

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΤΟΥ cDNA ΤΗΣ  
ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*) ΠΟΥ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΕΙ ΜΙΑ  
ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΠΑΡΟΜΟΙΑ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ PRION ΤΩΝ  
ΤΕΤΡΑΠΟΔΩΝ: ΙΣΤΟΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ**

**ΘΕΟΔΩΡΙΔΟΥ ΜΑΡΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2005**



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

Αριθ. Εισ.: 4297/1  
Ημερ. Εισ.: 09-03-2005  
Δωρεά:  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΘΕΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087982

---

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη συγκεκριμένη εργασία, μελετήθηκε το cDNA της πρωτεΐνης stPrP (similar to Prion Protein) από την τσιπούρα (*Sparus aurata*). Χρησιμοποιώντας την τεχνική της PCR, κλωνοποιήθηκε τμήμα του cDNA της stPrP, μήκους 772bp, το οποίο στη συνέχεια αλληλουχήθηκε. Η αμινοξική αλληλουχία, που προέκυψε από το τμήμα αυτό, παρουσιάζει 64% ομοιότητα με τις αμινοξικές αλληλουχίες των stPrPs από τα ψάρια *Fugu rubripes* και *Lateolabrax japonicus*. Η ιστοειδική έκφραση του mRNA της πρωτεΐνης stPrP της τσιπούρας ανιχνεύτηκε με αποτύπωση κατά Northern και RNase Protection Assay. Σε αμφότερες τις περιπτώσεις, η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρήθηκε στον εγκέφαλο.

---

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

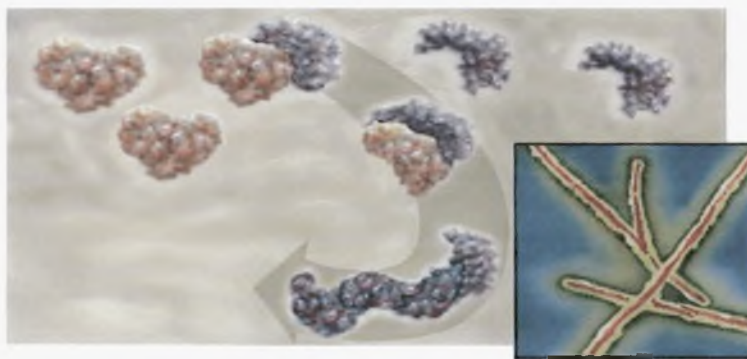
Η βιολογία των prion αποτελεί ένα πρωτόγνωρο φαινόμενο που πιθανότατα εκπροσωπεί ένα θεμελιώδη μηχανισμό cross-talk μεταξύ των πρωτεϊνών. Ωστόσο, το ενδιαφέρον των επιστημόνων έχει εστιαστεί στην εμπλοκή των prion στην πρόκληση σπογγώδους εγκεφαλοπάθειας στον άνθρωπο και τα θηλαστικά. Η επιδημία της νόσου των τρελών αγελάδων (BSE) και η εμφάνιση μιας νέας παραλλαγής της νόσου Creutzfeldt-Jacob (new variant Creutzfeldt-Jacob Disease, nvCJD) που αποδίδεται στην κατανάλωση από τον άνθρωπο, προϊόντων μολυσμένων με BSE, έκανε ακόμα πιο επιτακτική την ανάγκη ερμηνείας όχι μόνο της βιολογίας των prion, αλλά και του τρόπου που αυτά μπορούν να μεταδίδονται από είδος σε είδος (Brown et al. 2001).

Η νόσος των τρελών αγελάδων αποδόθηκε στην εκτροφή των βοοειδών με κρεατάλευρα και οστεάλευρα (Meat-and-Bone Meal, MBM) που περιείχαν μολυσματικούς παράγοντες prion. Εκτός από τα βοοειδή και από άλλα θηλαστικά, διάφορα είδη ψαριών μεγάλης εμπορικής αξίας εκτέθηκαν σε μολυσματικούς παράγοντες prion (Scrapie και BSE) μέσω της εκτροφής τους με MBM. Η χρήση των MBM εγκαταλείφθηκε λόγω της εμφάνισης της νόσου nvCJD και της πιθανότητας μετάδοσης των prion και στα ψάρια και μετέπειτα στον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσής τους από τον τελευταίο. Ωστόσο, η πιθανότητα επανέκθεσης των

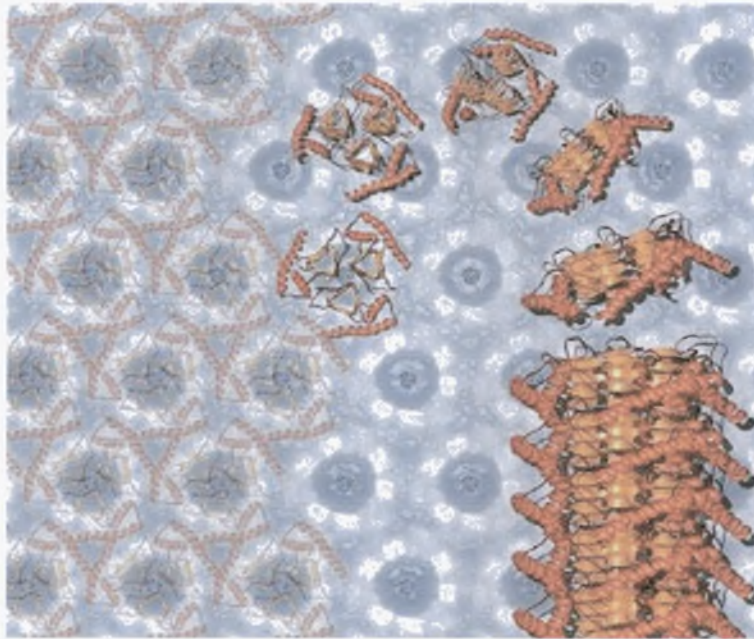
ψαριών σε μολυσματικούς παράγοντες prion δεν μπορεί να αποκλεισθεί. Για αυτό το λόγο, η διερεύνηση της βιολογίας των prion των ψαριών θεωρήθηκε σημαντική (Matthews D. 2003).

Οι νόσοι των prion, γνωστές και ως μεταδοτικές σπογγώδεις εγκεφαλοπάθειες (Transmissible Spongiform Encephalopathies, TSE) είναι θανατηφόρες νευροεκφυλιστικές ασθένειες και είναι είτε γενετικές, είτε μεταδοτικές, είτε σποραδικές. Η νόσος scrapie των αιγοπροβάτων, η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια των βοοειδών (Bovine Spongiform Encephalopathy, BSE) και η νόσος Creutzfeldt-Jacob (Creutzfeldt-Jacob Disease, CJD) του ανθρώπου είναι οι πιο γνωστές TSE, ενώ έχουν αναγνωριστεί και άλλες σε μια πλειάδα θηλαστικών (Prusiner 1997). Μέχρι σήμερα, δεν υπάρχει καμία ένδειξη νόσου των prion στα ψάρια, τουλάχιστον με τον τρόπο που αυτή εκδηλώνεται στα θηλαστικά.

Ως prion (**proteinaceous infectious particle**) ορίζεται το πρωτεϊνικό μολυσματικό σωματίδιο που στερείται νουκλεϊκού οξέος και αποτελείται κυρίως έως αποκλειστικά από την πρωτεΐνη PrP<sup>Sc</sup>. Η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια οφείλεται στην ανώμαλη διαμόρφωση της φυσιολογικής κυτταρικής πρωτεΐνης PrP<sup>C</sup> σε PrP<sup>Sc</sup> που επάγεται από την ίδια την PrP<sup>Sc</sup> (protein only hypothesis), καθώς και στη συσσώρευση της PrP<sup>Sc</sup> στον εγκέφαλο (Εικόνα 1). Η μετατροπή της PrP<sup>C</sup> σε PrP<sup>Sc</sup> είναι μια μετα-μεταφραστική διαδικασία κατά την οποία η PrP<sup>C</sup> χάνει ένα σημαντικό ποσοστό της δομής α-έλικας που διαθέτει και αποκτά δομή β-πτυχωτής επιφάνειας. Η έκφραση της PrP<sup>C</sup> είναι απαραίτητη τόσο για τον πολλαπλασιασμό (replication), όσο και για την μεταφορά της PrP<sup>Sc</sup> από το περιφερικό στο κεντρικό νευρικό σύστημα (neuroinvasion), εν ολίγοις είναι απαραίτητη για την παθογένεση των TSE (Brandner et al. 1996, Weismann et al. 2002, Aguzzi et al. 2004, Aguzzi and Polymenidou 2004). Επομένως για την εμφάνιση TSE στα ψάρια, είναι απαραίτητη η έκφραση της PrP<sup>C</sup> σε αυτά.



Εικόνα 1: Η μετατροπή της PrP<sup>C</sup> σε PrP<sup>Sc</sup>.



Εικόνα 2: Η συσσώρευση της PrP<sup>Sc</sup> στον εγκέφαλο

Στα θηλαστικά, η πρωτεΐνη PrP<sup>C</sup> είναι μια μεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη που συνδέεται με τη πλασματική μεμβράνη μέσω μιας GPI (glycosylphosphatidylinositol) άγκυρας. Κωδικοποιείται από το γονίδιο PrnP, εκφράζεται στον εγκέφαλο και λιγότερο σε άλλους ιστούς (κυρίως λεμφικούς) ενώ η λειτουργία της είναι ελάχιστα γνωστή. Εκτός από τη θέση δέσμευσης της GPI άγκυρας, η πρωτεΐνη PrP<sup>C</sup> αποτελείται από ένα σηματοδοτικό πεπτίδιο, ένα κλάσμα λυσινών, μια περιοχή επαναλήψεων, μια υδρόφοβη περιοχή και ένα καρβοξυτελικό άκρο που περιέχει μια δισουλφιδική γέφυρα και μία ή δύο θέσεις γλυκοσυλίωσης (Oidtmann et al. 2003, Premzl et al 2003).

Στα ψάρια, μέχρι σήμερα έχει ταυτοποιηθεί το cDNA των πρωτεϊνών stPrP-1, stPrP-2, PrP-461 και PrP-like του ψαριού *Fugu rubripes* και της πρωτεΐνης stPrP από τα ψάρια *Lateolabrax japonicus*, *Paralichthys olivaceus* και *Salmo salar* (Rivera-Milla et al. 2003, Oidtmann et al. 2003, Suzuki et al. 2003, Liao et al. 2005). Οι πρωτεΐνες αυτές καλούνται stPrPs (similar to PrPs) κι όχι PrPs, γιατί δεν έχει εξακριβωθεί ακόμα αν πρόκειται για ομόλογες πρωτεΐνες. Πάντως, η υδρόφοβη περιοχή είναι συντηρημένη, ανάμεσα στις κλάσεις των σπονδυλωτών και αποτελεί σημείο αναφοράς τόσο για τις πρωτεΐνες PrPs, όσο και για τις stPrPs (Oidtmann et al. 2003, Premzl et al 2003).



Παρόλη τη συντηρημένη υδρόφοβη περιοχή, η αμινοξική αλληλουχία της PrP ή stPrP ενός είδους, στο σύνολό της, είναι μοναδική, γεγονός που κάνει δύσκολη τη μετάδοση του prion από το ένα είδος στο άλλο. Η σχετική αντίσταση που προβάλλει ένα είδος δέκτη στην μετάδοση του prion ενός είδους δότη προς αυτό αποτελεί τον λεγόμενο φραγμό μεταξύ των ειδών (Dalsgaard 2002). Ο φραγμός μεταξύ των ειδών εξαρτάται από τις αμινοξικές αλληλουχίες του είδους δότη και του είδους δέκτη, από το στέλεχος της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup> και από την πρωτεΐνη X. Στέλεχος της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup> είναι μία συγκεκριμένη στερεοχημική διαμόρφωση της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup>. Υπάρχουν πολλά στελέχη (strains) που ανταποκρίνονται σε διαφορετικές διαμορφώσεις της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup> (Scott et al. 1997). Η πρωτεΐνη X, είναι μία μοριακή συνοδός (chaperone) που συμμετέχει στη μετατροπή της PrP<sup>C</sup> σε PrP<sup>Sc</sup> (DeBurmman et al. 1997).

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία επιχειρείται η κλωνοποίηση και αλληλούχηση του cDNA τσιπούρας (*Sparus aurata*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP της τσιπούρας, καθώς και η έκφραση του mRNA του στους ιστούς της τσιπούρας.

Η τσιπούρα *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) ανήκει στην οικογένεια Sparidae. Πρόκειται για μια χαρακτηριστική περίπτωση πρωτανδρικού ερμαφροδιτισμού, όπου τα δύο πρώτα χρόνια της ζωής της, η τσιπούρα είναι αρσενική και στη συνέχεια γίνεται θηλυκή. Έχει μια περίοδο αναπαραγωγής που εκτείνεται από τον Οκτώβριο έως το Δεκέμβριο. Είναι κοινή στη Μεσόγειο, συναντάται στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού από την Μεγάλη Βρετανία έως το Πράσινο Ακρωτήριο, ενώ είναι σπάνια στη Μαύρη Θάλασσα. Είναι κατά βάση σαρκοφάγο ψάρι και τρέφεται με οστρακόδερμα, κυρίως με μύδια και στρείδια. Η απαίτηση της σε πρωτεΐνες, όντας σαρκοφάγο ψάρι, ήταν αυτή που ευνόησε αρχικά την χρησιμοποίηση MBM στην εκτροφή της.

Η συγκεκριμένη εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο μιας ευρύτερης ερευνητικής προσπάθειας που σκοπό έχει τη διερεύνηση της πιθανότητας μετάδοσης των μολυσματικών παραγόντων prion (Scrapie και BSE) σε εκτρεφόμενα ψάρια μέσω της διατροφής τους με MBM.

Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός των stPrPs των ψαριών μπορεί να συμβάλλει στην περαιτέρω κατανόηση της μοριακής εξέλιξης των PrPs και στην αποσαφήνιση της σχέσης δομής/ λειτουργίας των PrPs.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### Απομόνωση RNA και Σύνθεση cDNA

Ολικό RNA απομονώθηκε από ιστό ήπατος, νεφρού, εντέρου, βραγχίων, καρδιακού μυός, σπλήνα, ερυθρού και λευκού μυός, εγκεφάλου και από λιπώδη ιστό τσιπούρας με RNeasy Midi Kit (Qiagen). Ένα μικρογραμμάριο (1μg) ολικού RNA εγκεφάλου μεταγράφηκε αντίστροφα με το SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

### PCR

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR σχεδιάστηκαν με βάση τις πιο συντηρημένες περιοχές του cDNA των ψαριών *Fugu rubripes* και *Salmo salar* και αγοράστηκαν από την MWG-Biotech. Η PCR έγινε σε τελικό όγκο 50μl, που περιείχε 5μl 10x buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 μM dNTPs, 0.2 μM εκκινητή PrF1 (5'-ATG GGG AGG TTG TGT GAA GTG G-3'), 5μl 10x Universal Primer Mix A από το Smart RACE cDNA Amplification Kit της Clontech (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3'), 2.5 μονάδες Taq πολυμεράση (Promega) και 2.5μl cDNA. Η PCR περιελάμβανε ένα αρχικό κύκλο αποδιάταξης στους 94°C για 3min, 5 κύκλους με αποδιάταξη στους 94°C για 15sec, επαναδιάταξη στους 64°C για 20sec και επέκταση στους 72°C για 3min, 5 κύκλους με αποδιάταξη στους 94°C για 5sec, επαναδιάταξη στους 61°C για 10sec και επέκταση στους 72°C για 3min και τέλος 20 κύκλους με αποδιάταξη στους 94°C για 5sec, επαναδιάταξη στους 59°C για 10sec και επέκταση στους 72°C για 3min.

Τέσσερα μικρόλιτρα (4μl) του προϊόντος της PCR χρησιμοποιήθηκαν για την επανεντοπισμένη PCR (nested PCR) μαζί με 5μl 10x buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mM dNTPs, 0.2 mM εκκινητή PrF2 (5'-ACA TGG GCT AAA AAA AGT GG-3'), 0.2 mM PrR2 (5'-ATC CAT GAA GTT CTC GTA GGA CTC-3'), 1.5 μονάδα Taq πολυμεράση (Promega). Η PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες: ένας αρχικός κύκλος αποδιάταξης στους 94°C για 3min και στη συνέχεια αποδιάταξη στους 94°C

για 30sec, επαναδιάταξη στους 53°C για 30sec και επέκταση στους 72°C για 1.5min για 40 κύκλους. Το προϊόν της nested PCR ηλεκτροφορήθηκε σε πηκτή αγαρόζης 1% (w/v) που περιείχε 1.2μl βρωμιούχου αιθιδίου (10mg/ml) για τον εντοπισμό της επιθυμητής ζώνης που αντιστοιχεί σε ένα PCR προϊόν μεγέθους 800bp περίπου.

#### Κλωνοποίηση και Ανάλυση Αλληλουχίας

Το PCR προϊόν καθαρίστηκε με PCR Purification Kit (Stratagene) και εισήχθηκε στον πλασμιδιακό φορέα κλωνοποίησης TOPO TA (TOPO TA Cloning® kit, Invitrogen). Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο χρησιμοποιήθηκε για το μετασχηματισμό βακτηρίων TOPO 10. Τα βακτήρια αυτά επιστρώθηκαν σε τριβλία με άγαρ και επωάστηκαν για 17 ώρες στους 37°C. Μία από τις αποικίες που προέκυψαν υποβλήθηκε σε υγρή καλλιέργεια στους 37°C και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο απομονώθηκε με το miniprep kit της Qiagen και αλληλουχήθηκε. Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε με το software OMIGA Version 2.0 (Kramer 2001), καθώς και το BLAST 2.0 network service του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul et al. 1990).

#### Αποτύπωση κατά Northern

Τριάντα μικρογραμμάρια (30 μg) ολικού RNA από έντερο, καρδιακό μυ, σπλήνα και εγκέφαλο τσιπούρας διαχωρίστηκαν βάσει μεγέθους με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή φορμαλδεΰδης 0.2M / αγαρόζης 1.2% (w/v). Το RNA μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη (Hybond-XL, Amersham Pharmacia Biotech) με τριχοειδή μεταφορά για 16 ώρες και σταθεροποιήθηκε σε αυτή με ξήρανση της τελευταίας για 2 ώρες στους 80°C και με UV crosslinking. Η μεμβράνη επωάστηκε στους 42°C στο διάλυμα προϋβριδοποίησης (5x SSC, 5x Denhardt's reagent, 0.5% SDS, 100 μg/ml fragmented calf thymus DNA). Μετά από 4 ώρες, η μεμβράνη εισήχθηκε στο διάλυμα υβριδοποίησης (5x SSC, 5x Denhardt's reagent, 0.5% SDS), αφού προστέθηκε σε αυτό ο ραδιενεργά σημασμένος ανιχνευτής και η υβριδοποίηση διεξήχθη στους 42°C για 16 ώρες. Ο ανιχνευτής ήταν ένα τμήμα DNA μεγέθους 331 bp που προέκυψε από πέψη του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου με τα ένζυμα



περιορισμού EcoR I και Kpn I και σημάνθηκε ραδιενεργά ( $4 \times 10^5$  cpm) με random priming (Prime-a-gene® Labeling System, Promega). Μετά το πέρας των 16 ωρών, η μεμβράνη πλύθηκε μια φορά με  $2 \times$  SSC/ 0.1% SDS για 20min σε θερμοκρασία δωματίου, μια φορά με  $1 \times$  SSC/ 0.1% SDS για 15min σε θερμοκρασία δωματίου, μια φορά με  $1 \times$  SSC/ 0.1% SDS για 30min στους  $60^\circ\text{C}$  και μια φορά με  $0.1 \times$  SSC/ 0.1% SDS για 30min στους  $60^\circ\text{C}$ . Τα ραδιενεργά σημασμένα υβρίδια ανιχνεύθηκαν με έκθεση της μεμβράνης σε Kodak X-OMAT AR film για 3 ημέρες στους  $-80^\circ\text{C}$ .

#### RNase Protection Assay

Η αλληλουχία του ανιχνευτή στην RNase Protection Assay ήταν η ίδια με εκείνη που χρησιμοποιήθηκε στην υβριδοποίηση κατά Northern. Η αλληλουχία αυτή ενσωματώθηκε με το Rapid Ligation Kit (Roche), στο πλασμίδιο pBSIIKS (Stratagene) και συγκεκριμένα downstream του προαγωγέα της T3 RNA πολυμεράσης, αφού προηγουμένως, το πλασμίδιο pBSIIKS κόπηκε με τα ένζυμα περιορισμού EcoR I και Kpn I. Κύτταρα του στελέχους XL10 του *Escherichia coli* μετασηματίστηκαν με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, επιστρώθηκαν σε τριβλία με άγαρ και επώαστηκαν για 17 ώρες στους  $37^\circ\text{C}$ . Μία από τις αποικίες με μετασηματισμένα βακτήρια υποβλήθηκε σε γρήγη καλλιέργεια στους  $37^\circ\text{C}$  και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο απομονώθηκε με το miniprep kit της Qiagen και κόπηκε με το ένζυμο περιορισμού Not I. Το γραμμικό, πλέον, πλασμίδιο μεταγράφηκε παρουσία [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]CTP σε antisense RNA με την T3 RNA πολυμεράση. Ο ραδιενεργός RNA ανιχνευτής καθαρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε στην RNase Protection Assay (RNase Protection Kit, Roche Molecular Biochemicals). Συνοπτικά, 10μg ολικού RNA από ήπαρ, νεφρό, έντερο, βράγχια, καρδιακό μυ, σπλήνα, ερυθρό και λευκό μυ, εγκέφαλο και λιπώδη ιστό υβριδοποιήθηκαν με RNA ανιχνευτή ( $4 \times 10^5$  cpm) και το μονόκλωνο RNA, αποκόπηκε με τις ριβονουκλεάσες RNase A και RNase T1. Τα υβριδοποιημένα τμήματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτική πολυακρυλαμιδίου 4% / ουρίας 7M. Τα ραδιενεργά σημασμένα υβρίδια ανιχνεύθηκαν με έκθεση της πηκτικής σε Kodak XRP film για 3 ημέρες στους  $-80^\circ\text{C}$ . Για να διαπιστωθεί ότι αναλώθηκαν ίσες ποσότητες RNA από κάθε ιστό, μαζί με τον RNA ανιχνευτή για την stPrP, προστέθηκε ως μάρτυρας RNA ανιχνευτής για τη β-ακτίνη, μεγέθους 204bp.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Κλωνοποίηση και Αλληλούχηση τμήματος cDNA που κωδικοποιεί την stPrP της τσιπούρας

Με την PCR ενισχύθηκε ένα τμήμα στο 5' άκρο του cDNA από εγκέφαλο τσιπούρας. Το τμήμα αυτό κλωνοποιήθηκε και αλληλουχήθηκε. Τα αποτελέσματα της αλληλούχησης έδειξαν ότι το κλωνοποιημένο τμήμα ήταν 772bp.

Η νουκλεοτιδική αλληλουχία των 772bp της τσιπούρας συγκρίθηκε με νουκλεοτιδικές αλληλουχίες στη βάση δεδομένων Genbank χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST. Η αλληλουχία της τσιπούρας είχε μεγαλύτερη ομοιότητα (69%) με τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη stPrP του ψαριού *Lateolabrax japonicus* και την πρωτεΐνη PrP-461 του ψαριού *Fugu rubripes*. Εξίσου, σημαντική ομοιότητα (65% και 63%) είχε με τις αλληλουχίες που κωδικοποιούν την πρωτεΐνη stPrP του ψαριού *Paralichthys olivaceus* και την πρωτεΐνη stPrP-1 του *Fugu rubripes* αντίστοιχα, ενώ η ομοιότητά της με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP του σολομού *Salmo salar* ανέρχεται στο 54%.

Με τη βοήθεια του προγράμματος OMIGA, έγινε πολλαπλή ομοπαράθεση της αλληλουχίας των 772bp της τσιπούρας με τις αλληλουχίες που αναφέρθηκαν στην προηγούμενη παράγραφο, καθώς και με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη stPrP-2 του ψαριού *Fugu rubripes*. Η ομοιότητα μεταξύ της αλληλουχίας των 772bp της τσιπούρας και της αλληλουχίας από την πρωτεΐνη stPrP-2 του *Fugu rubripes* είναι 35%. Τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης απεικονίζονται στην Εικόνα 3. Στη συγκεκριμένη εικόνα συμπεριλήφθηκε μόνο το τμήμα της ομοπαράθεσης που αφορά το cDNA της τσιπούρας που κλωνοποιήθηκε (772bp). Συνολικά, το cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP του ψαριού *Lateolabrax japonicus* αποτελείται από 1900bp, το cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PrP-461 του ψαριού *Fugu rubripes* από 1899bp, το cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP-1 του ψαριού *Fugu rubripes* από 2435bp, το cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP-2 του ψαριού *Fugu rubripes* από 1275bp και το cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP του σολομού (*Salmo salar*) από 3138bp. Στο ψάρι *Paralichthys olivaceus*, έχουν αλληλουχηθεί 1559bp του συνολικού cDNA που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη stPrP.

1 50

*Fugu* stPrP-2 ..... ATGAAGCTCA GTTTGTGTGTC  
*Fugu* stPrP-1 CATCTTAAAA ATTCTTTTGT GTGTAGGACC ATGATGGGGA GGTGTGTGA  
*Fugu* PrP-461 .....CATG ATGATGGGGA GGTGTGTGA  
*Lateol* stPrP GCACGCACAG AGACCGTCAG TTCACAGGCC ACGATGGGGA GATTATGCGA  
*Parali* stPrP GATCCACAC AAACCACCAA CTCACGGGCC ATGATGGGGA GATTGTCCGA  
*Sparus* stPrP .....  
*Salmo* stPrP CAATCGTCTC GAATCTCCTA CGGGCAG.TC ATCATGGGAA AGCTGTGTGA

51 100

*Fugu* stPrP-2 CCTTCTCAGC TTGTCACTTC TTCTGTTTCA TGCCCATTTT TCACTTGGAC  
*Fugu* stPrP-1 AGTGGTTCTC CTGTCCCTCC TTTTGT..G TTTCTGCTGA AACTAAAGC  
*Fugu* PrP-461 AGTGGTTCTC CTGTCCCTCC TTTTGT..G TTTCTGCTGA AACTAAAGC  
*Lateol* stPrP GGTGGCTCTT GTGTCCCTTC TTATTAT..G TTTCTCCTGA AACTGAATC  
*Parali* stPrP GGTGTGCTGT GTGTCCCTTC TTGTGT..C TTTCTCCTGA GACTGAATC  
*Sparus* stPrP **CATGGGCTAA AAAAAGTGGC AGCAGCA..G CAGCGGCAGG AAA..AGCAC**  
*Salmo* stPrP GCTGGCCCTG GTGTCTCTTG CCCTCCT..G GCTCTGCTTC AACTGACTC

101 150

*Fugu* stPrP-2 GAAAAAGTGG AGGCACCTCT GGGAAAGGCT CTAGCTCCA. ..ATAAGTCC  
*Fugu* stPrP-1 AACATGGGCT AAAAAAAGTG GAAGTA.GCG GTGGCA.... ..AGAAAACG  
*Fugu* PrP-461 AACATGGGCT AAAAAAAGTG GAAGTA.GCG GTGGCA.... ..AGAAAACG  
*Lateol* stPrP GACATGGGCA AAAAGAGGTA GCAGCA.GCA GCAGCAGCAG CAAGAAAACC  
*Parali* stPrP TACATGGGCT AAAAGAGGTA GCAGCA.GCA GCGGAA.... ..AGAAGACC  
*Sparus* stPrP **ATCATCCTCC AGCAACAGGG GTGGGACACA ATCAAA.... ..ACCATCC**  
*Salmo* stPrP TACATGGGCC AAGAGAAGTG GCAGCA.GCA GCAGCAGCAG CAAAAAGACA

151 200

*Fugu* stPrP-2 TCCTCATCCA ACAATGAGAA AACCAAAACT AGCAGTAATG CAGGCAACAG  
*Fugu* stPrP-1 GGTTCCTCCA CCAA...CTG GGGTAGTAGG ACACCA....  
*Fugu* PrP-461 GGTTCCTCCA CCAA...CTG GGGTAGTAGG ACACCA....  
*Lateol* stPrP TCGTCCCTCCA GCAA...CAA GGTGGGACA CAATCAAAC CAACAAGCTC  
*Parali* stPrP TCATCATCAA GCAA...CAG GGTGGGACA CAAACAAAGC CATCTAGCTC  
*Sparus* stPrP **GTACCAATCG AAAC...ACC AATCCATATC CCTCTGG...**  
*Salmo* stPrP GCATCCAGCA ACAGGGGCTC AGATAAAAAG CCGCCGAAAA CATCAAACAC

	201	250
<i>Fugu</i> stPrP-2	AAACAATCAA GGCTTCGTCT CTGAGAGTGG ATCCCCAAG CAGCAGGGAG	
<i>Fugu</i> stPrP-1	.....TCAA AACCATCCG. ...GTTCTCA G...CCCAAT CGGAACAGCA	
<i>Fugu</i> PrP-461	.....TCAA AACCATCCG. ...GTTCTCA G...CCCAAT CGGAACAGCA	
<i>Lateol</i> stPrP	TCATCCAGGA AACTACCCAC GACAGCCACA GAACCCCAAT CGAAACCCCA	
<i>Parali</i> stPrP	TTCACCAGGA AGCTATCCGA GGCAGCCCCA GAGTCCCAAT CGAAACCCCA	
<i>Sparus</i> stPrP	<b>.....TGGA AGTTATCCC. ...GGAGCTG G...TAACAC TAATCCAGGA</b>	
<i>Salmo</i> stPrP	ACAGACGGGA AGCTACCCTA GACAACCCCA AAGCCCAAT AGGAACCCCA	

	251	300
<i>Fugu</i> stPrP-2	ACAACGCTCC TGGTGGAGGA GGTTATGGCC ATGGAGG..T TATGGAGGAG	
<i>Fugu</i> stPrP-1	ACCCTTATCC TTCAGGTGGA AGTTACCC.. .....C CACCCAGGAA	
<i>Fugu</i> PrP-461	ACCCTTATCC TTCAGGTGGA AGTTACCC.. .....C CAACCAGGAA	
<i>Lateol</i> stPrP	ATCCATATCC AGCGGGTGGGA AGTTACCC.. .....T TATCCAGGAG	
<i>Parali</i> stPrP	ATCCATATCC CGCCGGGGGA AGTTACCC.. .....T CATCCTGGAG	
<i>Sparus</i> stPrP	<b>GAGG.ATAT CCCAGACAAA ACCCAGGAAG .....T TATCCAGGAG</b>	
<i>Salmo</i> stPrP	ACCCGTACCC AGCAGGAGGT AGTTATCCAG GGAGAGGTAC CAATCAGAAC	

	301	350
<i>Fugu</i> stPrP-2	GTTTTGGTGG CC.GTGGTGG TCATGGTTAT GGTGTTTATG GTCATCCAGG	
<i>Fugu</i> stPrP-1	C..... . . . .GGGCCA GTCCAACCCA GGAGGATATC CAAGACAAAA	
<i>Fugu</i> PrP-461	C..... . . . .GGGCCA GTCCAACCCA GGAGGATATC CAAGACAAAA	
<i>Lateol</i> stPrP	C..... . . . .TGGTAG TAACCCTAAC CAGTATCCTG GTAGAGTCAA	
<i>Parali</i> stPrP	C..... . . . .AGGCAA TACAAATCCC GGAGGTGTTC CCAGACAAAA	
<i>Sparus</i> stPrP	<b>C..... . . . .TGGTAA CTCTAATCCA GGAGGATATC CCAGACAAAA</b>	
<i>Salmo</i> stPrP	CAGAACCAG CCGGTGGATA CCCTGCAGCA GGTGGCTACC CCAACCAGCA	

	351	400
<i>Fugu</i> stPrP-2	TTATGGTGGT CATGGTTA.. .TGGTGTTTA TGGTCATCCA GGTTATGGTG	
<i>Fugu</i> stPrP-1	CCCAGCAAGT AACCCAG... TCGGTGGCAG TCCGAACCAG TATCCCGGTC	
<i>Fugu</i> PrP-461	CCCAGCAAGT AACCCAG... TCGGTGGCAG TCCGAACCAG TATCCCGGTC	
<i>Lateol</i> stPrP	TCCTGGGGGA TATCCAAA.. .TCAGAACC TGCAGGAGGC TATCCAGCTG	
<i>Parali</i> stPrP	CCCAGGAAGT TATCCAGGAG CTGGTAGTTA TCCTAACCAG TATCCTGGTA	
<i>Sparus</i> stPrP	<b>CCCAGGAAGT TATCCAGGAG CTGGTAGTAA CCCTAACCAG TATCCTGGTA</b>	
<i>Salmo</i> stPrP	GTATCCAGGC AGAGCCAATC CTGGGGGATA TCCAAACCAG AATCCTGCAG	

	401		450
<i>Fugu</i> stPrP-2	GTCATGGTTT	TCATGGTCGT	GGAGGTTATA AACCAGGAGA TGGACCCTAC
<i>Fugu</i> stPrP-1	GAACCAATCC	TGGGGGTAC	CCAAATCAGA ACCCTGCAGG AGGGGGCTA.
<i>Fugu</i> PrP-461	GAACCAATCC	TGGGGGTAC	CCAAATCAGA ACCCTGCAGG AGGGGGCTAC
<i>Lateol</i> stPrP	CAGGAGGCTA	TCCAGCTGCA	GGAGGCTATC CAGCCGCAGG TGGATACCCG
<i>Parali</i> stPrP	GAGCCAATCC	TGGGGGTAAAT	CCAAATCAGA ATCCTGCAGG TGGCTACCCA
<i>Sparus</i> stPrP	GAGCCAATCC	TGGAGGGTAC	CCAAATCAGA ATCCAGCAGG TGGATACCC.
<i>Salmo</i> stPrP	CTGGAGGTTA	CCCTGCCGCT	GGTGGCAATC CTGCAGCAGG TGGCTACCCC

	451		500
<i>Fugu</i> stPrP-2	AGAGGCAGTT	ATGGGGGAGG	GTATTATGAT TATGGAGGTA GATACATCAA
<i>Fugu</i> stPrP-1	.....	.....	..... .TCCTAATCA
<i>Fugu</i> PrP-461	C.CAAAT...	CAGAACCCTG	CAGGA..... .GGGGGCT ATCCTAATCA
<i>Lateol</i> stPrP	G.CCGCT...	GGGGGGTATC	CTAAC..... .CAAACC CAGGGAGAGG
<i>Parali</i> stPrP	G.CTGCA...	GGTGGCTACC	C..... .AGCTG CAGGTGGCTA
<i>Sparus</i> stPrP	....A.....	.....G	CCGCA..... .GGAGGAT ATCCAAATCA
<i>Salmo</i> stPrP	AACCAGC...	AGTATCCAGG	CAGAGCCAAT CCTGGGGGAT ATCCAAACCA

	501		550
<i>Fugu</i> stPrP-2	CCAGAATCCA	AACAACC...	AAATTCTTAG CCCTCATTAT GTTAACAGTT
<i>Fugu</i> stPrP-1	GAATCCTGCA	AGAGGG...	AATTATCCAA ATCAG..TAT CCAGCTGGTG
<i>Fugu</i> PrP-461	GAATCCAGCA	AGAGGG...	AATTATCCAA ATCAG..TAT CCAGCTGGTG
<i>Lateol</i> stPrP	GAATTATCCA	AATCAAC...	AGCAACCTGC TGGAGGCTAC CCTGCTGCAG
<i>Parali</i> stPrP	TCCTGCTGCA	GGTGGCT...	ACCCAGCTGG AGGAGGCTAC CCAGCTGGAG
<i>Sparus</i> stPrP	AAACCCAGCG	AGAGGG...	AACTACCCAA ATCAG..AAT CCAGCTGCTG
<i>Salmo</i> stPrP	GAACCCAGCA	GCTGGAGGTT	ACCCTGCTGC TGGTGGCAAT CCTGCAGCAG

	551		600
<i>Fugu</i> stPrP-2	TTGGTGATGG	AGGCCGTGGT	GGTCGACGTG GCTCTGCGTT TTA.....
<i>Fugu</i> stPrP-1	GAAGCAATCC	AAACCAA...	TACCCAGGCA GAGCTGGTAC C.....
<i>Fugu</i> PrP-461	GAAGCAATCC	AAACCAA...	TACCCAGGCA GAGCTGGTAC C.....
<i>Lateol</i> stPrP	GTGGCTATCC	CAACCAA...	AATCCAGGCA GAGCTGGTAC C.....
<i>Parali</i> stPrP	GTGGTTATCC	TAACCAG...	AATCCTGCAA GAAATTATCC A.....
<i>Sparus</i> stPrP	GAGGCTACCC	CAACCAA...	TATCCAGGCA GAGCTGGTAC C.....
<i>Salmo</i> stPrP	GTGGCTACCC	CAACCAGCAG	TATCCAGGCA GAGCCAATCC TGGGGGATAT



	601		650
<i>Fugu stPrP-2</i>	...TGACAAA GTTAAAGTCA TGGGCAGATC TCCATCCC.. .....		
<i>Fugu stPrP-1</i>	...AACCAAG GAGGATATCC TAACCAGTAC CCTCCTGC.. .....		
<i>Fugu PrP-461</i>	...AACCAAG GAGGATATCC TAACCAGTAC CCTCCTGC.. .....		
<i>Lateol stPrP</i>	...AACCAAG GAGGATATCC TAACCAGTAC CCAGCTGC.. .....		
<i>Parali stPrP</i>	...AATCAGT ATCCAGGTGC AGGAGGTTAC CCAGCAGC.. .....		
<i>Sparus stPrP</i>	...AACCAAG GAGGATATCC CAACCAGTAC CCAGCTGG.. .....		
<i>Salmo stPrP</i>	CCAAACCAGA ACCCAGCAGC TGGAGGTTAC CCTGCTGCTG GTGGCAATCC		

	651		700
<i>Fugu stPrP-2</i>	.....ATGA ATCCAAAGGG TTTGGCCACA CTGCAGCAAG GGCAGCGAGC		
<i>Fugu stPrP-1</i>	.....AGGT GGATACCCGG GCCAGGGAGG .TTACCCTG. ..CTG..CAG		
<i>Fugu PrP-461</i>	.....AGGT GGATACCCGG GCCAGGGAGG .TTACCCTG. ..CTG..CAG		
<i>Lateol stPrP</i>	.....AGGA GGTTACCC.A GCTGCAGGGG GTTACCCAG. ..CTG..CAG		
<i>Parali stPrP</i>	.....AGGT GGTTATCCTA ACCAGAATCC TGCAAGAAA. ..TTATCCAA		
<i>Sparus stPrP</i>	.....AGGA GGTTATCCCA ATCAG..... .T.ATCCAG. ..GTG..CTG		
<i>Salmo stPrP</i>	TGTAGCAGGT GGCTATCCCA ACCAGCAGTA TCCAGGCAGA GCCAATCCTG		

	701		750
<i>Fugu stPrP-2</i>	GGAGGGGCTG TGGCAAAAAT GGCTGTA... .....		
<i>Fugu stPrP-1</i>	GTAGATACCC AGGCCAGGGA GGTTACCCTC AGT..... .....		
<i>Fugu PrP-461</i>	GTAGATACCC AGGCCAGGGA GGTTACCCTC AGT..... .....		
<i>Lateol stPrP</i>	GTGGCTACCC AG..... .....		
<i>Parali stPrP</i>	ATCAGTATCC AG..... .....		
<i>Sparus stPrP</i>	GGGGCTACCC AG..... .....		
<i>Salmo stPrP</i>	GGGGATATCC AAACCAGAAT CCTGCAGCTG GAGGTTACCC TGCCGCTGGT		

	751		800
<i>Fugu stPrP-2</i>	G...ACTACG GGCTGGGAAG GTTCCCACGC CCTCCCTTCC AGTTTCAAAG		
<i>Fugu stPrP-1</i>	....ACCCTG CTGCTGGGGG CTATCCAAAT CAG..... .....		
<i>Fugu PrP-461</i>	....ACCCTG CTGCTGGGGG CTATCCAAAT CAG..... .....		
<i>Lateol stPrP</i>	..... CAGCCGGTGG CTATCCTAAC CAA..... .....		
<i>Parali stPrP</i>	..... GTGCTGGAGG CTACCC..... .....		
<i>Sparus stPrP</i>	..... CTGCAGGTGG CTATCCTAAC CAA..... .....		
<i>Salmo stPrP</i>	GGCAATCCTG TAGCAGGTGG CTATCCCAAC CAGCAGTATC CAGGCAGAGC		

	801		850
<i>Fugu</i> stPrP-2	CCCCGAGGAA	GAGTATTACT	ACAACCACTA CATGTACAGG ACCTACGGGG
<i>Fugu</i> stPrP-1	.....	AGGTCCCCTT	ATCAGTACCC TGCAGCAGGT GGCTACCC.A
<i>Fugu</i> PrP-461	.....	AGGTCCCCTT	ATCAGTACCC TGCAGCAGGT GGCTACCC.A
<i>Lateol</i> stPrP	.....	AGGTCCCCTT	ACCAGTATCC AGCAGGAGGT GGTACCC.A
<i>Parali</i> stPrP	.....	AGGTGCCGGG	GGC..TACCC AGCAGCAGGT GGCTACCC.A
<i>Sparus</i> stPrP	.....	AGGTCCCCGT	ACCAGTACCC AGCAGCAGGC GGTACCC.A
<i>Salmo</i> stPrP	CAATCCTGGG	GGATATCCAA	ACCAGAACCC AGCAGCTGGA GGTACCCCA

	851		900
<i>Fugu</i> stPrP-2	TCAAGTCTAC	TGATGCCAAC	GACTACAGCA GAGATTATTT TTACAGTAAA
<i>Fugu</i> stPrP-1	GTCAGAACC.	.GGAAATACA	GGACCAGGGT GGGGTCAGCC TGGCGGACAC
<i>Fugu</i> PrP-461	GTCAGAACC.	.GGAAATACA	GGACCAGGGT GGGGTCAGCC TGGCGGACAC
<i>Lateol</i> stPrP	GTCAGAGGG.	.GGAAATACA	GGACAGGGTT GGGGTCAGCC TGGTATGAAT
<i>Parali</i> stPrP	GTCAGAGGG.	.GGTAATATA	GGACAAGGTT GGGGTGTGCC TGGCGGAAAT
<i>Sparus</i> stPrP	GTCAGAGGT.	.GGGAACACA	GGTTGGGGTC AGGGTCAGGC TGGTGGGTAC
<i>Salmo</i> stPrP	ACCAGAATCC	AGGGAGAGGA	GGAGTCAATC CTGGTTACCC AGCCGGAGGT

	901		950
<i>Fugu</i> stPrP-2	CCCC...TGG	AAAACATGA	AAGACACATG AAC..... ACCT
<i>Fugu</i> stPrP-1	C.....CCG	GAGGTTACCC	A..... GGT..... GGCTA
<i>Fugu</i> PrP-461	C.....CCG	GAGGTTACCC	A..... GGT..... GGCTA
<i>Lateol</i> stPrP	C.....CAG	GGGGTTACCC	C..... G...
<i>Parali</i> stPrP	C.....CCG	GGGGTTACCC	C..... G...
<i>Sparus</i> stPrP	C.....CAG	GGGGTCACCC	CTATGGTGGC GGT..... GGTTA
<i>Salmo</i> stPrP	CACCCTGCTG	GAGGTTACCC	AGTAAGAGGG GGAAATACTG GCTGGGGGCA

	951		1000
<i>Fugu</i> stPrP-2	GCATGAAGAA	TATAGAGCTT	CTGC..CTGA AGAAAACCAA CAGAAAAGCA
<i>Fugu</i> stPrP-1	TCCTGGAGGA	TACCCTGGTG	GTG...CGGT TGGTGGTTAC A....CCAAC
<i>Fugu</i> PrP-461	TCCTGGAGGA	TACCCTGGTG	GTG...CGGT TGGTGGTTAC A....CCAAC
<i>Lateol</i> stPrP	.....GAGG.	.A.....GCG	G.....C TGGTGGTCAC C....CCAAC
<i>Parali</i> stPrP	.....GTGGT	TACCCTGGTG	GTT...ACCC TGGTGGTTAC C....CTAAC
<i>Sparus</i> stPrP	CGCTGGTGGC	TATCCCGGTG	GTG...CCGC TGGTGGTTAC C....CAAAC
<i>Salmo</i> stPrP	GGCAGGGGGC	TACCCTGGTG	GAGGGACAGG AGGAGGTTAC CA.ACCCAAC

	1001		1050
<i>Fugu</i> stPrP-2	ACAAACCAGC	CCTTATATACG	CCTTCCAGTC CCGTTTTAGC TCCAAATAAT
<i>Fugu</i> stPrP-1	TGGAACCCAA	ATAATAAAAT	CCTCAG..CC CCAGATTTGG CGGAGGGGGC
<i>Fugu</i> PrP-461	TGGAACCCAA	ATAATAAAAT	CCTCAG..CC CCAGATTTGG CGGAGGGGGC
<i>Lateol</i> stPrP	TGGAACCCAA	ATAATAAGAT	CCTCAG..TC CCGGCTTTGG TGGAGGAGGC
<i>Parali</i> stPrP	TGGAACCCCA	ATAATAAGAT	CCTCAG..TC CCCGCTTTGG TGGGGGAGGC
<i>Sparus</i> stPrP	TGGAACCCAA	ATAATAAGAT	CCTCAG..TC CT.GGCTTGG TGGAGGAGGC
<i>Salmo</i> stPrP	TGGAACCCAA	ACAATAAGAT	CCTCAG..TC CCCGCTATGG TGGAGG...C
	1051		1100
<i>Fugu</i> stPrP-2	GACACAGACA	ACAACACTGC	AGCAGACAAC TCCTCAACCT CCACAACCTCC
<i>Fugu</i> stPrP-1	TATATGCC..	.....CGG	GATGGGGGGC TCCCCTTTCT CACAGTCAGT
<i>Fugu</i> PrP-461	TATATGCC..	.....TGG	GATGGGGGGC TCCCCTTTCT CACAGTCAGT
<i>Lateol</i> stPrP	TATGGATACG	GCGGTCATGG	AATGGGCGGG TCTCCTTTCT CTCGCTCCGT
<i>Parali</i> stPrP	TATGGGCATG	GTGGTTATGG	GATGGGAGGT TCTCCATTCT CCCAATCTGT
<i>Sparus</i> stPrP	TACGGACA..	.....TGG	TGGTTA.... .....
<i>Salmo</i> stPrP	TATGGTTATG	GAGG...TAT	GGGAGGTGGC TCTCCCCTTCT CACGCTCAGT

**Εικόνα 3:** Σύγκριση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των cDNA που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες stPrP-2 (AY188583), stPrP-1 (AY141106) και PrP-461 (AF531159) του *Fugu rubripes* και για την πρωτεΐνη stPrP του *Paralichthys olivaceus* (AY854950), του *Lateolabrax japonicus* (AY854951), της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και του *Salmo salar* (AY141107). Οι τελείες που παρεμβάλλονται στις αλληλουχίες συμβολίζουν τα κενά που θέτει το πρόγραμμα OMIGA ώστε να προκύψει η βέλτιστη ομοπαράθεση. Με κόκκινο σημαίνεται το τμήμα του cDNA που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του ανιχνευτή στην RNase Protection Assay, καθώς και στην αποτόπωση κατά Northern.

Από τη νουκλεοτιδική αλληλουχία των 772 bp προέκυψε μια αμινοξική αλληλουχία 257 αμινοξέα. Η τελευταία συγκρίθηκε με τις αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών PrP-461, stPrP-1 και stPrP-2 του *Fugu rubripes*, της πρωτεΐνης stPrP του *Lateolabrax japonicus*, της πρωτεΐνης stPrP του *Paralichthys olivaceus* και της πρωτεΐνης stPrP του σολομού (*Salmo salar*) με τη βοήθεια του προγράμματος OMIGA. Η αμινοξική αλληλουχία της τσιπούρας έχει 64% ομοιότητα με την αντίστοιχη της πρωτεΐνης stPrP του *Lateolabrax japonicus* και της πρωτεΐνης PrP-461 του ψαριού *Fugu rubripes* και 63% ομοιότητα με εκείνη της πρωτεΐνης stPrP-1 του ίδιου ψαριού. Επίσης, παρουσιάζει 59% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης stPrP του *Paralichthys olivaceus* και 58% ομοιότητα με την αλληλουχία της πρωτεΐνης stPrP του σολομού (*Salmo salar*). Τέλος, έχει 16% ομοιότητα με την

αλληλουχία της πρωτεΐνης stPrP-2 του *Fugu rubripes*. Τα αποτελέσματα της ομοπαράθεσης απεικονίζονται στην εικόνα 4.

Στην τσιπούρα, τα 257 αμινοξέα αντιστοιχούν σε τμήμα του σηματοδοτικού πεπτιδίου, στο κλάσμα λυσινών και την περιοχή επαναλήψεων (repeat region) της πρωτεΐνης PrP. Συγκεκριμένα, τα τρία πρώτα αμινοξέα (θρεονίνη, τρυπτοφάνη, αλανίνη) της τσιπούρας αποτελούν τμήμα του σηματοδοτικού πεπτιδίου, όπως και για τις πρωτεΐνες stPrP του *Paralichthys olivaceus* και του *Lateolabrax japonicus*, τις PrP-461 και stPrP-1 του *Fugu rubripes*, καθώς και την stPrP του σολομού (*Salmo salar*). Οι δύο λυσίνες στην 4<sup>η</sup> και 5<sup>η</sup> θέση αποτελούν το κλάσμα λυσινών. Το κλάσμα λυσινών δεν είναι συντηρημένο μόνο μεταξύ των αλληλουχιών που παρουσιάζονται στην εικόνα 4, αλλά και μεταξύ των περισσότερων οργανισμών για τους οποίους έχει ταυτοποιηθεί η PrP (Oidtmann et al, 2003). Τέλος, η περιοχή επαναλήψεων εκτείνεται από το 6<sup>ο</sup> έως το 257<sup>ο</sup> αμινοξύ, όπου υπάρχουν επαναλήψεις του τετραπεπτιδίου GGYG. Οι επαναλήψεις του τετραπεπτιδίου απαντώνται και στα άλλα ψάρια. Λόγω της υψηλής τους αναλογίας σε γλυκίνη και προλίνη, οι περιοχές επαναλήψεων καλούνται και περιοχές πλούσιες σε γλυκίνη και προλίνη (Gly-Pro-rich region).

	1	50
<i>Fugu stPrP-2</i>	.....MKLSL LSLLSLSLLL FFAHFSLGRK SGGTSGKGS SNKSS.....	
<i>Fugu stPrP-1</i>	.MGRICEVVL LSLLLLFLN TKATWAKKSG SSG.GKKTGS STNWG.SRTP	
<i>Fugu PrP-461</i>	MMGRICEVVL LSLLLLFLN TKATWAKKSG SSG.GKKTGS STNWG.SRTP	
<i>Lateol stPrP</i>	.MGRICEVAL VSLIMFLN TESTWAKRGS SSSSSSKTS SSSNK.GGTQ	
<i>Parali stPrP</i>	MMGRLEAV VSLLVFLS TESTWAKRGS SSSG..KTS SSSNR.GGTQ	
<i>Sparus stPrP</i>	..... TWAKKTG SSSSGRKSTS SSSNR.GGTQ	
<i>Salmo stPrP</i>	.MGKLCAL VSLALLLH TDSTWAKRGS SSSSSSKTA SSNRGSDKKP	
	51	100
<i>Fugu stPrP-2</i>	.....SSNE KTKTSSNAGN RN.....	
<i>Fugu stPrP-1</i>	SKPSG..... SQPNR NSNPYPSGGS YP.....	
<i>Fugu PrP-461</i>	SKPSG..... SQPNR NSNPYPSGGS YP.....	
<i>Lateol stPrP</i>	SKPTSSHPGN YPRQPQPNR NPNYPAGGS YP.....	
<i>Parali stPrP</i>	TKPSSSPGS YPRQPQSPNR NPNYPAGGS YP.....	
<i>Sparus stPrP</i>	SKP..... SSTNR NTNYPYPSGGS YPGAGNTN.. ..PGGGYRQ	
<i>Salmo stPrP</i>	PKTSNTQTGS YPRQPQSPNR NPNYPYAGGS YPGRGTNQNQ NPAAGY AAG	

101 150

*Fugu* stPrP-2 ..... ..NQGFVSES

*Fugu* stPrP-1 ....HPGTGQ SNF~~Y~~RQN ..PASN~~V~~GG S.....P NQYPGR~~T~~NP~~P~~

*Fugu* PrP-461 ....QPGTGQ SNF~~Y~~RQN ..PASN~~V~~GG S.....P NQYPGR~~T~~NP~~P~~

*Lateol* stPrP ....YPGAGS N.....P NQYPGR~~V~~NP~~P~~

*Parali* stPrP ....HPGAGN TNP~~V~~RQN ..P~~S~~~~V~~GGAG SY.....P NQYPGR~~A~~NP~~P~~

*Sparus* stPrP NPGSYPGAGN SNP~~Y~~RQN ..P~~S~~~~V~~GGAG SN.....P NQYPGR~~A~~NP~~P~~

*Salmo* stPrP GYPNQQYPGR ANP~~Y~~NQN PAA~~Y~~AAG GNPAA~~Y~~N QQYPGR~~A~~NP~~P~~

151 200

*Fugu* stPrP-2 GSPKQQGDN. ....APG GGGYGHGG.. ....YGGGFGG

*Fugu* stPrP-1 GYPNQN.... ..A G~~Y~~NQN.. ..AR~~N~~~~N~~

*Fugu* PrP-461 ~~Y~~NQN.... ..A G~~Y~~NQNPA G~~Y~~NQN.. ..AR~~N~~~~N~~

*Lateol* stPrP ~~Y~~NQNPA~~G~~ ..A A~~G~~YAA~~G~~ ..AA~~G~~Y~~A~~

*Parali* stPrP ~~N~~NQNPA~~G~~ ..A A~~G~~YAA~~G~~ ..AA~~G~~Y~~A~~

*Sparus* stPrP ~~Y~~NQNPA~~G~~ ..A A~~G~~Y~~N~~QN.. ..AR~~N~~~~N~~

*Salmo* stPrP ~~Y~~NQNPA~~A~~ G~~Y~~AAGGNPA A~~G~~Y~~N~~QQYP GRANP~~G~~Y~~N~~ QN~~AA~~Y~~A~~

201 250

*Fugu* stPrP-2 RG.....GH ~~Y~~GVYGHPGY G.....GHG YGVY~~H~~Y~~G~~~~L~~HGFHG....

*Fugu* stPrP-1 QY....PAG~~E~~ SN~~N~~.QYPGR ....AGTNQ~~G~~ G~~Y~~NQ~~T~~PA~~G~~ G~~Y~~GGQ~~G~~Y~~A~~

*Fugu* PrP-461 QY....PAG~~E~~ SN~~N~~.QYPGR ....AGTNQ~~G~~ G~~Y~~NQ~~T~~PA~~G~~ G~~Y~~GGQ~~G~~Y~~A~~

*Lateol* stPrP A~~L~~..... ~~Y~~YN.QNPGR G...N~~Y~~NQQ QPA~~G~~Y~~AA~~ G~~Y~~NQNPGRA

*Parali* stPrP G~~L~~...~~L~~AG~~E~~ G~~Y~~N.QNPAR ....N~~Y~~NQY PGAG~~E~~Y~~AA~~ G~~Y~~NQNPARN

*Sparus* stPrP QN....PAA~~E~~ G~~Y~~N.QYPGR ....AGTNQ~~G~~ G~~Y~~NQ~~T~~PA~~G~~ G~~Y~~N.....

*Salmo* stPrP A~~L~~...N~~V~~A~~E~~ G~~Y~~NQQYPGR ANP~~Y~~NQN PAA~~Y~~AAG GNPVA~~Y~~N

251 300

*Fugu* stPrP-2 .....R~~G~~Y KPGD.....

*Fugu* stPrP-1 .....AGR YPGQ~~E~~... ..QYPAA~~E~~Y~~N~~QR.....SPYQ

*Fugu* PrP-461 .....AGR YPGQ~~E~~... ..QYPAA~~E~~Y~~N~~QR.....SPYQ

*Lateol* stPrP GTNQ~~G~~Y~~N~~Q YPAA~~E~~..... ..Y~~Y~~AA~~E~~Y~~N~~AAAGGY~~PA~~AG GYPNQRSPYQ

*Parali* stPrP .....YPNQ YPGA~~E~~..... ..Y~~Y~~GA~~E~~Y~~N~~AAAG.....

*Sparus* stPrP .....Q YPGA~~E~~..... ..Y~~Y~~AA~~E~~Y~~N~~QR.....SPYQ

*Salmo* stPrP .....QQ YPGRANP~~E~~Y~~N~~QNPA~~E~~Y~~N~~QN...PGR GGVNPGYPAG



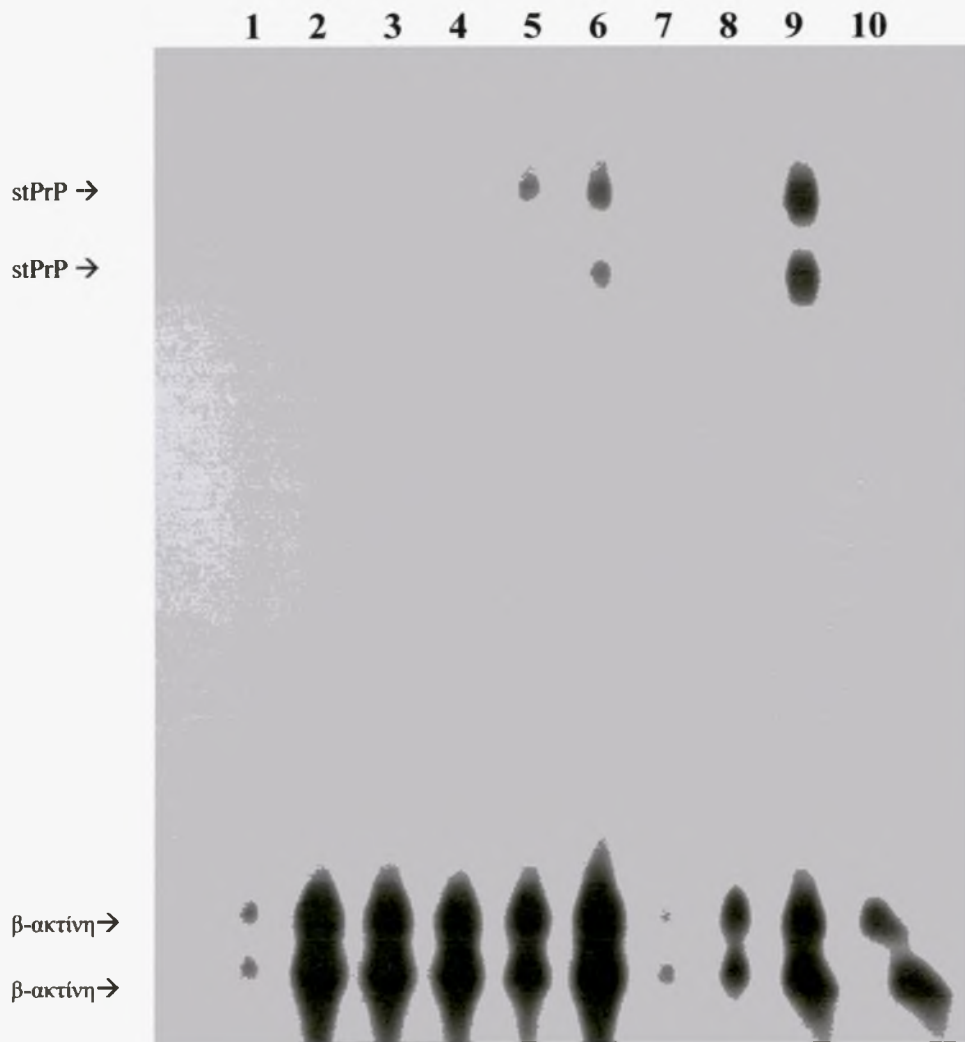
	301		350
<i>Fugu</i> stPrP-2	....P RGS YGGGYDYDG. ....G.. ....R INQ		
<i>Fugu</i> stPrP-1	YPAA GY VR TGNTGPGWGQ P H PGGYPG ... PGGYE AVEGTNW		
<i>Fugu</i> PrP-461	YPAG GY VR GGNTGQGWG. ...QP MN ... YE AA H NW		
<i>Lateol</i> stPrP	YPAG GY VR GGNTGQGWG. ...Q MN ... YE AA H NW		
<i>Parali</i> stPrP	....G YPVR GGNIGQGWG. ...VPG N G ... PGGYE GYPGGY NW		
<i>Sparus</i> stPrP	YPAA GY VR GGNTGWGQGQ A GYPG H Y GGGYA GYE AA GY NW		
<i>Salmo</i> stPrP	GHPA GY VR GGNTGWGQAG .. YPG GTG ..... YQ .....NW		
	351		400
<i>Fugu</i> stPrP-2	NPNNQILSPH YVNSFGDGGR GRRRGSFYD KVKVMGRSPS HESKGFHTA		
<i>Fugu</i> stPrP-1	NPNNKILSPR FGGGGYMPG. ..MGGSPFSQ SVQSMGYKPK SP..SFAKKA		
<i>Fugu</i> PrP-461	NPNNKILSPR FGGGGYMPG. ..MGGSPFSQ SVQSMGYKPK SP..SFAKKA		
<i>Lateol</i> stPrP	NPNNKILSPG FGGGGYGYGG HGMGGSPFSR SVQSMGYQPK ST..GFAKKA		
<i>Parali</i> stPrP	NPNNKILSPR FGGGGYGHGG YGMGGSPFSQ SVQNMGYKPK ST..GFAKKA		
<i>Sparus</i> stPrP	NPNNKILSPG LVEEATDMV. ..V.....		
<i>Salmo</i> stPrP	NPNNKILSPR YGGGYGYGGM G..GGSPFSR SVQGMGQYPS TQSKGFAKKA		

**Εικόνα 4:** Σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών των πρωτεϊνών stPrP-2 (AAO43567), stPrP-1 (AAN38988) και PrP-461 (AAN88028) του *Fugu rubripes*, stPrP (AAW33660) του *Paralichthys olivaceus*, stPrP (AAW33661) του *Lateolabrax japonicus*, stPrP της τσιπούρας (*Sparus aurata*) και stPrP (AAN38989) του σολομού (*Salmo salar*). Οι τελείες που παρεμβάλλονται στις αλληλουχίες συμβολίζουν τα κενά που θέτει το πρόγραμμα OMIGA ώστε να προκύψει η βέλτιστη ομοπαράθεση. Με κίτρινο σημαίνεται τμήμα του σηματοδοτικού πεπτιδίου, με γαλάζιο το κλάσμα λυσινών και με πράσινο οι επαναλήψεις του τετραπεπτιδίου GGYF.

#### Ιστοειδική έκφραση της stPrP της τσιπούρας

Για την εύρεση της ιστοειδικής έκφρασης της stPrP της τσιπούρας εφαρμόστηκαν δυο τεχνικές, η RNase Protection Assay και η αποτύπωση κατά Northern. Αρχικά, εφαρμόστηκε η RNase Protection Assay. Στην τεχνική αυτή, δεν μεσολαβούν οι χρονοβόρες διαδικασίες της τριχοειδούς μεταφοράς του RNA σε μεμβράνη, της προϋβριδοποίησης καθώς και των πλύσεων. Το γεγονός αυτό καθιστά την RNase Protection Assay ευκολότερη και ταχύτερη της αποτύπωσης κατά Northern. Εξάλλου, η αποκοπή του μονόκλωνου RNA με τις ριβονουκλεάσες RNase A και RNase T1 προσφέρει στην RNase Protection Assay μεγαλύτερη ευαισθησία και αξιοπιστία.

Για την RNase Protection Assay χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 10 ιστοί και συγκεκριμένα ιστός ήπατος, νεφρού, εντέρου, βραγχίων, καρδιακού μυός, σπλήνα, ερυθρού και λευκού μυός, εγκεφάλου καθώς και λιπώδης ιστός. Η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στον εγκέφαλο (Εικόνα 5). Ωστόσο, το mRNA της stPrP της τσιπούρας εκφράζεται σε σημαντικό βαθμό και στο σπλήνα, ελαφρώς λιγότερο στον καρδιακό μυ, πολύ λιγότερο στο νεφρό και το λευκό μυ, ενώ στα υπόλοιπα όργανα είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμο.



**Εικόνα 5:** RNase Protection Assay για την έκφραση του mRNA της stPrP της τσιπούρας. 1.ήπαρ, 2.νεφρό, 3.έντερο, 4.βράγχια, 5.καρδιακός μυς, 6.σπλήνας, 7.ερυθρός μυς, 8.λευκός μυς, 9.εγκέφαλος, 10.λιπώδης ιστός. Ολικό RNA (10μg) από τους δέκα ιστούς υβριδοποιήθηκαν με RNA ανιχνευτή ειδικό για την stPrP της τσιπούρας, το μονόκλωνο RNA αποκόπηκε και τα υβριδοποιημένα τμήματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου/ ουρίας. Στο κάτω μέρος της εικόνας, η έκφραση του mRNA της β-ακτίνης χρησιμεύει ως μάρτυρας για να δείξει ότι αναλώθηκαν ίσες ποσότητες RNA από κάθε ιστό.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της RNase Protection Assay, στην αποτύπωση κατά Northern, χρησιμοποιήθηκαν οι 3 εκείνοι ιστοί, στους οποίους παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη έκφραση του mRNA της stPrP της τσιπούρας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ο καρδιακός μυς, ο σπλήνας και ο εγκέφαλος της τσιπούρας. Για να διαπιστωθεί η εγκυρότητα της μεθόδου, το έντερο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, καθώς στην RNase Protection Assay, η έκφραση του mRNA της stPrP είναι ελάχιστα ανιχνεύσιμη στον ιστό αυτό.

Τα αποτελέσματα της αποτύπωσης κατά Northern είναι παρεμφερή με εκείνα που προέκυψαν από την RNase Protection Assay. Στον καρδιακό μυ, το σπλήνα και τον εγκέφαλο ανιχνεύτηκε μια ζώνη περίπου 3.9kb (Εικόνα 6). Όπως και στην RNase Protection Assay, έτσι και στην αποτύπωση κατά Northern, η μεγαλύτερη έκφραση του mRNA της stPrP της τσιπούρας παρατηρείται στο εγκέφαλο, σε αξιόλογο βαθμό στο σπλήνα και λιγότερο στον καρδιακό μυ, ενώ δεν παρατηρείται καμία έκφραση στο έντερο.



**Εικόνα 6:** Αποτύπωση κατά Northern της ιστοειδικής έκφρασης του mRNA της stPrP της τσιπούρας. 1.έντερο, 2.καρδιακός μυς, 3.σπλήνας, 4.εγκέφαλος. Ολικό RNA (30 μg) από τους τέσσερις ιστούς διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική φορμαλδεΐδη/ αγαρόζης, μεταφέρθηκε σε νάυλον μεμβράνη και υβριδοποιήθηκε με έναν ανιχνευτή, ειδικό για την stPrP της τσιπούρας, μεγέθους 331 bp.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

### Ανάλυση αλληλουχίας

Στη συγκεκριμένη εργασία κλωνοποιήθηκε κι αλληλουχήθηκε ένα τμήμα 772bp του cDNA της τσιπούρας και διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του mRNA που μεταγράφεται από το cDNA αυτό είναι κυρίαρχη στον εγκέφαλο. Η υψηλή ομοιότητα της αλληλουχίας αυτής με εκείνες των stPrPs που έχουν ταυτοποιηθεί σε διάφορα ψάρια, καθώς και το πρότυπο ιστοειδικής έκφρασης που ομοιάζει πολύ αυτό του σολομού (*Salmo salar*) επιτρέπει την υπόθεση ότι πρόκειται για ένα τμήμα της stPrP της τσιπούρας (Rivera-Milla et al. 2003, Oidtmann et al. 2003, Liao et al. 2005).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής και αμινοξικής αλληλουχίας της stPrP της τσιπούρας με τις αντίστοιχες αλληλουχίες από τα ψάρια, στα οποία έχουν ταυτοποιηθεί οι stPrPs, δείχνει σημαντική ομοιότητα. Μεγαλύτερη ομοιότητα υπάρχει με την αλληλουχία της stPrP του *Lateolabrax japonicus*, καθώς και με αυτές των PrP-461 και stPrP-1 του *Fugu rubripes* (Rivera-Milla et al. 2003, Oidtmann et al. 2003, Liao et al. 2005). Η ομοιότητα μπορεί να οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι τα τρία αυτά ψάρια ανήκουν στην ίδια τάξη (Percomorpha). Η υπόθεση αυτή, σε πρώτη φάση, αναιρείται, αφού η μικρότερη ομοιότητα παρατηρείται με την αλληλουχία της stPrP-2 του *Fugu rubripes*, ψαριού που όπως αναφέρθηκε ανήκει στην ίδια τάξη με την τσιπούρα. Όμως, με μια προσεκτικότερη ματιά, διαπιστώνεται ότι η stPrP-2 έχει μικρή ομοιότητα με όλες ανεξαρτήτως τις stPrPs στην περιοχή επαναλήψεων (repeat region) (Oidtmann et al, 2003). Επομένως, δεν τίθεται θέμα αναίρεσης της παραπάνω υπόθεσης.

Εξάλλου, στις ομοπαράθεσεις των εικόνων 3 και 4, συμπεριλήφθηκαν μόνο οι νουκλεοτιδικές και αμινοξικές αλληλουχίες των stPrPs που έχουν ταυτοποιηθεί στα ψάρια, δηλαδή σε ζώα που ανήκουν στην ίδια κλάση με την τσιπούρα. Η ομοπαράθεση της αλληλουχίας της stPrP της τσιπούρας με εκείνες των PrPs των τετραπόδων παραλείφθηκε, διότι δεν προσφέρει καμία ουσιαστική πληροφορία σχετικά με την ομοιότητα μεταξύ τους. Αυτό συμβαίνει διότι στην τσιπούρα, το τμήμα των 257 αμινοξέων που ταυτοποιήθηκε αντιστοιχεί σχεδόν εξολοκλήρου στην περιοχή επαναλήψεων (repeat region) της πρωτεΐνης stPrP. Η περιοχή επαναλήψεων είναι πολύ μικρή έως ανύπαρκτη στην PrP των τετραπόδων, με αποτέλεσμα μια

πιθανή ομοπαράθεση των περιοχών αυτών να δείχνει πολύ μικρή ομοιότητα μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, στα ψάρια, η περιοχή αυτή εκτείνεται από 70 έως 201 αμινοξέα, ενώ στο βάτραχο *Xenopus laevis* απουσιάζει εντελώς, στη χελώνα έχει μήκος 60 αμινοξέα και στα πτηνά καθώς και τα θηλαστικά εκτείνεται από 32 έως 54 αμινοξέα (Simonic et al. 2000, Strumbo et al. 2001, Rivera-Milla et al. 2003, Oidtmann et al. 2003, Liao et al. 2005).

Η ομοπαράθεση της αλληλουχίας της stPrP της τσιπούρας με εκείνες των PrPs των τετραπόδων παραλείφθηκε για έναν ακόμα λόγο. Εκτός από τις διαφορές στο μήκος της περιοχής επαναλήψεων (repeat region), ανάμεσα στις κλάσεις των σπονδυλωτών υπάρχουν διαφορές και στη σύσταση της περιοχής επαναλήψεων (repeat region). Στα ψάρια υπάρχουν διάσπαρτες επαναλήψεις του τετραπεπτιδίου GGYR. Στη χελώνα υπάρχουν δέκα διαδοχικές επαναλήψεις του εξαπεπτιδίου XNPXYR και στα πτηνά έξι έως εννέα επαναλήψεις του ίδιου πεπτιδίου (Simonic et al. 2000). Στα θηλαστικά, υπάρχουν επαναλήψεις του οκταπεπτιδίου R(Q/H)GGGWGQ ή του εννιαπεπτιδίου R(Q/H)GGGGWGQ, όπως στην περίπτωση της γάτας *Felis catus* (van Rheede et al. 2003, Rivera-Milla et al. 2003, Oidtmann et al. 2003, Lysek et al. 2004, , Liao et al. 2005). Για τους ίδιους ακριβώς λόγους, η κατασκευή φυλογενετικού δένδρου, διαφωτιστική στις περισσότερες περιπτώσεις, δεν κρίθηκε σκόπιμη στη συγκεκριμένη εργασία, διότι θα ήταν μάλλον αποπροσανατολιστική (Liberski et al. 2002).

Παρόλο, λοιπόν, που τα δομικά μοτίβα που απαρτίζουν την PrP είναι συντηρημένα μεταξύ των κλάσεων των σπονδυλωτών, το μέγεθος και η σύστασή τους παρουσιάζει αξιοσημείωτες διαφορές (Premzl et al. 2003). Αυτό το συμπέρασμα μπορεί να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο για την εξαγωγή συμπερασμάτων αναφορικά με το φραγμό μεταξύ των ειδών (species barrier), τη μοριακή εξέλιξη των stPrPs και PrPs και τη σχέση δομής/ λειτουργίας της πρωτεΐνης stPrP και PrP.

#### Φραγμός μεταξύ των ειδών (Species barrier)

Όπως είναι γνωστό από την εισαγωγή, ο φραγμός μεταξύ των ειδών εξαρτάται από τις αμινοξικές αλληλουχίες του είδους δότη και του είδους δέκτη, από το στέλεχος της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup> και από την πρωτεΐνη X. Επειδή, όμως, η έρευνα για τα πριον των ψαριών, βρίσκεται ακόμα σε πρώιμο στάδιο, δεν υπάρχουν πληροφορίες για την παρουσία στελεχών της πρωτεΐνης PrP<sup>Sc</sup> και πρωτεΐνης X στα ψάρια. Γι' αυτό



θα γίνει λόγος μόνο για την εξάρτηση του φραγμού μεταξύ των ειδών από τις αμινοξικές αλληλουχίες του είδους δότη και του είδους δέκτη.

Έχει βρεθεί ότι το αμινοτελικό άκρο των PrPs φαίνεται να επηρεάζει την παθογένεση των TSE και την μετάδοση των μολυσματικών παραγόντων prion από είδος σε είδος. Η πρωτεΐνη stPrP της τσιπούρας διαφέρει από τις πρωτεΐνες PrP των θηλαστικών τόσο στο μήκος, όσο και στη σύσταση της περιοχής επαναλήψεων του αμινοτελικού άκρου τους. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι ο φραγμός μεταξύ τους είναι υψηλός και η μετάδοση των μολυσματικών παραγόντων prion είναι δύσκολη. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη μόνο τη διαφορά μεταξύ αμινοξικών αλληλουχιών, η πιθανότητα μετάδοσης των μολυσματικών παραγόντων prion (Scrapie και BSE) στην τσιπούρα μέσω της διατροφής της με MBM που προέρχονται από θηλαστικά (αιγοπρόβατα και βοοειδή) είναι μικρή (Horwich et al. 1997, Moore et al. 1997, Horiuchi et al. 2000, McKintosh et al. 2003).

#### Μοριακή εξέλιξη των PrPs και stPrPs

Τα 257 αμινοξέα της stPrP δεν επιτρέπουν την δημιουργία μιας σφαιρικής εικόνας για τις διαφορές και τις ομοιότητες της πρωτεΐνης stPrP με τις PrPs, με αποτέλεσμα η συναγωγή κάποιου συμπεράσματος για τη μοριακή εξέλιξη των PrPs και stPrPs να είναι εξαιρετικά δύσκολη. Ωστόσο, οι αμινοξικές αλληλουχίες των stPrPs των άλλων ψαριών μπορούν να προσφέρουν ένα έρεισμα για την διατύπωση κάποιων θεωριών.

Στα θηλαστικά, το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης PrP είναι αδόμετο και εύκαμπτο, ενώ το καρβοξυτελικό άκρο είναι σφαιρικό και άκαμπτο. Ο ρυθμός μοριακής εξέλιξης είναι ταχύτερος για τα μόρια που δε βρίσκονται κάτω από δομικούς περιορισμούς, εξού και η απόκλιση ανάμεσα στο αμινοτελικό άκρο των stPrPs των ψαριών και των PrPs των θηλαστικών (Ogayar A. 1998, van Rheede T. 2003).

Εξάλλου, οι διαφορές στο αμινοτελικό άκρο των stPrPs των ψαριών και των PrPs των θηλαστικών πιθανότατα οφείλονται στους ταχείς ρυθμούς μοριακής απόκλισης των PrPs από τις stPrPs, ενώ η ομοιότητα στο αμινοτελικό άκρο των stPrPs των ψαριών πιθανότατα οφείλεται σε μοριακή στάση μέσα στην κλάση των ψαριών (Rivera-Milla et al. 2003).

### Σχέση δομής/ λειτουργίας της πρωτεΐνης stPrP

Πολύ λίγα είναι γνωστά για τη σχέση δομής/ λειτουργίας της πρωτεΐνης PrP, πόσο μάλλον για την stPrP. Πάντως το αμινοτελικό άκρο φαίνεται να παίζει κι εδώ ίσως το σημαντικότερο ρόλο. Οι επαναλήψεις του οκταπεπτιδίου P(Q/H)GGGWGQ στην αμινοξική αλληλουχία της πρωτεΐνης PrP δείχνουν ότι στα θηλαστικά, η PrP είναι μια πρωτεΐνη που δεσμεύει χαλκό, καθώς το αμινοξύ ιστιδίνη μπορεί να δεσμεύσει ιόντα χαλκού (Cu). Λόγω αυτής της ιδιότητας, η PrP μπορεί να λειτουργεί σαν δισμουτάση του υπεροξειδίου (SuperOxide Dismoutase, SOD). Η δράση της αυτή της προσδίδει ένα νευροπροστατευτικό ρόλο, καθώς μπορεί να προφυλάσσει τους νευρώνες από το οξειδωτικό stress (Brown et al. 2002, Deignan et al. 2004, Premzl et al. 2004). Όμως, στο αμινοτελικό άκρο της stPrP δεν υπάρχουν επαναλήψεις του οκταπεπτιδίου P(Q/H)GGGWGQ, ούτε η απομονωμένη παρουσία ιστιδίνης. Γενικότερα, οι αμινοξικές αλληλουχίες της stPrP της τσιπούρας και των PrPs των θηλαστικών αποκλίνουν πολύ, ώστε να είναι εύλογη η υπόθεση ότι η stPrP της τσιπούρας και οι PrPs των θηλαστικών έχουν διαφορετικές λειτουργίες.

Συγκρίνοντας, την αμινοξική αλληλουχία της τσιπούρας με άλλες αμινοξικές αλληλουχίες χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο BLAST, προκύπτει ότι η αμινοξική αλληλουχία της τσιπούρας παρουσιάζει κάποια ομοιότητα με τις αννεξίνες, που είναι πρωτεΐνες που δεσμεύουν ιόντα ασβεστίου. Συγκεκριμένα, η αννεξίνη max4 του ψαριού *Oryzias latipes* (CAA72125) παρουσιάζει 28% ομοιότητα με την αμινοξική αλληλουχία της τσιπούρας κι έχει στο αμινοτελικό της άκρο επαναλήψεις του τετραπεπτιδίου GGYR, όπως η stPrP της τσιπούρας. Όμως, στη δέσμευση του ασβεστίου δε φαίνεται να εμπλέκεται το τετραπεπτίδιο αυτό. Εντούτοις, η ομοιότητα των stPrPs με πρωτεΐνες που δεσμεύουν ιόντα ίσως ανοίξει το δρόμο για την ανακάλυψη της πραγματικής τους λειτουργίας.

### Ιστοειδική έκφραση της stPrP της τσιπούρας

Τα αποτελέσματα της αποτύπωσης κατά Northern και της RNase Protection Assay συνάδουν με την αρχική υπόθεση, καθώς η μεγαλύτερη έκφραση αναμένεται στον εγκεφαλικό ιστό. Η RNase Protection Assay για την έκφραση του mRNA της stPrP της τσιπούρας παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με την αποτύπωση κατά Northern της έκφρασης του mRNA της stPrP του σολομού (*Salmo salar*) (Oidtmann

et al. 2003). Και στις δύο περιπτώσεις, η μεγαλύτερη έκφραση παρατηρείται στον εγκέφαλο. Μεγάλη, επίσης, έκφραση παρατηρείται στο σπλήνα, στον καρδιακό μυ, στο νεφρό και το μυ τόσο της τσιπούρας, όσο και του σολομού.

Στα θηλαστικά, η μεγαλύτερη έκφραση PrP παρατηρείται στον εγκέφαλο. Τα λεμφικά όργανα και ιδίως ο σπλήνας ελέγχουν την ταχύτητα της μεταφοράς της PrP<sup>Sc</sup> από το περιφερικό σύστημα στον εγκέφαλο (neuroinvasion), γι' αυτό η έκφραση της PrP στο σπλήνα είναι καθοριστική για τα θηλαστικά. Τα αποτελέσματα της αποτύπωσης κατά Northern και RNase Protection Assay δείχνουν ότι η μεγαλύτερη έκφραση του mRNA της stPrP της τσιπούρας παρατηρείται στον εγκέφαλο, ενώ σημαντική είναι και η έκφραση στο σπλήνα. Δηλαδή, η τσιπούρα και τα θηλαστικά παρουσιάζουν όμοιο πρότυπο έκφρασης αναφορικά με τους δύο αυτούς ιστούς.

Η κατάσταση διαφοροποιείται στα άλλα όργανα. Χαρακτηριστικότερη περίπτωση είναι αυτή όπου στα θηλαστικά, το έντερο είναι ένας από τους κύριους ιστούς που εκφράζουν την PrP, ενώ στην τσιπούρα είναι ένας από τους ιστούς που δεν την εκφράζουν καθόλου την stPrP. Αυτό μπορεί να υποδεικνύει άλλη οδό μετάδοσης του prion στον οργανισμό της τσιπούρας ή ότι απλά τα αποτελέσματα δεν είναι απόλυτα αξιόπιστα. Για την αποκάλυψη της πραγματικής ιστοειδικής κατανομής της stPrP της τσιπούρας είναι απαραίτητη η δημιουργία ειδικού αντισώματος για εφαρμογές στην κυτταροανοσοχημεία και την ELISA (Lemaire-Vieille et al. 2000, Mironov et al. 2003, Moleret et al. 2003).

---

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. κ. Γρηγόριο Κρέη για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες υποδείξεις του, την κα Laurence Favre για τις σημαντικές τεχνικές γνώσεις που μου μετέδωσε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και την κα Ευρυδίκη Μπουκουβάλα για την πραγματικά μεγάλη βοήθεια που μου προσέφερε σε θεωρητικό και τεχνικό επίπεδο. Τέλος, ευχαριστώ ολόθερμα την καθηγήτριά μου, κα Κατερίνα Μούτου για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις και διορθώσεις που έκανε στην εργασία μου.

---

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ◆ Aguzzi A., Polymenidou M., 2004. Mammalian Prion Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*; 116: 313-327.
- ◆ Aguzzi A., Heikenwalder M., Miele G., 2004. Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *The Journal of Clinical Investigation*; 114 (2): 153-160.
- ◆ Altschul S., Gish W., Miller W., Myers E., Lipman D., 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *The Journal of Molecular Biology*; 215: 403-410.
- ◆ Brandner S., Raeber A., Sailer A., Blättler A., Fischer M., Weissmann C., Aguzzi A., 1996. Normal host prion protein (PrPC) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 93: 13148-13151.
- ◆ Brown DR., Nicholas RStJ., Canevari L., 2002. Lack of Prion Protein Expression Results in a Neuronal Phenotype Sensitive to Stress. *Journal of Neuroscience Research*; 67: 211-224.
- ◆ Brown P., Will RG., Bradley R., Asher DM., Detwiler L., 2001. Bovine Spongiform Encephalopathy and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Background, Evolution, and Current Concerns. *Perspectives, Emerging Infectious Diseases*; 7(1): 6-16.
- ◆ Dalsgaard NJ., 2002. Prion disease: An overview. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*; 110: 3-13.
- ◆ DebBurman SK., Raymond GJ., Caughey B., Lindquist S., 1997. Chaperone supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 13938-13943.
- ◆ Deignan ME., Prior M., Stuart LE., Comerford EJ., McMahon HEM., 2004. The structure function relationship for the Prion protein. *Journal of Alzheimer's Disease*; 6: 283-289.
- ◆ Horiuchi M., Priola SA., Chabry J, Caughey B., 2000. Interactions between heterologous forms of prion protein: Binding, inhibition of conversion, and species barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 97(11): 5836-5841.

- ◆ Horwich AL., Weissman JS., 1997. Deadly Conformations-Protein Misfolding in Prion Disease. *Cell*; 89: 499-510.
- ◆ Kramer JA., 2001. OMIGA: a PC-based sequence analysis tool. *Molecular Biotechnology*; 19(1): 97-106.
- ◆ Lawson VA., Priola SA., Meade-White K., Lawson M., Chesebro B., 2004. Flexible N-terminal Region of Prion Protein Influences Conformation of Protease-resistant Prion Protein Isoforms Associated with Cross-species Scrapie Infection *in Vivo* and *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry*; 279(14): 13689-13695.
- ◆ Lemaire-Vieille C., Schulze T., Podevin-Dimster V., Follet J., Bailly Y., Blanquet-Grossard F., Decavel J.-P., Heinen E., Cesbron J.-Y., 2000. Epithelial and endothelial expression of the green fluorescent protein reporter gene under the control of bovine prion protein (PrP) gene regulatory sequences in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 5422-5427.
- ◆ Liao M., Zhang Z., Yang G., 2005. Cloning and characterization of prion protein coding genes of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*) and bastard halibut (*Paralichthys olivaceus*). Unpublished.
- ◆ Liberski PP. and Mariusz Jaskólski, 2002. Prion Diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*; 62: 197-226.
- ◆ Lysek DA., Nivon LG., Wüthrich K., 2004. Amino acid sequence of the *Felis catus* prion protein. *Gene*; 341: 249-253.
- ◆ Matthews D., Cooke BC., 2003. The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish. *Scientific and Technical Review of the International Office of Epizootics*; 22(1): 283-296.
- ◆ McKintosh E., Tabrizi SJ., and Collinge J., 2003. Prion diseases. *Journal of NeuroVirology*; 9: 183-193.
- ◆ Mironov A. Jr, Latawiec D., Wille H., Bouzamondo-Bernstein E., Legname G., Williamson RA., Burton D., DeArmond SJ., Prusiner SB., Peters PJ., 2003. Cytosolic Prion Protein in Neurons. *The Journal of Neuroscience*; 23(18): 7183-7193.
- ◆ Molerés FJ., Castle M., Velayos JL., 2003. Expression of cellular prion protein (PrP<sub>c</sub>) in the rat central nervous system. *European Journal of Anatomy*; 7(2): 85-90.



- ◆ Moore RC., Melton DW., 1997. Molecular Transgenic analysis of prion diseases. *Human Reproduction*; 3 (6): 529-544.
- ◆ Ogayar A., Sánchez-Pérez M., Prions: an evolutionary perspective. 1998. *International Microbiology*; 1: 183-190.
- ◆ Oidtmann B., Simon D., Holtkamp N., Hoffmann R., Baier M., 2003. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) coding for homologues to tetrapod prion proteins. *Federation of European Biochemical Societies Letters*; 538: 96-100.
- ◆ Premzl M., Sangiorgio L., Strumbo B., Marshall Graves JA., Simonic T., Gready JE., 2003. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene*; 314: 89-102.
- ◆ Prusiner SB., Scott MR., 1997. Genetics of Prions. *Annual Review of Genetics*; 31: 139-175.
- ◆ Prusiner SB., 1997. Prion Diseases and the BSE Crisis. *Science*; 278: 245-251.
- ◆ Prusiner SB., Scott MR., DeArmond SJ., Cohen FE., 1998. Prion Protein Biology. *Cell*; 93: 337-348.
- ◆ Rivera-Milla, E., Stuermer, C.A., Malaga-Trillo, E., 2003. An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA. *Trends in Genetics*; 19: 72-75.
- ◆ Scott MR., Groth D., Tatzelt J., Torchia M., Tremblay P., DeArmond SJ., Prusiner SB., 1997. Propagation of Prion Strains through Specific Conformers of the Prion Protein. *Journal of Virology*; 71(12): 9032-9044.
- ◆ Simonic T., Duga S., Strumbo B., Asselta R., Ceciliani F., Ronchi S., 2000. cDNA cloning of turtle prion protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters*; 469: 33-38.
- ◆ Strumbo B., Ronchi S., Bolis LC., Simonic T., 2001. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *Federation of European Biochemical Societies Letters*; 508: 170-174.
- ◆ Suzuki T., Kurokawa T., Hashimoto H., Sugiyama M., 2002. cDNA sequence and tissue expression of *Fugu rubripes* prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 294: 912-917.

- ◆ van Rheede T., Smolenaars MMW., Madsen O., de Jong WW., 2003. Molecular Evolution of the Mammalian Prion Protein. *The Society for Molecular Biology and Evolution*; 20(1): 111-121.
  - ◆ Weissmann C., Enari M., Klöhn PC., Rossi D., Flechsig E., 2002. Molecular biology of prions. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*; 62: 153-166.
-

