

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ »**

Στέλλα Γεωργίου
Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

**Μελέτη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης
στο λευκό μυ και στο ήπαρ της τσιπούρας
(*Sparus aurata* L.)**



Λάρισα, Ιούνιος 2010

**Μελέτη της επίδρασης της αυξητικής ορμόνης στο λευκό μυ
και στο ήπαρ της τσιπούρας (*Sparus aurata* L.)**

Τριμελής επιτροπή

Αικατερίνη Μούτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογίας
Σπονδυλωτών στο Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Ζήσης Μαμούρης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών στο
Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Θεολογία Σαραφίδου, Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών στο Τμήμα Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής & Συγκριτικής Βιολογίας, του Τμήματος Βιοχημείας - Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την τριμελή εξεταστική επιτροπή και ιδιαίτερα την καθηγήτριά μου, κ. Κατερίνα Μούτου, για την πολύτιμη και εύρυθμη συνεργασία μας. Επίσης, τον κ. Κώστα Σταμάτη για τη βοήθεια και τη συμπαράσταση του.

περιεχόμενα

<i>Εισαγωγή</i>	<i>1-17</i>
<i>Σκοπός</i>	<i>18</i>
<i>Υλικά και Μέθοδοι</i>	<i>19-28</i>
<i>Αποτελέσματα</i>	<i>29-34</i>
<i>Συζήτηση</i>	<i>35-40</i>
<i>Βιβλιογραφία</i>	<i>41-49</i>

Εισαγωγή

Η ιχθυοκαλλιέργεια είναι ένας δυναμικός κλάδος της Ελληνικής πρωτογενούς παραγωγής. Στη σχετικά μικρή του ιστορία, η εισαγωγή καινοτόμων μεθοδολογιών και η οικονομική ενίσχυση από την Ευρωπαϊκή Ένωση οδήγησε σε ραγδαία αύξηση της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας με πρωταγωνιστές την τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*). Ειδικά μετά το 1980 που ξεκίνησε η συστηματική εκτροφή αυτών των δύο ειδών, η Ελλάδα μεγέθυνε κατά 20 φορές την παραγωγή κατά τη δεκαετία 1990-2000, αγγίζοντας το 2002 τους 103.000 τόνους, που αντιστοιχεί στο 57% της παγκόσμιας παραγωγής. Αυτή τη στιγμή, η Ελλάδα διαθέτει την ισχυρότερη θαλασσοκαλλιέργεια σε όλη τη Μεσόγειο και είναι η μεγαλύτερη παραγωγός τσιπούρας σε όλη την Ευρώπη. Πάνω από το 80 % της αξίας του παραγόμενου προϊόντος και 76 % του όγκου παραγωγής εξάγεται, καθιστώντας την τσιπούρα και το λαβράκι, στο σύνολό τους, το υπ. αριθμόν ένα εξαγωγικό προϊόν του πρωτογενούς τομέα, για το 2007, με ύψος εξαγωγών 415 εκατομμύρια ευρώ (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών, 2008).

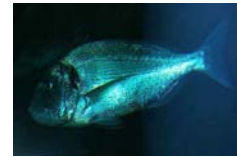


Η τσιπούρα

Ο τελεόστεος *Sparus aurata*, γνωστός ως τσιπούρα (Εικόνα 1), ζει σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές, με αμμώδεις βυθούς και μαύρες φυκιάδες (*Posidonia oceanica*) και σε βάθη από 15-30m το καλοκαίρι ενώ το χειμώνα πιο βαθιά (150m), προκειμένου να αποφύγει τις χαμηλές θερμοκρασίες και να αναπαραχθεί. Συναντάται από τον Τροπικό Ατλαντικό ως τη Μεγάλη Βρετανία, τη Μεσόγειο και τις Ελληνικές θάλασσες ενώ σπανίζει στη Μαύρη θάλασσα.



Sparus aurata	
Υπόφυλο	Vertebrata
Υπέρκλαση	Osteichthyes
Κλάση	Actinopterygii
Υπόκλαση	Teleostei
Τάξη	Percinoformes
Οικογένεια	Sparidae



Εικόνα 1. Τσιπούρα (*Sparus aurata*).

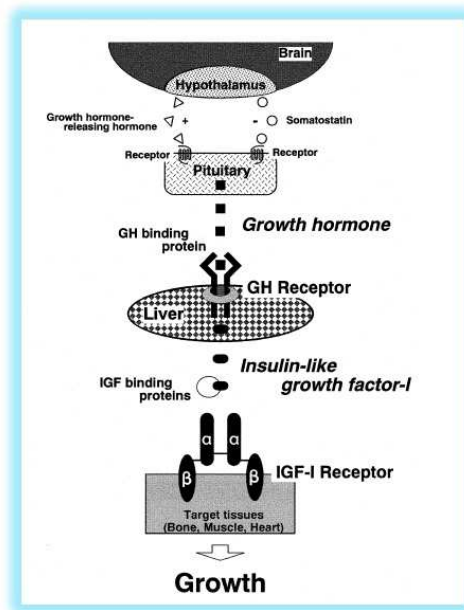
Η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο ψάρι και στις διατροφικές της προτιμήσεις περιλαμβάνονται δίθυρα μαλάκια, τα οποία διαρρηγνύει με την ισχυρή οδοντοστοιχία της, μαλακόστρατα, σκουλήκια, μικρά ψάρια, καρκινοειδή και εχινόδερμα. Αναπαράγεται την περίοδο Οκτώβρη-Δεκέμβρη. Είναι πρώτανδρο ψάρι και πιο συγκεκριμένα, τα άτομα του είδους ξεκινούν τη ζωή τους ως αρσενικά, για να εγκαταλείψουν μετά από τρία περίπου έτη αυτή τη φυλετική ταυτότητα, μετατρέπόμενα σε θηλυκά (www.fishbase.org).

Το φιλέτο της τσιπούρας είναι άσπρο, τρυφερό και αποτελεί εξαιρετικής ποιότητας τροφή για τον άνθρωπο. Η χημική σύσταση του κρέατος περιλαμβάνει 81,10% νερό, 17,00% πρωτεΐνες, 0,93% λίπη και 0,97% τέφρα. Η απόδοση σε φιλέτο προσεγγίζει το 70% (Πανταρίδης, 2005). Το φιλέτο, δηλαδή ο **λευκός μύς**, είναι το τελικό προϊόν της ιχθυοκαλλιέργειας, που από τη δεκαετία του '80 συγκεντρώνει ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο στον ελλαδικό χώρο όσο και παγκόσμια. Οι μηχανισμοί αύξησης και ανάπτυξης του λευκού μύος έχουν μεγάλη σημασία για τη φυσιολογία του ψαριού, όσον αφορά στη βελτιστοποίηση της κολυμβητικής ικανότητας, στην αξιοποίηση της τροφής, με έμφαση στη συνολική ποιότητα των προνυμφικών σταδίων και στο δυναμικό αύξησης τους. Προκειμένου να αναπτυχθεί μια οικονομικά βιώσιμη ιχθυοκαλλιέργεια είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών αυτών και των παραγόντων που τους επηρεάζουν προκειμένου να βελτιωθούν οι τρέχουσες πρακτικές εκτροφής.



Πως αυξάνεται σε μέγεθος το ψάρι;

Η σωματική αύξηση ορίζεται ως η αύξηση του σωματικού μεγέθους ή του βάρους και ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση εξωγενών (από το περιβάλλον ή από την επάρκεια / ανεπάρκεια τροφής) και ενδογενών ερεθισμάτων (ορμονικός έλεγχος) (Company et al. 2001, Pèrez-Sánchez et al. 2002, Gahr et al. 2008). Η πληροφορία που προέρχεται από τα εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα προωθείται και επιδρά στη ρύθμιση της αύξησης μέσω του σωματοτροπικού άξονα της αυξητικής ορμόνης (**G**rowth **H**ormone, GH) και του αυξητικού παράγοντα παρόμοιου της ινσουλίνης I (**I**nsulin-like **G**rowth **F**actor **I**, IGFI, Εικόνα 2). Στα ψάρια η αυξητική ορμόνη παράγεται από την αδενούποφυση (Herrero-Turrión et al. 2003, Deane & Woo 2009) και όπως και σε άλλα είδη σπονδυλωτών, η απελευθέρωση της ρυθμίζεται από δύο νευροπεπτίδια του υποθαλάμου, την ανασταλτική σωματοστατίνη (Somatostatin, SRIF) και τον διεγερτικό παράγοντα απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRF). Από τη στιγμή που θα εκλυθεί η αυξητική ορμόνη, η διεγερτική επίδραση στην αύξηση των διαφόρων ιστών επιτυγχάνεται μέσω της πρόσδεσης στους υποδοχείς αυξητικής ορμόνης (GHRs), μέσω των οποίων επηρεάζει άμεσα την αύξηση και το μεταβολισμό των ιστών-στόχων, ή μέσω της έκκρισης του IGFI, όπως υποστηρίζεται από τη «θεωρία δράσης του διπλού τελεστή» (Dual effector theory of action, Green et al. 1985). Πολλές φορές η δράση της αυξητικής ορμόνης και του IGFI διαμεσολαβείται από τις πρωτεΐνες στις οποίες προσδένονται (GHBP, IGFBP).



Εικόνα 2. Ο σωματοτροπικός άξονας (Moriyama et al. 2000).

Ο σωματοτροπικός άξονας διαδραματίζει ένα ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της αύξησης και είναι πολύ σημαντική η γρήγορη προσαρμογή του στις μεταβαλλόμενες απαιτήσεις του περιβάλλοντος. Ανάμεσα σε αυτές είναι οι διακυμάνσεις των θρεπτικών ουσιών που λαμβάνονται από το ψάρι. Η θρεπτική κατάσταση επενεργεί άμεσα στη ρύθμιση των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης στην κυκλοφορία, όπως επίσης του IGFI, των πρωτεϊνών που συνδέονται με την ορμόνη και τον IGFI (GHBP, IGFBP), και των αντίστοιχων υποδοχέων (Pèrez-Sánchez et al. 2000). Στην τσιπούρα, και σε άλλα ψάρια, η στέρηση τροφής συνοδεύεται από αυξημένα επίπεδα αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα. Αλλά και τα χαρακτηριστικά του σιτηρέσιου της τσιπούρας, η οποία είναι ένα ψάρι με υψηλές απαιτήσεις για διατροφικές πρωτεΐνες, παίζουν ρόλο στη διαθεσιμότητα της αυξητικής ορμόνης και στην απόκριση του ήπατος στην ορμόνη (Company et al. 2001). Αυτά τα χαρακτηριστικά αφορούν την ποσότητα και το ενεργειακό περιεχόμενο των διατροφικών πρωτεϊνών, το αμινοξικό προφίλ και την προέλευσή τους (ζωικές ή φυτικές) (Pèrez-Sánchez et al. 2000, 2002, Gómez-Requeni et al. 2004).

Σε επίπεδο ιστών η αυξητική ορμόνη παρουσιάζει πλειοτροπική δράση, ενώ λειτουργεί ως πολυδύναμος ενδοκρινικός ρυθμιστής πολλών φυσιολογικών

διαδικασιών (Reineke et al. 2005). Στην τσιπούρα πλήθος εργασιών επιβεβαιώνει την αλληλένδετη σχέση περιβάλλοντος και συνθηκών διαβίωσης με τη σύνθεση και έκλυση αυξητικής ορμόνης. Οι συγγραφείς Pèrez-Sánchez & Le Bail (1999) παρατήρησαν επιβράδυνση του ρυθμού αύξησης, της πρόσληψης τροφής και των επιπέδων της αυξητικής ορμόνης στο πλάσμα με την ελάττωση της θερμοκρασίας του νερού. Ακόμη, η μεγάλη αύξηση της διάρκειας της ημέρας κατά την άνοιξη διεγείρει τη σύνθεση και απελευθέρωση της αυξητικής ορμόνης (Pèrez-Sánchez et al. 2000, Vargas-Chacoff et al. 2009). Πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο τρόπος μεταχείρισης των ιχθύων στις ιχθυογεννητικές μονάδες και το στρες λόγω συνωστισμού στους κλωβούς μειώνουν τα επίπεδα της ορμόνης στο πλάσμα (Rottland et al. 2001). Σε *in vitro* πειράματα η αυξητική ορμόνη βρέθηκε να επηρεάζει άμεσα την έκκριση βιτελλογενίνης (Mosconi et al. 2002). Επιπλέον, έχει προταθεί, ο πιθανός ρόλος της αυξητικής ορμόνης ως αυξητικού παράγοντα ερυθροποίησης, μυελοποίησης και λεμφοποίησης σε καλλιέργειες λευκοκυττάρων (Calduch-Giner et al 1995). Πειραματικά δεδομένα σε *in vitro* συνθήκες έδειξαν ότι η αυξητική ορμόνη δρα διεγερτικά και στην ενεργοποίηση των φαγοκυττάρων. Αυτά τα δεδομένα συμβάλλουν στη γνώση σχετικά με την ενίσχυση της ανθεκτικότητας ενάντια στους παθογόνους οργανισμούς, που αποτελούν σημαντικό πρόβλημα στις ιχθυοκαλλιέργειες.



Πως επιδρά η αυξητική ορμόνη στα ψάρια;

Στα ψάρια έχουν γίνει αρκετές απόπειρες μεταφοράς και υπερέκφρασης διαγονιδίων της αυξητικής ορμόνης σε ομόλογα ή ετερόλογα συστήματα, οι οποίες είχαν ως αποτέλεσμα αξιοσημείωτη ενίσχυση της αύξησης των σολωμοειδών κατά 3-10 φορές (Devlin, 1997). Εντυπωσιακή αύξηση σημείωσε διαγονιδιακός σολομός, ο οποίος έγινε 5-30 φορές μεγαλύτερος σε σχέση με τους μη γενετικά τροποποιημένους σολομούς που συμπεριλήφθηκαν στο πείραμα (Devlin et al. 1995). Μικρότερη επίδραση καταγράφηκε για τον κυπρίνο (Zhu et al. 1992, Chen et al. 1993) και την τιλάπια (Martínez et al. 1996). Σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης λίγες εργασίες διευκρινίζουν τη μεταβολή του σωματοτροπικού άξονα έπειτα από χορήγηση

ανασυνδυασμένης βόειας αυξητικής ορμόνης (Gomez et al. 1999, Biga et al. 2004α, 2004β, 2005). Σε νεαρά άτομα τσιπούρας μια μοναδική ένεση αυξητικής ορμόνης αύξησε το επίπεδο του IGF1 στην κυκλοφορία (Vega-Rubín de Celis et al. 2003).

Η απαρχή του σηματοδοτικού μονοπατιού της αυξητικής ορμόνης περιλαμβάνει την αλληλεπίδραση με τους ειδικούς υποδοχείς (**G**rowth **H**ormone **R**eceptors, **GHRs**) που υπάρχουν στην κυτταρική επιφάνεια των ιστών-στόχων της. Με την ειδική πρόσδεση επάγεται ο σχηματισμός ομοδιμερών (δύο υποδοχείς με ένα μόριο της αυξητικής ορμόνης), που ενεργοποιεί έναν καταρράκτη φωσφορυλιώσεων, επιφέροντας τελικά τις μεταβολικές και αυξητικές δράσεις της ορμόνης (Zhu et al. 2001).

Οι υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης ανήκουν στην τάξη I της υπερ-οικογένειας των υποδοχέων κυτταροκινών, η οποία περιλαμβάνει τους υποδοχείς της προλακτίνης, της λεπτίνης, της ερυθροποιητίνης, και άλλων μορίων (Korchick & Andry 2010). Ωστόσο, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς είναι ένας ετερογενής πληθυσμός. Στα ανώτερα σπονδυλωτά έχει παρατηρηθεί ανταγωνισμός για τη δέσμευση με την ορμόνη των πρωτεϊνών που δεσμεύουν την ορμόνη GHBP και των τμημάτων των διαμεμβρανικών μορφών των υποδοχέων (Edens & Talamantes 1998, Ross et al. 1999). Η εναλλακτική δέσμευση παρέχει έναν ακόμη τρόπο ρύθμισης της συγκέντρωσης της ορμόνης ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του οργανισμού. Εκτός από το χαρακτηριστικό μοτίβο δομής της υπερ-οικογένειας (Korchick & Andry 2010), οι υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης προσαρμόζουν την έκφρασή τους σε επίπεδο ιστών λόγω των παραλλαγών της 5'UTR περιοχής (Saera-Villa et al. 2007) ενώ έχει προταθεί η διαφορετική τους έκφραση λόγω αναπτυξιακού σταδίου ή και φυσιολογικών μεταβολών, όπως επί παραδείγματι με την εναλλαγή των εποχών (Calduch-Giner et al. 2003).

Στην τσιπούρα έχουν βρεθεί υποδοχείς της αυξητικής ορμόνης στο ήπαρ, στο σκελετικό μυ, στο λιπώδη ιστό, στον σπλήνα, στα ερυθροκύτταρα και στον νεφρώνα (Muñoz-Cueto et al. 1996, Saera-Villa et al. 2005, 2007). Σε κάθε ιστό-στόχο η βιολογική δράση είναι διαφορετική. Αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη έκφραση των

υποδοχέων στο ήπαρ, (Pèrez-Sánchez et al. 1994), και που καθιστά το ήπαρ τον κύριο ιστό-στόχο της αυξητικής ορμόνης της τσιπούρας.

Δύο τύποι GHR έχουν απομονωθεί στην τσιπούρα και είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων (Saera-Villa et al. 2005). Ο **υποδοχέας τύπου I (GHR I)**, ο οποίος είναι πιο συγγενικός με τους υποδοχείς ιχθύων, εκτός των σολομοειδών, και ο **υποδοχέας τύπου II (GHR II)**, ο οποίος είναι πιο συγγενικός με τους υποδοχείς σολομοειδών). Οι «διπλοί» υποδοχείς των ιχθύων προσθέτουν μια επιπλέον βαθμίδα ρύθμισης του σωματοτροπικού άξονα σε αυτά τα ζώα. Σε επίπεδο ιστών, η έκφραση του GHR I στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό νεαρών ατόμων είναι 2-3 φορές υψηλότερη συγκριτικά με τον GHR II ενώ και οι δύο υποδοχείς εκφράζονται στο ίδιο επίπεδο στο σκελετικό μυ. Πέραν τούτου, η εναλλαγή των εποχών και η ηλικία φαίνεται να επιδρά διαφορετικά στη μεταγραφή του GHR I ενώ ο GHR II ενδέχεται να μεταβάλλεται σε στρεσογόνες καταστάσεις του ψαριού, όπως για παράδειγμα στην επιδιόρθωση των ιστών και την επιβίωση (Saera-Villa et al. 2005, 2007).

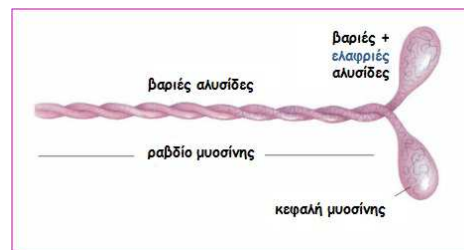


Μοριακή δομή του σκελετικού μυ

Η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης 2 (MLC2)

Στο σκελετικό μυ η χορήγηση αυξητικής ορμόνης έχει διεγερτική επίδραση στην αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου στο σολομό (Faucouneau et al 1996). Το βασικό πρωτεϊνικό συστατικό του γραμμωτού μυϊκού ιστού είναι η μυοσίνη. Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από μια σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή, η οποία συνδέεται με ένα πολύ μακρύ ραβδίο (Εικόνα 3). Το ραβδίο είναι ένα ελικοειδές σπείραμα α-έλικας, που σχηματίζεται από δύο βαριές αλυσίδες (MHCs). Σε κάθε κεφαλή το αμινοτελικό άκρο δύο διαφορετικών βαριών αλυσίδων συνδέεται με ένα ζευγάρι ελαφριών αλυσίδων (MLCs). Κάθε κεφαλή περιέχει μια περιοχή δέσμευσης της ακτίνης και έχει δραστηριότητα ATPάσης (Lowey 1994, Stryer 1997). Οι ελαφριές αλυσίδες ανήκουν στην υπερ-οικογένεια της τροπονίνης-C, που περιλαμβάνει, ακόμη, τις πρωτεΐνες που συνδέονται με Ca^{2+} , καλμοδουλίνη και παραλβουμίνη (Periasamy et al. 1984). Ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τις αλκαλι-

ελαφριές αλυσίδες και τις ελαφριές αλυσίδες του δινιτροβενζοϊκού οξέος (DTNB) (Weeds & Lowey 1971). Στο σκελετικό μυ συναντώνται δύο διαφορετικοί τύποι ελαφριών αλυσίδων, η MLC1 και η MLC3. Οι DTNB-ελαφριές αλυσίδες ονομάζονται **MLC2** και έχουν ρυθμιστικό, και ίσως καταλυτικό, ρόλο προσδένοντας Ca^{2+} . Για αυτό το λόγο, συχνά αναφέρονται ως ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (Weeds & Lowey 1971).



Εικόνα 3: Το μόριο της μυσίνης, που αποτελείται από δύο βαριές και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες.

Οι MHCs και οι MLCs απαντώνται σε πολλαπλές ισομορφές. Η κατανομή τους επηρεάζεται από τον τύπο του ιστού ή/και το αναπτυξιακό στάδιο ενώ η έκφρασή τους είναι υπό περιβαλλοντικό και ορμονικό έλεγχο (Gautier et al. 1982, Izumo et al. 1986). Όπως και στα υπόλοιπα σπονδυλωτά, οι μυσίνες του σκελετικού μυός των ψαριών περιέχουν δύο αλκαλι-ελαφριές αλυσίδες, τις MLC1 και MLC3, και μία ρυθμιστική **MLC2** αλυσίδα. Στην τσιπούρα έχουν βρεθεί δύο ισομορφές της MLC2, η MLC2A και η MLC2B, οι οποίες εμφανίζουν διακριτό ιστο-ειδικό πρότυπο έκφρασης (Moutou et al. 2001, 2005, Sarroroulou et al. 2006). Η MLC2A ισομορφή έχει τρία εναλλακτικά μετάγραφα, που αποτελούν προϊόν επιλογής χρήσης διαφορετικών σημάτων πολυαδενυλίωσης στο 3'UTR. Η έκφρασή της περιορίζεται στο σκελετικό μυ, δηλαδή στο λευκό φιλέτο) και κόκκινο μυ ενώ σηματοδοτεί το σχηματισμό των νεοσυντιθέμενων μυϊκών ινών (Sarroroulou et al. 2006, Moutou et al. 2009). Η δεύτερη ισομορφή είναι η MLC2B, η οποία εμφανίζει ευρύτερη έκφραση, όπως για παράδειγμα στον κόκκινο και λευκό μυ, στο στομάχι, στο έντερο, στην καρδιά, στο ήπαρ, στο νεφρό, στον σπλήνα, στον εγκέφαλο, στα βράγχια και

στην επιδερμίδα (Sarroroulou et al. 2006). Αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι η τσιπούρα είναι ο δεύτερος τελεόστεος στον οποίο υπάρχουν δύο ισομορφές της MLC2. Ο πρώτος είναι το halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), με τις αμινοξικές αλληλουχίες της MLC2B να εμφανίζουν 98% ομοιότητα (Sarroroulou et al. 2006).

PCR πραγματικού χρόνου

Η τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR) έχει εφοδιάσει την επιστημονική κοινότητα με ένα πολυδύναμο εργαλείο για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων. Αποτελεί μια βελτίωση της ήδη υπάρχουσας τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, που πρωτοπεριγράφηκε από τον Mullis και τους συνεργάτες το 1990. Υπάρχουν πολλοί λόγοι που δίνουν προβάδισμα στη real-time PCR έναντι της απλής PCR (Πίνακας 1) με τον σημαντικότερο να έγκειται στη δυνατότητα για παρακολούθηση της παραγόμενης ποσότητας του προϊόντος κατά τη διάρκεια της αντίδρασης (Kubista et al. 2006).

Πίνακας 1: Διαφορές της απλής έναντι της PCR πραγματικού χρόνου (www3.appliedbiosystems.com/AB_Home/applicationstechnologies/Real-TimePCR/Real-TimePCRvsTraditionalPCR/index.htm, www.img.cas.cz/ge/p113.pdf)

Real-Time PCR vs απλής PCR		
	Real-Time PCR	Απλή PCR
Συνοπτικά	Μετράει τον πολλαπλασιασμό του PCR προϊόντος κατά την εξέλιξη του πειράματος	Μετράει το συνολικό PCR προϊόν στο τέλος του πειράματος, αφού έχουν ολοκληρωθεί οι κύκλοι πολλαπλασιασμού
Ποσοτική ή ημι-ποσοτική	Ποσοτική γιατί τα δεδομένα συλλέγονται κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης PCR	Ημι-ποσοτική γιατί συγκρίνεται η ένταση της ζώνης σε gel με πρότυπα γνωστής συγκέντρωσης
Εφαρμογές	<ul style="list-style-type: none"> Ποσοτικοποίηση γονιδιακής έκφρασης 	Πολλαπλασιασμός του DNA για

<ul style="list-style-type: none"> • Ανίχνευση παθογόνων • Γονοτύπηση SNPs • Εύρεση αριθμού αντιγράφων • siRNA/iRNA πειράματα • Ανίχνευση miRNAs • Ανάλυση MicroRNAs • Immune qPCR • Γονιδιακό προφίλ έκφρασης γονιδίων - Διαγνωστική 	<ul style="list-style-type: none"> • Αλληλούχηση • Γονοτύπηση • Κλωνοποίηση
---	--

	<u>Πλεονεκτήματα της Real-Time PCR</u>	<u>Μειονεκτήματα της συμβατικής PCR</u>
Περιληπτικά	<ul style="list-style-type: none"> • Αυξημένο εύρος ανίχνευσης • Ανιχνεύσιμες αλλαγές δύο φορές περισσότερο • ΤΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΣΥΛΛΕΓΟΝΤΑΙ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΤΙΚΗ ΦΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ • Αύξηση στην ένταση του φθορισμού του δείγματος είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των αντιγράφων που παράγονται 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή ακρίβεια • Χαμηλή ευαισθησία • Μη αυτοματοποιημένη • Απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία με το πέρας της αντίδρασης • Διαχωρισμός βάσης μεγέθους • Τα αποτελέσματα δεν παριστάνονται με αριθμούς

➤ Αρχικό εκμαγείο: DNA ή cDNA

Πριν την έναρξη πειράματος προσδιορισμού της γονιδιακής έκφρασης με την PCR πραγματικού χρόνου είναι απαραίτητη η επιλογή της αρχικής μήτρας του DNA, η οποία μπορεί να προέρχεται από απομόνωση DNA ή από αντίστροφα μεταγραμμένο RNA σε cDNA. Ανεξάρτητα από την προέλευσή του το DNA πρέπει να είναι εξαιρετικά καθαρό και χωρίς επιμολύνσεις με αναλογία A_{260}/A_{280} 1,8-2,0 σε 10 mM Tris, pH 8.5.

Περαιτέρω, η επιλογή των εκκινητών για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής εξαρτάται από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί και τις ανάγκες του πειράματος. Οι εκκινητές μπορεί να είναι oligo-d(T), τυχαίοι εκκινητές (random primers) και ειδικοί για το στόχο (target specific primers), που έχουν διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, ενώ οι αποδόσεις που επιτυγχάνουν δεν είναι ίδιες (Wong & Medrano, 2005, Kubista et al. 2006). Σε κάθε διαφορετική πειραματική διαδικασία είναι συνήθως απαραίτητο να σχεδιάζονται, να συντίθενται και να αξιολογούνται αρκετά ζεύγη εκκινητών, μέχρι να βρεθεί το ζεύγος εκείνο που δεν σχηματίζει διμερή και η απόδοση της ενίσχυσης προσεγγίζει το 100% (Bustin et al. 2005).

➤ Από τη συμβατική PCR στη Real-Time PCR - Βασικές έννοιες

Με την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης επιτυγχάνεται η εκθετική αντιγραφή μιας αλληλουχίας στόχου χρησιμοποιώντας μια θερμοανθεκτική πολυμεράση. Η αντίδραση ακολουθεί τρία στάδια ξεκινώντας με την εκθετική, περνώντας στη γραμμική και καταλήγοντας στο πλατό. Ο πολλαπλασιασμός των μορίων κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης και περιγράφεται από τον τύπο

$$X_n = X_o \times (E+1)^n \quad (1)$$

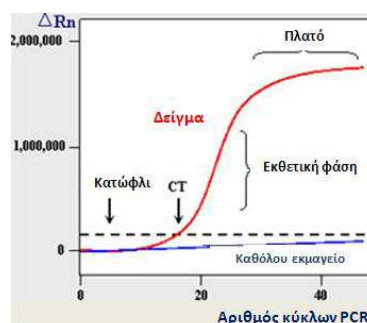
όπου X_n είναι η ποσότητα του PCR προϊόντος στον κύκλο n , X_o είναι η ποσότητα του αρχικού εκμαγείου του DNA και E είναι η απόδοση του πολλαπλασιασμού (amplification efficiency), που κυμαίνεται από 0 (καθόλου πολλαπλασιασμός) ως 1 (διπλασιασμός του PCR προϊόντος σε κάθε κύκλο). Στην PCR πραγματικού χρόνου συμμετέχουν φθορίζοντα μόρια δείκτες (για παράδειγμα μια χρωστική ουσία που προσδένεται στο δίκλωνο DNA ή ένας ανιχνευτής σημασμένος με χρωστική) που επιτρέπουν την παρακολούθηση της εξέλιξης της αντίδρασης PCR (Stratagene, 2004). Σε κάθε κύκλο πολλαπλασιασμού η ένταση του φθορισμού της χρωστικής ουσίας (R , ένταση του φθορισμού μετά την αφαίρεση του θορύβου) είναι ευθέως ανάλογη της ποσότητας του PCR προϊόντος, οπότε η εξίσωση (1) μετατρέπεται σε

$$R_n = R_o \times (E+1)^n \quad (2).$$

Όπου R_o η ένταση φθορισμού στην αρχή της αντίδρασης και R_n η ένταση φθορισμού μετά από n κύκλους ενίσχυσης. Η ένταση του φθορισμού φθορισμού στην αρχή της αντίδρασης (R_o) είναι ανάλογη της ποσότητας του εκμαγείου DNA και μπορεί να γραφεί εναλλακτικά ως εξής (Čikoš et al. 2009):

$$R_o = R_n / (E+1)^n \quad (3)$$

Χρησιμοποιώντας τις τιμές της έντασης φθορισμού του PCR προϊόντος έναντι του αριθμού των κύκλων ενίσχυσης που απαιτήθηκαν προκύπτουν καμπύλες πολλαπλασιασμού (amplification curves), που έχουν τη μορφή που παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Στις μεθόδους ανάλυσης των δεδομένων που προκύπτουν από την PCR πραγματικού χρόνου προσδιορίζεται ένα σημείο αναφοράς που αντιπροσωπεύει τις ίδιες ποσότητες PCR προϊόντος σε κάθε δείγμα. Το σημείο της καμπύλης πολλαπλασιασμού στο οποίο η καμπύλη προσεγγίζει αυτό το σημείο αναφοράς χαρακτηρίζεται ως crossing point ενώ ο αριθμός των κύκλων για να επιτευχθεί αυτό σημαίνεται ως CP. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο σημείο αναφοράς είναι η οριακή ένταση (threshold fluorescence), η τιμή της οποίας προσδιορίζεται από το χρήστη ή αυτόματα από το μηχάνημα και ο αριθμός των κύκλων για να επιτευχθεί αυτή είναι γενικά αποδεκτό ως Ct (cycle threshold). Είναι εύκολα αντιληπτό ότι όσο μικρότερη είναι η αρχική ποσότητα του εκμαγείου DNA, τόσο περισσότεροι κύκλοι πολλαπλασιασμού απαιτούνται για να προσεγγιστεί το σημείο αναφοράς (Εικόνα 4, Čikoš et al. 2007, 2009).



Εικόνα 4: Γράφημα αναπαράστασης των βασικών εννοιών της PCR πραγματικού χρόνου (<http://rt-pcr.com/>).

Στις μεθόδους ανάλυσης δεδομένων που στηρίζονται στην εύρεση ενός ορίου (threshold) το n στην εξίσωση (3) μπορεί να αντικατασταθεί από το C_t και να προκύψει η εξίσωση (4)

$$R_o = R_{C_t} / (E+1)^{C_t} \quad (4)$$

όπου το R_{C_t} πλέον χαρακτηρίζει την οριακή ένταση φθορισμού (threshold fluorescence) που προσδιορίζεται για κάθε μία από τις συγκρινόμενες ενισχύσεις ξεχωριστά ή μία τιμή έντασης φθορισμού του κατωφλιού (threshold fluorescence) κοινή για όλες τις συγκρινόμενες ενισχύσεις. Στη δεύτερη περίπτωση η αριθμητική τιμή του R_{C_t} μπορεί να αγνοηθεί ή να αντικατασταθεί από 1.0 και η τιμή του R_o να υπολογίζεται όπως κατωτέρω (Čikoš et al. 2007)

$$R_o = 1/(E+1)^{C_t} \quad (5)$$

Προχωρώντας από τα δεδομένα στην ποσοτικοποίηση

Στην PCR πραγματικού χρόνου το σήμα φθορισμού αντανακλά τη συσσώρευση του PCR προϊόντος σε κάθε κύκλο πολλαπλασιασμού. Έχουν προταθεί αρκετές μέθοδοι που ποσοτικοποιούν τη γονιδιακή έκφραση, που διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: την απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification) και τη σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification).

➤ Απόλυτη ποσοτικοποίηση (absolute quantification)

Σε αυτή τη μέθοδο προσδιορίζεται ο αριθμός μορίων μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας-στόχου (DNA ή RNA) ανά κύτταρο, ανά ολικό DNA ή RNA ή ανά μονάδα μάζας ιστού. Απαιτείται η κατασκευή μιας πρότυπης καμπύλης όπου οι ποσότητες της αλληλουχίας – στόχου (αριθμός αντιγράφων ή μάζα RNA/DNA) είναι γνωστές με μεγάλη ακρίβεια (Čikoš et al. 2009). Από την πρότυπη καμπύλη προκύπτει μια γραμμική σχέση μεταξύ του C_t και της αρχικής ποσότητας του εκμαγείου RNA ή cDNA (που δηλώνεται από την τιμή R^2 ή Pearson Correlation Coefficient και πρέπει να προσεγγίζει τη μονάδα ($\geq 0,985$)), επιτρέποντας την εύρεση

των συγκεντρώσεων των άγνωστων δειγμάτων βάση του Ct τους (Wong & Medrano, 2005, Stratagene, 2004, Čikoš et al. 2009).

➤ *Σχετική ποσοτικοποίηση (absolute quantification)*

Η σχετική ποσοτικοποίηση συσχετίζει την ένταση του σήματος της PCR του μετάγραφου-στόχου (target transcript) στις ομάδες μεταχείρισης με εκείνη ενός άλλου δείγματος, όπως της ομάδας του μάρτυρα (Livak & Schmittgen 2001). Μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση υπολογίζονται βάση ενός εξωτερικού προτύπου (external standard) ή ενός δείγματος αναφοράς (reference sample ή calibrator). Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά μαθηματικά μοντέλα για τον υπολογισμό της μέσης κανονικοποιημένης γονιδιακής έκφρασης (Wong & Medrano, 2005, Čikoš et al. 2007, Pfall 2001, Muller et al. 2002, Gentle et al 2001, Liu & Saint 2002, Peirson et al. 2003). Μεταξύ αυτών, η συγκριτική μέθοδος (comparative Ct method, Livak & Schmittgen 2001) είναι η μέθοδος επεξεργασίας των δεδομένων στην παρούσα μελέτη και θα αναλυθεί εκτενώς παρακάτω.

Στις τεχνικές που απαιτείται η χρήση της απόδοσης του πολλαπλασιασμού (amplification efficiency, E), η τελευταία υπολογίζεται από την κλίση της πρότυπης καμπύλης από σειρά διαδοχικών αραιώσεων αντιπροσωπευτικού δείγματος (Wong & Medrano, 2005, Čikoš et al. 2007)

$$E = [10^{(-1/\text{κλίση})}] - 1 \quad (6)$$

❏ Η μέθοδος της σχετικής πρότυπης καμπύλης

Στην εν λόγω μέθοδο η ποσότητα του κάθε πειραματικού δείγματος προσδιορίζεται πρώτα βάση της πρότυπης καμπύλης και μετά εκφράζεται σε σχέση με ένα δείγμα αναφοράς. Είναι η απλούστερη μέθοδος ποσοτικοποίησης επειδή δεν απαιτείται η χρήση εξωγενών προτύπων, δεν ποσοτικοποιούνται τα δείγματα αναφοράς και δεν βασίζεται σε σύνθετους μαθηματικούς υπολογισμούς. Καθώς, όμως, δεν συμμετέχει ένα δείγμα ενδογενούς μάρτυρα (endogenous control, συνήθως ένα γονίδιο αναφοράς) στην ανάλυση των αποτελεσμάτων, η μέθοδος χρήζει κανονικοποίησης (Wong & Medrano, 2005, Čikoš et al. 2007).

■ Η συγκριτική ή $2^{-\Delta\Delta C_t}$ μέθοδος

Αυτή η μέθοδος είναι ένα μαθηματικό μοντέλο που υπολογίζει διαφορές στη γονιδιακή έκφραση ως μια σχετική διαφορά μεγέθους (relative fold difference) ανάμεσα σε πειραματικό δείγμα και στο δείγμα αναφοράς. Οι συγκρίσεις ανάμεσα στα δείγματα γίνονται άμεσα χωρίς την παρεμβολή καμπύλης αναφοράς. Παρότι δεν απαιτούνται οι αποδόσεις ενίσχυσης του γονιδίου-στόχου και του γονιδίου αναφοράς να είναι ίδιες, η κινητική της ενίσχυσης αυτών πρέπει να είναι περίπου ίση (Livak & Schmittgen 2001, Pfall 2001, Wong & Medrano, 2005, VanGuider et al. 2008, Čikoš et al. 2009).

Κανονικοποίηση

Εξαιτίας της εξαιρετικής ευαισθησίας της PCR πραγματικού χρόνου και της αναπόφευκτης εμφάνισης πειραματικού σφάλματος είναι πιθανό να υπάρχει απόκλιση των πειραματικών δεδομένων από δείγμα σε δείγμα. Αρκετές παράμετροι που δεν σχετίζονται άμεσα με την αντίδραση PCR, για παράδειγμα η αστάθεια του RNA, η παρουσία αναστολέων κατά τη διαδικασία απομόνωσης, οι διαφορετικές αποδόσεις της αντίστροφης μεταγραφής και της PCR, ενδέχεται να παρεμβάλλονται και να αμφισβητούν την αξιοπιστία των πειραματικών δεδομένων (Huggett et al. 2005). Συνεπώς αξιώνεται η εισαγωγή μιας μεθόδου κανονικοποίησης, που να αμβλύνει τις διαφορές από δείγμα σε δείγμα.

Πρωταρχικά, η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA μπορεί να συμβάλλει στη διακύμανση και στην έλλειψη αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων που συναντώνται συχνά κατά την ανάλυση. Η ακεραιότητα, η ποιότητα και η ποσότητα του απομονωθέντος RNA σε συνδυασμό με την ενδογενή αστάθεια και τη διαφορετική απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής εισάγουν επιπλέον πηγές μεταβλητότητας που μπορούν να ξεπεραστούν με τη συμμετοχή ενδογενών ή εξωγενών μαρτύρων (endogenous & exogenous controls) (Bustin et al. 2005, Huggett et al. 2005, Wong & Medrano, 2005).

 *Ενδογενής μάρτυρας*

Η κανονικοποίηση ως προς ένα γονίδιο αναφοράς (reference gene/ control gene/ endogenous standard) είναι μια απλή και δημοφιλής μέθοδος, που χρησιμεύει ως ένας θετικός μάρτυρας για την αντίδραση (positive control). Το ιδανικό γονίδιο αναφοράς για την κανονικοποίηση πρέπει να εκφράζεται με αμετάβλητο τρόπο σε όλα τα δείγματα σε μια δεδομένη μελέτη σε διαφορετικούς ιστούς και κυτταρικούς τύπους, σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, παρά την ενδεχόμενη διαφορετική πειραματική μεταχείριση. Τα προαναφερθέντα μπορεί να είναι γονίδια βασικών λειτουργιών (mRNAs, housekeeping genes), ριβοσωμικό RNA (ribosomal RNA, rRNA), ολικό RNA ή πολλαπλά mRNAs (Wong & Medrano, 2005, Bustin et al. 2005, Huggett et al. 2005, VanGuilder et al. 2005, Hendricks-Balks et al. 2007, Thellin et al. 1999, 2009).

 *Εξωγενής μάρτυρας*

Μια άλλη προσέγγιση αφορά στην εισαγωγή εξωγενούς τεχνητού μορίου RNA στο δείγμα πριν το βήμα της αντίστροφης μεταγραφής. Είναι προτιμότερη αυτή η στρατηγική έναντι της χρήσης ολικού RNA διότι λαμβάνονται υπόψη και η πιθανή αποικοδόμηση του RNA κατά το χειρισμό και η απόδοση της αντίστροφης μεταγραφής. Εν τούτοις δεν αποτρέπεται ο κατακερματισμός του RNA ούτε τα σφάλματα στην ποσοτικοποίηση του ολικού RNA (Huggett et al. 2005, Thellin et al. 2009).

Μέθοδοι ανίχνευσης σήματος

Στα πρωτόκολλα της PCR πραγματικού χρόνου το σήμα προέρχεται από χρωστικές που φθορίζουν στο δοκιμαστικό σωλήνα που λαμβάνει χώρα η αντίδραση και η ένταση του σήματος θεωρείται ανάλογη της ενίσχυσης. Οι χρωστικές αυτές διαφέρουν στη χημική τους δομή και στον τρόπο που εκπέμπουν το σήμα φθορισμού. Στη διεθνή βιβλιογραφία έχουν παρουσιαστεί επτά χημείες ανίχνευσης σήματος (signal detection chemistries), που ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες:

■ *Ανιχνευτής με συμπληρωματική αλληλουχία για το DNA στόχο, που απαρτίζεται από ένα ολιγονουκλεοτίδιο σημασμένο με χρωστική που φθορίζει συν έναν καταστολέα [όπως ανιχνευτές υβριδισμού, ανιχνευτές υδρόλυσης και τέσσερις τύποι ανιχνευτών φουρκέτας (molecular beacons, scorpions, εκκινητές Sunrise και εκκινητές LUX)].*

■ *Μη ειδική χρωστική που προσδένεται στο DNA, με κυριότερο εκπρόσωπο τη χρωστική SYBR Green I, που προσδένεται σε δίκλωνο DNA και είναι η μέθοδος ανίχνευσης του σήματος φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα πειραματική διαδικασία (Stratagene, 2004, Wong & Medrano, 2005, Thellin et al. 2009).*

Κάθε διακριτή χημεία ανίχνευσης σήματος διαφέρει στη χημική της δομή, στον αριθμό εκκινητών και ανιχνευτών που απαιτούνται, στην ικανότητα να συμμετέχει σε PCR ενίσχυσης πολλαπλών μεταγράφων (multiplex PCR), τη δυνατότητα ή μη για διάκριση αλληλομόρφων, το κόστος της και την απαίτηση ή όχι για καμπύλη διαχωρισμού (dissociation curve) (Thellin et al. 2009). Η επιλογή έγκειται στις ξεχωριστές ανάγκες και ιδιαιτερότητες του κάθε πειράματος, όπως επίσης στη διαφορετική ακρίβεια και ευαισθησία που παρέχει η καθεμιά τους.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση της επίδρασης αυξητικής ορμόνης σε δομικά (MLC2A, MLC2B) και ρυθμιστικά (μυογενίνη, υποδοχείς αυξητικής ορμόνης) γονίδια του λευκού μυ σε άτομα τσιπούρας κατά τη φάση της ταχείας αύξησής τους. Νεαρά άτομα τσιπούρας έλαβαν αυξανόμενες δόσεις πρόβειας αυξητικής ορμόνης ως μια ενδοπεριτοναϊκή ένεση. Μελετήθηκε η επίδραση των διαφορετικών δόσεων μία, δύο, τέσσερις και επτά ημέρες που ακολούθησαν τη χορήγηση της αυξητικής ορμόνης. Τα αποτελέσματα σχετίστηκαν με την έκφραση των υποδοχέων αυξητικής ορμόνης τύπου I και II στο ήπαρ.

Υλικά και μέθοδοι

➤ Χορήγηση αυξητικής ορμόνης

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις εγκαταστάσεις του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσιών Ερευνών στην Αθήνα, τον Ιούλιο του 2005. Εξήντα νεαρά άτομα *Sparus 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 ημέρες. Κατά την έναρξη του πειράματος τα ψάρια αναισθητοποιήθηκαν με MS-222 (~ 35 mg/l), έλαβαν ενδοπεριτοναϊκά 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 «C» 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, η ημερήσια προσφορά τροφής ήταν 2% του σωματικού βάρους των ψαριών. Τα ψάρια διατρέφονταν με εμπορικά σύμπληκτα (BioMar AE) αναγραφόμενης σύστασης: 44% πρωτεΐνη, 20% λιπίδια, 15,8% ENEO και 8,2% τέφρα, μια φορά ημερησίως (14.00μμ). 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.

➤ Δειγματοληψία και απομόνωση RNA

Δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν τις ημέρες 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. Με τους κατάλληλους χειρισμούς, από κάθε ψάρι αφαιρούνταν περίπου 100 mg ήπατος και λευκού μυ, τα οποία εμβαπτίζονταν σε RNAlater (R0901, Sigma), που εξασφαλίζει για 24 h τουλάχιστον τη μη αποικοδόμηση του ευαίσθητου RNA σε θερμοκρασία δωματίου και διατηρούνταν στους -20°C μέχρι την εξαγωγή ολικού RNA. Τα δείγματα λαμβάνονταν πάντα την ίδια ώρα (24 h μετά τη χορήγηση τροφής) και η ώρα δειγματοληψίας καταγράφονταν. Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε μηχανικά (ομογενοποιητής ULTRA TURAX, IKA-WERKE) από τα δείγματα των ιστών σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος TRI Reagent (T9424, Sigma), ενός φαινολικού διαλύματος για την απομόνωση ολικού RNA με τη χρήση χλωροφορμίου και ισοπροπανόλης. Τα δείγματα RNA που προέκυψαν κατακρημνίστηκαν σε διάλυμα αιθανόλης 75 % και διατηρήθηκαν στους -80°C . Για την εξασφάλιση της καλύτερης δυνατής ποιότητας RNA, όλη η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση διπλά αποστειρωμένων υλικών και DEPC ddH₂O (Diethyl Pyrocarbonate, Research Organics) για την καταστροφή των υπαρχόντων νουκλεασών.

➤ Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός του RNA

Αρχικά, τα δείγματα RNA φυγοκεντρήθηκαν στις 12000 rpm για 30 min στους 4°C . Η υπερκείμενη αιθανόλη απομακρύνθηκε και τα δείγματα αφέθηκαν να στεγνώσουν. Το RNA επαναδιαλυτοποιήθηκε σε ενέσιμο ύδωρ (Water for injection, DEMO S.A.) και τοποθετήθηκε στον πάγο. Όλοι οι ακόλουθοι χειρισμοί περιλάμβαναν την παραμονή των δειγμάτων σε πάγο. Η ποσότητα προσδιορίστηκε φωτομετρικά (Eppendorf, Biophotometer), όπως και η ποιότητα του RNA βάσει της αναλογίας A260/A280. Από αυτά δημιουργήθηκαν διαλύματα RNA με συγκέντρωση 5 $\mu\text{g/mL}$ με ενέσιμο ύδωρ, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA).

➤ Σύνθεση cDNA

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής περιελάμβανε τη σύνθεση του cDNA με εκκινητές oligodT(18) (O 4387, Sigma) και τυχαία εξαμερή 48190-011, Invitrogen). Κάθε αντίδραση περιείχε



5 μg ολικού RNA

1 μL dNTP's (10 mM)/ 1 μL RH (10 mM)

2 μL 10x RT buffer

2 μL DTT (0,1 M)

0,5 μL αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, 200 U/μL; GIBCO)

και οι συνθήκες είχαν ως εξής:



25°C για 10 min

42°C για 50 min

72°C για 10 min

Με το πέρας της αντίδρασης οι αντιδράσεις με εκκινητές oligodT(18) και τυχαία εξαμερή συνενώνονταν και τα cDNAs φυλάσσονταν στους -20°C.

Ο έλεγχος της επιτυχίας της σύνθεσης του cDNA εξακριβώθηκε με τη μέθοδο της PCR με εκκινητές για την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης. Από τυχαίο δείγμα χρησιμοποιήθηκε 1 μl ως υπόστρωμα. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε:



5 μl 10x PCR buffer

3 μl MgCl₂ (25 mM)

1 μl dNTPs (10 mM)

1 μl forward primer b-actin BAF 5' GAGGAGCACCCNGTCSTG 3' (100 pmol/μl)

1 μl reverse primer b-actin BAR 5' GGTGGTWCCWCCRGACARYAC 3' (100 pmol/μl)

0,2 μl Taq

37,8 μl dH₂O

Η αντίδραση ενίσχυσης περιελάμβανε



3 min στους 94°C
 45 sec στους 94°C
 1 min στους 48 °C
 1 min στους 72 °C.

} 30 επαναλήψεις

Με το πέρας της αντίδρασης τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2 %, όπου παρατηρήθηκε η παραγωγή προϊόντος.

➤ Ανάπτυξη μεθόδου Real-Time PCR

• Διαδικασία *real-time PCR*

Για την πραγματοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (*real-time PCR*) 3 μl cDNA χρησιμοποιήθηκαν ως εκμαγείο. Κάθε αντίδραση περιείχε επιπλέον:



21,7 μl SYBR GREEN I (KK4601, KAPA Biosystems)
 1 μl forward primer (10 pmol/μl)
 1 μl reverse primer (10 pmol/μl)
 16,6 μl dH₂O,

έτσι ώστε ο όγκος κάθε δείγματος να ρυθμιστεί στα 43,3 μl. Από αυτό χρησιμοποιούνταν 20 μl για την αντίδραση, η οποία επαναλαμβάνονταν εις διπλούν. Τα δείγματα φυγοκεντρώνταν στιγμιαία και τοποθετούνταν στο μηχάνημα της *real-time PCR Mx3005p* (Stratagene, 2004), όπου η αντίδραση προγραμματιζόταν με συνθήκες κοινές για όλα τα ζεύγη εκκινητών και περιλάμβαναν τα εξής βήματα:

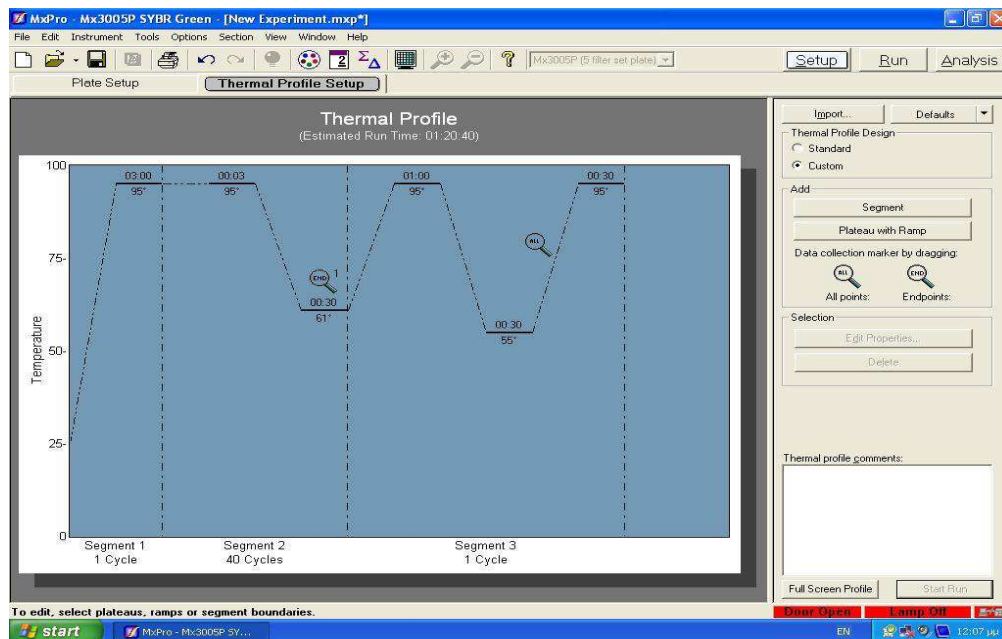


3 min ενεργοποίησης της πολυμεράσης στους 95°C
 3 sec στους 95 °C για την αποδιάταξη των κλώνων
 30 sec στους 61°C για την υβριδοποίηση των εκκινητών
 με το εκμαγείο και την επέκταση των κλώνων.

} 40 επαν

Ακολουθούσε η καμπύλη τήξης (*Melting Curve*) με σταδιακή

αύξηση της θερμοκρασίας από τους 55 °C στους 95 °C για τον έλεγχο διμερών των εκκινητών και των πιθανών διαφορετικών προϊόντων της PCR. Στην κάτωθι εικόνα 6 παρουσιάζεται η εικόνα του μηχανήματος κατά τη ρύθμιση των συνθηκών κάθε πειράματος.



Εικόνα 6: Προγραμματισμός της αντίδρασης real-time PCR βάση των συνθηκών σύμφωνα με τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος.

- **Πρότυπες καμπύλες - υπολογισμός βαθμού απόδοσης αντίδρασης**

Από τα 48 δείγματα που συμμετείχαν στη μελέτη λήφθηκε 1μl για τη δημιουργία ενός συλλεκτικού δείγματος. Στη συνέχεια το συλλεκτικό δείγμα διαδοχικά αραιώθηκε 1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 και 1:1000 φορές, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή πρότυπων καμπυλών για κάθε ζεύγος εκκινητών. Οι πρότυπες καμπύλες δημιουργήθηκαν παριστάνοντας γραφικά τον αριθμό κύκλων (threshold cycle) με το φυσικό λογάριθμο της αραιώσης του συλλεκτικού δείγματος cDNA. Μέσω της κλίσης της κάθε καμπύλης υπολογίστηκε ο βαθμός απόδοσης (Efficiency) κάθε αντίδρασης χρησιμοποιώντας τον εξής τύπο:

$$\text{Efficiency} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

όπου slope η κλίση της πρότυπης καμπύλης.

Ο βαθμός απόδοσης του κάθε γονιδίου πρέπει να πλησιάζει στο 100 %. Οι τιμές που λήφθηκαν απεικονίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ο βαθμός απόδοσης των γονιδίων που έλαβαν μέρος στην ανάλυση.

	EF1a	b-actin	TubA	GAPDH	RPS18	Myog	MLC2B	MLC2A	GHRI	GHRII
WM	96,88	99,91	97,55	96,79	107,15	105,52	90,62	95,63	105,13	90,56
L	106,44	100,43	111,43	112,16	98,06	-	-	-	100,58	97,93

Δεδομένης της απόδοσης της αντίδρασης για κάθε ιστό και γονίδιο, για τον προσδιορισμό της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (Comparative Ct Method, Čikoš et al., 2007). Σε αυτή τη μέθοδο το Ct προσδιορίζεται στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA και προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_0 = R_{Ct} / (E + 1)^{Ct}$$

όπου: R₀, το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA, R_{Ct}, το επίπεδο φθορισμού που επιλέχθηκε για τη συγκριτική ανάλυση, E, η απόδοση της αντίδρασης, και Ct, ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

- *Γονίδια αναφοράς - υπολογισμός παράγοντα κανονικοποίησης*

Στην παρούσα εργασία με την μέθοδο της Real-time PCR μελετήθηκαν τα εξής πέντε γονίδια αναφοράς:

- EF1a
- b-actin
- TubA
- RPS18
- GAPDH

Οι εκκινητές των γονιδίων και τα μεγέθη των προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον ακόλουθο Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Τα γονίδια αναφοράς που μελετήθηκαν, οι αριθμοί πρόσβασης στη GenBank, οι εκκινητές και το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος.

Γονίδιο Accession Number	Εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
β-actin X89920	FW 5' CGACATCCGTAAGGACCTGT 3'	206 bp
	RV 5' ACATCTGCTGGAAGGTGGAC 3'	
EF1a AF184170	FW 5' TCAAGGCATGGAAGGTTGAG 3'	152 bp
	RV 5' AGTTCCAATACCGCCGAT 3'	

RPS18 AM490061	FW 5' AGGGTGTGGCAGACGTTAC 3'	197 bp
	RV 5' CAGGACCTGGCTGTATTTGC 3'	
TubA AY326430	FW 5' AGGTGGGCATCAACTACCAG 3'	195 bp
	RV 5' CACCCTCTTCCATACCCTCA 3'	
GAPDH DQ641630	FW 5' ATCACTGCCACCCAGAAGAC 3'	192 bp
	RV 5' GTCAACCACTGACACGTTGG 3'	

Η σταθερότητα έκφρασης των γονιδίων-αναφοράς (M) υπολογίστηκε με το geNorm και τα γονίδια κατατάχθηκαν κατά σειρά αυξανόμενης σταθερότητας. Το geNorm προσδιορίζει τη σταθερότητα στην έκφραση κάθε γονιδίου και υπολογίζει τελικά τη σταθερότητα όλων των γονιδίων βασιζόμενο στην ομοιότητα που παρουσιάζουν τα πρότυπα έκφρασής τους σε κατά ζεύγη συγκρίσεις, χρησιμοποιώντας το γεωμετρικό μέσο ως παράγοντα κανονικοποίησης. Σε κάθε βήμα της ανάλυσης επιλέγεται και εξαιρείται το γονίδιο με τη μεγαλύτερη τιμή M και άρα το πιο ασταθές, μέχρι να προσδιορισθούν τα δύο πιο σταθερά γονίδια αναφοράς (Vandesompele et al. 2002). Για τον υπολογισμό των επιπέδων R0 των γονιδίων αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method).

Ο παράγοντας κανονικοποίησης για κάθε δείγμα υπολογίστηκε με την χρήση του geNorm ως ο γεωμετρικός μέσος των δύο καλύτερων γονιδίων αναφοράς. Η έκφραση όλων των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με αυτόν τον παράγοντα κανονικοποίησης.

- **Γονίδια- στόχοι**

Η έκφραση των ισομορφών A και B της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης, όπως επίσης και των τριών διαφορετικών εναλλακτικών μεταγράφων της ισομορφής A μελετήθηκε στο λευκό μυ των διαφορετικών ομάδων O, A, B και C. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκε και το γονίδιο της μυογενίνης, η οποία αποτελεί ρυθμιστικό

παράγοντα της μυογένεσης, και συγκεκριμένα εκφράζεται στη φάση της διαφοροποίησης (Johnston et al., 2006). Επιπρόσθετα, εξετάστηκε η επίδραση της αυξητικής ορμόνης και σε επίπεδο υποδοχέων. Η έκφραση του υποδοχέα I (Growth Hormone Receptor I, GHRI) και II (GHRII) της αυξητικής ορμόνης διερευνήθηκε τόσο στο λευκό μυ όσο και στο ήπαρ. Τα γονίδια, οι εκκινητές και τα μεγέθη των προϊόντων τους φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Τα γονίδια-στόχοι που μελετήθηκαν, οι αριθμοί πρόσβασης στη GenBank, οι εκκινητές και το μέγεθος του ενισχυμένου προϊόντος.

Γονίδιο	Εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
Myogenin	FW 5' CAGAGGCTGCCCAAGGTGGAG 3'	183 bp
	RV 5' CAGGTGCTGCCCGAACTGGGCTCG 3'	
MLC2A	FW 5' GCCCATCAACTTCACCGTCTTT 3'	184 bp
	RV 5' GGTTGGTCATCTCCTCAGCGG 3'	
MLC2B	FW 5' TCCCTTTGCTATTCTGCCTTC 3'	242 bp
	RV 5' AAATCAGCCCTATTCCCCATA 3'	
GHRI	FW 5' TTGGGCATCCTCATACTCATC 3'	203 bp
	RV 5' TGGTAGAAATCTGGCGCATAG 3'	
GHRII	FW 5' GACAAGCTCACAGACCTGGAC 3'	174 bp
	RV 5' TTGATTTGGGATGAGAGGATG 3'	

➤ Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της κανονικοποιημένης έκφρασης (ποσοστά) μετατράπηκαν με τον τύπο του τόξου-ημίτονου ποσοστού (arcsine transformation) και στη συνέχεια εισήχθησαν στην two-way ANOVA, η οποία επηρεάζεται από δύο παράγοντες: τον χρόνο και την δόση της αυξητικής ορμόνης.

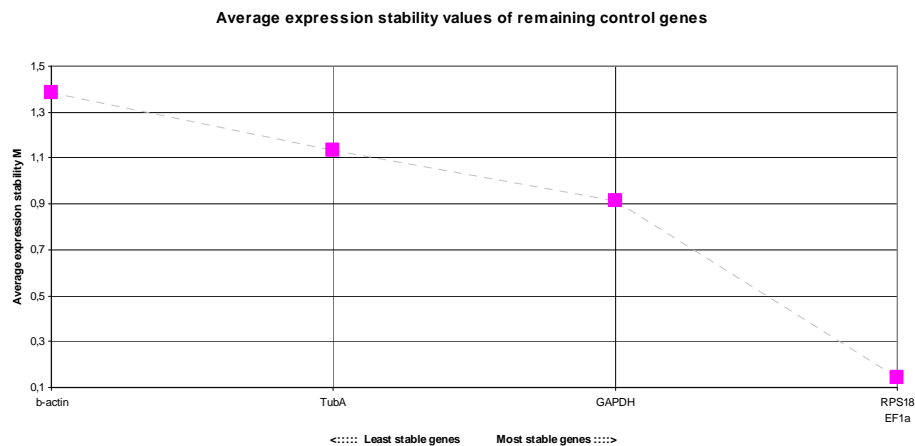
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε και με το πρόγραμμα REST 2008 (Pfaffl et al. 2002), το οποίο επιτρέπει την κανονικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων στόχων με πολλαπλά γονίδια αναφοράς. Το REST 2008 είναι σχεδιασμένο για τη σύγκριση αποτελεσμάτων ανάμεσα σε μια ομάδα μάρτυρα και μια πειραματική ομάδα και υπερβαίνει το πρόβλημα της στατιστικής ανάλυσης αναλογιών που δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή εισάγοντας απλές στατιστικές δοκιμασίες τυχαιοποίησης (randomization tests) και λαμβάνοντας υπόψη το βαθμό απόδοσης κάθε αντίδρασης.

Αποτελέσματα

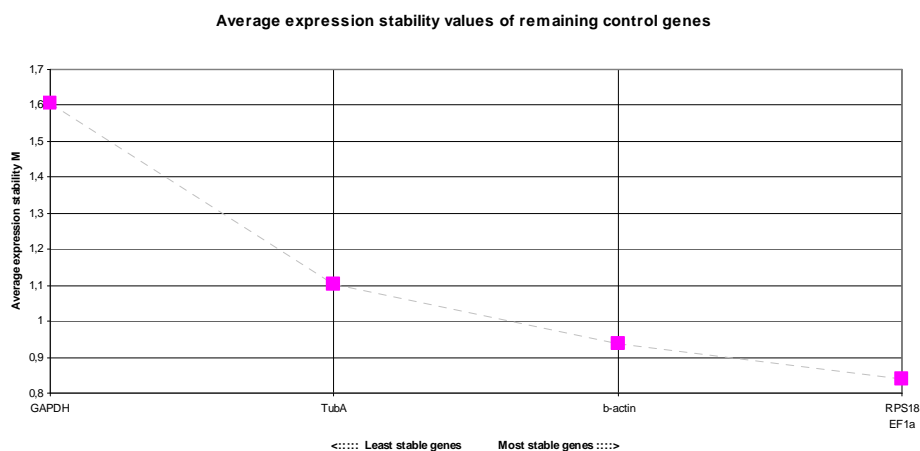


Γονίδια αναφοράς

- Πέντε γονίδια αναφοράς εξετάστηκαν ως προς τη σταθερότητα της έκφρασής τους στις συνθήκες της συγκεκριμένης πειραματικής διαδικασίας. Το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης geNorm επέλεξε ανάμεσα στα γονίδια EF1a, β-actin, TubA, RPS18 και GAPDH τα δύο με τη μικρότερη τιμή M, δηλαδή τα γονίδια αναφοράς με την πιο σταθερή έκφραση. Τόσο στο λευκό μυ (Εικόνα 6) όσο και στο ήπαρ (Εικόνα 7) τα γονίδια EF1a και RPS18 ήταν αυτά με τη σταθερότερη έκφραση.



Εικόνα 6: Τα γονίδια με τη χαμηλότερη τιμή M, δηλαδή τα γονίδια με την πιο σταθερή έκφραση στο λευκό μυ, είναι τα γονίδια EF1a και RPS18 σύμφωνα με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης geNorm.



Εικόνα 7: Τα γονίδια με την πιο σταθερή έκφραση στο ήπαρ είναι τα γονίδια EF1a και RPS18 σύμφωνα με το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης geNorm.



Γονίδια-στόχοι

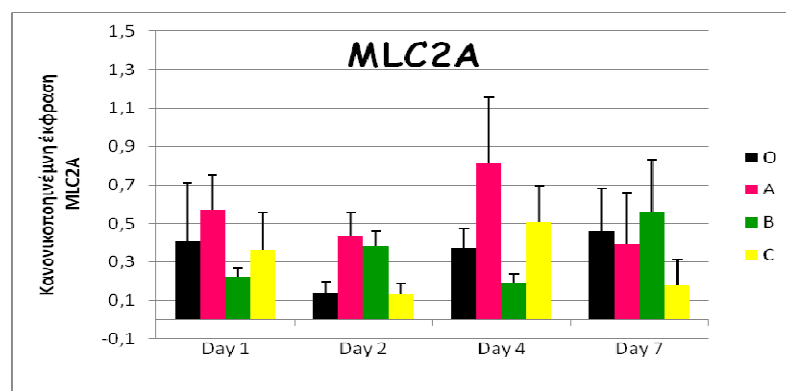
Η έκφραση όλων των γονιδίων-στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον παράγοντα κανονικοποίησης, όπως αυτός προκύπτει από το geNorm. Τα αποτελέσματα της κανονικοποιημένης έκφρασης υποδεικνύουν ότι η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων αυξητικής ορμόνης σε νεαρά άτομα τσιπούρας δεν είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στο ήπαρ και στο λευκό μυ 1, 2, 4 και 7 ημέρες έπειτα από τη χορήγηση.



Λευκός μυς

➤ MLC2A

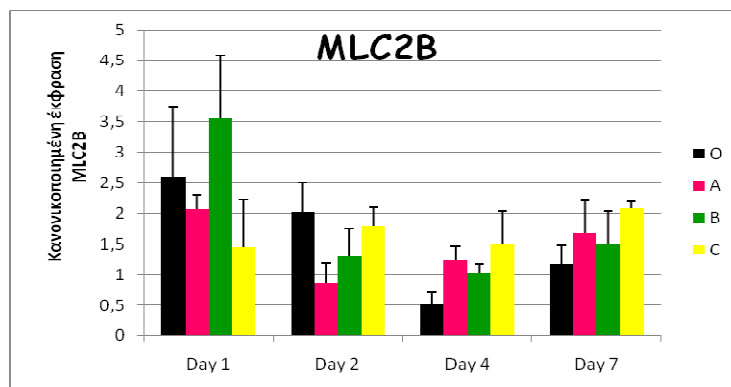
Η έκφραση της ελαφριάς αλυσίδας 2A της μυοσίνης (MLC2A) στην ομάδα μάρτυρα δε διέφερε μεταξύ των ημερών που ακολούθησαν τη χορήγηση της αυξητικής ορμόνης. Επίσης, η έκφραση της MLC2A δεν επηρεάστηκε σημαντικά μετά τη χορήγηση 0,1, 1 και 10 μg oGH/g σωματικού βάρους (Ομάδες A, B και C αντίστοιχα) μία, δύο, τέσσερις και επτά ημέρες που ακολούθησαν τη χορήγηση στο λευκό μυ (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Κανονικοποιημένη έκφραση (MO+ΤΣ) της MLC2A στο λευκό μυ. Οι ομάδες A, B και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg oGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα O (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

➤ MLC2B

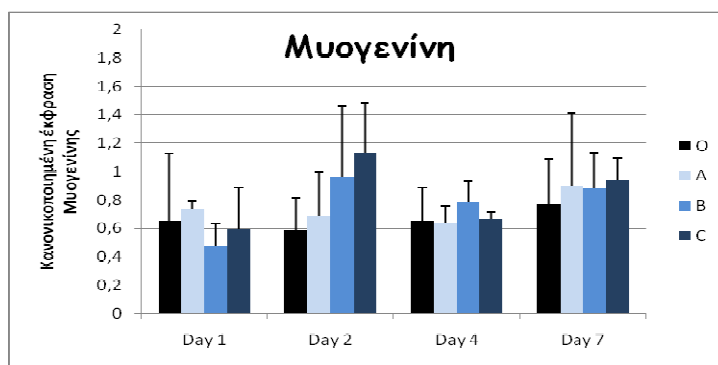
Η επίδραση της αυξητικής ορμόνης δεν είχε στατιστικώς σημαντικό αποτέλεσμα στην MLC2B (Εικόνα 9). Συνολικά, τα επίπεδα έκφρασης της MLC2B ήταν σχετικά αυξημένα συγκριτικά με την ισομορφή MLC2A.



Εικόνα 9: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) της MLC2B στο λευκό μυ. Οι ομάδες A, B και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα O (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

➤ Μυογενίνη

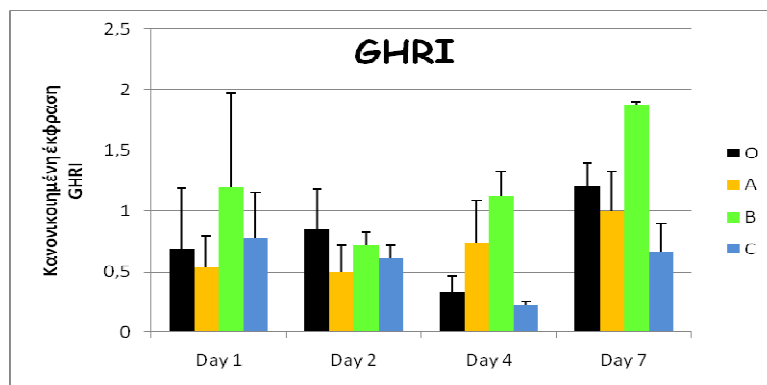
Τα επίπεδα έκφρασης της μυογενίνης, που αποτελεί ρυθμιστικό παράγοντα της μυογένεσης, ήταν σχετικά σταθερά μεταξύ των διαφορετικών μεταχειρίσεων αλλά και μεταξύ των διαφορετικών ημερών διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας (Εικόνα 10). Δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη χορήγηση της ορμόνης.



Εικόνα 10: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) της μυογενίνης στο λευκό μυ. Οι ομάδες Α, Β και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα Ο (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

➤ GHRI

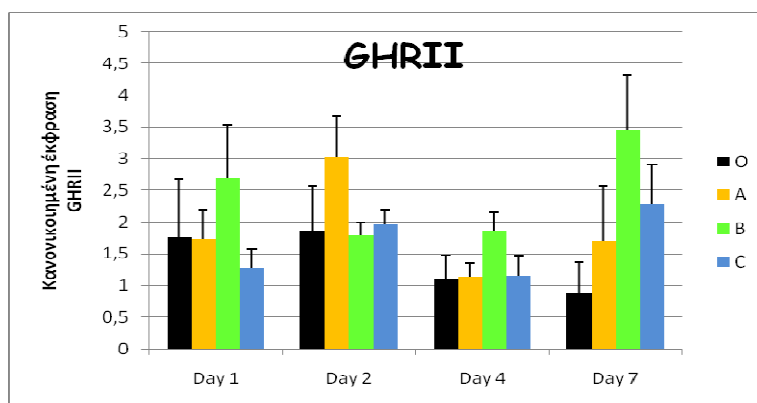
Η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων της αυξητικής ορμόνης δεν επέφερε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης τύπου I στο λευκό μυ στη διάρκεια των επτά ημερών (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) του GHRI στο λευκό μυ. Οι ομάδες Α, Β και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα Ο (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

➤ GHRII

Ο υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης τύπου II δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά από την επίδραση της αυξητικής ορμόνης (Εικόνα 12). Συγκρινόμενος με τον GHRI, ο GHRII εμφάνισε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης.



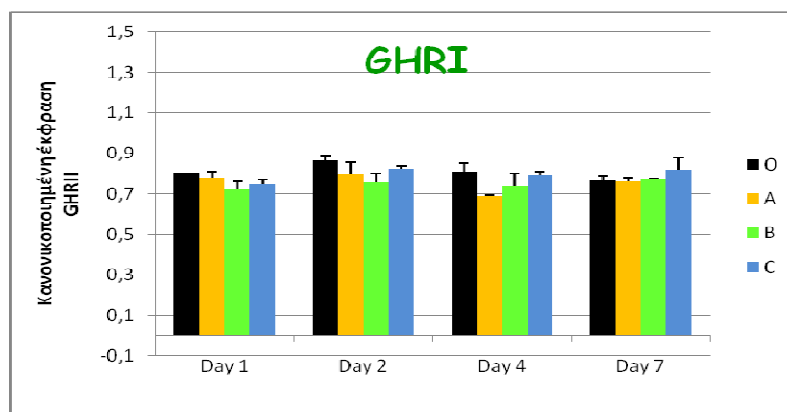
Εικόνα 12: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) του GHRII στο λευκό μυ. Οι ομάδες A, B και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα O (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.



Ήπαρ

➤ GHRI

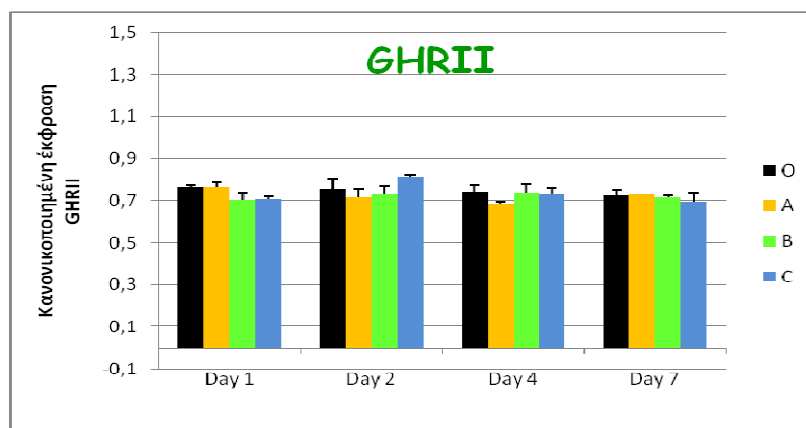
Ο GHRI δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά στο ήπαρ μετά τη χορήγηση 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους (Ομάδες A, B και C αντίστοιχα) μία, δύο, τέσσερις και επτά ημέρες που ακολούθησαν τη χορήγηση (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) του GHRI στο ήπαρ. Οι ομάδες Α, Β και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα Ο (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

➤ GHRII

Ο GHRII δεν μεταβλήθηκε στατιστικώς σημαντικά με τη χορήγηση της αυξητικής ορμόνης στο ήπαρ (Εικόνα 14). Τα επίπεδα έκφρασης του ήταν παρόμοια με τα επίπεδα του GHRI.



Εικόνα 14: Κανονικοποιημένη έκφραση (ΜΟ+ΤΣ) του GHRII στο ήπαρ. Οι ομάδες Α, Β και C έλαβαν 0,1, 1 και 10 μg οGH/g σωματικού βάρους αντίστοιχα ενώ η ομάδα Ο (μάρτυρας) έλαβε διάλυμα 0,9% NaCl.

Συζήτηση

Ο ρυθμός σωματικής αύξησης των ιχθύων κυμαίνεται ανάλογα με την ηλικία, την εποχή του έτους και την ενεργειακή κατάσταση του ψαριού. Όπως προαναφέρθηκε, εξωτερικά και εσωτερικά σήματα επεξεργάζονται, προωθούνται και ανταποκρίνονται στις ανάγκες του οργανισμού μέσω του σωματοτροπικού άξονα (Company et al. 2001, Pèrez-Sánchez et al. 2002). Η πλειοτροπική δράση της αυξητικής ορμόνης υποστηρίζεται από την ευρεία κατανομή των υποδοχέων της σε πολλούς ιστούς στο σώμα, με το ήπαρ να ανταποκρίνεται πρώτο στη δράση της. Η μελέτη της επίδρασης αυξητικής ορμόνης σε νεαρά άτομα τσιπούρας στο ήπαρ, που είναι ο κύριος ιστός-στόχος της, αλλά και στον λευκό μυ, που είναι ο βασικός αυξανόμενος ιστός, αποτέλεσε το αντικείμενο της παρούσας εργασίας.

Στη βιβλιογραφία πλήθος πειραμάτων πραγματοποιούνται την ενίσχυση της αύξησης που επιτυγχάνεται με ετερόλογα ή ομόλογα συστήματα χορήγησης της αυξητικής ορμόνης σε σολομοειδή (Gahr et al, 2008 και αναφορές) και μη σολομοειδή, όπως στην τσιπούρα (Company et al. 2001, Pèrez-Sánchez et al. 2002 και αναφορές). Η χρήση ετερόλογων ορμονών για τη διερεύνηση του ορμονικού ελέγχου στα ψάρια έχει εφαρμοστεί με επιτυχία. Οι ετερόλογες ορμόνες εμφανίζουν μικρότερη συγγένεια με τους υποδοχείς των τελεόστεων σε σχέση με τις ορμόνες των ιχθύων. Ωστόσο, συγκρίσεις μεταξύ των φυσιολογικών επιδράσεων ομόλογων και ετερόλογων ορμονών υποδεικνύουν ποσοτικά όμοιες επιδράσεις σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες (Prunet & Aujevin 1995, Sangiao-Albarellos et al. 2005, 2006). Στην παρούσα μελέτη χορηγήθηκε πρόβεια αυξητική ορμόνη (oGH, ετερόλογο σύστημα), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ξανά με επιτυχία στην τσιπούρα (Mancera et al. 2002) σε δόσεις όμοιες με αυτές που έχουν περιγραφεί σε άλλες μελέτες στη τσιπούρα και σε άλλα είδη (Pèrez-Sánchez et al. 1994, Fauconneau et al. 1996).

Αναπτυξιακές μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξητική ορμόνη εμφανίζεται από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια στην τσιπούρα ενώ τα επίπεδα της έκφρασής της αυξάνονται κατά την ανάπτυξη (Funkenstein et al 1992, Herrero-Turrión et al. 2003).

Έτσι, για την παρούσα μελέτη επιλέχθηκε η χορήγηση της οGH να γίνει σε άτομα που έχουν ολοκληρώσει την ανάπτυξή τους και βρίσκονται σε φάση ταχείας αύξησης.

Η βιολογική δράση της αυξητικής ορμόνης ξεκινά με την πρόσδεσή στους υποδοχείς της (GHRs). Ο κύριος ιστός στον οποίο προσδένεται είναι το ήπαρ και σε νεαρά άτομα τσιπούρας η σύνδεση αυτή είναι 30-50 φορές υψηλότερη συγκριτικά με το λιπώδη ιστό, το σκελετικό μυ και τον εγκέφαλο (Pèrez-Sánchez et al. 1994, Calduch-Giner et al. 2003). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι αυξανόμενες δόσεις αυξητικής ορμόνης στο ήπαρ των ατόμων που εξετάστηκαν δεν είχαν στατιστικώς σημαντική επίδραση στην έκφραση των GHRs μέχρι και επτά ημέρες μετά τη χορήγηση. Η έκφραση των GHRs των ομάδων μεταχείρισης είναι σχεδόν ίδια με την έκφραση των GHRs του μάρτυρα. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με τη θετική ρύθμιση (αύξηση των μεταγράφων) των GHRs στην πέστροφα έπειτα από τρεις ημέρες από τη χορήγηση περίπου δεκαπλάσιας δόσης βόειας αυξητικής ορμόνης (120 mg/k) (Gahr et al, 2008). Η διαφορετική πηγή προέλευσης της ορμόνης, η πολύ μεγαλύτερη δόση και το είδος του ψαριού ίσως να διαφοροποιούν την έκφραση των υποδοχέων.

Στο ήπαρ, τα επίπεδα έκφρασης του GHRI ήταν όμοια με τα επίπεδα του GHRII. Ο GHRI έχει βρεθεί να εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με τον GHRII στο ήπαρ νεαρών ατόμων τσιπούρας που δεν είχαν υποστεί καμία μεταχείριση. Περαιτέρω, οι δύο τύποι υποδοχέων φαίνεται να αποκρίνονται με τον ίδιο τρόπο στη στέρηση τροφής, μειώνοντας τα επίπεδα έκφρασής τους. Ακόμη, η εναλλαγή των εποχών επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο τα επίπεδα έκφρασής τους στο συγκεκριμένο ιστό (Saera-Vila et al. 2005, 2007). Ωστόσο, η ηλικία φαίνεται να επηρεάζει αρνητικά την ηπατική έκφραση του GHRI (Saera-Vila et al. 2005).

Στο λευκό μυ το πρότυπο έκφρασης των υποδοχέων ακολούθησε το πρότυπο του ήπατος. Η αυξητική ορμόνη δεν επέφερε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των δύο υποδοχέων, γεγονός που αντιτίθεται στην αύξησή τους στο λευκό μυ της πέστροφας στην προαναφερόμενη εργασία του Gahr και των συνεργατών του (2008). Ωστόσο, και οι δύο τύποι υποδοχέων εκφράζονται σε

μεγαλύτερο βαθμό στο λευκό μυ σε σχέση με το ήπαρ, που επιβεβαιώνεται από την ίδια μελέτη.

Στο λευκό μυ ο GHRII εμφάνισε μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης συγκρινόμενος με τον GHRI. Η διαφορετική ρύθμιση των δύο τύπων υποδοχέων είναι επιβεβαιωμένη από βιβλιογραφικά δεδομένα, τα οποία υποστηρίζουν τη διακριτή μεταβολή τους ανάλογα με το ερέθισμα που δέχονται. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η έκφραση του GHRI στο λευκό μυ της τσιπούρας αυξάνεται σε ηλικιακά μεγαλύτερα ψάρια. Οι εποχές του έτους, που αντανακλούν θερμοκρασιακές διακυμάνσεις, επηρεάζουν την αυξητική ορμόνη και μεταβάλλουν με διαφορετικό τρόπο την έκφραση των δύο τύπων υποδοχέων (Saera-Vila et al. 2007).

Τα επίπεδα έκφρασης του GHRII στο ήπαρ δε μεταβάλλονται με την ηλικία. Ο ίδιος υποδοχέας ενεργοποιείται μεταγραφικά στο λευκό μυ μετά από στέρηση τροφής και σε περιπτώσεις στρες λόγω συνωστισμού. Αυτό υποδηλώνει ότι ο συγκεκριμένος υποδοχέας μεταβάλλει τα επίπεδα έκφρασής του όταν απαιτείται επιδιόρθωση ιστών και σε καταστάσεις που απειλούν την επιβίωση. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται από την ύπαρξη δύο εναλλακτικών μεταγράφων του γονιδίου του υποδοχέα αυξητικής ορμόνης που κωδικοποιούν τους δύο τύπους υποδοχέων στην τσιπούρα. Οι διακριτές 5' μη μεταφραστικές περιοχές, φέρουν ρυθμιστικά στοιχεία που ανταποκρίνονται στις εκάστοτε ανάγκες του ψαριού. Ο υποκινητής του GHRI περιέχει συντηρημένες CCAAT-περιοχές και περιοχές πλούσιες σε GC ενώ στον GHRII έχουν βρεθεί αλληλουχίες που σχετίζονται με ανταπόκριση σε καταστάσεις στρες. Συνολικά τα παραπάνω δεδομένα υποδεικνύουν ότι η συμβολή των δύο τύπων GHR στην αύξηση πιθανώς να διαφοροποιείται όχι μόνο με το είδος του ψαριού αλλά και την ηλικία, την ενεργειακή κατάστασή του και τις συνθήκες του περιβάλλοντός (Saera-Vila et al. 2005, 2007, Benedito-Palos et al 2007).

Στα ψάρια ο λευκός μυς αντιπροσωπεύει μεγάλο μέρος της σωματικής μάζας τους και αποτελεί το τελικό προϊόν της ιχθυοκαλλιέργειας. Εξαιτίας αυτού η γνώση των υπεύθυνων μηχανισμών για το σχηματισμό, την ανάπτυξη και την αύξηση του λευκού μυ είναι εξαιρετικής σημασίας. Η διαρκής αύξηση σε όλη τη διάρκεια ζωής είναι αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό του μυ του ψαριού. Ο μυς συντίθεται από βαριές

και ελαφρές αλυσίδες της μυοσίνης (MHC και MLC αντίστοιχα). Οι πολλαπλές ισομορφές τους επιδεικνύουν ιστοειδική και αναπτυξιακή κατανομή και η έκφρασή τους βρίσκεται υπό ορμονικό και περιβαλλοντικό έλεγχο (Gautier et al. 1982, Izumo et al. 1986). Η αυξητική ορμόνη που χορηγήθηκε σε νεαρά άτομα τσιπούρας δεν βρέθηκε να επηρεάζει την έκφραση της ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας MLC2, καθώς δεν είχε στατιστικώς σημαντική επίδραση στα επίπεδα έκφρασης της MLC2A και MLC2B στο λευκό μυ. Αντίθετα, η παροχή θυρεοειδικών ορμονών αύξησε τα μεταγγραφα της MLC2 του λευκού μύος σε πιο νεαρά άτομα τσιπούρας (Moutou et al. 2001).

Τα επίπεδα έκφρασης της ισομορφής MLC2B ήταν αυξημένα συγκριτικά με τα επίπεδα της ισομορφής MLC2A. Είναι πιθανό η ισομορφή MLC2B να εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό φυσιολογικά, γεγονός που ενισχύεται από την ευρύτερη κατανομή της σε επίπεδο ιστών. Η ισομορφή MLC2A εκφράζεται στο σκελετικό μυ (λευκός και κόκκινος μυς) ενώ η ισομορφή MLC2B εκφράζεται όχι μόνο στο μυ αλλά και σε περιφερικούς ιστούς (Moutou et al. 2001). Η ισομορφή MLC2A έχει βρεθεί ότι είναι δείκτης ανάπτυξης και αύξησης των νεοσυντιθέμενων μυϊκών ινών σε μοριακό επίπεδο και υπάρχουν ενδείξεις ότι η έκφρασή της μειώνεται μετά τη μεταμόρφωση ενώ σταθεροποιείται σε υψηλότερα επίπεδα η έκφραση της MLC2B (Moutou et al. 2001, 2009, Sarroroulou et al. 2006). Οι δόσεις της αυξητικής ορμόνης και η πηγή προέλευσής της (πρόβεια αντί για της τσιπούρας) ίσως να μην ήταν κατάλληλες για να προκαλέσουν σημαντικές αλλαγές στην έκφραση της MLC2.

Η ανάπτυξη του μύος περιλαμβάνει μια σειρά γεγονότων όπου ανώριμα κύτταρα καταλήγουν να διαφοροποιούνται και να ωριμάζουν σε μυϊκές ίνες. Η διαδικασία ελέγχεται από την έκφραση πολλών ρυθμιστικών παραγόντων της μυογένεσης (Myogenic Regulatory Factors, MRFs). Ανάμεσα στους ρυθμιστικούς παράγοντες βρίσκεται η μυογενίνη, η οποία εκφράζεται στη φάση διαφοροποίησης των κυττάρων (Johnston et al 2004). Ο υποκινητής της μυογενίνης της τσιπούρας περιλαμβάνει αλληλουχίες απαραίτητες για την ενεργοποίηση των περισσότερων μυϊκών γονιδίων και αλληλουχίες πρόσδεσης των MEF2 (Codina et al. 2008). Έχει βρεθεί, μάλιστα, πως η έκφραση της MLC2A ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης της μυογενίνης (Moutou et al. 2009). Στην παρούσα μελέτη συμπεριλήφθηκε η έκφραση

της μυογενίνης στο μυ προκειμένου να διαπιστωθεί πιθανός σχηματισμός νέων μυϊκών κυττάρων καθοδηγούμενων από τη χορήγηση της αυξητικής ορμόνης. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν διαφορά στα επίπεδα έκφρασής της πριν και μετά τη χορήγηση αυξανόμενων δόσεων της αυξητικής ορμόνης, επιβεβαιώνοντας την παράλληλη ρύθμιση της έκφρασής της με αυτή των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης.

Η ανάλυση του υποκινητή της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης περιέχει ιστοειδικές αλληλουχίες (Funkenstein 2007). Εκτός από την αλληλουχία TATA, η περιοχή 1400 bp ανοδικά περιέχει θέσεις πρόσδεσης για δύο μεγάλες οικογένειες μεταγραφικών παραγόντων χαρακτηριστικών του μυ: την οικογένεια MyoD των βασικών μεταγραφικών παραγόντων έλικας-θηλιάς-έλικας (basic helix-loop-helix, bHLH) και τον ενισχυτικό παράγοντα των μυοκυττάρων-2 (MEF2). Σημαντικά μέλη της πρώτης οικογένειας είναι Myf5, MyoD, MRF4 και η μυογενίνη. Οι πρωτεΐνες MEF2 προσδέονται στον υποκινητή πολλών γνωστών γονιδίων που εκφράζονται στο μυ (Black & Olson 1998). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι πολλά γονίδια του σκελετικού μυ απαιτούν τη συνέργεια των MEF2 και bHLH προκειμένου να ενεργοποιηθεί η μεταγραφή τους (Funkenstein 2007). Σύμφωνα με τις παραπάνω πληροφορίες η αυξητική ορμόνη, ενδεχομένως, να μην επηρεάζει άμεσα την έκφραση των ελαφριών αλυσίδων της μυοσίνης. Ίσως να απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα προκειμένου να συμβούν όλα τα μεταβολικά γεγονότα που θα επιφέρουν μετρίσιμη μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των αλυσίδων της μυοσίνης. Πιθανώς αυτό να εξηγεί εν μέρει την έλλειψη διαφορών στα επίπεδα έκφρασης των αλυσίδων της μυοσίνης στα ψάρια που εξετάστηκαν.

Επιπλέον, η αυξητική ορμόνη αφού εκκριθεί στην κυκλοφορία έχει δύο μεταβολικές τύχες: να προσδεθεί στους ειδικούς υποδοχείς της στους ιστούς-στόχους ή να συνδεθεί με τις πρωτεΐνες που προσδέουν την αυξητική ορμόνη (GHBP). Στους αρουραίους το ήπαρ είναι η κύρια πηγή των πρωτεϊνών (Bauman et al. 1993). Η σύνδεση με τις ειδικές πρωτεΐνες έχει σαν αποτέλεσμα την καθυστέρηση των μεταβολικών επιδράσεων της ορμόνης, καθώς πιθανώς οι πρωτεΐνες παίζουν το ρόλο προσωρινών αποθηκών της ορμόνης ώσπου η τελευταία να προσδεθεί στον ιστό-στόχο. Η ορμόνη, επομένως, δεν είναι άμεσα διαθέσιμη να επάγει κάποια

αποτέλεσμα. Στην παρούσα εργασία δεν μελετήθηκε η εν λόγω πρόσδεση, που ίσως εξηγούσε καλύτερα τα πειραματικά μας δεδομένα. Εναλλακτικά, στους αρουραίους ο χρόνος ημιζωής του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης είναι μικρός, με αποτέλεσμα την έντονη σύνθεση του υποδοχέα (Baxter et al. 1985). Στην τσιπούρα δεν υπάρχουν δεδομένα για το χρόνο ημιζωής και το ρυθμό σύνθεσης και αποικοδόμησης των υποδοχέων της αυξητικής ορμόνης, που πιθανό να δικαιολογούσε την αναποτελεσματική δράση της ορμόνης στον ήπαρ και στο λευκό μυ.

Συμπερασματικά, η χορήγηση αυξανόμενων δόσεων πρόβειας αυξητικής ορμόνης δεν επηρέασε τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων αυξητικής ορμόνης τύπου I και II στο λευκό μυ και στο ήπαρ ούτε τα επίπεδα έκφρασης των ελαφριών αλυσίδων MLC2A και MLC2B και της μυογενίνης στο λευκό μυ. Οι παράμετροι, που ενδεχομένως συνέβαλαν στα μη αναμενόμενα αποτελέσματα, ήταν η πηγή προέλευσης αυξητικής ορμόνης, το εύρος δόσεων της ορμόνης που χορηγήθηκαν και αλληλεπιδράσεις με ορμόνες ή μεταγραφικούς παράγοντες ή άλλους παράγοντες που συμμετέχουν στο μονοπάτι του σωματοτροπικού άξονα.

Βιβλιογραφία

- Bailly, S., Israel, N., Fay, M., Gougerot-Pocidallo, M.A., Duff, G.W. (1996). An intronic polymorphic repeat sequence modulates interleukin-1 alpha gene regulation. *Molecular Immunology*, **33**, 999–1006.
- Baumann, G. (1993) Growth hormone-binding proteins. Proceedings of the Society for Experimental Biology and *Medicine*, **202**, 392-400.
- Baxter, R.C. (1985) Measurement of growth hormone and prolactin receptor turnover in rat liver. *Endocrinology* **117**:650-656.
- Benedito-Palos, L., Saera-Vila, a., Calduch-Giner, J.-A., Kaushik, S. & Pérez-Sánchez, J. (2007) Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fastgrowing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, **267**, 199-212.
- Biga, P.R., Cain, K.D., Hardy, R.W., Schelling, G.T., Overturf, K., Roberts, S.B., Goetz, F.W. & Ott, T.L. (2004) Growth hormone differentially regulates muscle myostatin1 and -2 and increases circulating cortisol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, **138**, 32-41.
- Biga, P.R., Schelling, G.T., Hardy, R.W., Cain, K.D., Overturf, K., Ott T.L. (2004b) The effects of recombinant bovine somatotropin (rbST) on tissue IGF-I, IGF-I receptor, and GH mRNA levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, **135**, 324-333.
- Biga, P.R., Peterson, B.C., Schelling, G.T., Hardy, R.W., Cain, K.D., Overturf, K., Ott, T.L. (2005) Bovine growth hormone treatment increased IGF-I in circulation and induced the production of a specific immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, **246**, 437-445.
- Black, B.L., Olson, E.N., (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **14**, 167–196.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M.W. (2005) Quantitative real-time RT-PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, **34**, 597-601.

- Chen, T.T., Kight, L., Lin, C.M., Powers, D.A, Hayat, M., Chatakondi, N., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Dunham, R.A. (1993) Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp (*Cyprinus carpio*). *Marine Molecular Biology and Biotechnology*, **2**, 88-95.
- Calduch-Giner, J.A., Sitjà-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Pérez-Sánchez, J. (1995) Evidence for a direct action of GH on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of endocrinology*, **146**, 459-467.
- Calduch-Ginera, J.A., Mingarroa, M., Vega-Ruín de Celis, S., Boujard, D., Pérez-Sánchez, J. (2003) Molecular cloning and characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth hormone receptor (GHR). Assessment of alternative splicing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, **136**, 1-13.
- Čikos, S., Bukovská, A. & Koppel, J. (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, **8**, 113.
- Čikos, S. & Koppel, J. (2009) Transformation of real-time PCR fluorescence data to target gene quantity. *Analytical Biochemistry*, **384**, 1-10.
- Codina, M., Bian, Y.-H., Gutiérrez, J. & Du, S.-J. (2008) Cloning and characterization of myogenin from seabream (*Sparus aurata*) and analysis of promoter muscle specificity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, **3**, 128-139.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **130**, 435-445.
- Deane, E.E. & Woo, N.Y.S. (2009) Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: a review. *Reviews of Fish Biology and Fisheries*, **19**, 97-120.
- Devlin, R.H., Yesaki, T.Y., Donaldson, E.M., Du, S.J., Hew, C.L. (1995) Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 1376-1384.

- Devlin, R.H. (1997) Transgenic salmonids. *In Transgenic animals: Generation and Use* (ed. By L.M. Houdebine), pp. 105-117. Harwood Academic Publishers, The Netherlands.
- Funkenstein, B., Tandler, A. & Cavari, B. (1992) Developmental expression of the growth hormone gene in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **87**, R7-R9.
- Gahr, S.A., Vallejo, R.L., Weber, G.M., Shepherd, B.S., Silverstein, J.T. & Rexroad III, C.E. (2008) Effects of short-term growth hormone treatment on liver and muscle transcriptomes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiological Genomics*, **32**, 380-392.
- Edens, A. & Talamantes, F. (1998) Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrine Review*, **19**, 559-582.
- Fauconneau, B., Mady, M.P. & LeBail, P.Y. (1996) Effect of growth hormone on muscle protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, **15**, 49-56.
- Funkenstein, B., Skopal, T., Rapoport, B., Rebhan, Y., Du, S.J. Radaelli, G. (2007) Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of myosin light chain-2 gene expressed in white muscle of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part D*, **2**, 187-199.
- Gauthier, G.F., Lowey, S., Benfield, P.A. & Hobbs, A.W. (1982) Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Cell Biology*, **92**, 472-484.
- Gebhardt, F., Zanker, K.S., Brandt, B. (1999). Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *Journal of Biology and Chemistry*, **274**, 13 176-180.
- Gentle, A., Anastasopoulos, F. & McBrien, N.A. (2001) High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques*, **31**, 502-508.
- Gomez, J.M., Weil, C., Ollitrault, M., Le Bail, P.Y., Breton, B., Le Gac, F. (1999) Growth hormone (GH) and gonadotropin subunit gene expression and pituitary and plasma changes during spermatogenesis and oogenesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, **113**, 413-428.

- Gómez-Requena, P., Mingarro, M., Calduch-Ginera, J.A., Méedaleb, F., Martinc, S.A.M., Houlihanc, D.F., Kaushikb, S., Pérez-Sánchez, J. (2004) Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, **232**, 493-510.
- Green, H., Morikawa, M., Nixon, T. (1985) A dual effector theory of growth hormone action. *Differentiation*, **29**, 195-198.
- Hendriks-Balk, M.C., Michel, M.C. & Alewijnse, A.E. (2007) Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data. *Basic Research of Cardiology*, **102**, 195-197.
- Herrero-Turrión, M.J., Rodríguez, R.E., Velasco, A., González-Sarmiento, R., Aijón, J. & Lara, J. M. (2003) Growth hormone expression in ontogenic development in gilthead sea bream. *Cell Tissue Research*, **313**, 81-92.
- Huggett, J. Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, **6**, 279-284.
- Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. (1986). All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science*, **231**, 597-600.
- Johnston, I.A. (2006) Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology*, **209**, 2249-2264.
- Johnston, I.A., Abercromby, M., Vieira, V.L.A., Sigursteindóttir, R.J., Kristjánsson, B., Sibthorpe, D. & Skúlason, S. (2004). Rapid evolution of muscle fibre number in post-glacial populations of Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Experimental Biology*, **207**, 4343-4360.
- Kopchick, J.J., Andry, J.M. (2000) Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism*, **71**, 293-314.
- Koubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J. Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A. & Zoric, N. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95-125.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, **25**, 402-408.

- Liu, W. & Saint, D.A. (2002) A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*, **302**, 52-59.
- Lowey, S. (1994). The structure of vertebrate muscle myosin. *In Myology* (ed. by A.G. Engel and C. Franzini-Armstrong), pp. 485-505. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Mancera, J.M., Laiz-Carrión, R., Martín del Rio, M.P., 2002. Osmoregulatory action of PRL, GH, and cortisol in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *General and Comparative Endocrinology*, **129**, 95-103.
- Martínez, R., Estrada, M.P., Berlanga, J., Guillén, I, Hernández, O., Cabrera, E., Pimentel, R., Morales, R., Herrera, F., Morales, A., Piña, JC., Abad, Z., Sánchez, V., Melamed, P., Lleonart, R., de la Fuente, J. (1996) Growth enhancements in transgenic tilapia by ectopic expression of tilapia growth hormone. *Molecular Marine Biotechnology*, **5**, 62-70.
- Mosconi, G., Carnevali, O., Habibi, H.R., Sanyal, R., & Polzonetti-Magni, A. M. (2002) Hormonal mechanisms regulating hepatic vitellogenin synthesis in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *American Journal of Physiology and Cell Physiology*, **283**, 673-678.
- Moutou, K.A., Canario, A.V.M., Mamuris, Z. & Power, D.M. (2001) Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *The Journal of Experimental Biology*, **204**, 3009-3018.
- Moutou, K.A., Silva, N., Mamuris, Z. & Power, D.M. (2005) Expression of the myosin light chains 1 and 2 in the developing fast muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Arch. Tierz. Dummerstorf*, **75** (Special issue).
- Moutou, K.A., Godina, M., Georgiou, S., Gutiérrez, J. & Mamuris, Z. (2009) Myosin light chain 2 in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a molecular marker of muscle development and growth, pp. 289-292, In Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M. & Sorgeloos P. (Eds.), *LARVI '09 – 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium*, *European Aquaculture Society, Special Publication No. 38*, Oostende, Belgium, 2009.

- Muller, P.Y., H. Janovjak, Miserez, A.R. & Dobbie, Z. (2002) Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, **32**, 1372-1379.
- Mullis, K. (1990) The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, **262**, 56-65.
- 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 auratus* tissues using a recombinant gilthead seabream growth hormone. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. 114C*, **1**, 17-22.
- Πανταρίδης, Κ., Κλαουδάτος, Σπ., Παναγιωτάκη, Π. & Νεοφύτου Χ. Αύξηση αντιστάθμισης στην εκτροφή τσιπούρας (*Sparus aurata*). 8^ο Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας & Αλιείας (http://www.ekt.gr/content/display?ses_mode=rnd&ses_lang=el&prnbr=68023).
- Peirson, S.N., Butler, J.N. & Foster, R.G. (2003) Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, **31**, e73.
- 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 Physiology and Biochemistry*, **22**, 135-144.
- 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., Martí-Palanca, H., & Le Bail, P.-Y. (1994) Homologous growth hormone (GH) binding in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). Effect of fasting and refeeding on hepatic Gh-binding and plasma somatomedin-like immunoreactivity. *Journal of Fish Biology*, **44**, 287-301.
- Pérez-Sánchez, J., Calduch-Giner, J.A., Mingarro, M., Vega-Rubín de Celis, S., Gómez-Requeni, P., Saera-Vila, A., Astola, A. & Valdivia, M.M. (2002) Overview of fish growth hormone family. New insights in genomic organization and heterogeneity of growth hormone receptors. *Fish Physiology and Biochemistry*, **27**, 243-258.

- Periasamy, M., Strehler, E., Garfinkel, L., Gubits, R., Ruiz-Opazo, N. & Nadal-Ginard, B. (1984) Fast skeletal muscle myosin light chain 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *Journal of Biology and Chemistry*, **259**, 13595–13604.
- Pfall, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, **29**, 00.
- Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. (2002) Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, **30**, e36.
- Prunet, P. & Auperin, B. (1995) Prolactin receptors. *Fish Physiology*, **13**, 367-390.
- Reineke, M., Björnsson, B.T., Dickoff, 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. *General and Comparative Endocrinology*, **142**, 20-24.
- Ross, R.J.M. (1999) Truncated growth hormone receptor isoforms. *Acta Paediatrica*, **428** (Suppl.), 164-166.
- Rotllant, J., Balm, P.H.M., Pérez-Sánchez, J., Wendelaar-Bonga, S.E., Tort, L. (2001) Pituitary and interrenal function in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei) after handling and confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*, **121**, 333-342.
- Sarropoulou, E., Power, D.M., Mamuris, Z. & Moutou, K. (2006) The two isoforms of myosin light chain 2 in gilthead sea bream (*Sparus aurata*); alternative polyadenylation site selection and tissue expression. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, **49** (Special Issue), 92-96.
- Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F.J., Míguez, J.M., Martín del Río, M.P., Soengas, J.L., Mancera, J.M. (2006) Growth hormone and prolactin actions on osmoregulation and energy metabolism of gilthead sea bream (*Sparus auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **144**, 491-500.
- Saera-Vila, A., Caldach-Giner, J.A. & Pérez-Sánchez, J. (2007) Co-expression of IGFs and GH receptors (GHRs) in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): sequence analysis of the GHR-flanking region. *Journal of Endocrinology*, **194**, 361-372.

- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A. & Pérez-Sánchez J 2005 Duplication of growth hormone receptor (GHR) in fish genome: gene organization and transcriptional regulation of GHR type I and II in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *General and Comparative Endocrinology*, **142**, 193-203.
- Stratagene, 2004 (2004) Introduction to Quantitative PCR: Methods and Applications Guide.
- Stryer, L. (1997) Biochemistry, 3d Edition. W. H. Freeman and co, New York.
- Sun, L.Z. & Farmanfarmanian. A. (1992) Age-dependent effects of growth hormone on striped bass hybrids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, **101**, 237-248.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De, B.B., Coumans, B., Hennen, G., *et al.* (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology*, **75**, 291-295.
- Thellin, O., ElMoualij, B., Heinen, E., Zorzi, W. (2009) A decade of improvements in quantification of gene expression and internal standard selection. *Biotechnology Advances*, **27**, 323-333.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, **3**, RESEARCH0034.
- Vega-Rubín de Celis, S., Gómez, P., Calduch-Giner, J.A., Médale, F. and Pérez-Sánchez, J. (2003). Expression and characterisation of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) somatolactin (SL): Assessment of *in vivo* metabolic effects. *Marine Biotechnology*, **5**, 92-101.
- Weeds, A.G. & Lowey, S. (1971). Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *Journal of Molecular Biology*, **61**, 701-725.
- Wong, M.L. & Medrano, J.F. (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, **39**, 1-11.
- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M. (2008) Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, **44**, 619-626
- Vargas-Chacoff, L., Astola, A., Arjona, F.J., Martín del Río, M.P., García-Cózar, F., Mancera, J.M. & Martínez-Rodríguez, G. (2009) Gene and protein expression

- for prolactin, growth hormone and somatolactin in *Sparus aurata*: Seasonal variations. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, **153**, 130-135.
- Zhu, Z. (1992) Generation of fast growing transgenic fish: methods and mechanisms. *In Transgenic Fish* (ed. by C.L. Hew & G.L. Fletcher), pp. 92-119. World Scientific Publishing, Singapore
- Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 153 (2009) 130–135