. Οι φάσεις μεταξύ εξονίων και ιντρονίων δηλώνονται επάνω από κάθε εξόνιο. Το μέγεθος κάθε γονιδίου δίνεται σε κύκλο. His57μοτίβο: TAAHC, Asp102μοτίβο: DIMLL, Ser195μοτίβο: GDSGGP. Η αντιστοιχία μεταξύ των ομόλογων εξονίων παρουσιάζεται με διακεκομμένες γραμμές.



Σχήμα 3.7. Σύγκριση της γονιδιακής οργάνωσης του θρυψινογόνου ανάμεσα στον Άνθρωπο (HUMAN), το *Takifugu* (FUGU) και τα ομόλογα γονίδια της τσιπούρας. Τα εξόνια εμφανίζονται ως λευκά τετράγωνα, τα ιντρόνια ως γραμμές και αναγράφεται το μήκος κάθε ιντρονίου. Οι φάσεις μεταξύ εξονίων και ιντρονίων δηλώνονται επάνω από κάθε εξόνιο. Το μέγεθος κάθε γονιδίου δίνεται σε κύκλο. SP: πεπτιδίο αναγνώρισης, AP: πεπτιδίο ενεργοποίησης, His57μοτίβο: TAAHC, Asp102μοτίβο: DIMLL, Ser195μοτίβο: GDSGGP. Η αντιστοιχία μεταξύ των ομόλογων εξονίων παρουσιάζεται με διακεκομμένες γραμμές.

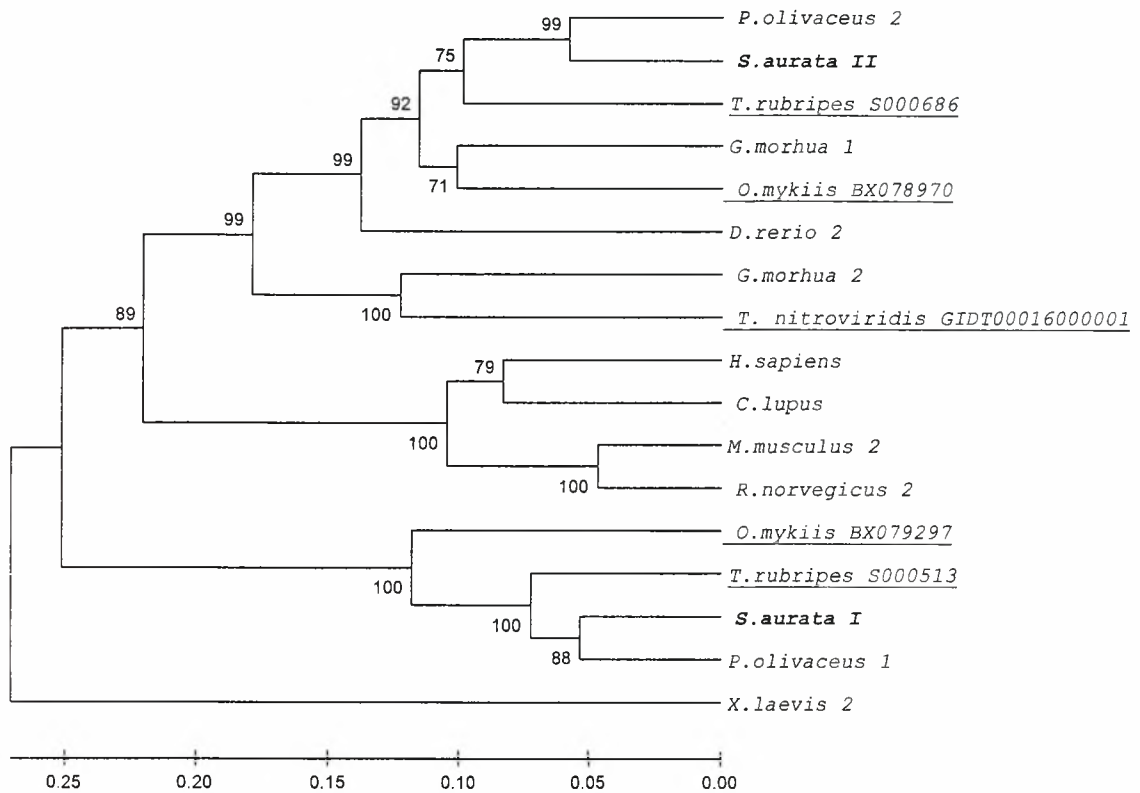
Φυλογενετική ανάλυση

Για τη μελέτη της εξελικτικής σχέσης ανάμεσα στις δύο ισομορφές CHTR και το TRPII, με τα αντίστοιχα γονίδια άλλων σπονδυλωτών, πραγματοποιήθηκε μοριακή φυλογενετική ανάλυση. Τα χυμοθρυψινογόνα των σπονδυλωτών χωρίζονται σε δύο κλάδους (Σχήμα 3.8). Ο πρώτος περιλαμβάνει την ισομορφή CHTRII των τελεόστεων και τα CHTR των θηλαστικών, ενώ ο δεύτερος περιλαμβάνει την ισομορφή CHTRI των τελεόστεων. Οι CHTR μορφές της τσιπούρας ομαδοποιούνται με τις αντίστοιχες μορφές του *P. olivaceus*. Είναι αξιοσημείωτο ότι, οι αλληλουχίες CHTR, που ανακτήθηκαν από τις βάσεις δεδομένων των *Oncorhynchus mykiss* και *Takifugu rubripes*, αντιστοιχούν σε δύο διαφορετικά χυμοθρυψινογόνα.

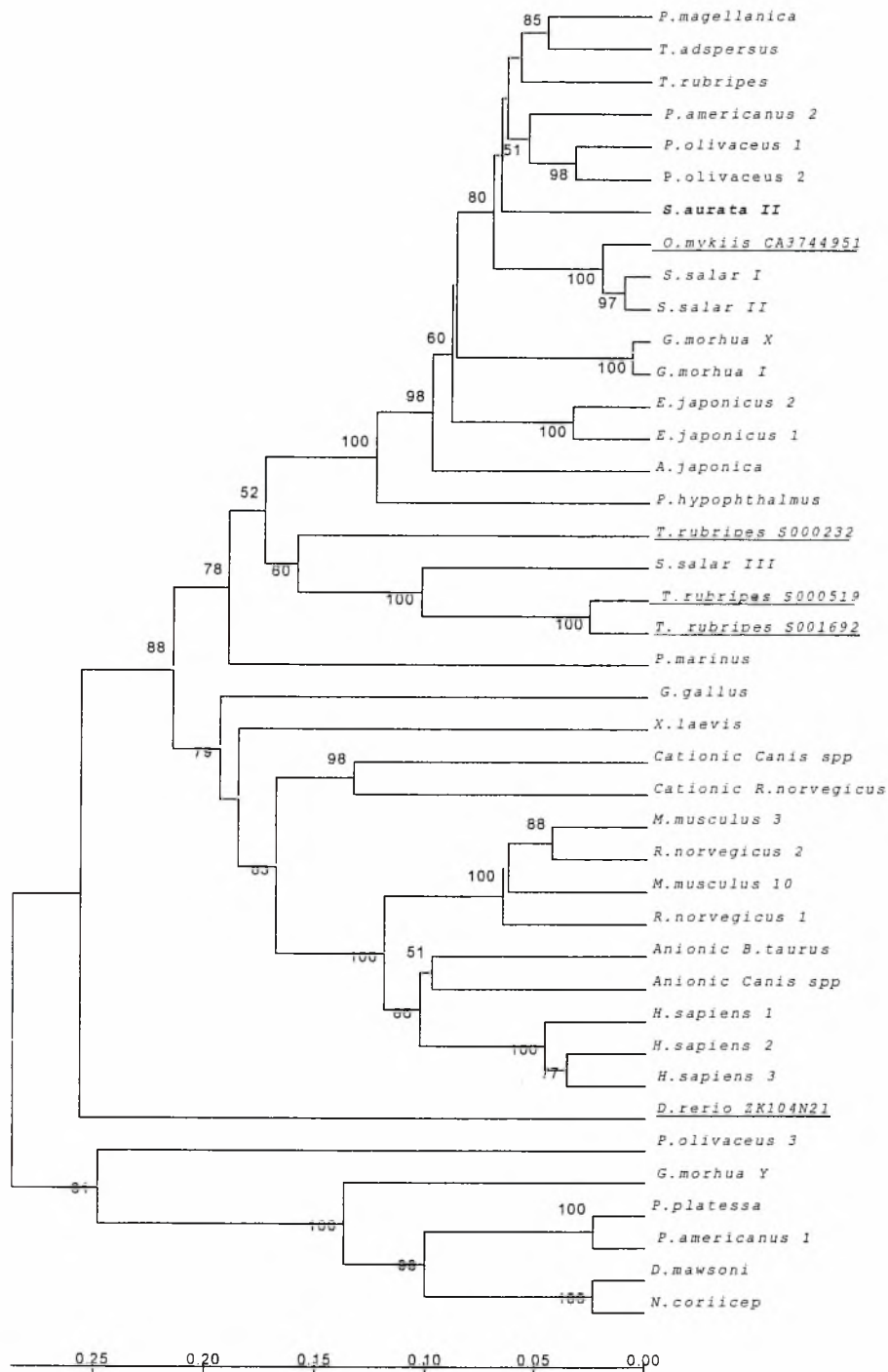
Τα θρυψινογόνα ομαδοποιούνται σε δύο κυρίως κλάδους (Σχήμα 3.9). Ο πρώτος περιλαμβάνει τα θρυψινογόνα των ψαριών που διαβιούν σε πολύ ψυχρά περιβάλλοντα και είναι γνωστό ότι αποτελούν την ομάδα III των θρυψινογόνων. Η ομάδα αυτή υπάρχει τουλάχιστον από τη διαφοροποίηση των Ακανθόμορφων, 150 εκατομμύρια χρόνια πριν, και αποτελεί μια «ταχέως εξελισσόμενη» ταξινομική ομάδα (Roach, 2002). Περιλαμβάνει ένζυμα προσαρμοσμένα να δρουν σε εξαιρετικά ψυχρά περιβάλλοντα και έχουν ως γενικά χαρακτηριστικά υψηλότερη καταλυτική αποτελεσματικότητα, χαμηλότερο αριθμό δεσμών υδρογόνου, λιγότερο πυκνές δομές, αυξημένη επιφανειακή υδροφιλία, αυξημένο αριθμό αμινοξέων μεθειονίνης και προλίνης, διαφορετική αναδίπλωση του βρόχου αυτόλυσης, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν χάσει μια δισουλφιδική γέφυρα (π.χ. θρυψινογόνο Υ του *G. morhua*; Gudmundsdottir & Palsdottir, 2005). Ο δεύτερος κλάδος περιλαμβάνει όλα τα υπόλοιπα θρυψινογόνα των σπονδυλωτών. Εντός αυτού του κλάδου τα θρυψινογόνα των ψαριών, διαφοροποιούνται από των άλλων σπονδυλωτών, υποδηλώνοντας ότι ο πρώτος διπλασιασμός του κοινού προγονικού γονιδίου προηγήθηκε της διαφοροποίησης των τελεόστεων (Suzuki et al., 2002).

Έκφραση των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου και θρυψινογόνου σε διαφορετικούς ιστούς και αναπτυξιακά στάδια

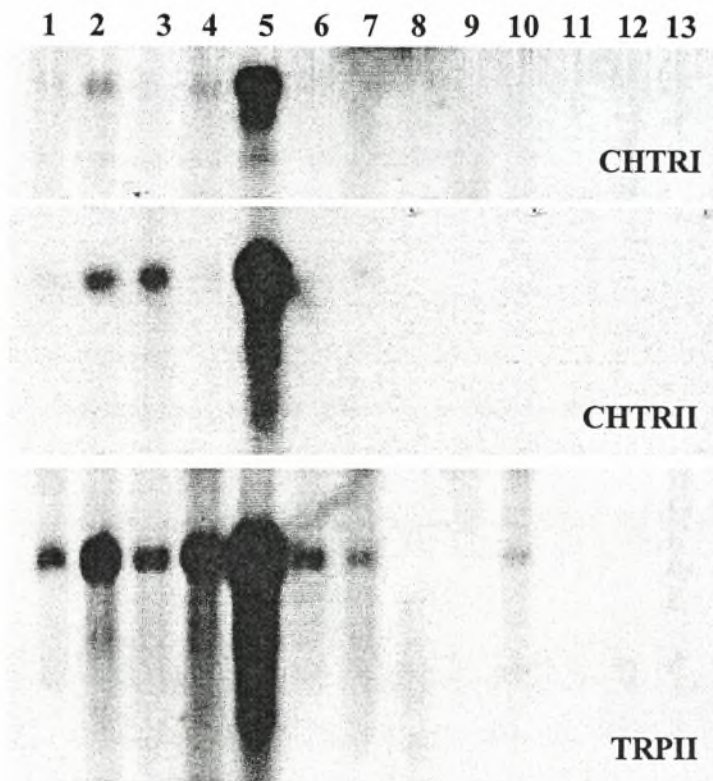
Το μήκος των μεταγράφων των CHTRI, CHTRII και TRPII προσδιορίστηκε σε 1227 bp, 1016 bp και 918 bp αντίστοιχα. Σε νεαρά άτομα τσιπούρας, κύρια περιοχή έκφρασης για όλα τα ζυμογόνα αναδείχτηκε το συκώτι (Σχήμα 3.10). Όλα τα μετάγραφα ανιχνεύτηκαν σε τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα (στομάχι,



Σχήμα 3.8. Φυλογενετική ανάλυση (μέθοδος UPGMA) η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των συντηρημένων αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένης της καταλυτικής τριάδας, των γονιδίων χυμοθρυψινογόνου διαφόρων σπονδυλωτών. Οι αριθμοί πρόσβασης που αφορούν τη βάση δεδομένων NCBI αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής. Οι αλληλουχίες της τσιπούρας εμφανίζονται με έντονα γράμματα, ενώ οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από γενωμικές και ESTs βάσεις δεδομένων υπογραμμίζονται. Η γραμμή αναφοράς δηλώνει τις φυλογενετικές αποστάσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.



Σχήμα 3.9. Φυλογενετική ανάλυση (μέθοδος UPGMA) η οποία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των συντηρημένων αλληλουχιών, συμπεριλαμβανομένης της καταλυτικής τριάδας, των γονιδίων θρυπσινογόνου διαφόρων σπονδυλωτών. Οι αριθμοί πρόσβασης που αφορούν τη βάση δεδομένων NCBI αναφέρονται στο Κεφάλαιο 2 της παρούσας διατριβής. Οι αλληλουχίες της τσιπούρας εμφανίζονται με έντονα γράμματα, ενώ οι αλληλουχίες που ανακτήθηκαν από γενωμικές και ESTs βάσεις δεδομένων υπογραμμίζονται. Η γραμμή αναφοράς δηλώνει τις φυλογενετικές αποστάσεις των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.



Σχήμα 3.10. Έκφραση των CHTRI, CHTRII και TRPII γονιδίων σε διαφορετικούς ιστούς νεαρών ατόμων τσιπούρας: 1, στομάχι; 2, πλωρικά τυφλά; 3, πρόσθιο έντερο; 4, οπίσθιο έντερο; 5, ήπαρ; 6, καρδιά; 7, σπλήνας; 8, λευκός μυς; 9, ερυθρός μυς; 10, βράγχια; 11, εγκέφαλος; 12, νεφρός; 13, επιδερμίδα.

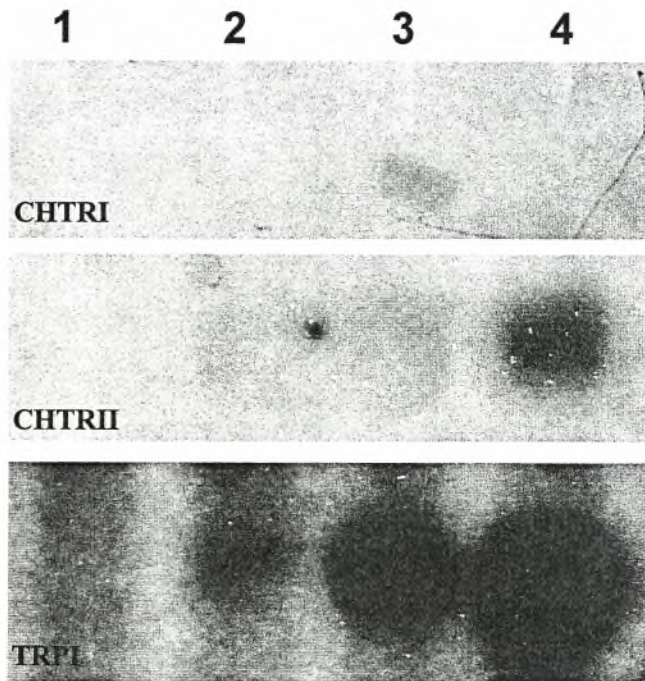
πυλωρικά τυφλά, πρόσθιο και οπίσθιο έντερο), με τα πυλωρικά τυφλά να παρουσιάζουν την πλέον έντονη έκφραση. Αξιοσημείωτη είναι η απουσία έκφρασης του CHTRI στο πρόσθιο έντερο (Σχήμα 3.10^Α). Τα CHTRII και TRPII επίσης ανιχνεύτηκαν στον σπλήνα (Σχήμα 3.10^{Β-Γ}).

Στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια τσιπούρας, μετάγραφα των CHTRI και CHTRII ανιχνεύθηκαν μόλις την πρώτη ημέρα εξωγενούς τροφοληψίας (Σχήμα 3.11^{Α-Β}), ενώ η έκφραση του TRPII ξεκινά δύο μέρες πριν το άνοιγμα του στόματος (Σχήμα 3.11^Γ).

3.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα πεπτικά ένζυμα των πρωτεασών της σερίνης, εξελίχθηκαν μέσω ενός τυχαίου γονιδιακού αναδιπλασιασμού ενός μικρού τμήματος 15-18 νουκλεοτιδίων με εξειδίκευση θρυψίνης (de Haen et al., 1975; Baptista et al., 1998), και οι διαφορές στα υποστρώματα εκλογής τους μπορούν να αποδοθούν κυρίως σε αλλαγές των αμινοξέων στη θέση πρόσδεσης του υποστρώματος (Neurath, 1984). Οι μορφές CHTR και TRP, που απομονώθηκαν από την τσιπούρα, περιέχουν τα υψηλά συντηρημένα αμινοξέα Ser195, His57 και Asp102 της καταλυτικής τριάδας των ενζύμων (Suzuki et al., 2002). Επίσης, διατηρούν τις κυστεΐνες που σχηματίζουν τέσσερις και έξι δισουλφιδικές γέφυρες στα μόρια της χυμοθρυψίνης και της θρυψίνης αντίστοιχα (Hartley, 1970; Suzuki et al., 2002). Όπως τα θρυψινογόνα των περισσότερων σπονδυλωτών, το TRPII διατηρεί συνολικά 12 κυστεΐνες που δημιουργούν έξι υψηλά συντηρημένες δισουλφιδικές γέφυρες στις θέσεις: 22-157, 42-58, 128-232, 136-201, 168-182, 191-220 (Hartley, 1970; Gudmundsdottir et al., 1993; Male et al., 1995; Roach et al., 1997).

Η εκλεκτική επιλογή υποστρώματος από τις πρωτεάσες της σερίνης, καθορίζεται από τις ηλεκτροστατικές ιδιότητες της S1 θέσης πρόσδεσης του. Η προτίμηση της θρυψίνης για αμινοξέα λυσίνης ή αργινίνης και της χυμοθρυψίνης για μεγάλες αρωματικές πλευρικές αλυσίδες, εξαρτώνται από την παρουσία Asp189 και Ser189 αντίστοιχα, στη βάση της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (Suzuki et al., 2002). Αυτά τα δύο χαρακτηριστικά αμινοξέα είναι συντηρημένα στα γονίδια CHTR και TRP της τσιπούρας. Το αμινοξύ στη θέση 192 της S1 θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος - Met για το χυμοθρυψινογόνο και Gln για το θρυψινογόνο - είναι επίσης υψηλά συντηρημένο. Το CHTRI αποτελεί τη μόνη εξαίρεση, φέροντας ένα



Σχήμα 3.11. Έκφραση των CHTRI, CHTRII και TRPII γονιδίων σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια τσιπούρας: 1, ανάπτυξη ματιού; 2, ανάπτυξη θωρακικού πτερυγίου; 3, άνοιγμα στόματος; 4, χρωματισμός ματιού.

Gln192, όπως έχει παρατηρηθεί και στο χυμοθρυψινογόνο 1 του *P. olivaceus* (Suzuki et al., 2002).

Στις πρωτεάσες της σερίνης, καθένα από τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας περιβάλλεται από ένα υψηλά συντηρημένο μοτίβο. Το μοτίβο “GDSGGP” περιβάλλει τη Ser195, το “TAAHC” την His57 και το “DIMLL” το Asp102 (Yousef et al., 2004). Στα χυμοθρυψινογόνα και θρυψινογόνα των τελεόστεων, μόνο το μοτίβο γύρω από τη Ser195, το αμινοξύ που επιτίθεται στον πεπτιδικό δεσμό, είναι έντονα συντηρημένο, ενώ το μοτίβο που περιβάλλει την His57 είναι συντηρημένο μόνο στα χυμοθρυψινογόνα. Ο Yousef και οι συνεργάτες του (2004) αναφέρουν ότι επτά αμινοξέα είναι υψηλά συντηρημένα στην οικογένεια της χυμοθρυψίνης στον Άνθρωπο: Pro28, His57, Asp102, Cys168, Cys182, Ser195 and Gly196. Τα παραπάνω αμινοξέα είναι επίσης συντηρημένα στα CHTR και TRP της τσιπούρας, μαζί με τα Gly193 και Ser214 (στο μικρό μοτίβο SWG), τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό της κοιλότητας του οξυ-ανιόντος και της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (Birktoft et al., 1976; Bartunik et al., 1989; Yousef et al., 2004). Επιπλέον, τα γονίδια CHTR και TRP της τσιπούρας διατηρούν το Asp194. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης των πρόδρομων μορίων, το Asp194 περιστρέφεται και αλληλεπιδρά με την Ile16, η οποία αποτελεί το νέο N-άκρο του ενεργού ενζύμου· και η προκύπτουσα γέφυρα άλατος προκαλεί την απαραίτητη αλλαγή στη διαμόρφωση του, ώστε να ολοκληρωθεί ο σχηματισμός της κοιλότητας του οξυ-ανιόντος και της θέσης πρόσδεσης του υποστρώματος (Berg et al., 2002; Yousef et al., 2004).

Στην επιφάνεια των πρωτεασών της σερίνης σχηματίζονται δύο σημαντικοί βρόχοι στις θέσεις 185-188 (βρόχος 1) και 221-225 (βρόχος 2), οι οποίοι είναι διαφορετικοί για τα CHTR και TRP. Ο βρόχος 1 είναι συντηρημένος στα χυμοθρυψινογόνα των τελεόστεων (60%), ενώ ο βρόχος 2 στα θρυψινογόνα (80%) (Hedstrom et al., 1994; Male et al., 1995). Αυτοί οι δύο βρόχοι αλληλεπιδρούν συνεργατικά με την S1 θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και την Tyr172, για τον καθορισμό της εκλεκτικότητας στη θρυψίνη, παρά το γεγονός ότι δεν έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα (Hedstrom et al., 1992, 1994).

Για τη σταθεροποίηση της ενεργούς θρυψίνης είναι απαραίτητη η ύπαρξη ιόντων ασβεστίου (Bode & Schwager, 1975). Στα θρυψινογόνα των ψαριών, παρόλα αυτά, η θέση πρόσδεσης των ιόντων ασβεστίου, η οποία σχηματίζεται από τα αμινοξέα στις θέσεις 70, 72, 75 και 80, παρουσιάζει σχετικά χαμηλό βαθμό συντήρησης. Στο θρυψινογόνο του *Bos taurus*, τα αμινοξέα στην αντίστοιχη θέση

είναι τα Glu70, Asn72, Val75 and Glu80, ενώ στο TRPII της τσιπούρας αναγνωρίστηκε μόνο το Glu80. Ωστόσο, η συναγόμενη αμινοξική αλληλουχία θρυψίνης στην τσιπούρα, ξεκινά με το μοτίβο "IVGG", το οποίο θεωρείται απαραίτητο για τη σταθεροποίηση του ενεργού ενζύμου (Roach et al., 1997).

Τα θρυψινογόνα των εξελιγμένων σπονδυλωτών φέρουν ένα πεπτιδίο ενεργοποίησης, με αρνητικά φορτισμένα αμινοξέα, συνήθως Val-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, το οποίο δρα ως θέση αναγνώρισης από την εντεροκινάση, που φυσιολογικά ενεργοποιεί το θρυψινογόνο (Neurath, 1984; Spilliaert & Gudmundsdottir, 1999). Στο TRPII της τσιπούρας, αυτό το πεπτιδίο έχει μήκος επτά αμινοξέων, περιλαμβάνει τρία Asp και καταλήγει σε μια Lys, όπως παρατηρείται στην πλειονότητα των θρυψινογόνων (Spilliaert & Gudmundsdottir, 1999). Τα πεπτιδία ενεργοποίησης των θηλαστικών, διαφέρουν από αυτά που μέχρι τώρα έχουν αναγνωριστεί στα ψάρια, καθώς φέρουν τέσσερα συνεχόμενα Asp αντί για λιγότερα από τρία (Gudmundsdottir et al., 1993). Η ενεργοποίηση του χυμοθρυψινογόνου από την άλλη, πραγματοποιείται με μια διάσπαση του δεσμού Arg15-Phe16 υπό τη δράση της θρυψίνης (Birktoft et al., 1976). Στο CHTRI της τσιπούρας, η Arg15 έχει αντικατασταθεί από μια Lys15, όπως και στο χυμοθρυψινογόνο 1 του *P. olivaceus* (Suzuki et al., 2002).

Ακριβώς πριν το πεπτιδίο ενεργοποίησης του θρυψινογόνου στα σπονδυλωτά υπάρχει, στο N-άκρο, το πεπτιδίο αναγνώρισης, το οποίο είναι απαραίτητο για τη μεταφορά της νεοσυντιθέμενης πρωτεΐνης κατά μήκος της μεμβράνης του ενδοπλασματικού δικτύου, πριν αφαιρεθεί στον αυλό του ΕΔ υπό τη δράση μιας μεμβρανικής πεπτιδάσης αναγνώρισης (signal peptidase). Στο TRPII της τσιπούρας, το πεπτιδίο αναγνώρισης αποτελείται από δεκατρία αμινοξέα, κυρίως υδροφοβικά, και φέρει ένα κατάλοιπο Ala ως τελικό αμινοξύ, ακολουθώντας το γενικό κανόνα των ευκαρυωτικών αλληλουχιών πεπτιδίων αναγνώρισης (Neurath, 1984; Gudmundsdottir et al., 1993).

Αν και θα περιμέναμε οι μορφές χυμοθρυψινογόνου και το θρυψινογόνο της τσιπούρας να ομαδοποιούνται με τα ομόλογα γονίδια άλλων Perciformes, αυτά ομαδοποιούνταν με τα αντίστοιχα γονίδια του *P. olivaceus*, ένα είδος της κλάσης Pleuronectiformes. Το παραπάνω είδος ζει σε παρόμοιο περιβάλλον με την τσιπούρα, στην Ιαπωνική Θάλασσα και αντιμετωπίζει τα ίδια εύρη θερμοκρασίας και αλατότητας, στο ίδιο γεωγραφικό μήκος (www.fishbase.net/). Σύμφωνα με το μοντέλο της προσαρμοσμένης εξέλιξης (adaptive evolution model), που θεωρεί τα

γονίδια των σπονδυλωτών ως αποτέλεσμα της προσαρμογής τους στο περιβάλλον (Hughes, 2002), τα ομόλογα γονίδια αυτών των δύο ειδών μπορεί να έχουν εξελιχθεί παράλληλα και σύμφωνα με τις περιβαλλοντικές απαιτήσεις.

Η ανάλυση της έκφρασης των CHTRI, CHTRII και TRPII, σε νεαρά άτομα τσιπούρας, ανέδειξε το ήπαρ ως κύρια περιοχή έκφρασης όλων των ζυμογόνων. Το συκώτι βρίσκεται σε επαφή με το έντονα διαχυτό πάγκρεας των ψαριών και το γενικό πρότυπο έκφρασης των CHTR και TRP στους διάφορους ιστούς της τσιπούρας συμπίπτει με την κατανομή του παγκρεατικού ιστού όπως περιγράφεται για το *P. olivaceus*: κατά μήκος του φλεβικού συστήματος από το στομάχι στο ήπαρ, την καρδιά, το σπλήνα, τα πλωρικά τυφλά και το έντερο, όπως επίσης και την ηπατική φλέβα εισόδου στο συκώτι (Kurokawa & Suzuki, 1995). Τα πλωρικά τυφλά είναι το τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, που συγκέντρωνει την εντονότερη έκφραση όλων των γονιδίων, και εμφανίζεται ως η κύρια περιοχή πρωτεϊνικής πέψης κατά μήκος του εντέρου. Αντίθετα με τις μορφές χυμοθρυψινογόνου, το TRPII εκφράζεται έντονα σε όλες τις επιμέρους περιοχές του πεπτικού σωλήνα, συμπεριλαμβανομένου του στομάχου· γεγονός που πιθανόν σχετίζεται με το χαμηλό ισοηλεκτρικό σημείο του συναγόμενου σταθερού ενζύμου και μια πιθανή ευρύτερη δράση του. Αξιοσημείωτη, επίσης, είναι η εμφάνιση των CHTRII και TRPII στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου, στο οποίο παρατηρείται κυρίως απορρόφηση μακρομορίων μέσω πινοκύτωσης (Cataldi et al., 1987).

Η Northern blot ανάλυση για τα CHTRI, CHTRII και TRPII, στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας μετά την εκκόλαψη, έδειξε ότι η έκφραση τους ξεκινά πριν τη φάση της εξωγενούς τροφοληψίας, ιδιαίτερα όσον αφορά το θρυψινογόνο, του οποίου η έκφραση εμφανίζεται δύο μέρες πριν το άνοιγμα του στόματος και σαφώς πριν την ολοκλήρωση της διαφοροποίησης του γαστρεντερικού σωλήνα (Sarasquete et al., 1993; Sarasquete et al., 1995; Elbal et al., 2004). Το στάδιο πρώτης τροφοληψίας στα ατελή ιχθύδια, χαρακτηρίζεται από την παρουσία ενζύμων που συνδέονται με το μεταβολισμό (πέψη, απορρόφηση και αφομοίωση) μορίων, όπως οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια, παρά το γεγονός ότι η δραστηρότητά τους είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα και το κάθε ένζυμο αναπτύσσεται ανεξάρτητα κατά τη διάρκεια της οντογένεσης (Kolkovski, 2001).

Συμπερασματικά, τα CHTRI, CHTRII και TRPII που απομονώθηκαν από την τσιπούρα, εμφανίζουν υψηλά συντηρημένα αμινοξέα, απαραίτητα για την καταλυτική δράση και τη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους. Το πρότυπο

έκφρασης τους κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα, των γειτονικών αδένων και οργάνων είναι το αναμενόμενο, εκτός από την εμφάνιση τους στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου, γεγονός που χρήζει περαιτέρω μελέτης στα πλαίσια της προσπάθειας κατανόησης της φυσιολογίας θρέψης των ψαριών. Επίσης, η έκφραση των γονιδίων προηγείται της έναρξης της εξωγενούς τροφοληψίας και της διαφοροποίησης του γαστρεντερικού σωλήνα, στοιχείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους εκτροφείς για τη βελτιστοποίηση των διατροφικών σχημάτων κατά τις πρώτες μέρες τροφοληψίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Η ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΤΗΣ ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*) ΣΤΗΝ ΑΙΦΝΙΔΙΑ ΜΕΙΩΣΗ ΤΗΣ ΑΛΑΤΟΤΗΤΑΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Συχνά ταχύτερη αύξηση των ψαριών παρατηρείται σε περιβάλλοντα ενδιάμεσης αλατότητας (Boeuf & Payan, 2001). Το προσλαμβανόμενο - λόγω οσμωρύθμισης - νερό, από τα ψάρια που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον, όντας αλκαλικό ($\text{pH} \approx 8,0$), είναι πιθανό να μεταβάλλει τις φυσικοχημικές συνθήκες στον εντερικό αυλό (Usher et al., 1990) και να επηρεάζει απευθείας τη λειτουργία και την απόδοση των πεπτικών ενζύμων (Boeuf & Payan, 2001), των οποίων οι λειτουργικές δομές και η επλεκτικότητα διατηρούνται μέσω ιοντικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στην υπεύθυνη περιοχή του ενζύμου και το περιβάλλον μέσον (Barrett et al., 2004). Η παραπάνω υπόθεση ενισχύεται από τα αποτελέσματα πειραμάτων που έδειξαν επίδραση της αλατότητας στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών (*Dicentrarchus labrax*: Alliot et al., 1983; *Sparus sarba*: Woo & Kelly, 1995; *Mugil cephalus*: Barman et al., 2005).

Σε προηγούμενη εργασία (Moutou et al., 2004), νεαρά άτομα *Sparus aurata* παρουσίασαν ταχύτερη αύξηση όταν υποβλήθηκαν σε αλατότητα 20‰ σε σχέση με 33‰ και η αλατότητα επηρέασε τη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών μετά από περίοδο εκτροφής δύο μηνών. Σ' αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζεται η μελέτη της επίδρασης της αιφνίδιας μείωσης της αλατότητας, στη δραστικότητα των πεπτικών πρωτεασών και τα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος στο ίδιο είδος, την τσιπούρα (*Sparus aurata* L.), κατά τη διάρκεια της μεταβατικής περιόδου εγκλιματισμού της. Πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της αλατότητας στην πρωτεϊνική πεπτικότητα μπορούν εν δυνάμει να φωτίσουν πιθανούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης μεταξύ οσμωρύθμισης και πέψης, συμβάλλοντας στην κατανόηση της διατροφικής και οικολογικής φυσιολογίας των ευρύαλων ειδών. Επιπλέον, η μελέτη ενός μεγάλου αριθμού πεπτικών ενζύμων σε διαφορετικά τμήματα του γαστρεντερικού σωλήνα ενός σαρκοφάγου είδους, είναι πιθανό να αναδείξει τη σχετική σημασία αυτών των ενζύμων στην πρωτεολυτική διαδικασία. Γι' αυτό, i) οι ολικές όζινες πρωτεάσες, ii) οι ολικές αλκαλικές πρωτεάσες, iii) οι πρωτεάσες της σερίνης: θρυψίνη, χυμοθρυψίνη και ελαστάση, iv) οι μεταλλοπρωτεάσες:

καρβοξυπεπτιδάση Α και καρβοξυπεπτιδάση Β μετρήθηκαν στο στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και το οπίσθιο έντερο νεαρών ατόμων τσιπούρας που μεταφέρθηκαν αιφνίδια από 33% σε αλατότητα 21%.

4.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Εκατόν είκοσι δύο νεαρά άτομα τσιπούρας *S. aurata* ($13,5 \pm 2,2$ g) που αποκτήθηκαν από τοπική μονάδα εκτροφής ιχθύων (ΙΧΘΥΟ ΑΕ, Βαθύκοιλο Πελασγίας) προσαρμόστηκαν σε συνθήκες αλατότητας 33‰ για ένα μήνα πριν την έναρξη του πειράματος. Στη συνέχεια, τα ψάρια διαιρέθηκαν σε έξι πειραματικές ομάδες των 37 ατόμων η κάθε μια και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία όγκου 140-lt το καθένα. Τρεις από τις πειραματικές ομάδες υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και άλλες τρεις σε 21‰ για 15 μέρες. Τα ψάρια τρέφονταν στο 2,5% του σωματικού τους βάρους με τη χρήση εμπορικών συμπύκτων (BioMar ΑΕ) αναγραφόμενης σύστασης: 47% πρωτεΐνη, 20% λιπίδια, 15,2% ΕΝΕΟ και 8% τέφρα, μια φορά ημερησίως (15.00). Κάθε ενυδρείο ήταν εξοπλισμένο με αυτόνομο αερισμό και σύστημα φιλτραρίσματος και ανακύκλωσης του νερού. Η φωτοπερίοδος κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν 11D:13L. Τα επίπεδα οξυγόνου, θερμοκρασίας και αλατότητας μετρούνταν καθημερινά. Η διακύμανση της θερμοκρασίας ($22,6 \pm 1,3$ °C) ήταν η ίδια μεταξύ των μεταχειρίσεων. Οι επιθυμητές τιμές αλατότητας επιτυγχάνονταν μέσω αραιώσης θαλασσινού νερού (33-34‰) με μη κατεργασμένο γλυκό νερό γεώτρησης (0-1‰) όταν αυτό κρίνονταν απαραίτητο. Κατά τη διάρκεια του πειράματος δεν καταγράφηκαν θνησιμότητες.

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 0, 1, 2, 3, 4, 8, 10 και 15 μετά τη μεταφορά των ψαριών στις διαφορετικές συνθήκες αλατότητας. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας, έξι άτομα από κάθε μεταχείριση αναισθητοποιούνταν με τη χρήση MS 222, ζυγίζονταν ατομικά και δειγματοληπτούνταν. Τα δείγματα λαμβάνονταν πάντα την ίδια ώρα (24 h μετά τη χορήγηση τροφής) και η ώρα δειγματοληψίας καταγράφονταν.

Η λήψη και η προετοιμασία των δειγμάτων αίματος, στομάχου, πυλωρικών τυφλών, πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, καθώς και οι μετρήσεις συγκέντρωσης κορτιζόλης και ενζυμικών δραστηριοτήτων πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο αντίστοιχο κεφάλαιο «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ» της παρούσας διατριβής.

Συγκεκριμένα, όσον αφορά τις μετρήσεις των ενζυμικών δραστηριοτήτων η πραγματοποίηση των προκαταρκτικών ελέγχων οδήγησε στη χρήση των παρακάτω συνθηκών (Πίνακας 4.1):

Πίνακας 4.1. Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των δραστηριοτήτων i) ολικών όξινων πρωτεασών, ii) ολικών αλκαλικών πρωτεασών, iii) πρωτεασών της σερίνης: θρυψίνης, χυμοθρυψίνης και ελαστάσης, iv) μεταλλοπρωτεασών: καρβοξυπεπτιδάσης A και καρβοξυπεπτιδάσης B μετά την πραγματοποίηση προκαταρκτικών ελέγχων

	Υπόστρωμα	Τελική συγκέντρωση υποστρώματος	Ποσότητα ενζυμικού εκχυλίσματος (μl)	Χρόνος αντίδρασης (min)
Ολικές όξινες πρωτεάσες	αιμοσφαιρίνη	0,5%	10	10
Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες	αζοκαζεΐνη	1,5%	10	30
Θρυψίνη	BAPNA	0,5 mM	10	6
Χυμοθρυψίνη	BTEE	0,5 mM	10-20	2-5 *
Ελαστάση	N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide	1 mM	5	2-5 *
Καρβοξ/ση A	hippuryl-L-phenylalanine	0,5 mM	5-15	2-5 *
Καρβοξ/ση B	hippuryl-L-arginine	0,5 mM	5	2-5 *

* Συνεχείς μετρήσεις

4.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ειδικές ενζυμικές δραστηριότητες εκφράστηκαν ως U/mg πρωτεΐνη, καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο κάθε επιμέρους τμήματος του εντέρου ανάμεσα και μέσα στις μεταχειρίσεις. Σε συμφωνία με παλαιότερες αναφορές (Alarcón et al., 1998; Moutou et al., 2004), τα ενζυμογράμματα των αλκαλικών τμημάτων του εντέρου της τσιπούρας ανέδειξαν

τέσσερις καζεΐνολυτικές ζώνες μεγέθους 25-90 kDa, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν με τη χρήση εκλεκτικών αναστολέων. Η μεταβολή της αλατότητας δεν επηρέασε το ισοενζυμικό προφίλ και η χυμοθρυψίνη εμφανίστηκε ως η κυριότερη πρωτεάση στα συγκεκριμένα τμήματα (Σχήμα 4.1). Αντίθετα, στο στομάχι η χρήση εκλεκτικών αναστολέων ανέδειξε ως μοναδική πρωτεάση την πεψίνη.

Ολικές όξινες και αλκαλικές πρωτεάσες

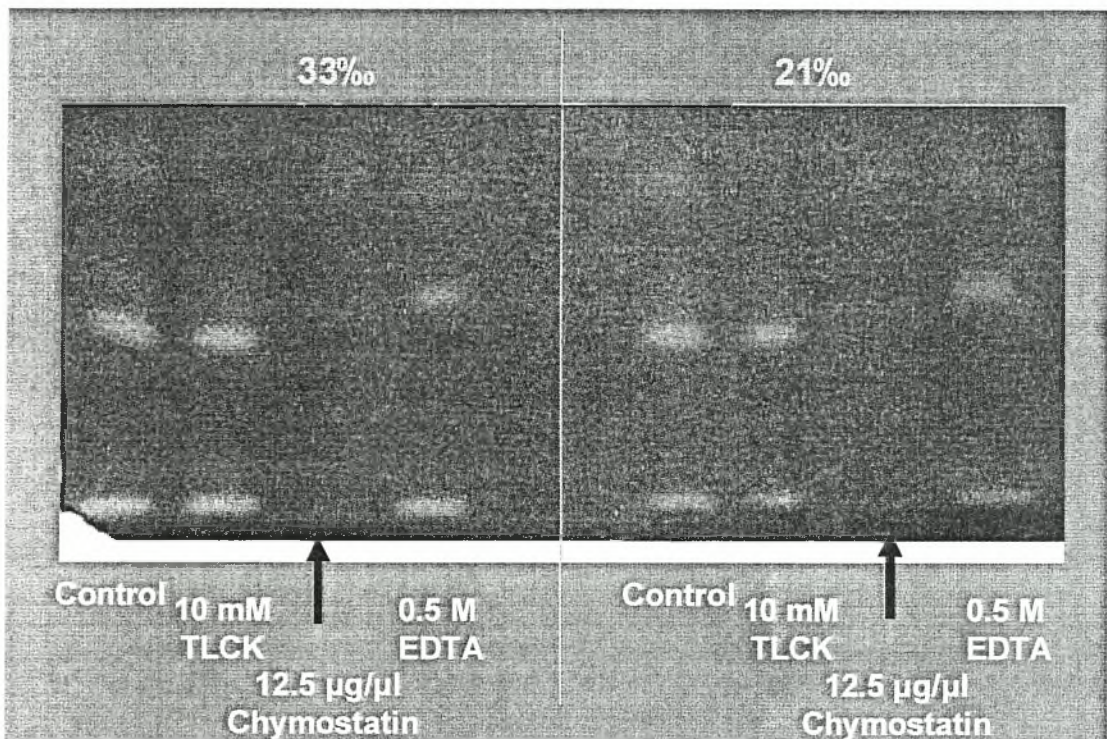
Η μεταβολή της αλατότητας δεν επηρέασε σημαντικά, ούτε τη δραστηριότητα των ολικών όξινων πρωτεασών (πεψίνη) στο στομάχι, ούτε τη δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στα διάφορα τμήματα του εντέρου. Παρόλα αυτά, η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών ήταν σημαντικά διαφορετική ($P < 0,001$) ανάμεσα στα επιμέρους εντερικά τμήματα, με το πρόσθιο έντερο να εμφανίζει τις μικρότερες τιμές (Πίνακας 4.2).

Η χρήση εκλεκτικών αναστολέων (Πίνακας 4.3) κατά της δραστηριότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών επιβεβαίωσε τη σημαντική συνεισφορά της χυμοθρυψίνης (ευαίσθητη στη chymostatin) στην ολική δραστηριότητα των αλκαλικών τμημάτων του εντέρου, ενώ η θρυψίνη (ευαίσθητη στο TLCK) φάνηκε να έχει δευτερεύοντα ρόλο, ανεξάρτητα αλατότητας. Επίσης, ανιχνεύθηκε η παρουσία πρωτεασών ευαίσθητων σε χηλικούς παράγοντες (χρήση EDTA). Αξίζει να σημειωθεί, ότι δεν εντοπίστηκαν όξινες πρωτεάσες στα αλκαλικά εντερικά τμήματα, ούτε αλκαλική δραστηριότητα στο στομάχι.

Πρωτεάσες της σερίνης

Η αιφνίδια μεταβολή της αλατότητας δεν είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των κυριότερων πρωτεασών της σερίνης, θρυψίνη και χυμοθρυψίνη. Οι ειδικές δραστηριότητες και των δύο ενζύμων ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ($P < 0,001$) ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου, με το οπίσθιο έντερο να εμφανίζει τις υψηλότερες τιμές και το πρόσθιο τις χαμηλότερες (Πίνακας 4.4).

Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός αλληλοεπικάλυψης ανάμεσα στη δράση χυμοθρυψίνης και θρυψίνης, η σχετική παρουσία ισοενζυμικών μορφών και οι πιθανές αλλαγές μετά τη μεταφορά των ψαριών σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας, οι εκλεκτικοί αναστολείς chymostatin και TLCK χρησιμοποιήθηκαν κατά της δραστηριότητας θρυψίνης και χυμοθρυψίνης αντίστοιχα (Πίνακας 4.5). Η θρυψίνη



Σχήμα 4.1. Ενζυμογράμματα αλκαλικών πρωτεασών στα πλωρικά τυφλά ατόμων τσιπούρας, που υποβλήθηκαν σε διαφορετικές αλατότητες, παρουσία εκλεκτικών αναστολέων.

Πίνακας 4.2. Ειδική δραστηριότητα ολικών όξινων και αλκαλικών πρωτεασών (U mg/ πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) για άτομα τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$) μεταξύ τους

	Ολικές όξινες πρωτεάσες	Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες		
	Στομάχι	Πυλωρικά τυφλά	Πρόσθιο έντερο	Οπίσθιο έντερο
33‰	121,63 \pm 4,5	10,04 \pm 0,7 ^a	4,76 \pm 0,4 ^b	9,51 \pm 1,0 ^a
21‰	126,47 \pm 4,7	8,61 \pm 0,8 ^a	4,43 \pm 0,4 ^b	9,50 \pm 0,8 ^a

Πίνακας 4.3. Ποσοστιαία αναστολή (%; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) των ολικών αλκαλικών πρωτεασών από τη χρήση ειδικών αναστολέων στα επιμέρους τμήματα του εντέρου ατόμων τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των ποσοστιαίων αναστολών στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$) μεταξύ τους

	Ομάδα πρωτεασών	Πυλωρικά τυφλά	Πρόσθιο έντερο	Οπίσθιο έντερο
TLCK	θρυψίνη			
33‰		32,27 \pm 4,1 ^a	33,80 \pm 4,4 ^a	40,91 \pm 4,4 ^a
21‰		31,87 \pm 3,9 ^a	30,37 \pm 4,4 ^a	37,93 \pm 4,1 ^a
Chymostatin	χυμοθρυψίνη			
33‰		49,09 \pm 4,4 ^a	38,74 \pm 5,3 ^a	42,80 \pm 4,7 ^a
21‰		50,81 \pm 4,3 ^a	37,90 \pm 5,0 ^a	48,49 \pm 3,8 ^a
PMSF	πρωτεάσες σερίνης			
33‰		37,76 \pm 4,4 ^a	31,00 \pm 4,2 ^a	45,82 \pm 4,0 ^b
21‰		26,35 \pm 4,3 ^a	35,64 \pm 5,3 ^a	40,88 \pm 4,5 ^b
EDTA	μεταλλοπρωτεάσες			
33‰		22,66 \pm 8,1 ^a	25,18 \pm 7,0 ^a	18,02 \pm 5,4 ^a
21‰		12,56 \pm 4,4 ^a	24,31 \pm 7,8 ^a	17,40 \pm 6,8 ^a

Πίνακας 4.4. Ειδικές δραστηκότητες θρυψίνης και χυμοθρυψίνης (U mg/πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) για άτομα τοπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των ειδικών δραστηκότητων στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$) μεταξύ τους

	Πυλωρικά τυφλά	Πρόσθιο έντερο	Οπίσθιο έντερο
Θρυψίνη			
33‰	13,54 \pm 1,4 ^a	6,88 \pm 1,0 ^b	20,29 \pm 2,6 ^a
21‰	10,31 \pm 1,2 ^a	6,89 \pm 0,8 ^b	15,62 \pm 2,6 ^a
Χυμοθρυψίνη			
33‰	184,43 \pm 15,8 ^a	153,07 \pm 14,1 ^a	294,33 \pm 31,3 ^b
21‰	178,38 \pm 11,6 ^a	166,71 \pm 18,0 ^a	297,36 \pm 36,6 ^b

Πίνακας 4.5. Ποσοστιαία αναστολή (%; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) της θρυψίνης από τη χρήση chymostatin και της χυμοθρυψίνης από τη χρήση TLCK στα επιμέρους τμήματα του εντέρου ατόμων τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Οι μέσοι όροι των ποσοστιαίων αναστολών στην ίδια γραμμή με διαφορετικό εκθέτη είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικοί ($P < 0,05$) μεταξύ τους

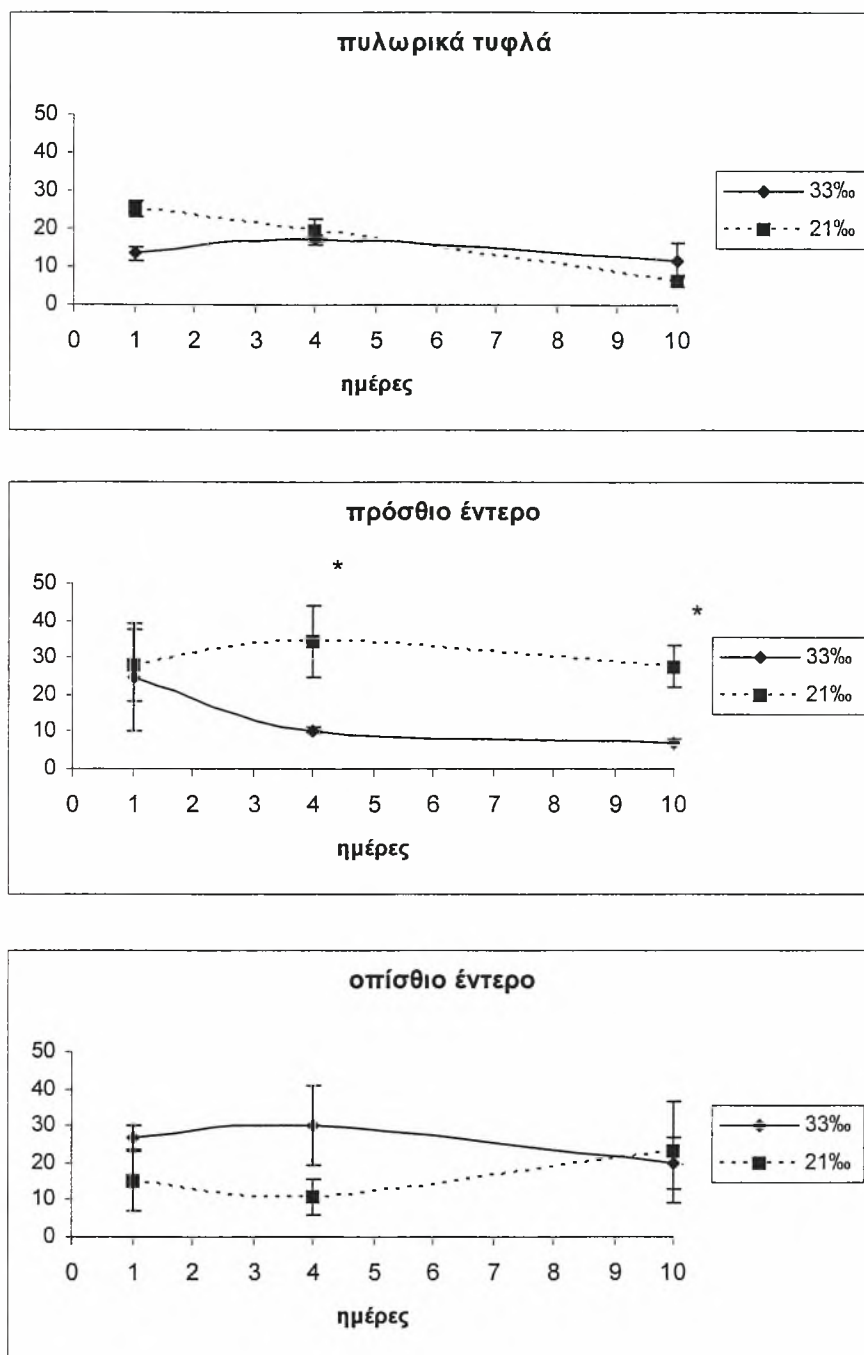
	Πυλωρικά τυφλά	Πρόσθιο έντερο	Οπίσθιο έντερο
CHYMOSTATIN vs θρυψίνη			
33‰	60,20 \pm 5,0 ^a	61,73 \pm 5,5 ^a	56,52 \pm 5,0 ^a
21‰	56,90 \pm 4,9 ^a	39,13 \pm 5,3 ^b	54,64 \pm 5,0 ^a
TLCK vs χυμοθρυψίνη			
33‰	26,44 \pm 1,1 ^a	23,80 \pm 1,4 ^a	25,62 \pm 0,4 ^a
21‰	29,32 \pm 0,8 ^b	26,59 \pm 0,5 ^a	25,71 \pm 0,3 ^a

αναστάλθηκε σημαντικά από τη χρήση chymostatin σε όλα τα αλκαλικά τμήματα του εντέρου και η αλατότητα δεν επηρέασε σημαντικά το πρότυπο αναστολής. Η χρήση TLCK είχε ηπιότερη επίδραση στη δραστικότητα της χυμοθρυψίνης, η οποία αναστάλθηκε σε ποσοστό 20-30% κατά μήκος του εντέρου και στις δύο μεταχειρίσεις. Παρά το γεγονός ότι, τα παραπάνω αποτελέσματα δε δηλώνουν αλλαγές στο προφίλ των κυριότερων πρωτεασών της σερίνης λόγω διαφορετικών συνθηκών αλατότητας, μπορεί να είναι ενδεικτικά του χαμηλού βαθμού εξειδίκευσης των ευρέως χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων και αναστολέων σε σχέση με τις πεπτικές πρωτεάσες των ψαριών.

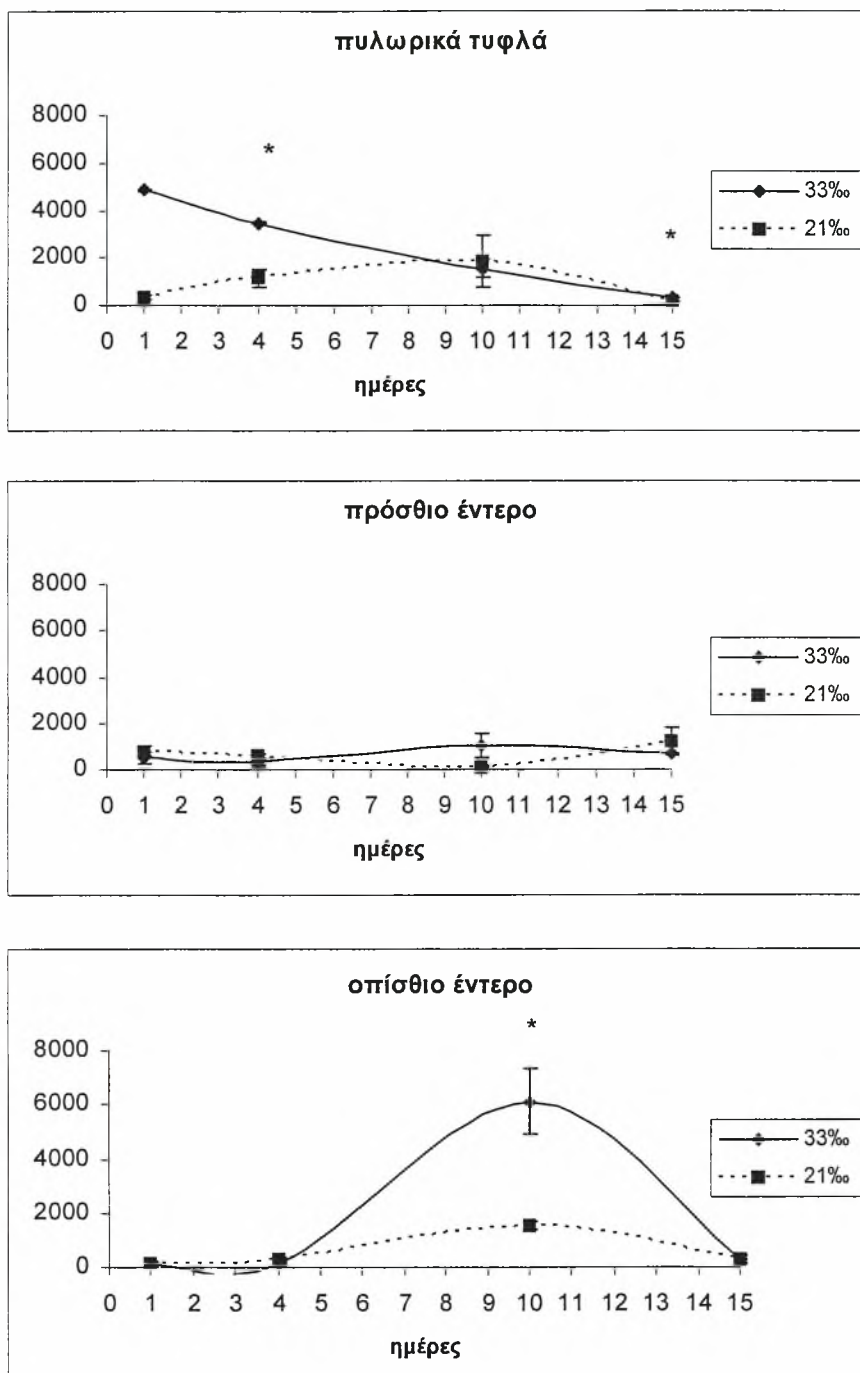
Η τρίτη πρωτεάση της σερίνης που μετρήθηκε, η ελαστάση, επηρεάστηκε σημαντικά από τη μεταβολή της αλατότητας στην περιοχή του πρόσθιου εντέρου, όπου ήταν σημαντικά υψηλότερη στα ψάρια ($P<0,05$) που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 21‰ καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (Σχήμα 4.2).

Μεταλλοπρωτεάσες

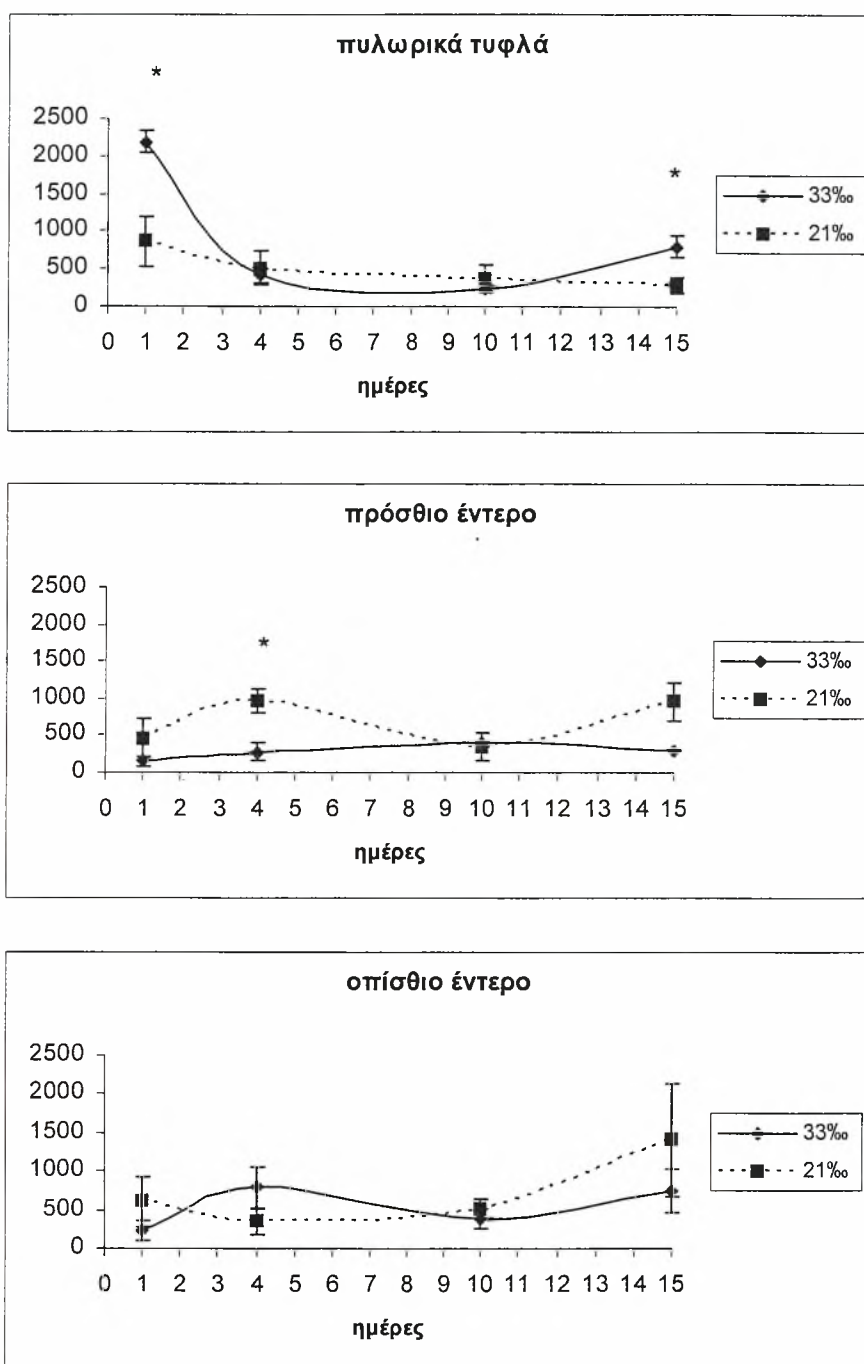
Οι μελέτες εκλεκτικών αναστολέων έδειξαν ότι, οι ευαίσθητες σε χηλικούς παράγοντες πρωτεάσες συνεισφέρουν περίπου 20% στη δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών κατά μήκος του εντέρου (Πίνακας 4.3). Και οι δύο μεταλλοπρωτεάσες που μελετήθηκαν - καρβοξυπεπτιδάση Α και καρβοξυπεπτιδάση Β - επηρεάστηκαν από την αλατότητα σε διαφορετικά τμήματα του εντέρου. Η καρβοξυπεπτιδάση Α ήταν σημαντικά διαφορετική ($P<0,01$) μεταξύ των μεταχειρίσεων στις περιοχές των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου (Σχήμα 4.3), ενώ η καρβοξυπεπτιδάση Β επηρεάστηκε σημαντικά από τη μεταβολή της αλατότητας ($P<0,01$) στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του πρόσθιου εντέρου (Σχήμα 4.4). Οι ειδικές δραστικότητες και των δύο καρβοξυπεπτιδασών ήταν σημαντικά διαφορετικές ($P<0,001$) ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου, μόνο στα ψάρια που κρατήθηκαν σε αλατότητα 33‰. Η καρβοξυπεπτιδάση Α αποτελούσε την κυρίαρχη μορφή στην υψηλή αλατότητα, εμφανίζοντας τουλάχιστον διπλάσια δραστικότητα από την καρβοξυπεπτιδάση Β (Σχήμα 4.5). Η μείωση της αλατότητας οδήγησε σε δραματική αλλαγή του λόγου των καρβοξυπεπτιδασών, σε όλα τα τμήματα του εντέρου, όπου οι δραστικότητες των δύο ενζύμων κυμάνθηκαν περίπου στο ίδιο επίπεδο.



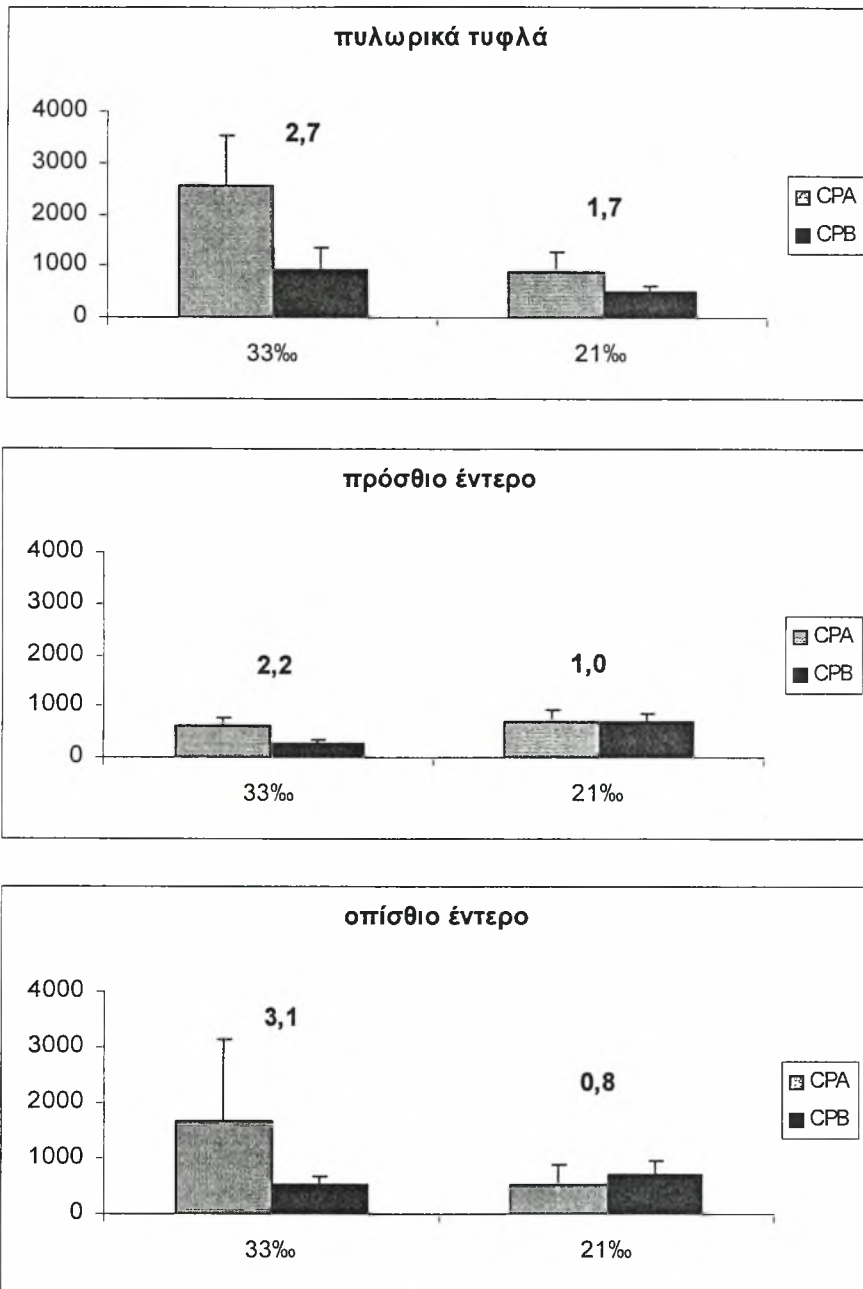
Σχήμα 4.2. Ειδική δραστικότητα ελασάσης (U/ mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) σε διαφορετικά αλκαλικά τμήματα του εντέρου ατόμων τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) τη συγκεκριμένη ημέρα του πειράματος.



Σχήμα 4.3. Ειδική δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης Α (U/ mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) σε διαφορετικά αλκαλικά τμήματα του εντέρου ατόμων τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) τη συγκεκριμένη ημέρα του πειράματος.



Σχήμα 4.4. Ειδική δραστικότητα καρβοξυπεπτιδάσης Β (U/ mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) σε διαφορετικά αλκαλικά τμήματα του εντέρου ατόμων που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα. Ο αστερίσκος (*) δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0,05$) τη συγκεκριμένη ημέρα του πειράματος.



Σχήμα 4.5. Ειδική δραστηριότητα καρβοξυπεπτιδάσης Α και καρβοξυπεπτιδάσης Β (U/ mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) σε διαφορετικά αλκαλικά τμήματα του εντέρου ατόμων τοπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33% και 21% αντίστοιχα. Ο αριθμός επάνω από τις στήλες ισούται με το λόγο CPA:CPB.

Συγκέντρωση κορτιζόλης

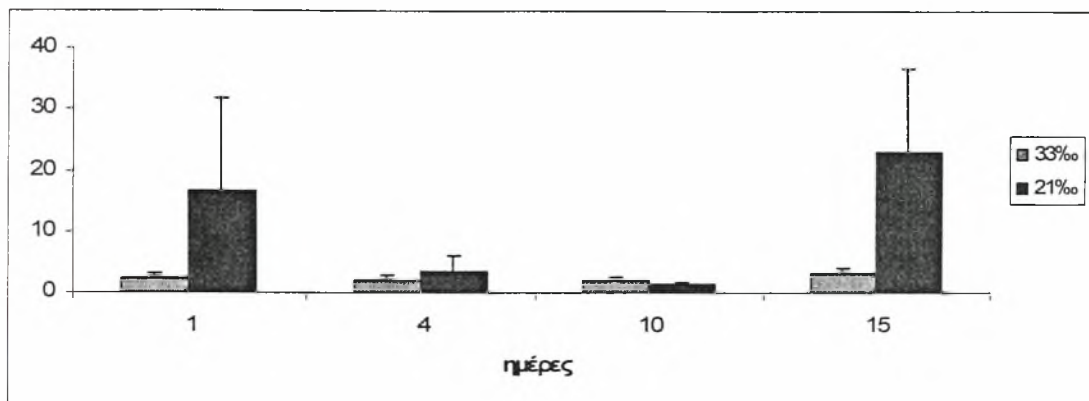
Η αλατότητα δεν είχε στατιστικά σημαντική επίδραση ($P>0,05$) στη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος, η οποία παρουσίασε υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των ατόμων, που υποβλήθηκαν σε μειωμένη αλατότητα (Σχήμα 4.6). Καμία σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε ανάμεσα στα επίπεδα κορτιζόλης και τις δραστηκότητες των πρωτεασών που μετρήθηκαν, ανεξαρτήτως συνθηκών αλατότητας.

4.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μικρής χρονικής διάρκειας μείωση της αλατότητας δεν επηρέασε σημαντικά, ούτε τη δραστηκότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι, ούτε τη δραστηκότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών και των κυριότερων πρωτεασών της σερίνης - θρυψίνης και χυμοθρυψίνης - στα αλκαλικά τμήματα του εντέρου. Σε συμφωνία με μελέτες *in vitro* που έδειξαν ότι η καζεϊνολυτική δραστηκότητα των εντερικών ολικών πρωτεασών της τσιπούρας είναι ανθεκτική σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων NaCl (0-0,5M: Munilla-Moran & Saborido-Rey, 1996b), τα παραπάνω αποτελέσματα, ενισχύουν την υπόθεση ότι ο ευρύαλος χαρακτήρας του *S. aurata* συγκροτείται από αντίστοιχες φυσιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένου ενός πεπτικού μηχανισμού ανθεκτικού σε αιφνίδιες μεταβολές της αλατότητας.

Αξιοσημείωτο είναι ότι, η μεταβολή της αλατότητας οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές των δραστηκότητων της ελαστάσης και των καρβοξυπεπτιδάσων, οι οποίες ήταν περισσότερο εμφανείς στο ανώτερο τμήμα του εντέρου (πυλωρικά τυφλά και πρόσθιο έντερο). Στα πυλωρικά τυφλά παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της δραστηκότητας των καρβοξυπεπτιδάσων Α και Β, ενώ οι αλλαγές της δραστηκότητας της ελαστάσης συγκεντρώθηκαν στο πρόσθιο έντερο μαζί με τις μεταβολές της δραστηκότητας της καρβοξυπεπτιδάσης Β. Στο οπίσθιο έντερο οι μεταβολές περιορίστηκαν σε αλλαγές στη δραστηκότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α.

Ο ρόλος του πεπτικού σωλήνα - από το στόμα μέχρι την έδρα - στην αφαλάτωση του προσλαμβανόμενου από τα ψάρια νερού μαζί με την τροφή, έχει αποτελέσει αντικείμενο μιας σειράς μελετών για τα είδη που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον (Ando et al., 2003; Cataldi et al., 1987; Kirsch & Meister, 1982; Shehadeh & Gordon, 1969; Smith et al., 1975). Μέσω μιας σειράς προσεγγίσεων του θέματος, έχει επιβεβαιωθεί ένα γενικό μοντέλο: η άντληση των μονοσθενών ιόντων λαμβάνει χώρα κυρίως στον οισοφάγο, το στομάχι συμπληρώνει τη δράση του οισοφάγου, το



Σχήμα 4.6. Συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος (ng/ml; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) ατόμων τσιπούρας που υποβλήθηκαν σε αλατότητα 33‰ και 21‰ αντίστοιχα.

εντερικό επιθήλιο απομακρύνει ενεργά εναπομείναντα μονοσθενή ιόντα και το νερό στον εντερικό αυλό εμφανίζεται εμπλουτισμένο σε μαγνήσιο και θείο. Τα ιστολογικά χαρακτηριστικά του οισοφάγου της τσιπούρας συμφωνούν με τον πιθανό ρόλο του στην αφαλάτωση του νερού (Cataldi et al., 1987). Στο χέλι, *Anguilla japonica*, *in vitro* και *in vivo* μελέτες έδειξαν ότι, συγκεκριμένες περιοχές του εντέρου είναι περισσότερο ενεργές στη μεταφορά ιόντων και μια μεγάλη μείωση της [Cl⁻] παρατηρήθηκε εντός λίγων χιλιοστών στην περιοχή του πρόσθιου εντέρου (Ando, 1975; Kirsch and Meister, 1982), ενώ πρόσφατη έρευνα ανέδειξε το σημαντικό οσμωρυθμιστικό ρόλο των πυλωρικών τυφλών (Veillette et al., 2005). Ο εγκλιματισμός των Salmonidae σε συνθήκες αλατότητας θαλασσινού νερού, περιλαμβάνει την αύξηση της ενεργής πρόσληψης υγρών από τα πυλωρικά τυφλά και είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με τη λειτουργία της πέψης και την πρόσληψη θρεπτικών (Seidelin et al., 2000; Veillette et al., 2005).

Οι αλλαγές στις δραστηριότητες των πεπτικών ενζύμων, που ακολούθησαν την αιφνίδια μεταβολή της αλατότητας στην παρούσα εργασία, συμφωνούν με τον οσμωρυθμιστικό ρόλο των επιμέρους τμημάτων του πεπτικού σωλήνα, όπως είναι γνωστός μέχρι σήμερα. Το στομάχι, που χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη απορρόφηση αλάτων, δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στην ενζυμική δραστηριότητα. Οι περισσότερο έντονες μεταβολές εντοπίζονται στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, το τμήμα του εντέρου όπου τα ανενεργά ζυμογόνα των πεπτικών πρωτεασών εισέρχονται στον εντερικό αυλό μέσω του παγκρεατικού αγωγού (Kurokawa & Suzuki, 1995), καθώς και στο πρόσθιο έντερο, όπου φαίνεται να λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της οσμωρυθμιστικής δράσης του εντέρου. Στο οπίσθιο έντερο η επίδραση της μεταβολής της αλατότητας ήταν ηπιότερη.

Στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, η μείωση της αλατότητας είχε σημαντική επίδραση στις δραστηριότητες των μεταλλοπρωτεασών που μελετήθηκαν (Σχήματα 4.4-4.5). Η δραστηριότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A ήταν μικρότερη κατά μήκος του εντέρου των ατόμων που υποβλήθηκαν σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας και η κυριαρχία της επί της καρβοξυπεπτιδάσης B εξαλειφθηκε (Σχήμα 4.6). Επιπλέον, η ζώνωση των καρβοξυπεπτιδάσεων μεταξύ των επιμέρους τμημάτων του εντέρου χάθηκε με τη μείωση της αλατότητας, ως ένας πιθανός μηχανισμός αντίδρασης. Οι πεπτικές μεταλλοπρωτεάσες δρουν σε συνθήκες αυξημένου pH και υψηλών συγκεντρώσεων δισθενών ιόντων (Clark et al., 1985; Hidalgo et al., 1999). Με βάση το παραπάνω, η μεταβολή της αλατότητας αναμένονταν να επηρεάσει τις

δραστικότητες τους και η υψηλότερη δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης A σε συνθήκες υψηλής αλατότητας μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη συγκέντρωση των απαιτούμενων ιόντων. Η καρβοξυπεπτιδάση A ήταν λιγότερο ανθεκτική στη μείωση της αλατότητας σε σχέση με την καρβοξυπεπτιδάση B.

Οι καρβοξυπεπτιδάσες αποτελούν εξωπεπτιδάσες, οι οποίες απελευθερώνουν αμινοξέα από το C-τελικό άκρο των διατροφικών πεπτιδίων και τα οποία στη συνέχεια υπάρχουν ενδείξεις ότι απορροφούνται από τα ψάρια σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με τα μικρού μήκους πεπτίδια (Bakke-McKeller et al., 2000). Η καρβοξυπεπτιδάση B μπορεί να συνεισφέρει στην περαιτέρω αποικοδόμηση των προϊόντων της δράσης της θρυψίνης, για τα οποία είναι εξειδικευμένη, ενώ η καρβοξυπεπτιδάση A είναι εξειδικευμένη για την αποικοδόμηση των προϊόντων της χυμοθρυψίνης. Αυτή η συσχέτιση των δραστηριοτήτων, υποστηρίζεται επίσης από τη συνδυασμένη κυριαρχία της χυμοθρυψίνης και της καρβοξυπεπτιδάσης A, που παρατηρήθηκε στο έντερο της τσιπούρας και μπορεί να υποδηλώνει μια συγκεκριμένη επίδραση της αλατότητας στην πεπτικότητα των πρωτεϊνών· οι μεταβολές της αλατότητας, είναι δυνατό να μην προκαλούν καμία επίδραση στις πρωτεάσες της σερίνης και το σύνολο των μικρών πεπτιδίων που παράγουν με τη δράση τους, αλλά η επίδραση τους στη δραστικότητα των καρβοξυπεπτιδασών μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων αμινοξέων για απορρόφηση.

Από ό,τι είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη φορά που η δραστικότητα της ελαστάσης μετρήθηκε σε ένα είδος Sparidae. Η ελαστάση διασπά πεπτιδικούς δεσμούς που περιλαμβάνουν αμινοξέα με μικρές πλευρικές αλυσίδες, όπως η αλανίνη και η σερίνη (Barrett et al., 2004), και ήταν η μόνη πρωτεάση της σερίνης που επηρεάστηκε από τη μεταβολή της αλατότητας. Οι αλλαγές στη δραστικότητα της εντοπίστηκαν στην περιοχή του πρόσθιου εντέρου, όπου εμφάνισε και τις υψηλότερες τιμές, καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η δραστικότητα της ελαστάσης σχετίζεται με υψηλές - περίπου 10 - τιμές pH (Glass et al., 1989; Eshel et al., 1993), ενώ οι Deguara et al. (2003) παρατήρησαν σε νεαρά άτομα *S. aurata* μια συνεχή αύξηση των τιμών pH (40h μετά την τελευταία τροφοληψία)· από 6,8 στο πρόσθιο έντερο σε 7,9 στο χαμηλότερο τμήμα του εντέρου. Γι' αυτό το λόγο, περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία, προκειμένου να εξηγηθεί ο εντοπισμός αυτής της πρωτεάσης στο πρόσθιο έντερο.

Η αιφνίδια μεταβολή της αλατότητας, δεν επηρέασε τη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος των ψαριών, παρά τον αποδεδειγμένο ρόλο της στην οσμορυθμιστική δράση της τσιπούρας (Mancera et al., 1993a, 1994). Η κορτιζόλη, είναι γενικά αποδεκτό, ότι δρα συνεργατικά με την προλακτίνη και την αυξητική ορμόνη, παρουσιάζοντας διττή οσμορυθμιστική δράση (McCormick, 2001) και υψηλότερες τιμές για λίγες ώρες, αμέσως μετά τη μεταφορά των ατόμων σε διαφορετικές συνθήκες αλατότητας (Franklin, 1992; Kelly & Woo, 1999; Marshall et al., 1999). Η έλλειψη επίδρασης στη συγκέντρωση κορτιζόλης, μπορεί να υποδηλώνει ότι, η μείωση της αλατότητας που ελέγχθηκε στην παρούσα εργασία, είναι εντός των ορίων αντοχής του *S. aurata*. Οι δύο αλατότητες που χρησιμοποιήθηκαν - 33‰ και 21‰ αντίστοιχα - ήταν σαφώς άνω του ισοοσμωτικού σημείου (11,6‰) της τσιπούρας (Tort et al., 1994), ενώ είναι πιθανόν, η αλατότητα να μην επιδρά δραματικά στις φυσιολογικές διαδικασίες όταν δε λαμβάνεται υπόψη η αλληλεπίδραση της με άλλες παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία και η διατροφή (Nordrum et al., 2000; Boeuf & Payan, 2001; Imsland et al., 2001). Οι πρόγονοι των σημερινών ψαριών που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον, εξελίχθησαν σε ένα περιβάλλον μικρότερης αλατότητας, και μπορεί να διατηρούν την ικανότητα τους για υπεροσμωρύθμιση μετά τη μεταφορά τους σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας (Moyle & Cech, 1982).

Ανεξάρτητα αλατότητας, η χυμοθρυψίνη αποτέλεσε την κυρίαρχη πρωτεάση κατά μήκος του αλκαλικού τμήματος του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας, όπως επίσης αναφέρεται από τους Alacρόn et al. (1998). Οι δραστηρότητες των αλκαλικών πρωτεασών ήταν στατιστικώς σημαντικά διαφορετικές ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου, ενώ απροσδόκητα υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν στο οπίσθιο έντερο. Στα ψάρια, το πάγκρεας αποτελεί ένα έντονα διάχυτο όργανο που κατανέμεται κατά μήκος του φλεβικού συστήματος· από το σκώπι στο στομάχι, το σπλήνα, τα πυλωρικά τυφλά και το έντερο (Fraisie et al., 1981; Kurakawa & Suzuki, 1995). Στην τσιπούρα, ο ελικοειδής προσανατολισμός του γαστρεντερικού σωλήνα, είναι πιθανό να επιτρέπει στον παγκρεατικό ιστό να βρίσκεται σε επαφή με όλα τα επιμέρους τμήματα του εντέρου, συμπεριλαμβανομένης της τελικής απόληξης του. Η έλλειψη περιορισμένου εντοπισμού των διαφόρων πεπτικών ενζύμων έχει επίσης αναφερθεί σε προηγούμενη εργασία (Deguara et al., 2003) και επιβεβαιώθηκε από το πρότυπο έκφρασης του θρυψινογόνου και των ισομορφών χυμοθρυψινογόνου ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου για την τσιπούρα (Κεφάλαιο 3). Στο *Chanos chanos*, η πεπτικότητα της τροφής ήταν μικρότερη στην περιοχή του πρόσθιου

εντέρου σε σύγκριση με το οπίσθιο και έτεινε να είναι χαμηλότερη στα ψάρια που διαβιούσαν στο θαλασσινό νερό, σε σχέση με το γλυκό, λόγω της ταχύτερης εκκένωσης του εντέρου τους (Ferraris et al., 1986). Οι υψηλότερες τιμές ενζυμικής δραστηριότητας, οι οποίες μετρήθηκαν στο οπίσθιο έντερο της τσιπούρας, σε συνδυασμό με έναν πιθανό αυξημένο χρόνο πέψης σε συνθήκες χαμηλής αλατότητας, μπορούν να μεταφραστούν σε υψηλότερη πεπτικότητα και διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών για απορρόφηση και αύξηση. Επιπλέον, η ικανότητα του οπίσθιου εντέρου να απορροφά αμινοξέα, πεπτιδία και κυρίως άθικτες πρωτεΐνες (Dabrowski & Dabrowska, 1981; Elbal & Agulleiro, 1986; Cataldi et al., 1987; Buddington et al., 1997; Bakke-McKeller et al., 2000), σε συνδυασμό με τη μεγάλη μάζα του και την μακρύτερη χρονικά αποθήκευση της υπό πέψη τροφής - σε σύγκριση με προηγούμενα τμήματα του εντέρου - είναι πιθανό να οδηγεί σε αποτελεσματικότερη χρήση του πρωτεϊνικού φορτίου (Dabrowski et al., 1986; Nordrum et al., 2000). Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι, είδη με σχετικά βραχείς πεπτικούς σωλήνες, όπως το σαρκοφάγο *S. aurata*, εμφανίζουν σημαντική απορρόφηση των θρεπτικών στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου τους (Ferraris & Ahearn, 1984). Τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδηλώνουν ότι το οπίσθιο έντερο μπορεί να παίζει έναν πολύ ενεργό ρόλο στην πέψη των διατροφικών πρωτεϊνών και την απορρόφηση των αμινοξέων, ενώ ο ακριβής του ρόλος στη φυσιολογία θρέψης της τσιπούρας μένει να ερευνηθεί περαιτέρω. Σε γενικές γραμμές, η κατανομή των πεπτικών πρωτεασών κατά μήκος του εντέρου των ψαριών δε φαίνεται να είναι χαρακτηριστική για κανένα επιμέρους τμήμα του, αν και μια συγκεκριμένη περιοχή είναι πιθανό να εμφανίζει την υψηλότερη δραστηριότητα ενός συγκεκριμένου ενζύμου. Η παραπάνω έλλειψη ζώνωσης, είναι πιθανό να απορρέει από την προσαρμοστικότητα των ψαριών, σε μια μεγάλη ποικιλία τροφών τις οποίες καταναλώνουν στο φυσικό τους περιβάλλον. Η εξελικτική άποψη που προτείνεται από τους Chakrabarti et al. (1995), δηλώνει ότι το έντερο των ψαριών βρίσκεται ακόμη στο εξελικτικό στάδιο, όπου τα πεπτικά ένζυμα δεν εμφανίζουν κάποια χωρική εξειδίκευση, όπως αυτή συναντάται στα ανώτερα θηλαστικά.

Η χρήση εκλεκτικών αναστολέων, κατέδειξε αλληλοεπικάλυψη των δράσεων θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, ιδιαίτερα όταν εκλεκτικοί αναστολείς της χυμοθρυψίνης χρησιμοποιήθηκαν κατά της δραστηριότητας θρυψίνης. Οι Cohen et al. (1981) υποστηρίζουν ότι, η θρυψίνη του *Cyprinus carpio* είναι πιθανό να αλληλεπιδρά με τις εκλεκτικές θέσεις πρόσδεσης της χυμοθρυψίνης για αρκετούς αναστολείς και

αντίστροφα, ενώ οι Murray et al. (2004), αναφέρουν χαμηλή εξειδίκευση των βιοχημικών μεθόδων μέτρησης της δραστικότητας θρυψίνης με τη χρήση ΒΑΡΝΑ ως υπόστρωμα και προτείνουν περαιτέρω έρευνα προκειμένου να καθορισθεί μια πιο ακριβής μέθοδος. Στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα υποστηρίζουν τη δεύτερη άποψη, καθώς η δραστικότητα θρυψίνης που μετρήθηκε με τη χρήση του ίδιου υποστρώματος, ήταν εξαιρετικά χαμηλή σε όλα τα επιμέρους τμήματα του εντέρου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, υποστηρίζουν την υπόθεση ότι ο ευρύαλος χαρακτήρας της τσιπούρας συγκροτείται από ένα σύνολο φυσιολογικών διαδικασιών, συμπεριλαμβανομένου ενός πεπτικού μηχανισμού ανθεκτικού σε αιφνίδιες μεταβολές της αλατότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΥΞΗΤΙΚΗΣ ΟΡΜΟΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΠΕΠΤΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΤΣΙΠΟΥΡΑ (*Sparus aurata*)

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Δεδομένου του κεντρικού ρόλου που διαδραματίζουν τα πεπτικά ένζυμα στη διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών για αύξηση, είναι πιθανό να βρίσκονται υπό τον έλεγχο της δράσης της αυξητικής ορμόνης, η οποία επιδρά άμεσα σε διάφορους ιστούς συγχρονίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα διάφορα αυξητικά φαινόμενα (Perez-Sanchez & Le Bail, 1999). Καθώς η αυξητική ορμόνη εμφανίζει έναν πολυδύναμο ρόλο, είναι πιθανόν να επιδρά τόσο στην παραγωγή, όσο και στη δραστηριότητα των πεπτικών πρωτεασών των ψαριών, τα οποία απαιτούν και προσλαμβάνουν υψηλότερα επίπεδα διατροφικών πρωτεϊνών σε σχέση με τα χερσαία σπονδυλωτά και η πέψη των πρωτεϊνών στον πεπτικό σωλήνα τους εμφανίζεται εξαιρετικά αποτελεσματική (Sun & Farmanfarmanian, 1992).

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετάται η βραχυχρόνια επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση και τη δραστηριότητα των πεπτικών ενζύμων, καθώς και στη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος της τσιπούρας (*Sparus aurata*), με σκοπό την ανίχνευση πιθανών σχέσεων αλληλεπίδρασης ανάμεσα στη δράση της κεντρικής ορμονικής ρύθμισης και την πέψη. Σ' αυτό το πλαίσιο, οι δραστηριότητες των ολικών όξινων και αλκαλικών πρωτεασών, της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης μετρήθηκαν στο στομάχι, στα πυλωρικά τυφλά, στο πρόσθιο και στο οπίσθιο έντερο νεαρών ατόμων τσιπούρας, στα οποία είχαν χορηγηθεί ενδοπεριτονιακά διαφορετικές δόσεις εξωγενούς πρόβειας αυξητικής ορμόνης (oGH). Επιπλέον, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα μεταγράφων θρυψινογόνου και χυμοθρυψινογόνων στο ήπαρ και τα πυλωρικά τυφλά όλων των ατόμων και συσχετίστηκαν με τις αντίστοιχες δραστηριότητες και τα επίπεδα κορτιζόλης.

5.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών στην Αθήνα, τον Ιούλιο του 2005. Εξήντα νεαρά άτομα *S. aurata* ($57,3 \pm 1,1$ g) διαιρέθηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες των 15 ατόμων, τα οποία

τοποθετήθηκαν σε 60-lt PVC δεξαμενές και εγκλιματίστηκαν στις πειραματικές συνθήκες για 10 μέρες. Κατά την έναρξη του πειράματος τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με MS-222 (~ 35 mg/l), έλαβαν ενδοπεριτονιακά διαφορετικές δόσεις από πρόβεια αυξητική ορμόνη (ovineGH, NIADDK-oGH-15, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) διαλυμένη σε 0,9% NaCl και επανατοποθετήθηκαν στις πειραματικές δεξαμενές. Η ομάδα «Α» έλαβε 0,1 μg oGH/g σωματικού βάρους, η ομάδα «Β» 1 μg oGH/g σωματικού βάρους και η ομάδα «Γ» 10 μg oGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα, ενώ ο μάρτυρας (ομάδα «Ο») έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl. Οι ενέσιμοι χορηγούμενοι όγκοι ήταν ανάλογοι του σωματικού βάρους κάθε ψαριού. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα ψάρια τρέφονταν στο 2% του σωματικού τους βάρους με τη χρήση εμπορικών συμπλήκτων (BioMar AE) αναγραφόμενης σύστασης: 44% πρωτεΐνη, 20% λιπίδια, 15,8% ENEO και 8,2% τέφρα, μια φορά ημερησίως (14.00). Κάθε ενυδρείο ήταν εξοπλισμένο με αυτόνομο αερισμό, σύστημα φιλτραρίσματος και ανακύκλωσης νερού. Η φωτοπερίοδος στη διάρκεια του πειράματος ήταν 14D:10L. Τα επίπεδα οξυγόνου, θερμοκρασίας και αλατότητας μετρούνταν καθημερινά. Η διακύμανση της θερμοκρασίας ($27,4 \pm 0,1$ °C) και της αλατότητας ($37,5 \pm 0,1$ ppt) ήταν η ίδια μεταξύ των μεταχειρίσεων, ενώ το διαλυμένο οξυγόνο κυμάνθηκε σε επίπεδα κορεσμού. Θνησιμότητες δεν καταγράφηκαν.

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 0, 1, 2, 4, και 7 του πειράματος. Κάθε ημέρα δειγματοληψίας, τρία άτομα από κάθε μεταχείριση αναισθητοποιούνταν με MS 222 και ζυγίζονταν ατομικά πριν τη λήψη δειγμάτων αίματος και πεπτικού σωλήνα. Τα δείγματα λαμβάνονταν πάντα την ίδια ώρα (24 h μετά τη χορήγηση τροφής) και η ώρα δειγματοληψίας καταγράφονταν. Η λήψη και η προετοιμασία των δειγμάτων αίματος, στομάχου, πολωρικών τυφλών, πρόσθιου και οπίσθιου εντέρου, οι μετρήσεις συγκέντρωσης κορτιζόλης και ενζυμικών δραστηριοτήτων, καθώς και ο έλεγχος της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ» της παρούσας διατριβής. Οι επιμέρους παράμετροι, που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των ενζυμικών δραστηριοτήτων, ούτως ώστε να εξασφαλίζεται γραμμική συσχέτιση του προϊόντος με το χρόνο, αποφασίστηκαν μετά την πραγματοποίηση προκαταρκτικών ελέγχων και παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Πίνακας 5.1. Παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση των δραστηριοτήτων i) ολικών όξινων πρωτεασών, ii) ολικών αλκαλικών πρωτεασών, iii) θρυψίνης και iv) χυμοθρυψίνης μετά την πραγματοποίηση προκαταρκτικών ελέγχων

	Υπόστρωμα	Τελική συγκέντρωση υποστρώματος	Ποσότητα ενζυμικού εκχυλίσματος (μl)	Χρόνος αντίδρασης (min)
Ολικές όξινες πρωτεάσες	αιμογλοβίνη	0,5%	10	15
Ολικές αλκαλικές πρωτεάσες	αζοκαζεΐνη	1,5%	10	30
Θρυψίνη	BAPNA	1 mM	10	4
Χυμοθρυψίνη	BTEE	0,5 mM	10	2,5*

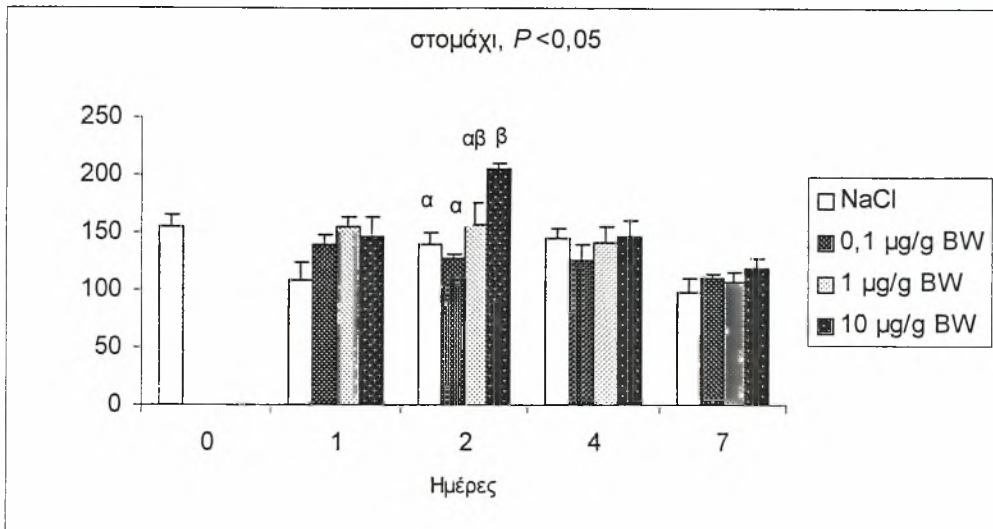
* Συνεχής μέτρηση

5.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

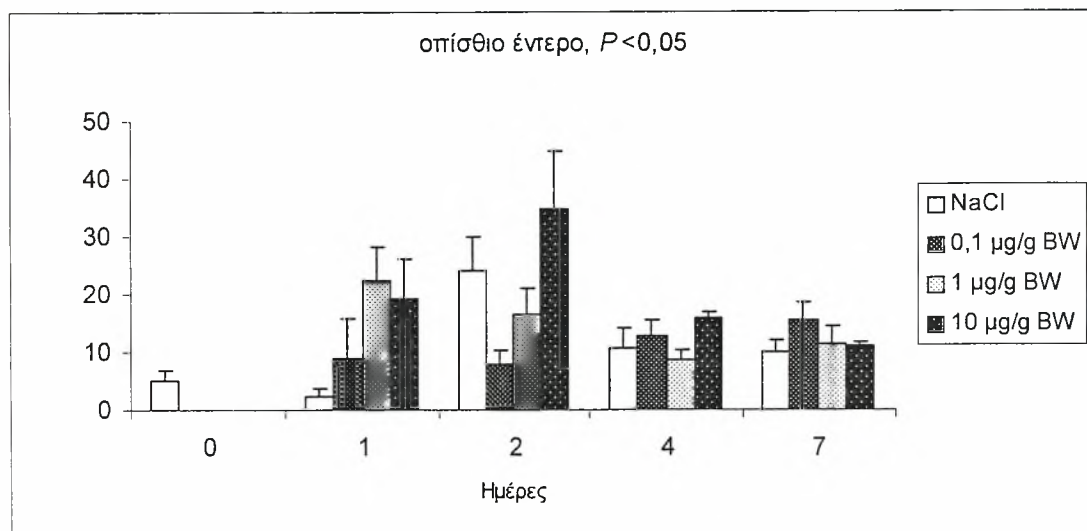
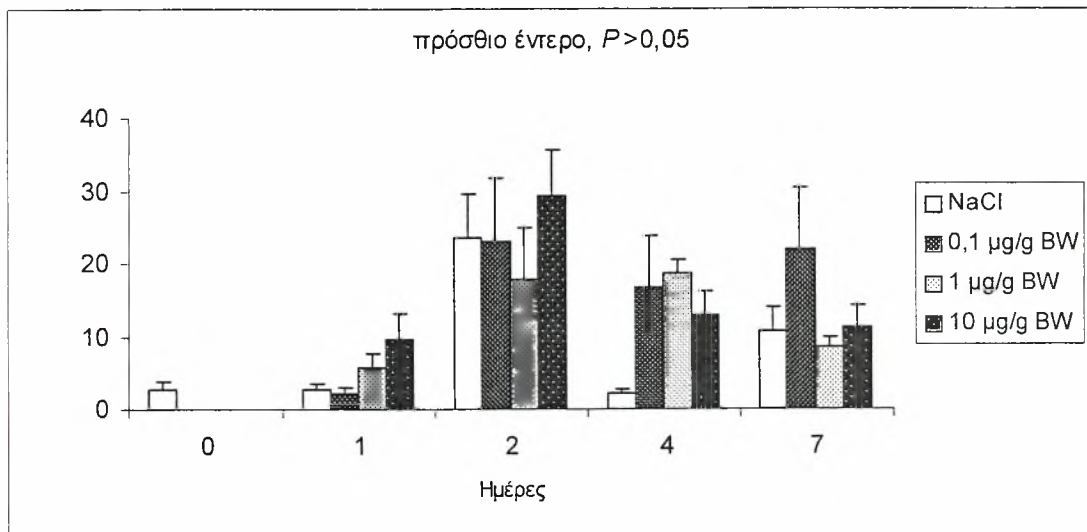
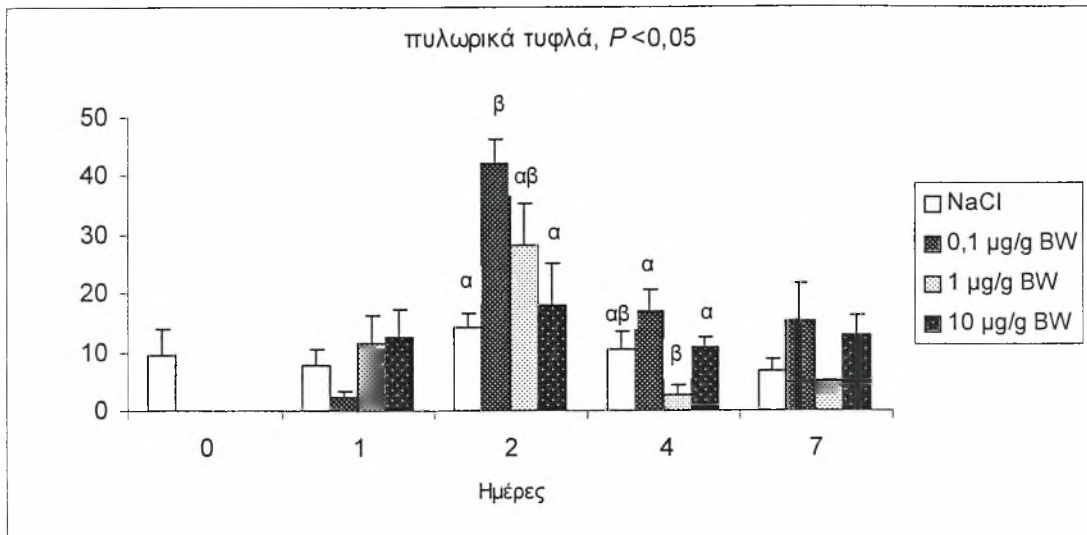
Δραστηριότητα πεπτικών πρωτεασών

Καθώς δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο πρωτεϊνικό περιεχόμενο ανά g ιστού για τα επιμέρους τμήματα του εντέρου ανάμεσα και μέσα στις μεταχειρίσεις, οι ειδικές ενζυμικές δραστηριότητες εκφράστηκαν ως U/mg πρωτεΐνη.

Οι διαφορετικές δόσεις της oGH επηρέασαν σημαντικά τη δραστηριότητα των ολικών όξινων πρωτεασών (πεψίνη) στο στομάχι (Σχήμα 5.1), καθώς και τη δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου (Σχήμα 5.2^{A,Γ}). Οι αλλαγές στις δραστηριότητες εντοπίστηκαν κυρίως τη δεύτερη μέρα μετά τη χορήγηση της oGH και η αυξανόμενη δόση οδήγησε σε αντίστροφα αποτελέσματα στη δραστηριότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι σε σχέση με των ολικών αλκαλικών στα πυλωρικά τυφλά. Έτσι, τα άτομα της ομάδας A παρουσίασαν τη μικρότερη δραστηριότητα όξινων πρωτεασών σε συνδυασμό με τη μεγαλύτερη των αλκαλικών πρωτεασών στα πυλωρικά τυφλά, ενώ το αντίστροφο παρατηρήθηκε στα άτομα της ομάδας Γ (Σχήματα 5.1-5.2^A). Αξίζει ν' αναφερθεί ότι, η δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών



Σχήμα 5.1. Ειδική δραστηριότητα ολικών όξινων (πεψίνη) πρωτεασών (U/mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) για άτομα τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Η διαφορετική σήμανση δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος ($P < 0,05$).



Σχήμα 5.2. Ειδική δραστηριότητα ολικών αλκαλικών πρωτεασών (U/mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) στα πυλωρικά τυφλά (Α), στο πρόσθιο (Β) και στο οπίσθιο έντερο (Γ) ατόμων τοπιούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Η διαφορετική σήμανση δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές τη συγκεκριμένη ημέρα του πειράματος ($P < 0,05$), ενώ το παραπάνω δεν παρατηρήθηκε στο οπίσθιο έντερο.

πρωτεασών δε διέφερε σημαντικά ($P>0,05$) ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου για το σύνολο των μεταχειρίσεων.

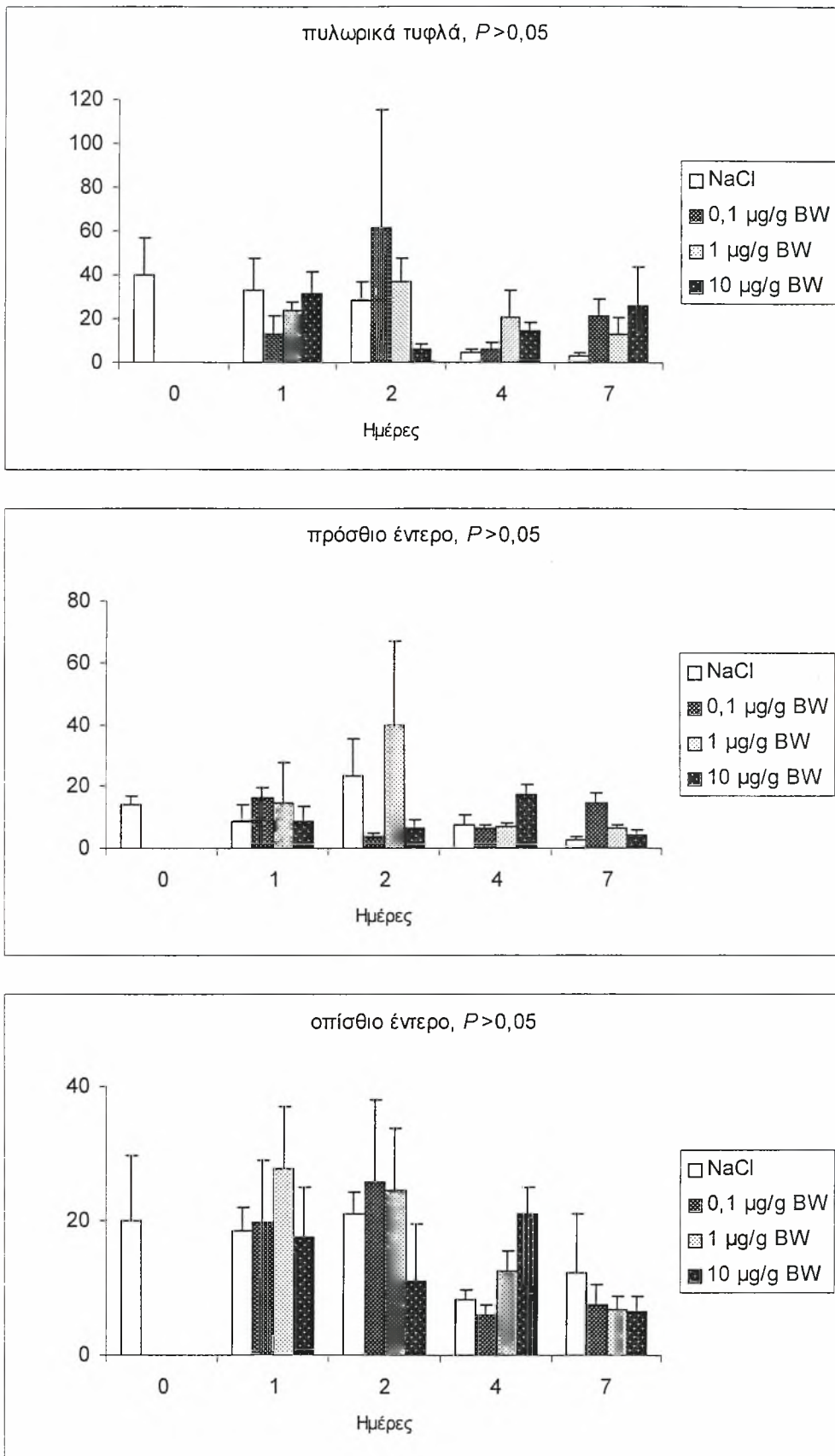
Η χρήση εκλεκτικών αναστολέων κατά της δραστικότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών έδειξε ότι η αναστολή που προκλήθηκε από τη chymostatin, αλλά και το TLCK (εκλεκτικοί για τη χυμοθρυψίνη και τη θρυψίνη αντίστοιχα) διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων στα πυλωρικά τυφλά ($P<0,05$), (Πίνακας 5.2). Επίσης, ανιχνεύθηκε η παρουσία πρωτεασών, ευαίσθητων σε χηλικούς παράγοντες, η οποία σε ορισμένες περιπτώσεις αντιστοιχούσε στο 60% της δραστικότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών, αναδεικνύοντας τη συμμετοχή των μεταλλοπρωτεασών στην πρωτεϊνική πέψη της τσιπούρας.

Οι διαφορετικές δόσεις oGH δεν είχαν καμία σημαντική επίδραση στη δραστικότητα θρυψίνης (Σχήμα 5.3), ενώ επηρέασαν σημαντικά ($P<0,05$) τη δραστικότητα χυμοθρυψίνης στην περιοχή του οπίσθιου εντέρου μόνο κατά την πρώτη ημέρα μετά τη χορήγηση της ορμόνης (Σχήμα 5.4[†]). Οι ειδικές δραστικότητες, και των δύο πρωτεασών της σερίνης, διέφεραν σημαντικά ($P<0,05$) ανάμεσα στα επιμέρους τμήματα του εντέρου, ενώ το πρόσθιο έντερο παρουσίασε και στις δύο περιπτώσεις τις χαμηλότερες τιμές. Τα πυλωρικά τυφλά, χαρακτηρίζονταν από τις υψηλότερες μέσες τιμές δραστικότητας για κάθε επιμέρους ένζυμο, χωρίς οι διαφορετικές δόσεις oGH να επηρεάσουν την παρατηρούμενη ζώνωση κατά μήκος του εντέρου.

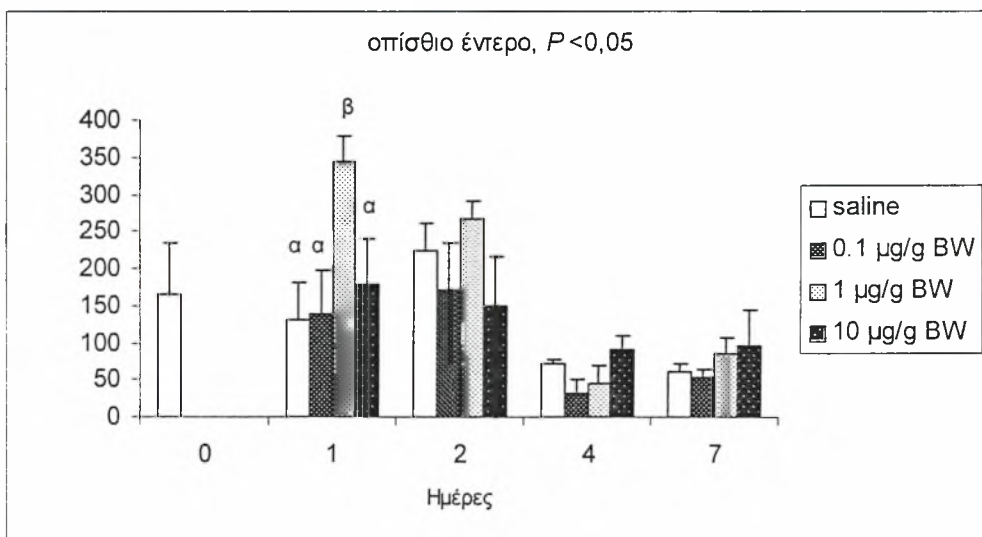
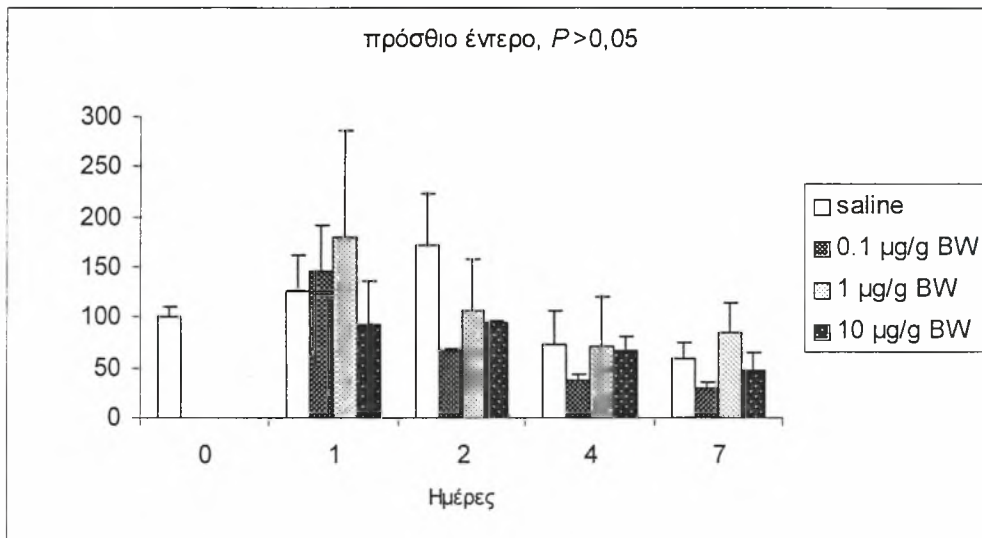
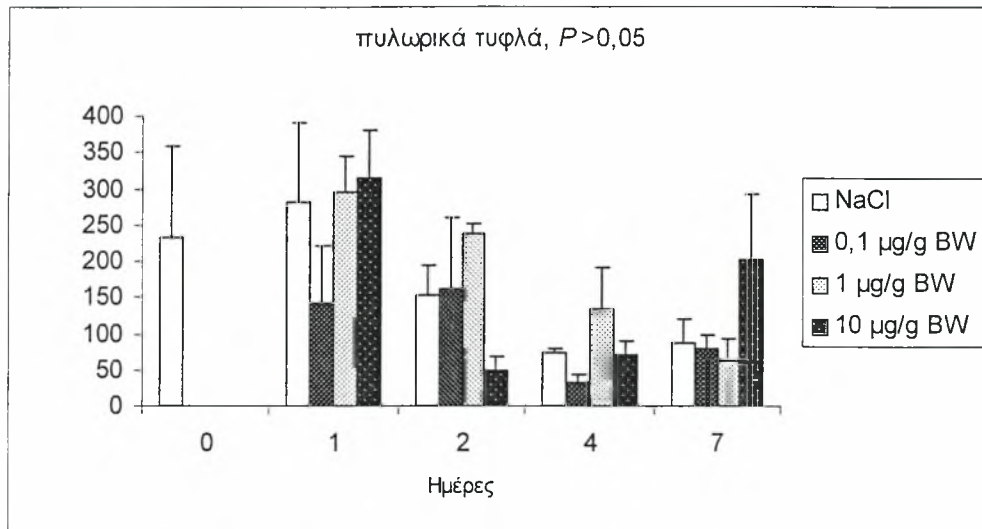
Η αναστολή της δραστικότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στα πυλωρικά τυφλά από τη χρήση TLCK, ήταν σημαντική μεταξύ των μεταχειρίσεων την ημέρα 7 του πειράματος (Πίνακας 5.2), χωρίς όμως να συνδυάζεται με στατιστικώς σημαντικές διαφορές στη δραστικότητα θρυψίνης (Σχήμα 5.3) και ολικών αλκαλικών πρωτεασών. Επιπλέον, αναστολή της δραστικότητας των ολικών αλκαλικών πρωτεασών από τη chymostatin, ήταν σημαντική μεταξύ των μεταχειρίσεων την ημέρα 2 (Πίνακας 5.2), χωρίς να συνδυάζεται με σημαντικές διαφορές στη δραστικότητα χυμοθρυψίνης (Σχήμα 5.3). Τα παραπάνω, είναι πιθανό να οφείλονται στην έλλειψη εξειδίκευσης των εκλεκτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στη μέτρηση των αντίστοιχων ενζυμικών δραστικοτήτων - όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4 της παρούσας διατριβής - ή/και στη μη εκλεκτική δράση του εκάστοτε αναστολέα, με αποτέλεσμα το TLCK και η chymostatin να αναστέλλουν, τόσο τη δραστικότητα θρυψίνης, όσο και τη δραστικότητα χυμοθρυψίνης.

Πίνακας 5.2. Ποσοστιαία αναστολή (%; μέσος όρος ± τυπ. σφάλμα) των ολικών αλκαλικών πρωτεασών από τη χρήση εκλεκτικών αναστολέων στα πολωρικά τυφλά ατόμων τυφώθρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων oGH. Τα ποσοστά αναστολής από τη chymostatin και το TLCK διέφεραν σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και η διαφορετική σημασιολογία δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος ($P < 0,05$)

Ομάδα	Ημέρα 0	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 7
TLCK					
NaCl	37,3 ± 12,3	62,9 ± 19,3	48,0 ± 24,8	52,3 ± 29,0	95,1 ± 4,9 ^α
0,1 µg/g BW		36,3 ± 31,9	57,8 ± 13,6	22,5 ± 21,9	53,6 ± 27,2 ^{αβ}
1 µg/g BW		47,9 ± 28,9	68,9 ± 7,6	0,0 ± 0,0	10,3 ± 10,3 ^β
10 µg/g BW		2,0 ± 2,0	34,7 ± 20,6	7,4 ± 7,4	4,3 ± 4,3 ^β
CHYMOSTATIN					
NaCl	19,0 ± 11,3	74,2 ± 13,7	61,6 ± 6,3 ^α	37,8 ± 31,3	51,0 ± 22,9
0,1 µg/g BW		54,0 ± 27,4	31,6 ± 7,2 ^β	10,6 ± 9,5	29,5 ± 29,5
1 µg/g BW		52,4 ± 24,3	75,6 ± 5,3 ^α	0,0 ± 0,0	19,6 ± 13,5
10 µg/g BW		12,2 ± 6,2	18,8 ± 9,8 ^β	38,2 ± 19,8	10,3 ± 10,3
EDTA					
NaCl	15,2 ± 9,0	20,6 ± 15,7	60,7 ± 8,6	26,1 ± 20,7	0,0 ± 0,0
0,1 µg/g BW		33,3 ± 33,3	18,7 ± 18,7	51,9 ± 26,4	24,5 ± 24,5
1 µg/g BW		26,2 ± 26,2	52,7 ± 13,8	0,0 ± 0,0	3,4 ± 3,4
10 µg/g BW		15,6 ± 15,6	26,5 ± 17,3	50,0 ± 27,3	15,7 ± 8,5



Σχήμα 5.3. Ειδική δραστηριότητα θρυψίνης (U/mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) στα πυλωρικά τυφλά (Α), στο πρόσθιο (Β) και στο οπίσθιο έντερο (Γ) ατόμων τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH.



Σχήμα 5.4. Ειδική δραστηριότητα χυμοθρυψίνης (U/mg πρωτεΐνη; μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) στα πυλωρικά τυφλά (Α), στο πρόσθιο (Β) και στο οπίσθιο έντερο (Γ) ατόμων τσιπούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Η διαφορετική σήμανση δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος ($P < 0,05$).

Συγκέντρωση κορτιζόλης

Οι διαφορετικές δόσεις οGH δεν είχαν σημαντική επίδραση ($P>0,05$) στη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος, η οποία παρουσίασε υψηλή παραλλακτικότητα μεταξύ των ατόμων.

Επίπεδα έκφρασης των ζυμογόνων

Σε κάθε περίπτωση, τα επίπεδα μεταγράφων του ήπατος ήταν κατά πολύ υψηλότερα από αυτά των πυλωρικών τυφλών (Πίνακας 5.3). Οι διαφορετικές δόσεις οGH επηρέασαν σημαντικά την παραγωγή των μεταγράφων χυμοθρυψινογόνου I και θρυψινογόνου II ($P<0,01$) στην περιοχή του ήπατος (Πίνακας 5.3^A), ενώ αντίθετα δεν είχαν καμία επίδραση ($P>0,05$) στην έκφραση των μορίων στα πυλωρικά τυφλά (Πίνακας 5.3^B). Η επίδραση ήταν μεγαλύτερης διάρκειας στην περίπτωση του θρυψινογόνου II, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης και των δύο ζυμογόνων παρατηρήθηκαν την ημέρα 4 του πειράματος.

Προκειμένου να διερευνηθεί η ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ των μελετούμενων παραμέτρων σε ατομικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση, με τη χρήση του μη παραμετρικού συντελεστή συσχέτισης Spearman (Πίνακας 5.4). Μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση διαπιστώθηκε μεταξύ της χορηγούμενης δόσης οGH και της συγκέντρωσης κορτιζόλης στο αίμα των ψαριών ($R=-0,34$, $P<0,05$), υποδεικνύοντας ότι αυξημένη δόση οGH οδήγησε σε μείωση των επιπέδων κορτιζόλης. Επίσης, άμεση στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση διαπιστώθηκε ανάμεσα στη χορηγούμενη δόση οGH και τις δραστηκότητες των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι ($R=0,32$, $P<0,05$), καθώς και των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στο οπίσθιο έντερο ($R=0,30$, $P<0,05$). Η οGH δεν συσχετίστηκε σημαντικά με την έκφραση των ζυμογόνων σε κανένα από τους δύο ιστούς που εξετάστηκαν. Μια σημαντική θετική συσχέτιση, ωστόσο, διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων κορτιζόλης και της έκφρασης του θρυψινογόνου II στο ήπαρ ($R=0,36$, $P<0,05$). Θετική συσχέτιση, επίσης, διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I στο ήπαρ και των δύο ζυμογόνων στα πυλωρικά τυφλά (Πίνακας 5.4), χωρίς όμως τα παραπάνω να συσχετίζονται με τα επίπεδα έκφρασης του θρυψινογόνου II στο ήπαρ. Αξιοσημείωτη, τέλος, υπήρξε η θετική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του θρυψινογόνου II στα πυλωρικά τυφλά με τα επίπεδα δραστηκότητας θρυψίνης και χυμοθρυψίνης κατά μήκος του εντέρου.

Πίνακας 5.3^Α. Έκφραση του θρυπτογόνου II και του χρομοθρυπτογόνου I (μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) στο ήπαρ ατόμων τσούρας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH. Η παραγωγή ζυμογόνων διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεταχειρίσεων και η διαφορετική σήμανση δηλώνει στατιστικά σημαντική διαφορά τη συγκεκριμένη ημέρα πειράματος ($P < 0,05$)

	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 7
TRP II				
NaCl	2,38 \pm 0,4 ^α	0,81 \pm 0,0	3,97 \pm 0,5 ^α	3,79 \pm 0,2 ^α
0,1 $\mu\text{g/g BW}$	1,68 \pm 0,3 ^{αβ}	0,87 \pm 0,1	5,79 \pm 0,5 ^β	3,95 \pm 0,2 ^α
1 $\mu\text{g/g BW}$	3,07 \pm 0,5 ^α	0,72 \pm 0,1	6,89 \pm 0,8 ^β	2,85 \pm 0,5 ^{αβ}
10 $\mu\text{g/g BW}$	1,13 \pm 0,4 ^β	0,56 \pm 0,1	5,26 \pm 0,2 ^β	2,35 \pm 0,4 ^β
CHTR I				
NaCl	0,84 \pm 0,1	1,26 \pm 0,3	0,80 \pm 0,4 ^β	0,29 \pm 0,1
0,1 $\mu\text{g/g BW}$	1,01 \pm 0,1	1,78 \pm 0,3	2,88 \pm 0,6 ^α	0,40 \pm 0,1
1 $\mu\text{g/g BW}$	1,01 \pm 0,1	1,40 \pm 0,2	4,17 \pm 0,6 ^α	0,45 \pm 0,1
10 $\mu\text{g/g BW}$	0,98 \pm 0,0	1,46 \pm 0,3	4,05 \pm 0,2 ^α	0,14 \pm 0,1

Πίνακας 5.3^β. Εκφραση του θρυμνινογόνου II και του χρομβροψινογόνου I (μέσος όρος \pm τυπ. σφάλμα) στα πολωρικά τυφλά στόμων τυποφάας μετά από χορήγηση διαφορετικών δόσεων οGH

	Ημέρα 1	Ημέρα 2	Ημέρα 4	Ημέρα 7
TRP II				
NaCl	0,42 \pm 0,1	0,28 \pm 0,1	0,06 \pm 0,0	0,03 \pm 0,0
0,1 $\mu\text{g/g BW}$	0,80 \pm 0,2	0,35 \pm 0,1	0,11 \pm 0,0	0,06 \pm 0,0
1 $\mu\text{g/g BW}$	0,44 \pm 0,1	0,33 \pm 0,1	0,34 \pm 0,2	0,04 \pm 0,0
10 $\mu\text{g/g BW}$	0,42 \pm 0,0	0,20 \pm 0,1	0,36 \pm 0,1	0,04 \pm 0,0
CHTR I				
NaCl	0,04 \pm 0,0	0,05 \pm 0,0	0,03 \pm 0,0	0,06 \pm 0,0
0,1 $\mu\text{g/g BW}$	0,10 \pm 0,1	0,13 \pm 0,1	0,06 \pm 0,0	0,02 \pm 0,0
1 $\mu\text{g/g BW}$	0,05 \pm 0,0	0,14 \pm 0,1	0,09 \pm 0,0	0,01 \pm 0,0
10 $\mu\text{g/g BW}$	0,05 \pm 0,0	0,02 \pm 0,0	0,08 \pm 0,0	0,01 \pm 0,0

Πίνακας 5.4. Μη παραμετρικός συντελεστής συσχέτισης Spearman μεταξύ των μελετούμενων πειραματικών παραμέτρων. *L*: ήπαρ, *PC*: πυλωρικά τυφλά, *AI*: πρόσθιο έντερο, *PI*: οπίσθιο έντερο, *TRP*: θρυψίνη, *CHTR*: χυμοθρυψίνη, *T. Alk.*: ολικές αλκαλικές πρωτεάσες, *e*: επίπεδα έκφρασης ζυμογόνων. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$

	Spearman R
L TRPIe : L CHTRi	0,13
L TRPIe : PC TRPIe	-0,26
L CHTRi : PC CHTRi	0,49 ***
L CHTRi : PC TRPIe	0,49 ***
PC CHTRi : PC TRPIe	0,62 ***
L TRPIe : PC T. Alk.	-0,32 *
L TRPIe : AI T. Alk.	-0,18
L TRPIe : PI T. Alk.	-0,22
L TRPIe : PC TRP	-0,23
L TRPIe : AI TRP	-0,09
L TRPIe : PI TRP	-0,25
L TRPIe : PC CHTR	-0,27
L TRPIe : AI CHTR	-0,42 **
L TRPIe : PI CHTR	-0,48 ***
PC TRPIe : PC T. Alk.	0,06
PC TRPIe : AI T. Alk.	-0,10
PC TRPIe : PI T. Alk.	-0,01
PC TRPIe : PC TRP	0,42 **
PC TRPIe : AI TRP	0,17
PC TRPIe : PI TRP	0,54 ***
PC TRPIe : PC CHTR	0,42 **
PC TRPIe : AI CHTR	0,34 *
PC TRPIe : PI CHTR	0,46 ***

Αντιθέτως, η παραγωγή χυμοθρυψινογόνου II, είτε στο ήπαρ, είτε στα πυλωρικά τυφλά, δεν συσχετιζόνταν σημαντικά με καμία από το σύνολο των μετρούμενων ενζυμικών δραστηριοτήτων στα επιμέρους τμήματα του εντέρου ($P>0,05$).

5.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι διαφορετικές δόσεις χορηγούμενης οGH επηρέασαν σημαντικά τη δραστηριότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι, όπως επίσης και τη δραστηριότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου. Επιπλέον, στο τμήμα του οπίσθιου εντέρου οι διαφορετικές δόσεις οGH είχαν σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα χυμοθρυψίνης. Στην ίδια περιοχή του εντέρου παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση ανάμεσα στις δραστηριότητες ολικών αλκαλικών πρωτεασών και χυμοθρυψίνης ($R = 0,29$, $P<0,05$), υποδηλώνοντας έτσι - σε συνδυασμό με τα παραπάνω - πιθανή επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην πέψη των πρωτεϊνών στο αλκαλικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα μέσω επίδρασης της στη δράση της χυμοθρυψίνης, η οποία αποτελεί και την κυρίαρχη πεπτική πρωτεάση για την τσιπούρα (Κεφάλαιο 4).

Όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων, οι διαφορετικές δόσεις οGH επηρέασαν σημαντικά την έκφραση του χυμοθρυψινογόνου I και του θρυψινογόνου II στο ήπαρ, όχι όμως και στα πυλωρικά τυφλά. Τα αποτελέσματα αυτά σε συνδυασμό με την παρατήρηση των Muñoz-Cueto et al. (1996) ότι η ενδογενής αυξητική ορμόνη δεν προσδέεται στα ενδοηπατικά κύτταρα του εξωκρινούς παγκρέατος της τσιπούρας, όπου και παράγονται τα ζυμογόνα των πεπτικών πρωτεασών, υποδηλώνουν μια έμμεση επίδραση της οGH στην έκφραση των δύο ζυμογόνων. Δεδομένου ότι το πάγκρεας στην τσιπούρα αποτελεί ένα έντονα διαχυτό όργανο (Cataldi et al., 1987; Muñoz-Cueto et al., 1996), η παρατηρούμενη επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην παραγωγή των ζυμογόνων, αποκλειστικά στην ηπατική περιοχή, μπορεί να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών ρυθμών μεταγωγής του σήματος για την έναρξη της μεταγραφής τους, μετά την εξάντληση των εκκρινόμενων ζυμογόνων από τα παγκρεατικά κύτταρα στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών (Kurokawa & Suzuki, 1995).

Οι διαφορετικές δόσεις οGH δεν επηρέασαν τη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος των ψαριών, ενώ αντίθετα σε ατομικό επίπεδο η χορηγούμενη δόση οGH συσχετιζόνταν αρνητικά με τη συγκέντρωση κορτιζόλης. Ο ρόλος της κορτιζόλης ως διαμεσολαβητή, όσον αφορά την εμφάνιση πιθανών επιδράσεων της

αυξητικής ορμόνης στις φυσιολογικές λειτουργίες των ψαριών, έχει προταθεί σε προηγούμενες μελέτες. Ο Young (1988) παρατήρησε ότι μεταχειρίσεις - είτε *in vitro*, είτε *in vivo* - με αυξητική ορμόνη είχαν ως αποτέλεσμα την αυξημένη αντίδραση του επινεφριδιακού ιστού του *Salmo trutta* στην δράση της κορτικοτροπίνης (ACTH). Η αυξητική ορμόνη αυξάνει τη δράση της ACTH στον επινεφριδιακό ιστό, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή γλυκοκορτικοειδών, μεταξύ αυτών και της κορτιζόλης. Επιπλέον, οι Shrimpton et al. (1995) αναφέρουν ότι αυξημένη δόση χορηγούμενης αυξητικής ορμόνης, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της κορτιζόλης στα βράγχια του ίδιου είδους. Η επίδραση διαφόρων στρεσοτικών καταστάσεων, τόσο στα επίπεδα αυξητικής ορμόνης, όσο και στα επίπεδα κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος των ψαριών, ενισχύει την εικόνα ύπαρξης μιας σύνθετης συσχέτισης αυξητικής ορμόνης και κορτιζόλης (McCormick et al., 1998; Björnsson et al., 2002). Σε καταστάσεις στιγμιαίου στρες, η άμεση επίδραση της κορτιζόλης στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης αυξάνει την έκκριση αυξητικής ορμόνης, ενώ σε καταστάσεις χρόνιου στρες η έκκριση αυξητικής ορμόνης θα μειωθεί μέσω της αρνητικής παλινδρομικής ρύθμισης του υποθαλάμου και του εκλυτικού της παράγοντα (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999). Στο σύνολο του οργανισμού, παρόλα αυτά, ταχύτεροι ρυθμοί αύξησης και συσσώρευσης πρωτεϊνών συναντώνται όταν τα επίπεδα αυξητικής ορμόνης και κορτιζόλης στο αίμα των ψαριών είναι μειωμένα, ενώ παράλληλα τα επίπεδα ινσουλίνης, T₃, IGFs, καθώς και η συγκέντρωση των ηπατικών υποδοχέων της, είναι αυξημένα (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999).

Η συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα αίματος των ψαριών σχετίζονταν θετικά με την παραγωγή θρυψινογόνου στο ήπαρ, το οποίο στη συνέχεια σχετίζονταν αρνητικά - σημαντικά ή μη - με την έκφραση του ίδιου μορίου στα πυλωρικά τυφλά και με το σύνολο των μετρούμενων ενζυμικών δραστηριοτήτων στα διάφορα τμήματα του εντέρου (Πίνακας 5.4). Επιπλέον, αξιοσημείωτη υπήρξε η θετική συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης του θρυψινογόνου II στα πυλωρικά τυφλά με τα επίπεδα δραστηριότητας θρυψίνης και χυμοθρυψίνης κατά μήκος του εντέρου. Ακόμη, η επίδραση των διαφορετικών δόσεων οGH στις δραστηριότητες των πρωτεασών επικεντρώνεται κυρίως τη δεύτερη ημέρα μετά τη χορήγηση τους, ενώ στα επίπεδα έκφρασής τους στο ήπαρ μετατοπίζεται χρονικά στις τελευταίες ημέρες του πειράματος. Τα παραπάνω φαίνεται ότι συνηγορούν υπέρ ενός συμπληρωματικού ρόλου των περιοχών του έντονα διάχυτου παγκρέατος γύρω από τα πυλωρικά τυφλά και το ήπαρ, πιθανόν μέσω της δράσης της χολεκιστοκινίνης (CCK), η οποία

παράγεται από το εντερικό επιθήλιο παρουσία τροφής, δρα στα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος προκαλώντας την απελευθέρωση των παραγόμενων ζυμογόνων και βρίσκεται υπό αρνητική παλινδρομική ρύθμιση από τη δράση της θρυψίνης (Buddington & Krogdahl, 2004; Volkoff et al., 2005; Nelson & Sheridan, 2006). Η παρουσία τροφής στον εντερικό αυλό είναι πιθανόν, μέσω της CCK, να προκαλεί έκκριση των ζυμογόνων από τα κύτταρα του παγκρέατος στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και με το πέρας των αποθεμάτων τους να αρχίζει η μεταγραφή και παραγωγή των ζυμογόνων στα ενδοηπατικά κύτταρα του. Οι Kurokawa & Suzuki (1995) αναφέρουν ότι, ένα σύνολο αγωγών προερχόμενων από τα κυψελιδικά κύτταρα του παγκρέατος (όπου παράγονται τα ζυμογόνα των πεπτικών ενζύμων), δημιουργούν τον παγκρεατικό αγωγό μέσω του οποίου τα προϊόντα της εξωκρινούς μοίρας του εισέρχονται στον εντερικό αυλό, στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών. Επίσης, οι ίδιοι συγγραφείς αποκλείουν - για το *Paralichthys olivaceus* - την απευθείας έκκριση των παγκρεατικών προϊόντων στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, χωρίς προηγουμένως να διέλθουν μέσω του παγκρεατικού αγωγού. Το παραπάνω, έρχεται σε αντίθεση με παλαιότερα αποτελέσματα - στο *Cyprinus carpio* - τα οποία υποθέτουν την ύπαρξη ενός πιθανού μηχανισμού σύνδεσης του εντερικού επιθηλίου και των παγκρεατικών κυττάρων μέσω του τοιχώματος του εντέρου, χωρίς όμως να την υποστηρίζουν επαρκώς (Fraisie et al., 1981).

Η θετική συσχέτιση που διαπιστώθηκε μεταξύ των επιπέδων έκφρασης του θρυψινογόνου II στα πυλωρικά τυφλά, τόσο με τα επίπεδα του χυμοθρυψινογόνου I στην ίδια περιοχή, όσο και με τα επίπεδα δραστηριότητας θρυψίνης και χυμοθρυψίνης κατά μήκος του εντέρου, συνάδει με την εικόνα της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των πεπτικών πρωτεασών υπό τη δράση της θρυψίνης (Barrett et al., 2004).

Ο χρόνος είχε σημαντική επίδραση στο σύνολο των παραμέτρων που μελετήθηκαν και οι διαφορετικές δόσεις οGH επηρέασαν σημαντικά τη δραστηριότητα των πεπτικών πρωτεασών κυρίως τη δεύτερη ημέρα μετά τη χορήγηση τους. Οι Sun & Farmanfarmanian (1992) υποστηρίζουν την ύπαρξη βραχυχρόνιων φυσιολογικών αντιδράσεων των οργανισμών στη χορήγηση εξωγενούς αυξητικής ορμόνης, ενώ οι Leedom et al. (2002) αναφέρουν ότι η χορήγηση αυξητικής ορμόνης σε διάλυμα NaCl δρα άπαξ και η επίδραση της εξαλείφεται εντός μερικών ωρών. Ακόμη, υποστηρίζουν ότι η εξάρτηση των αποτελεσμάτων από το χρόνο είναι σημαντικότερη της εξάρτησης από τη χορηγούμενη δόση αυξητικής ορμόνης, η οποία, παρόλα αυτά, δε φαίνεται να

ενισχύει τα αυξητικά φαινόμενα σε δόσεις μεγαλύτερες των 5 μg/g σωματικού βάρους.

Οι δραστηριότητες θρυψίνης και χυμοθρυψίνης διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα επιμέρους εντερικά τμήματα, ενώ οι ολικές αλκαλικές πρωτεάσες κυμάνθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα δραστηριότητας κατά μήκος του εντέρου. Επιπλέον, η παρούσα εργασία επιβεβαίωσε την κυριαρχία της χυμοθρυψίνης στο αλκαλικό τμήμα του πεπτικού σωλήνα της τσιπούρας, αλλά και τις υψηλές τιμές ενζυμικών δραστηριοτήτων στην περιοχή του οπίσθιου εντέρου. Η παραπάνω έλλειψη ζώνωσης - όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια της παρούσας διατριβής - είναι πιθανό να σχετίζεται με την προσαρμοστικότητα των ψαριών σε μια μεγάλη διατροφική ποικιλία (Deguara et al., 2003), τη θέση τους στη κλίμακα της εξέλιξης (Chakrabarti et al., 1995), τη διάχυτη φύση του παγκρέατος (Fraisie et al., 1981; Kurakawa & Suzuki, 1995) και τον ελικοειδή προσανατολισμό του γαστρεντερικού σωλήνα, ενώ συμφωνεί με το προφίλ κατανομής του θρυψινογόνου και των χυμοθρυψινογόνων στους διάφορους ιστούς της τσιπούρας (Κεφάλαιο 3).

Τα παρόντα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ύπαρξη σχέσεων μεταξύ της πέψης των πρωτεϊνών και της κεντρικής ορμονικής ρύθμισης, ενώ, από όσο είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε, αυτή αποτελεί και την πρώτη αναφορά επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στη δραστηριότητα και την έκφραση οποιουδήποτε πεπτικού ενζύμου. Η ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων θρυψίνης και χυμοθρυψίνης φαίνεται ότι πραγματοποιείται με διαφορετικό τρόπο και η έλλειψη άμεσης συσχέτισης της έκφρασης του χυμοθρυψινογόνου I με τις αντίστοιχες ενζυμικές δραστηριότητες κατά μήκος του εντέρου, ίσως μπορεί να αποδοθεί στα ενδιάμεσα στάδια μετα-μεταγραφικής, μεταφραστικής και αποθηκευτικής ρύθμισης στην έκκριση των ζυμογόνων, καθώς επίσης και στην έλλειψη υψηλής εξειδίκευσης των υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των επιπέδων δραστηριότητας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δράτικότητα των πεπτικών ενζύμων, αποτελεί τη συνισταμένη μιας σειράς μηχανισμών σε μεταγραφικό, μεταφραστικό και μετα-μεταφραστικό επίπεδο, καθώς και της πρωτεολυτικής ενεργοποίησης των ζυμογόνων, όπως και της ενζυμικής αναστολής, οι οποίοι βρίσκονται κάτω από ορμονική και νευρική ρύθμιση. Η μελέτη των πεπτικών ενζύμων σε μεταγραφικό επίπεδο αποτελεί σημαντικό εργαλείο για την ακριβή εκτίμηση της πεπτικής ικανότητας των ψαριών στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια και κάτω από διαφορετικά διατροφικά καθεστάτα. Ακόμη, τα μετάγραφα συγκεκριμένων ενζύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μελέτη διαφόρων φυσιολογικών φαινομένων, ενώ είναι δυνατό να αποτελέσουν τη βάση για την ανάπτυξη *in vitro* μεθόδων μέτρησης της πέψης των πρωτεϊνών, με τη χρήση ανασυνδιασμένων πρωτεασών συγκεκριμένων ειδών, αντί ακατέργαστων ενζυμικών εκχυλισμάτων (Alarcón et al., 1997).

Οι μορφές χυμοθρυψινογόνου (CHTRI και CHTRII) και θρυψινογόνου (TRPII), που απομονώθηκαν από την τσιπούρα (Κεφάλαιο 3), εμφανίζουν υψηλά συντηρημένα αμινοξέα, απαραίτητα για την καταλυτική δράση και τη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους (Hartley 1970; Gudmundsdottir et al. 1993; Male et al. 1995; Roach et al. 1997; Suzuki et al., 2002; Barrett et al., 2004), καθώς και εξαιρετικά συντηρημένη γονιδιακή οργάνωση. Η έκφραση των παραπάνω ζυμογόνων, προηγείται της έναρξης της εξωγενούς τροφοληψίας και της διαφοροποίησης του γαστρεντερικού σωλήνα της τσιπούρας, στοιχείο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους εκτροφείς για τη βελτιστοποίηση των διατροφικών σχημάτων στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του συγκεκριμένου είδους (Kolkovski, 2001).

Η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων, σε νεαρά άτομα τσιπούρας, ανέδειξε το ήπαρ ως κύρια περιοχή έκφρασης τους. Το ήπαρ περιέχει διάχυτα παγκρεατικά κύτταρα και το γενικό πρότυπο έκφρασης των ζυμογόνων στους διάφορους ιστούς της τσιπούρας, συμπίπτει με την κατανομή του παγκρεατικού ιστού, γύρω από τον πεπτικό σωλήνα και το φλεβικό σύστημα (Cataldi et al., 1987; Kurokawa & Suzuki, 1995). Τα πυλωρικά τυφλά είναι το τμήμα του γαστρεντερικού σωλήνα, που συγκεντρώνει την εντονότερη έκφραση όλων των ζυμογόνων, ως η κύρια περιοχή πρωτεϊνικής πέψης κατά μήκος του εντέρου. Αντίθετα με τις μορφές

χυμοθρυψινογόνου, το TRPII παρουσίασε υψηλά επίπεδα έκφρασης σε όλα τα τμήματα του πεπτικού σωλήνα, που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου του στομάχου.

Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία έκφρασης των CHTRII και TRPII στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου. Η υψηλή πρωτεολυτική δραστικότητα, στη συγκεκριμένη περιοχή του γαστρεντερικού σωλήνα, επιβεβαιώθηκε από τις μετρήσεις των ενζυμικών δραστικότητων του συνόλου των πεπτικών πρωτεασών, οι οποίες μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (Κεφάλαια 4 -5) και χρήζει περαιτέρω μελέτης. Η ικανότητα του οπίσθιου εντέρου ν' απορροφά αμινοξέα, πεπτιδία και κυρίως άθικτες πρωτεΐνες (Dabrowski & Dabrowska, 1981; Elbal & Agulleiro, 1986; Cataldi et al., 1987; Buddington et al., 1997; Bakke-McKeller et al., 2000), σε συνδυασμό με τη μεγάλη μάζα του και την αυξημένη πρωτεολυτική δραστικότητα, είναι δυνατό να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία θρέψης της τσιπούρας.

Η χρήση εκλεκτικών υποστρωμάτων και αναστολέων, ανέδειξε τη χυμοθρυψίνη, ως κυρίαρχη πεπτική πρωτεάση κατά μήκος του αλκαλικού τμήματος του εντέρου της τσιπούρας, επιβεβαιώνοντας τη σημασία του συγκεκριμένου ενζύμου όσον αφορά την υδρόλυση των διατροφικών πρωτεϊνών της τσιπούρας (Alarcón et al., 1998; Moutou et al., 2004). Παρόλα αυτά, η αλληλοεπικάλυψη της δράσης θρυψίνης και χυμοθρυψίνης, που παρατηρήθηκε στο σύνολο των μετρήσεων στα επιμέρους τμήματα του εντέρου (Κεφάλαια 4-5), υποδεικνύει, αφενός ότι τα συγκεκριμένα αποτελέσματα θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με σχετική επιφυλακτικότητα και αφετέρου, ενισχύει την υπόθεση περί ακαταλληλότητας των ευρέως χρησιμοποιούμενων εκλεκτικών υποστρωμάτων για τη μέτρηση των δραστικότητων των διάφορων πεπτικών πρωτεασών των ψαριών (Murray et al., 2004) και καταδεικνύει την ανάγκη ανάπτυξης νέων, μεγαλύτερης ακρίβειας, βιοχημικών μεθόδων προσδιορισμού της δραστικότητας των πεπτικών πρωτεασών στους τελεόστεους.

Το προσλαμβανόμενο - για λόγους οσμωρύθμισης - νερό, από τα ψάρια που διαβιούν στο θαλάσσιο περιβάλλον, όντας αλκαλικό ($\text{pH} \approx 8,0$), είναι πιθανό να μεταβάλει τις φυσικοχημικές συνθήκες στον εντερικό αυλό (Usher et al., 1990) και να επηρεάζει απευθείας τη λειτουργία και την απόδοση των πεπτικών ενζύμων (Boeuf & Payan, 2001). Στην παρούσα διατριβή (Κεφάλαιο 4), η αφνίδια μείωση της αλατότητας δεν είχε καμία επίδραση στη συγκέντρωση κορτιζόλης στο πλάσμα

αίματος, στη δραστικότητα των ολικών όξινων πρωτεασών στο στομάχι, στις δραστικότητες των ολικών αλκαλικών πρωτεασών και των σημαντικότερων πρωτεασών της σερίνης - θρυψίνη και χυμοθρυψίνη - στο αλκαλικό τμήμα του εντέρου. Αντίθετα, οδήγησε σε σημαντικές μεταβολές των δραστικοτήτων ελαστάσης και καρβοξυπεπτιδασών Α και Β, κυρίως στα ανώτερα τμήματα του εντέρου. Οι πιο έντονες μεταβολές εντοπίζονται στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών, όπου τα ανενεργά ζυμογόνα των πεπτικών πρωτεασών εισέρχονται στον εντερικό αυλό μέσω του παγκρεατικού αγωγού (Kurokawa & Suzuki, 1995), καθώς και στο πρόσθιο έντερο, όπου φαίνεται να λαμβάνει χώρα το μεγαλύτερο μέρος της οσμωρυθμιστικής δράσης του εντέρου (Shehadeh & Gordon, 1969; Smith et al., 1975; Kirsch and Meister, 1982; Ando et al., 2003). Η δραστικότητα της καρβοξυπεπτιδάσης Α ήταν μικρότερη κατά μήκος του εντέρου των ατόμων, που υποβλήθηκαν σε συνθήκες μειωμένης αλατότητας, και η κυριαρχία της επί της καρβοξυπεπτιδάσης Β εξαλείφθηκε, ενώ ταυτόχρονα το προφίλ κατανομής και των δύο ενζύμων μεταξύ των επιμέρους τμημάτων του εντέρου άλλαξε σημαντικά. Οι μεταβολές της αλατότητας, είναι πιθανό να μην προκαλούν καμία επίδραση στις κυριότερες πρωτεάσες της σερίνης και το σύνολο των μικρών πεπτιδίων που παράγουν με τη δράση τους, αλλά η επίδραση τους στη δραστικότητα των καρβοξυπεπτιδασών - οι οποίες δρουν σε συνθήκες αυξημένου pH και υψηλών συγκεντρώσεων δισθενών ιόντων (Clark et al., 1985; Hidalgo et al., 1999) - μπορεί να επηρεάζει σημαντικά τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων αμινοξέων για απορρόφηση.

Δεδομένου του κεντρικού ρόλου που διαδραματίζουν τα πεπτικά ένζυμα στη διαθεσιμότητα των πρωτεϊνών για αύξηση, είναι πιθανό αυτά να βρίσκονται υπό τον έλεγχο της δράσης της αυξητικής ορμόνης, η οποία φαίνεται ότι επιδρά άμεσα σε διάφορους ιστούς συγχρονίζοντας με αυτόν τον τρόπο τα διάφορα αυξητικά φαινόμενα (Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999). Στην παρούσα εργασία, οι διαφορετικές δόσεις χορηγούμενης oGH (Κεφάλαιο 5) επηρέασαν σημαντικά τη δραστικότητα των ολικών αλκαλικών πρωτεασών στην περιοχή των πυλωρικών τυφλών και του οπίσθιου εντέρου, όπου επίσης είχαν σημαντική επίδραση στη δραστικότητα χυμοθρυψίνης· υποδηλώνοντας πιθανή επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην αλκαλική πέψη των πρωτεϊνών μέσω επίδρασης της στη δραστικότητα της χυμοθρυψίνης, η οποία αποτελεί και την κυρίαρχη πεπτική πρωτεάση για την τσιπούρα. Η επίδραση της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση των γονιδίων CHTRI και TRPII, φαίνεται να μην είναι άμεση, αλλά αποτέλεσμα διαφορετικών ρυθμών

μεταγωγής του σήματος για την έναρξη της μεταγραφής τους ανάμεσα στις επιμέρους περιοχές της εξωκρινούς μοίρας του έντονα διάχυτου παγκρέατος (Cataldi et al., 1987; Kurokawa & Suzuki, 1995). Η παρουσία τροφής στον εντερικό αυλό είναι πιθανόν, μέσω της CCK (Buddington & Krogdahl, 2004; Volkoff et al., 2005; Nelson & Sheridan, 2006), να προκαλεί έκκριση των ζυμογόνων από τα κύτταρα του παγκρέατος, που βρίσκονται γύρω από την περιοχή των πυλωρικών τυφλών, και με το πέρας των αποθεμάτων τους να αρχίζει η μεταγραφή και παραγωγή των ζυμογόνων στα ενδοηπατικά κύτταρα του. Επιπλέον, στην παρούσα διατριβή, ενισχύεται η εικόνα ύπαρξης μιας σύνθετης συσχέτισης αυξητικής ορμόνης και κορτιζόλης (McCormick et al., 1998; Björnsson et al., 2002), με την κορτιζόλη να δρα ως διαμεσολαβητής, όσον αφορά την εμφάνιση πιθανών επιδράσεων της αυξητικής ορμόνης στις φυσιολογικές λειτουργίες των τελεόστεων. Η αυξητική ορμόνη επιδρά στη δράση της ACTH στον επινεφριδιακό ιστό και μέσω αυτής, στην παραγωγή της κορτιζόλης (Young, 1988). Επιπλέον, σε συνθήκες στιγμιαίου στρες, η άμεση επίδραση της κορτιζόλης στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης αυξάνει την έκκριση αυξητικής ορμόνης, ενώ σε καταστάσεις χρόνιου στρες η έκκριση αυξητικής ορμόνης θα μειωθεί μέσω αρνητικής παλινδρομικής ρύθμισης Pérez-Sanchez & Le Bail, 1999).

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, μελετήθηκαν τα πεπτικά ένζυμα της τσιπούρας, τα οποία κατέχουν κεντρικό ρόλο στην πέψη και τη διαθεσιμότητα των διατροφικών πρωτεϊνών για αύξηση.

- ✦ Αναπτύχθηκαν κατάλληλα μοριακά εργαλεία για τη μελέτη της έκφρασης των κυριότερων πρωτεασών της σερίνης, θρυψίνης και χυμοθρυψίνης.
- ✦ Ελέγχθηκε η απόκριση των πεπτικών πρωτεασών στην αιφνίδια μείωση της αλατότητας και η συμβολή τους στον ευρύαλο χαρακτήρα της τσιπούρας.
- ✦ Ερευνήθηκε ο ρόλος της αυξητικής ορμόνης στην έκφραση και τη δραστικότητα των κυριότερων πεπτικών πρωτεασών.

ABSTRACT

MOLECULAR CLONING AND CHARACTERIZATION OF THE MAJOR
SERINE PROTEASES GENES IN THE EURYHALINE TELEOST *Sparus*
aurata: SALINITY AND HORMONAL REGULATION OF GENE
EXPRESSION AND ENZYME ACTIVITY

Eleni N. Psochiou

Department of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly

Information on protease appearance at development, tissue distribution, regulation and coordination of expression levels is valuable for the understanding and manipulation of nutrition physiology at all stages of development and growth. For that, the use of different molecular tools is essential. During this work, two full-length cDNA clones encoding chymotrypsinogens I and II (CHTRI, 1022 bp; CHTRII 909 bp) and one cDNA clone encoding trypsinogen II (TRPII, 848 bp), were isolated from a cDNA library prepared from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) liver. The deduced amino acid sequences of the forms isolated contain highly conserved residues essential for serine protease catalytic activity and conformational maintenance. The deduced amino acid sequences of CHTR I and II are 261aa and 277 aa long, respectively, and share only 61% identity. Sea bream CHTRII appears to be the longest of all known teleostean chymotrypsinogen forms and contains a high number of methionine residues. Compared with CHTR I, CHTR II is more hydrophobic and has a lower isoelectric point. The deduced amino acid sequence of TRPII is 241aa long and has a signal peptide of thirteen amino acid residues and an activation peptide seven amino acids long. In contrast to CHTR I and II, TRPII has a low isoelectric point (4.95), which makes it anionic at neutral pH. Both, chymotrypsinogens and trypsinogen, are characterized by high conservative gene organization. Northern blot analysis revealed that liver is the major transcription site for all zymogens, while all zymogen transcripts were detected in parts of the digestive tract (stomach, pyloric caeca, anterior and posterior intestine), with pyloric caeca presenting the most intense expression. During sea bream development, chymotrypsinogen and mainly trypsinogen, were expressed at the mouth opening stage, well before the full formation of the digestive tract.

The response of the digestive proteases to abrupt salinity change was studied in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*), for 15 days, after transfer from 33‰ to 21‰. Salinity decrease affected significantly neither the plasma cortisol levels, nor the activity of total acid proteases in stomach, nor the activities of total alkaline proteases and major serine proteases -trypsin and chymotrypsin- in the alkaline part of the intestine. The activity of the major proteases was significantly different between the alkaline segments of the intestine, with posterior intestine presenting the highest activities followed by the pyloric caeca. This distribution pattern remained unaffected by salinity decrease. Notably, salinity change led to significant alterations in elastase and carboxypeptidase activity. The changes were more prominent in the upper part of the intestine (pyloric caeca and anterior intestine) than on the posterior intestine. In pyloric caeca significant alteration of carboxypeptidase A and B activity was observed, elastase changes were confined to anterior intestine together with alterations in carboxypeptidase B activity, while in posterior intestine the changes were restricted to carboxypeptidase A activity. The present results are supportive of the idea that the euryhaline character of gilthead sea bream is built up by physiological processes, including the major digestive device, tolerant to abrupt salinity changes.

Irrespective of salinity, chymotrypsin was the predominant enzyme along the alkaline part of the digestive tract. Alkaline proteases' activities were significantly different between the different segments along the intestine and, unexpectedly, higher values were recorded in the posterior part, suggesting that it may have very active role in dietary protein digestion and amino acid absorption. Moreover, the use of specific inhibitors, revealed a transactivity between trypsin and chymotrypsin activities, probably due to the lack of specificity of the biochemical assay for measure trypsin activity using BAPNA as substrate, while trypsin activity measured with the this substrate was quite low in all intestinal segments.

In order to investigate the short term effects of growth hormone on zymogen expression and enzyme specific activity of the major digestive proteases, gilthead sea bream juveniles, were administered of oGH different doses. Growth hormone administration had a significant effect on the chymotrypsinogen I and trypsinogen II expression levels in the liver, but not in the pyloric caeca. Administration of growth hormone different levels affected significantly the activity of total acid proteases in

stomach and the activity of total alkaline proteases in pyloric caeca and posterior intestine, where they also influenced significantly the activity of chymotrypsin. A significant positive correlation was observed between the expression levels of trypsinogen (TRP11) in the pyloric caeca with the levels of trypsin and chymotrypsin activities along the digestive tract. Cortisol appeared to have an intermediate role in growth hormone regulation phenomena on digestive proteases action.

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ahsan, M.N., Funabara, D., Watabe, S., 2001. Kinetic and structural properties of two isoforms of trypsin isolated from the viscera of Japanese anchovy, *Engraulis japonicus*. J. Prot. Chem. 20, 49-58.
- Asgeirsson, B., Bjarnason, B., 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparison with bovine chymotrypsin. Comp. Biochem. Physiol. B 99, 327-335.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., 1997. Studies on digestive enzymes in fish: Characterization and practical applications. Cahiers Options Méditerran. 22, 113-121.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., Abellan, E., 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). Fish Physiol. Biochem. 19, 257-267.
- Alliot, E., Pastoureaud, A., Thebault, H., 1983. Influence de la température et de salinité sur la croissance et la composition corporelle d'alevins de *Dicentrarchus labrax*. Aquaculture 31, 181-194.
- Ando, M., 1975. Intestinal water transport and chloride pump in relation to sea water adaptation of the eel, *Anguilla japonica*. Comp. Biochem. Physiol. A 52, 229-233.
- Ando, M., Mukuda, T., Kozaka, T., 2003. Water metabolism in the eel acclimated to sea water: from mouth to intestine. Comp. Biochem. Physiol. B 136, 621-633.
- Anson, M.L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with haemoglobin. J. Gen. Physiol. 22, 79-89.
- Bakke-McKellep, A.M., Nordrum, S., Krogdahl, A., Buddington, R.K., 2000. Absorption of glucose, amino acids and dipeptides by the intestines of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Fish Physiol. Biochem. 22, 33-44.
- Baptista, A.M., Jonson, P.H., Hough, E., Petersen, S.B., 1998. The origin of trypsin: evidence for multiple gene duplications in trypsins. J. Mol. Evol. 47, 353-362.
- Barman, U.K., Jana, S.N., Garg, S.K., Bhatnagar, A., Arasu, A.R.T., 2005. Effect of inland water salinity on growth, feed conversion efficiency and intestinal enzyme activity in growing grey mullet *Mugil cephalus* (Linn.): Field and laboratory studies. Aquacult. Int. 13, 241-256.
- Barnabé, G., 1990. Aquaculture Vol I. Ellis Horwood, London.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F., 2004. Serine and threonine peptidases. In: Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (Eds) Handbook of proteolytic enzymes Vol II. Elsevier Academic Press, London, pp1417-1447.
- Bartunik, H.D., Summers, L.J., Bartsch, H.H., 1989. Crystal structure of bovine β -trypsin at 1.5 Å resolution in a crystal form with low molecular packing density. J. Mol. Biol. 210, 813-828.

- Bell, G.I., Quinto, C., Quiroga, M., Valenzuela, P., Craik, C.S., Rutter, W.J., 1984. Isolation and sequence of a rat chymotrypsin B gene. *J. Biol. Chem.* 259, 14265-14270.
- Bern, H.A., Madsen, S.S., 1992. A selective survey of the endocrine system of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with emphasis on the hormonal regulation of ion balance. *Aquaculture* 100, 237-262.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., 2002. Catalytic strategies. In: Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (Eds) *Biochemistry*, 5th ed. WH Freeman Co, New York, pp 227-260.
- Bernard, F., Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Bieth, J., Spiess, B., Wermuth, C., 1974. The synthesis and analytical use of a highly sensitive and convenient substrate of elastase. *Biochem. Med.* 11, 350-357.
- Birktoft, J.J., Kraut, J., Freer, S.T., 1976. A detailed structural comparison between the charge relay system in chymotrypsinogen and in α -chymotrypsin. *Biochemistry* 15, 4481-4485.
- Björnsson, B.T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I.E., Hildahl, J., Agustsson, T., Jönsson, E., 2002. Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 227-242.
- Bode, W., Schwager, P., 1975. The single calcium-binding site of crystalline bovine β -trypsin. *FEBS Lett.* 56, 139-143.
- Boeuf, G., Payan, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 411-423.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A., Bakke-McKellep, A.M., 1997. The intestines of carnivorous fish: structure and functions and the relations with diet. *Acta Physiol. Scand.* 161, 67-80.
- Buddington, R.K., Krogdahl, A., 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 261-271.
- Cataldi, E., Cataudella, S., Monaco, G., Rossi, A., Tancioni, L., 1987. A study of the histology and morphology of the digestive tract of the sea-bream, *Sparus aurata*. *J. Fish Biol.* 30, 135-145.
- Chakrabarti, I., Gani, Md. A., Chaki, K.K., Sur, R., Misra, K.K., 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 167-177.
- Cheng, C.H.C., Chen, L.B., 1999. Evolution of an antifreeze glycoprotein. *Nature* 401, 443-444.
- Chen, L., DeVries, A.L., Cheng, C.H., 1997. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3811-3816.
- Claireaux, G., Lagardère, J.P., 1999. Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *J. Sea Res.* 42, 157-168.
- Clark, J., McDonald, N.L., Stark, J.R., 1985. Metabolism in marine flatfish: II. Protein digestion in dover sole (*Solea solea* L.). *Comp. Biochem. Physiol. B* 81, 217-222.

- Cohen, T., Gertler, A., Birk, Y., 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-II Kinetic properties and inhibition studies of trypsin, chymotrypsin and elastase. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69, 647-653.
- Collie, N.L., Stevens, J.J., 1985. Hormonal effects on L-proline transport in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) intestine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 59, 399-409.
- Company, R., Astola, A., Pendón, C., Valdivia, M.M., Pérez-Sánchez, 2001. Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 435-445.
- Dabrowski, K., Dabrowska, H., 1981. Digestion of protein by rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) and absorption of amino acids within the alimentary tract. *Comp. Biochem. Physiol. A* 69, 99-111.
- Dabrowski, K., Leray, C., Nonnotte, G., Colin, D.A., 1986. Protein digestion and ion concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) digestive tract in sea- and fresh water. *Comp. Biochem. Physiol. A* 83, 27-39.
- Daggett, V., Schröder, S., Kollman, P., 1991. Catalytic pathway of serine proteases: classical and quantum mechanical calculations. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 8926-8935.
- Deguara, S., Jauncey, K., Agius, C., 2003. Enzyme activities and pH variations in the digestive tract of gilthead sea bream. *J. Fish Biol.* 62, 1033-1043.
- Dewar, M.J.S., Storch, D.M., 1985. Alternative view of enzyme reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2225-2229.
- Douglas, S.E., Gallant, J.W., 1998. Isolation of cDNAs for trypsinogen from the winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *J. Mar. Biotechnol.* 6, 214-219.
- Dykes, C.W., Kay, J., 1976. Conversion of pepsinogen into pepsin is not a one-step process. *Biochem. J.* 153, 141-144.
- de Haen, C., Neurath, H., Teller, D.C., 1975. The phylogeny of trypsin-related serine proteases and their zymogens. New methods for the investigation of distant evolutionary relationships. *J. Mol. Biol.* 92, 225-259.
- Elbal, M.T., Agulleiro, B., 1986. A histochemical and ultrastructural study of the gut of *Sparus aurata* (Teleostei). *J. Submicrosc. Cytol.* 18, 335-347.
- Elbal, M.T., García Hernández, M.P., Lozano, M.T., Agulleiro, B., 2004. Development of the digestive tract of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Light and electron microscopic studies. *Aquaculture* 234, 215-238.
- Eshel, A., Lindner, P., Smirnoff, P., Newton, S., Harpaz, S., 1993. Comparative study of proteolytic enzymes in the digestive tracts of the european sea bass and hybrid striped bass reared in freshwater. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106, 627-634.
- Ferraris, R.P., Ahearn, G.A., 1984. Sugar and amino acid transport in fish intestine. *Comp. Biochem. Physiol. A* 77, 397-413.

- Ferraris, R.P., Catacutan, M.R., Mabelin, R.L., Jazul, A.P., 1986. Digestibility in milkfish, *Chanos chanos* (Forsskal): effects of protein source, fish size and salinity. *Aquaculture* 59, 93-105.
- Figarella, C., Negri, G.A., Guy, O., 1975. The two human trypsinogens. Inhibition spectra of the two human trypsins derived from their purified zymogens. *Eur. J. Biochem.* 53, 457-463.
- Fletcher, T.S., Alhadeff, M., Craik, C.S., Largman, C., 1987. Isolation and characterization of a cDNA encoding rat cationic trypsinogen. *Biochemistry* 26, 3081-3086.
- Franklin, C.E., Forster, M.E., Davison, W., 1992. Plasma cortisol and osmoregulatory changes in sockeye salmon transferred to sea water: comparison between successful and unsuccessful adaptation. *J. Fish Biol.* 41, 113-122.
- Fraisse, M., Woo, N.Y.S., Noaillac-Depeyre, J., Murat, J.C., 1981. Distribution pattern of digestive enzyme activities in the intestine of the catfish (*Ameiurus nebulosus* L.) and of the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 70, 443-446.
- Folk, J.E., Piez, K.A., Carroll, W.R., Gladner, J., 1960. Carboxypeptidase B. IV. Purification and characterization of the porcine enzyme. *J. Biol. Chem.* 235, 2272-2277.
- Folk, J.E., Schirmer, E.W., 1963. The porcine pancreatic carboxypeptidase A system. *J. Biol. Chem.* 238, 3884-3894.
- Foster, A.R., Houlihan, D.F., Gray, C., Medale, F., Fauconneau, B., Kaushik, S., Le Bail, P.Y., 1991. The effects of ovine growth hormone on protein turnover in rainbow trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82, 111-120.
- García-Carreño, F.L., 1992. Protease inhibition in theory and practice. *Biotechnol. Educ.* 3, 145-150.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65-69.
- García-Carreño, F.L., Del Toro, M.N., 1997. Classification of proteases without tears. *Biochem. Educ.* 25, 161-167.
- Genicot, S., Rentier-Delrue, F., Edwards, D., VanBeeumen, J., Gerday, C., 1996. Trypsin and trypsinogen from an Antarctic fish: molecular basis of cold adaptation. *Biochim. Biophys. Acta* 1298, 45-57.
- Georgopoulou, U., Sire, M.F., Vernier, J.M., 1986. Immunological demonstration of intestinal absorption and digestion of protein macromolecules in the trout, *Salmo gairdneri*. *Cell. Tissue Res.* 245, 387-395.
- Geuze, J.J., Slot, J.W., Tokuyasu, K.T., 1979. Immunocytochemical localization of amylase and chymotrypsinogen in the exocrine pancreatic cell with special attention to the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 82, 697-707.

- Girin, M., 1983. The sparidae: a warmwater finfish family with worldwide mariculture potential. Proceeding of the warmwater fish culture workshop Spec. Publ. 3, 3-14.
- Glass, H.J., MacDonald, N.L., Moran, R.M., Stark, J.R., 1989. Digestion of protein in different marine species. Comp. Biochem. Physiol. B 94, 607-611.
- Gudmundsdottir, A., Gudmundsdottir, E., Oskarsson, S., Bjarnason, J.B., Eakin, A.K., Craik, C.S., 1993. Isolation and characterization of cDNAs from Atlantic cod encoding two different forms of trypsinogen. Eur. J. Biochem. 217, 1091-1097.
- Gudmundsdottir, A., Oskarsson, S., Eakin, A.K., Craik, C.S., Bjarnason, J.B., 1994. Atlantic cod cDNA encoding a psychrophilic chymotrypsinogen. Biochim. Biophys. Acta 1219, 211-214.
- Gudmundsdottir, A., Palsdottir, H.M., 2005. Atlantic cod trypsins: from basic research to practical applications. Mar. Biotechnol. 7, 77-88.
- Halver, J.E., 1989. Fish nutrition. Academic Press Inc., San Diego, USA.
- Hartley, B.S., 1964. Amino-acid sequence of bovine chymotrypsinogen A. Nature 201, 1284-1287.
- Hartley, B.S., 1970. Homologies in serine proteinases. Phil. Trans. Royal Soc. Lond. 257B, 77-87.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W.J., 1992. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. Science 255, 1249-1253.
- Hedstrom, L., Perona, J.J., Rutter, W.J., 1994. Converting trypsin to chymotrypsin: residue 172 is a substrate specificity determinant. Biochemistry 33, 8757-8763.
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. Aquaculture 170, 267-283.
- Hoar, W.S., Randall, D.J., 1969. Fish physiology Vol I & Vol VIII. Academic Press Inc., London.
- Honey, N.K., Sakaguchi, A.Y., Quinto, C., McDonald, R.J., Bell, G.I., Craik, C., Rutter, W.J., Naylor, S.L., 1984. Chromosomal assignments of human genes for serine proteases trypsin, chymotrypsin B and elastase. Somat. Cell Mol. Genet. 10, 369-376.
- Hughes, A.L., 2002. Adaptive evolution after gene duplication. Trends Genet. 18, 433-434.
- Imsland, A.K., Foss, A., Gunnarsson, S., Berntssen, M.H.G., FitzGerald, R., Bonga, S.W., v Ham, E., Naevdal, G., Stefansson, S.O., 2001. The interaction of temperature and salinity on growth and food conversion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 198, 353-367.
- Jönsson, E., Johansson, V., Björnsson, B.T., Winberg, S., 2003. Central nervous system actions of growth hormone on brain monoamine levels and behaviour of juvenile rainbow trout. Horm. Behav. 43, 367-374.

- Kapoor, B.G., Smit, H., Verighina, I.A., 1975. The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13, 109-239.
- Kelly, S.P., Woo, N.Y.S., 1999. The response of sea bream following abrupt hyposmotic exposure. *J. Fish Biol.* 55, 732-750.
- Kirsch, R., Meister, M.F., 1982. Progressive processing of ingested water in the gut of sea water teleosts. *J. Exp. Biol.* 98, 67-81.
- Klaoudatos, S.D., Conides, A.J., 1996. Growth, food conversion, maintenance and long-term survival of gilthead seabream *Sparus auratus* L. juveniles after abrupt transfer to low salinity. *Aquacult. Res.* 27, 765-774.
- Klein, S.L., Strausberg, R.L., Wagner, L., Pontius, J., Clifton, S.W., Richardson, P., 2002. Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* Initiative. *Dev. Dyn.* 225, 384-391.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
- Koven, W., van Anholt, R., Lutzky, S., Atia, I.B., Nixon, O., Ron, B., Tandler, A., 2003. The effect of dietary arachidonic acid on growth, survival, and cortisol levels in different-age gilthead seabream larvae (*Sparus auratus*) exposed to handling or daily salinity change. *Aquaculture* 228, 307-320.
- Krogdahl, A., Sundby, A., Olli, J.J., 2004. Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) digest and metabolize nutrients differently. Effects of water salinity and dietary starch level. *Aquaculture* 229, 335-360.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 150-163.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., 1995. Structure of the exocrine pancreas of flounder (*Paralichthys olivaceus*): immunological localization of zymogen granules in the digestive tract using anti-trypsinogen antibody. *J. Fish Biol.* 46, 292-301.
- Kurokawa, T., Suzuki, T., Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Unuma, T., 2002. Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.* 68, 736-744.
- Laemmlli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzman, J.M., Martín del Río, M.P., Miguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiol. Biochem.* 27, 179-188.
- Laiz-Carrión, R., Martín del Río, M.P., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2003. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. *J. Exp. Zool. A* 298, 105-118.

- Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzman, J.M., Martín del Río, M.P., Miguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2005. Growth performance of gilthead sea bream *Sparus aurata* in different osmotic conditions: Implications for osmoregulation and energy metabolism. *Aquaculture* 250, 849-861.
- Lambert, Y., Dutil, J.D., Munro, J., 1994. Effects of intermediate and low salinity conditions on growth rate and food conversion of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 1569-1576.
- Leedom, T.A., Uchida, K., Yada, T., Richman, N.H.III, Byatt, J.C., Collier, R.J., Hirano, T., Grau, E.G., 2002. Recombinant bovine growth hormone treatment of tilapia: growth response, metabolic clearance, receptor binding and immunoglobulin production. *Aquaculture* 207, 359-380.
- Le François, N.R., Lamarre, S.G., Blier, P.U., 2004. Tolerance, growth and haloplasticity of the Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) exposed to various salinities. *Aquaculture* 236, 659-675.
- Le Huerou, I., Wicker, C., Guilloteau, P., Toullec, R., Puigserver, A., 1990. Isolation and nucleotide sequence of cDNA clone for bovine pancreatic anionic trypsinogen. Structural identity within the trypsin family. *Eur. J. Biochem.* 193, 767-773.
- Lesk, A.M., Fordham, W.D., 1996. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J. Mol. Biol.* 258, 501-537.
- Lin, C.H., Tsai, R.S., Lee, T.H., 2004. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nitroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 287-295.
- Lovell, T., 1989. Nutrition and feeding of fish. Van Nostrand Reinhold, New York, USA.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Macouzet, M., Lee, B.H., Simpson, B.K., 2003. Cloning of cunner trypsinogen cDNA in *Escherichia coli*. *Appl. Biotechnol. Food Sci. Policy.* 1, 243-251.
- Male, R., Lorens, J.B., Smalas, A.O., Torrissen, K.R., 1995. Molecular cloning and characterization of anionic and cationic variants of trypsin from Atlantic salmon. *Eur. J. Biochem.* 232, 677-685.
- Mancera, J.M., Pérez-Figares, J.M., Fernández-Llebregz, P., 1993a. Osmoregulatory responses to abrupt salinity changes in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 106, 245-250.
- Mancera, J.M., Fernández-Llebregz, P., Grondona, J.M., Pérez-Figares, J.M., 1993b. Influence of environmental salinity on prolactin and corticotropic cells in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 90, 220-231.

- Mancera, J.M., Pérez-Figares, J.M., Fernández-Llebrez, P., 1994. Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A* 107, 397-402.
- Mancera, J.M., Fernández-Llebrez, P., Pérez-Figares, J.M., 1995. Effect of decreased environmental salinity on growth hormone cells in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Fish Biol.* 46, 494-500.
- Mancera, J.M., McCormick, S.D., 1998. Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comp. Biochem. Physiol. B* 121, 43-48.
- Marshall, W.S., Emberley, T.R., Singer, T.D., Bryson, S.E., McCormick, S.D., 1999. Time course of salinity adaptation in a strongly euryhaline estuarine teleost, *Fundulus heteroclitus*: a multivariable approach. *J. Exp. Biol.* 202, 1535-1544.
- McCormick, S.D., Saunders, R.L., MacIntyre A.D., 1989. The effect of salinity and ration level on growth rate and conversion efficiency of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 82, 173-180.
- McCormick, S., Shrimpton, J.M., Carey, J.B., O'Dea, M.F., Sloan, K.E., Moryiama, S., Björnsson, B.Th., 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture* 168, 221-135.
- McCormick, S.D., 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *Amer. Zool.* 41, 781-794.
- McDonald, R.J., Stary, S.J., Swift, G.H., 1982. Two similar but nonallelic rat pancreatic trypsinogens. Nucleotide sequences of the cloned cDNAs. *J. Biol. Chem.* 257, 9724-9732.
- Moutou, A.K., Panagiotaki, P., Mamuris, Z., 2004. Effects of salinity on digestive protease activity in the euryhaline sparid *Sparus aurata* L.: a preliminary study. *Aquacult. Res.* 35, 912-914.
- Movileanu, L., Flonta, M.L., Mihailescu, D., Frangopol, P.T., 1998. Characteristics of ionic transport processes in fish intestinal epithelial cells. *BioSystems* 45, 123-140.
- Moyle, P.B., Cech, J.J., 1982. *Fishes. An introduction to ichthyology.* 5th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Munilla-Morán, R., Saborino-Rey, F.F., 1996a. Digestive enzymes in marine species. II. Amylase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 827-834.
- Munilla-Morán, R., Saborino-Rey, F.F., 1996b. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 395-402.
- Muñoz-Cueto, J.A., Martínez-Barberá, J.P., Pendón, C., Rodríguez, R.B., Sarasquete, C., 1996. Autoradiographic localization of growth hormone binding sites in *Sparus aurata* tissues

- using a recombinant gilthead sea bream growth hormone. *Comp. Biochem. Physiol. C* 114, 17-22.
- Murray, H.M., Pérez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 53-59.
- Náray-Szabó, G., 2000. Enzyme mechanisms: interplay of theory and experiment. *J. Mol. Struct.* 500, 157-167.
- Nelson, L.E., Sheridan, M.A., 2006. Gastroenteropancreatic hormones and metabolism in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 148, 116-124.
- Neurath, H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224, 350-357.
- Nordrum, S., Bakke-McKellep, A.M., Krogdahl, A., Buddington, R.K., 2000. Effects of soybean meal and salinity on intestinal transport of nutrients in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. B* 125, 317-335.
- Pérez-Sánchez, J., Le Bail, P.Y., 1999. Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. *Aquaculture* 177, 117-128.
- Pérez-Sánchez, J., 2000. The involvement of growth hormone in growth regulation, energy homeostasis, and immune function in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a short review. *Fish Physiol. Biochem.* 22, 135-144.
- Pérez, A., Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C., 1998. Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 19, 145-152.
- Perona, J.J., Craik, C.S., 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Prot. Sc.* 4, 337-360.
- Perona, J.J., Craik, C.S., 1997. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* 272, 29987-29990.
- Peterson, B.C., Small, B.C., Bosworth, B.G., 2004. Effects of bovine growth hormone (Posilac) on growth performance, body composition, and IGF1s in two strains of channel catfish. *Aquaculture* 232, 651-663.
- Pierce, A.L., Shimizu, M., Beckman, B.R., Baker, D.M., Dickhoff, W.W., 2005. Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 140, 192-202.
- Pinsky, S.D., LaForge, K.S., Luc, V., Scheele, G., 1983. Identification of cDNA clones encoding secretory isoenzyme forms: sequence determination of canine pancreatic prechymotrypsinogen 2 mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 7486-7490.
- Pinsky, S.D., LaForge, K.S., Scheele, G., 1985. Differential regulation of mRNA translation: full length mRNA sequences encoding two oppositely charged trypsinogen isoenzymes in the dog pancreas. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2669-2676.

- Polgar, L., 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161-2172.
- Puente, X.S., Sanchez, L.M., Overall, C.M., Lopez-Otin, C., 2003. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4, 544-558.
- Reinecke, M., Björnsson, B.T., Dickhoff, W.W., McCormick, S.D., Navarro, I., Power, D.M., Gutiérrez, J., 2005. Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen. Comp. Endocrinol.* xxx, x-x.
- Rinderknecht, H., Renner, I.G., Abramson, S.B., Carmack, C., 1984. Mesotrypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* 86, 681-692.
- Roach, J.C., Wang, K., Gan, L., Hood, L., 1997. The molecular evolution of the vertebrate trypsinogens. *J. Mol. Evol.* 45, 640-652.
- Roach, J.C., 2002. A clade of trypsins found in cold-adapted fish. *Proteins* 47, 31-44.
- Rotllant, J., Guerreiro, P.M., Anjos, L., 2005. Stimulation of cortisol release by the N terminus of teleost parathyroid hormone-related protein in interrenal cells in vitro. *Endocrinology* 146, 71-76.
- Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269, 187-196.
- Sangiao-Alvarellos, S., Laiz-Carrión, R., Guzman, J.M., Martín del Río, M.P., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285, R897-R907.
- Sangiao-Alvarellos, S., Miguez, J.M., Soengas, J.L., 2005. Actions of growth hormone on carbohydrate metabolism and osmoregulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 141, 214-225.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Gonzales de Canales, M.L., 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L.. *Histochem. J.* 25, 430-437.
- Sarasquete, M.C., Polo, A., Yufera, M., 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.. *Aquaculture* 130, 79-92.
- Sarropoulou, E., Power, D.M., Magoulas, A., Geisler, R., Kotoulas, G., 2005. Comparative analysis and characterization of expressed sequence tags in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) liver and embryos. *Aquaculture* 243, 69-81.
- Scheiner, S., Lipscomb, W.N., 1976. Molecular orbital studies of enzyme activity: catalytic mechanism of serine proteases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73, 432-436.
- Schoellmann, G., Shaw, E., 1963. Direct evidence for the presence of histidine in the active center of chymotrypsin. *Biochemistry* 2, 252-255.

- Shehadeh, Z.H., Gordon, M.S., 1969. The role of the intestine in salinity adaptation of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.* 30, 397-418.
- Sheidelin, M., Madsen, S.S., Blenstrup, H., Tipsmark, C.K., 2000. Time-course changes in the expression of Na⁺, K⁺-ATPase in gills and pyloric caeca of brown trout (*Salmo trutta*) during acclimation to seawater. *Physiol. Biochem. Zool.* 73, 446-453.
- Shrimpton, J.M., Devlin, R.H., Mclean, E., Byatt, J.C., Donaldson, E.M., Randall, D.J., 1995. Increases in gill cytosolic corticosteroid receptor abundance and saltwater tolerance in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) treated with growth hormone and placental lactogen. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98, 1-15.
- Silverstein, J.T., Shearer, K.D., Dickhoff, W.W., Plisetskaya, E.M., 1999. Regulation of nutrient intake and energy balance in salmon. *Aquaculture* 177, 161-169.
- Smith, H.W., 1930. The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. *Am. J. Physiol.* 93, 480-505.
- Smith, M.W., Ellory, J.C., Lahlou, B., 1975. Sodium and chloride transport by the intestine of the European flounder *Platichthys flesus* adapted to fresh or sea water. *Pflügers Arch.* 357, 303-312.
- Spilliaert, R., Gudmundsdottir, A., 1999. Atlantic cod trypsin Y-member of a novel trypsin group. *Mar. Biotechnol.* 1, 598-607.
- Spilliaert, R., Gudmundsdottir, A., 2000. Molecular cloning of the Atlantic cod chymotrypsinogen B. *Microb. Comp. Genomics* 5, 41-50.
- Srivastava, A.S., Kurokawa, T., Suzuki, T., 2002. mRNA expression of pancreatic enzyme precursors and estimation of protein digestibility in first feeding larvae of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A, 629-635.
- Stevenson, B.J., Hagenbuchle, O., Wellauer, P.K., 1986. Sequence organisation and transcriptional regulation of the mouse elastase II and trypsin genes. *Nucleic Acids Res.* 14, 8307-8330.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 16899-16903.
- Stroband, H.W.J., Van der Veen, F.H., 1981. Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *J. Exp. Zool.* 218, 149-156.
- Sun, L.Z., Farmanfarmaian, A., 1992. Biphasic action of growth hormone on intestinal amino acid absorption in stripped bass hybrids. *Comp. Biochem. Physiol.* 103A, 381-390.
- Sunde, J., Taranger, G.L., Rungruangsak-Torrissen, K., 2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 25, 335-345.

- Suzuki, T., Srivastava, A.S., Kurokawa, T., 2002. cDNA cloning and phylogenetic analysis of pancreatic serine proteases from Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 131, 63-70.
- Tandler, A., Anav, F.A., Choshniak, I., 1995. The effect of salinity on growth rate, survival and swimbladder inflation in gilthead seabream, *Sparus aurata*, larvae. *Aquaculture* 135, 343-353.
- Tchernia, P., 1969. Cours d'océanographie regionale. Ministère des Armées, Service Hydrographique et Océanographique de la Marine, Paris.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G., 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Tort, L., Landri, P., Altimiras, J., 1994. Physiological and metabolic changes of sea bream *Sparus aurata* to short-term acclimation at low salinity. *Comp. Biochem. Physiol. A* 108, 75-80.
- Ueberschar, B., 1995. The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. *ICES Mar. Sci. Symp.* 201, 119-129.
- Usher, M.L., Talbot, C., Eddy, F.B., 1990. Effects of transfer to seawater on digestion and gut function in Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 90, 85-96.
- Vega-Rubin de Celis, S., Rojas, P., Gómez-Requeni, P., Albalat, A., Gutiérrez, J., Medale, F., Kaushik, S.J., Navarro, I., Pérez-Sánchez, J., 2004. Nutritional assessment of somatolactin function in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): concurrent changes in somatotrophic axis and pancreatic hormones. *Comp. Biochem. Physiol. A* 138, 533-542.
- Veillette, P.A., White, R.J., Specker, J.L., Young, G., 2005. Osmoregulatory physiology of pyloric ceca: regulated and adaptive changes in Chinook salmon. *J. Exp. Zool. A* 303, 608-613.
- Volkoff, H., Canosa, L.F., Unniappan, S., Cerdá-Reverter, J.M., Bernier, N.J., Kelly, S.P., Peter, R.E., 2005. Neuropeptides and the control of food intake in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 3-19.
- Wang, K., Gan, L., Lee, I., Hood, L., 1995. Isolation and characterization of the chicken trypsinogen gene family. *Biochem. J.* 307, 471-479.
- Watanabe, T., Tomita, T.S., 1974. Genetic study of pancreatic proteinase and alpha-amylase in mice (*Mus musculus*). *Biochem. Genet.* 12, 419-428.
- Woo, N.Y.S., Kelly, S.P., 1995. Effects of salinity and nutritional status on growth and metabolism of *Sparus sarba* in a closed seawater system. *Aquaculture* 135, 229-238.
- Wu, R.S.S., Woo, N.Y.S., 1983. Tolerance of hypo-osmotic salinities in thirteen species of adult marine fish: implications for estuarine fish culture. *Aquaculture* 32, 175-181.
- Young, G., 1988. Enhanced response of the interrenal of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to ACTH after growth hormone treatment *in vivo* and *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71, 85-92.

Yousef, G.M., Elliott, M.B., Kopolovic, A.D., Serry, E., Diamandis, P., 2004. Sequence and evolutionary analysis of the human trypsin subfamily of serine peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1698, 77-86.

Zar, J.H., 1984. *Biostatistical analysis*. 2nd ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, UK.

ΕΛΛΗΝΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ

Παπουτσόγλου, Σ.Ε., 1998. *Ενδοκρινολογία ιχθύων*. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.

Σμοκοβίτης, Α., 1993. *Φυσιολογία*. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη. Θεσσαλονίκη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Κατάλογος των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών μετρήσεων

Προϊόν	Παρασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Acetic acid	Merck	100063 2511
Acrylamide	Sigma	A8827
Agarose	HT	SB11
Agarose LMP	Promega	V384A
Ammonium persulfate (APS)	Sigma	A3678
Ampicillin, sodium salt	Sigma	A2804
Azocasein, sulfanilamide	Sigma	A2765
N-benzoyl-L-arginine-4- nitroanilide hydrochloride (BAPNA)	Sigma	B3279
N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE)	Sigma	B6125
Brilliant blue R250	Sigma	B7920
5-brom-4-chlor-3-indolyl-β-D- galactopyranosid (X-Gal)	Sigma	B6024
Bromophenol blue	Sigma	B8026
Calcium chloride, dihydrate	Merck	102382 0000
Chloroform	Merck	102445 1000
Chymostatin , from microbial source	Sigma	C7268
Copper (II) sulphate-5-hydrate	Riedel-de Haën	31293
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Reagent Organics	2106D
N,N'-dimethyl-formamide (DMF)	Sigma	D4551
Dimethylsulphoxide (DMSO)	Fluka	41640
Dithiothreitol (DTT)	Sigma	D9779
dNTPs (set of dATP-dCTP-dGTP-dTTP)	Promega	41240
Ethanol	Riedel-de Haën	32221
Ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt:dehydrate (EDTA)	Sigma	E5134
Ethylenediaminetetraacetic acid, 0,5M (EDTA 0,5M)	Sigma	E7889
Ethidium bromide	Sigma	E8751
Folin ciocalteu's reagent	Sigma	F9252
Formaldehyde, 37% solution	PA Panreac	131328 1212
Formamide	PA Panreac	141956 1211

Προϊόν	Παρασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Gene ruler 100bp DNA ladder	Biolabs	N3231L
Glycerol, about 87%	Merck	104094 0000
Glycerol, >99,5%	PA Panreac	131339 1211
Glycine, electrophoresis reagent	Sigma	G8898
Haemoglobin, from bovine blood	Sigma	H2625
Heparin, sodium salt from porcine intestinal mucosa	Sigma	H1027
Hydrochloric acid, fuming 37%	Merck	100317 0000
Isopropanol	Merck	109634 0000
Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside, dioxane free (IPTG)	Fermentas	R0392
Kanamycin, monosulfate salt	Sigma	K0879
Kodak GBX Developer/ Replenisher	Sigma	P7042
Kodak GBX Fixer	Sigma	P8307
LB Agar	Sigma	L2897
LB Broth	Scharlau	01.384
	Sigma	L7275
	Scharlau	02.384
2-Mercaptoethanol	Riedel-de Haën	62736
Methanol	Merck	106009 2511
N,N'-methylene-bis-acrylamide	Sigma	M7256
MOPS, >99,5%	Sigma	M3183
Methylene blue, hydrate	Fluka	66720
Pepstatin A, from microbial source	Sigma	P5318
pGEM-T Easy Vector, System II	Promega	A1380
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Serva	32395
ortho-phosphoric acid, 85%	PA Panreac	131032 1211
Potassium chloride	Sigma	P9541
Potassium sodium tartrate, tetrahydrate	Sigma	P0165
Protein standard	Sigma Diagnostics	P7656
Oligo dT, d(pT)18	Sigma	O3382
Reverse Transcriptase, M-MLV	Promega	M1701
RNAase inhibitor	Invitrogen	10777 019
RNA marker	Promega	G3191
RNA later	Sigma	R0901
Sodium acetate, anhydrous	Sigma	S2889
Sodium acetate, trihydrate	Scharlau	S00024
Sodium acetate, buffer solution (3 M)	Sigma	S2404
Sodium carbonate	Sigma	S7795
Sodium chloride	PA Panreac	131659 1211
Tris-sodium citrate	Mallinckrodt	0734

Προϊόν	Παρασκευάστρια εταιρεία	Αριθμός καταλόγου
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma	L4390
Sodium hydroxide, anhydrous pellets	PA Panreac	131687 1211
Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate	Merck	K11432680
Sodium phosphate, monobasic anhydrous	Sigma	S0751
Sodium potassium tartrate	Sigma	S6170
N-succinyl-Ala-Ala-Ala p-nitroanilide	Sigma	S4760
Taq DNA polymerase, in buffer B N,N,N',N'- tetramethylethylenediamine (TEMED)	Promega	M1665
Tetracycline, hydrochloride	Research Organics	3009T
Tri-Reagent	Sigma	T8032
Na-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)	Sigma	T9424
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Sigma	T7254
Trichloroacetic acid (TCA)	Merck	108382 0500
Trypsin inhibitor from soybean (SBTI)	Merck	100807 0250
	Sigma	T9767

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Διαλύματα και συνταγές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραματικών μετρήσεων

Agarose 1,5% (northern blot) : 3 g αγαρόζη

150 ml DEPC ddH₂O

20 ml 10x MOPS

30 ml φορμαλδεΰδη

Charcoal solution: 25 ml ρυθμιστικού διαλύματος ζελατίνης

0,038 g Dextran

0,375 g άνθρακα

DEPC ddH₂O: 500 ml ddH₂O

50 μl DEPC

Electrophoresis buffer (alkaline zymogram, 1000 ml): 3 g Tris

14,4 g γλυκίνη

1 g SDS

Electrophoresis buffer (acid zymogram): 5 mM Tris

0,62 M γλυκίνη

pH = 7,0

Gelatin buffer: 0,5 g ζελατίνης

50 ml διάλυμα φωσφορικού

450 ml ddH₂O

Glycerol stock: 850 μl υγρής καλλιέργειας κυττάρων

150 μl γλυκερόλης

[³H]-cortisol/antibody solution: σημασμένη κορτιζόλη

(1500 cpm/100 μl)

αντίσωμα (750 cpm/100 μl)

Hybridization solution (Church-Gilbert): 1 mM EDTA

0,25 M NaHPO₄⁻

7% SDS

Loading buffer (alkaline zymogram, 1000 μl): 300 μl γλυκερόλη 10%

50 μl SDS 0,5%

7 μl μπλε βρωμοφαινόλης 0,007%

643 µl ddH₂O

Loading buffer (acid zymogram): 0,1 M Tris-H₃PO₄, pH = 5,5

20% γλυκερόλη

0,02% μπλε του μεθυλενίου

10x MOPS: 0,2 M MOPS

0,05 M NaC₂H₃O₂

0,01 M EDTA

pH = 7,0

Phosphate buffer: 115 g Na₂HPO₄

29,6 g NaH₂PO₄

21 ddH₂O

pH = 7,6

Resolving solution (northern blot) : 2,4 M φορμαλδεΐδη 37%

75% (w/v) φορμαμιδιο

1,3x MOPS

3 µg/ml βρωμιούχο αιθιδιο

20x SSC: 3 M NaCl

300 mM Na₃C₆H₅O₇

