



The effect of alpha-ketoglutarate on a piscine skin model: a molecular and morphological study

Rita Alves Costa

Nº 17723

Dissertação orientada por:

Professora Doutora Deborah Power
Faculdade de Ciências e Tecnologias
Universidade do Algarve

Faro 2009

*Dissertation presented at the University of Algarve
for obtention of a MsC. Degree in Biomedical Sciences*

*Dissertação apresentada à Universidade do Algarve
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas*

The contents of this dissertation are of exclusive responsibility of the author.

O conteúdo deste trabalho é da exclusiva responsabilidade da autora.

Rita Alves Costa

Acknowledgements

First of all I would like to acknowledge my supervisor Professor Doctor Deborah Power. I have to thank her for the opportunity of concluding this master while working at her lab at the same time and for all the support, encouragement and confidence trusted in me and my work.

I thank Professor Doctor Adelino Canário for receiving me in his research team.

I would also like to acknowledge Professor Adrian Paul Harrison, from the Department of Animal Health at the University of Copenhagen for the analysis of the aorta elastic recoil and promptly answers to my emails! I thank Dr. Toni Ibarz i Vals, from the Department of Physiology at the University of Barcelona for the analysis of blood transaminases.

Very special thanks to all my colleagues at the lab that explained me more details of some molecular biology techniques and Doctor Dulce Estêvão for the *in situ* probes and commenting some parts of this thesis.

I have to thank Nadia Silva, my dear friend and colleague from whose work I have learned so much from, and Ângela Ramos for their companionship inside and outside the lab during the last years!

Last but not least, I have to thank my family for their support and encouragement in one more journey, and Nuno for making me realise what is important!

O alfa-cetoácido (AKG) é um intermediário chave no ciclo do ácido tricarbóxico com um importante papel no metabolismo dos aminoácidos. Quando administrado como um suplemento é parcialmente convertido para CO₂, ficando uma parte disponível para actuar no organismo. Nos últimos anos vários trabalhos têm demonstrado que o AKG melhora a mineralização do osso, tanto o cortical como o trabecular, tornado os ossos mais fortes e resistentes e este efeito está relacionado com o aumento da síntese de colagénio, a base do processo de mineralização. O suplemento de AKG leva ao aumento do *pool* de prolina, que é um aminoácido que, quando hidrolisado pela prolil-4-hidroxilase (P4H), é essencial para a constituição da hélice tripla da molécula de colagénio. Neste trabalho pretendeu-se avaliar o efeito da administração oral de AKG na pele e escamas regeneradas da dourada *Sparus aurata*, uma espécie importante em aquacultura, tendo como hipótese que a síntese de colagénio seria estimulada. As escamas do lado esquerdo de dezanove exemplares adultos de dourada foram removidas e estes foram separados em três grupos experimentais e alimentados durante 14 dias com amêijoia – grupo Controlo, amêijoia suplementada com 0.1g/kg AKG (Gramineer International AB) – grupo tratado e com 140 mg de cálcio – grupo Placebo. A análise dos parâmetros plasmáticos no fim do período experimental revelou que a condição fisiológica dos animais não foi afectada com o procedimento experimental, uma vez que os níveis de cortisol, estradiol, cálcio e fósforo não foram afectados. No grupo AKG, o nível da transaminase aspartato-aminotransferase (AST) estava significativamente ($P < 0.05$) mais elevado do que no grupo Controlo, mas não o da alanina-aminotransferase (ALT), provavelmente devido à maior disponibilidade do AKG em circulação.

Foi feita uma caracterização morfológica da pele aquando da remoção das escamas, do tecido regenerado e do tecido intacto recorrendo a duas colorações: tricrómio de Masson e vermelho de picro sirius. Com 14 dias de regeneração, a pele da dourada em todos os grupos experimentais já tinha recuperado da agressão inicialmente induzida pela remoção das escamas. A epiderme formava um contínuo sobre a derme e dentro do *scale pocket* já restabelecido observou-se uma escama regenerada, semelhante à escama intacta mas mais fina. Para ambas as escamas, foi possível observar a estrutura típica das escamas elasmóides, com uma placa basal composta por camadas de colagénio mineralizado orientadas a 90° umas das outras. A observação do tecido corado com picro sirius pôs em evidência a birrefringência do colagénio sob luz polarizada. A placa basal das escamas tinha uma cor amarela,

proveniente do colagénio I que constitui a sua base de mineralização, e nas superfícies superior e inferior das escamas observou-se uma camada de pequenas fibras de colagénio, provavelmente colagénio I associado ao colagénio V ou mesmo elastina, identificadas pela sua cor azul-esverdeada sob luz polarizada. No grupo AKG, a membrana basal da epiderme tinha também uma cor azulada e era mais espessa do que nos grupos Controlo e Placebo. Ainda neste grupo, observou-se uma camada amarela sobre e ao longo da camada basal das células da epiderme. Esta não foi observada nos outros grupos experimentais e indica que poderá ter ocorrido uma maior síntese de colagénio I nestes indivíduos. A pele da dourada foi também caracterizada através de imunohistoquímica. Na epiderme, a presença de células reactivas com o antigene celular de células em renovação (PCNA) e p63 demonstrou que este era um tecido muito activo, com uma elevada taxa de renovação e substituição celular. As células da camada basal da epiderme e as células associadas à região posterior das escamas, na derme, reagiram com o anticorpo para a osteonectina (OSN) de dourada, demonstrando a importância desta proteína na matriz extra celular (ECM). Os osteoblastos associados às escamas intactas e regeneradas de todos os grupos experimentais reagiram com as sondas para o colagénio I e osteonectina de dourada e estavam dispersos ao longo das superfícies superior e inferior das escamas, aparecendo em maior número na região posterior das escamas. É a partir deste local que progride a frente de mineralização que leva ao crescimento das escamas. Nestas mesmas zonas foi detectada a presença de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), que permitiu a identificação dos osteoblastos associados à escama. Foram deste modo identificados os dois tipos de células responsáveis pela formação, crescimento e modelação das escamas.

A quantificação por qPCR da cadeia $\alpha 1$ do colagénio I de dourada (ColI $\alpha 1$) e da proteína de matriz osteopontina (SPP1) não revelou diferenças significativas na expressão destes dois genes entre grupos. Uma grande dificuldade encontrada neste método foi a validação de um gene de referência adequado para este tecido caracterizado por uma grande dinâmica celular, pelo que um gene de referência mais adequado terá ainda que ser escolhido e validado. Não obstante esta limitação, a expressão de ColI $\alpha 1$ e SPP1 foi mais elevada no tecido intacto e no tecido regenerado, respectivamente, do grupo tratado com AKG. A análise do módulo elástico das aortas dos diferentes grupos experimentais demonstrou que no grupo tratado com AKG este tecido é mais elástico, tem uma maior capacidade de resistir a uma deformação e mesmo assim recuperar a forma original do que as aortas do grupo Controlo. A quantificação do conteúdo da proteína colagénio I iria proporcionar uma ideia mais concisa do que se passa no tecido após administração de AKG.

Este foi o primeiro estudo direccionado ao efeito do AKG em tecidos de um teleósteo. Foi observado um efeito sobre a síntese de colagénio na pele e escamas da dourada, no entanto é ainda necessário mais trabalho para que esse efeito seja quantificado.

ABSTRACT

Alpha-ketoglutarate (AKG) is a key intermediate in the tricarboxylic acid cycle with important functions in glutamate and glutamine metabolism. Its effect after oral administration was studied in adult sea bream *Sparus aurata* skin and scales in order to evaluate the effect on collagen synthesis. Scales were removed from one side of the body and allowed to regenerate for 14 days; the control group received untreated food, the AKG (calcium salt) group received 0.1g/kg in the diet (Gramineer International AB) and the placebo group received food treated with 140 mg calcium pills. AKG administration did not affect cortisol, estradiol, calcium or phosphorus levels in sea bream plasma, but the levels of aspartate-aminotransferase (AST) were higher in the AKG treated group when compared to the Control. AKG administration did not modify the overall organisation of the sea bream skin or of scale regeneration, as observed after tissue staining with Masson's Trichrome. However, in the epidermis of the AKG treated group, the basement membrane was thicker than in the other groups both in the intact and regenerated scale, as revealed by birefringence under polarized light, which revealed a strong yellow band corresponding to collagen type I that was not observed in the control or placebo groups. Scale osteoblasts were identified by *in situ* hybridization with specific riboprobes and osteoclasts by TRAP staining and the content of Coll α 1 and osteopontin in intact and regenerating skin was evaluated by qPCR. No differences in the expression of these two genes were observed between experimental groups, but an adequate reference gene still needs to be identified. Assessment of the elastic recoil of aortas from each experimental group revealed it was significantly higher in the AKG group compared to the control and this modification in rats was associated with an increase in collagen synthesis. This is in agreement with the increase in collagen detected in the skin by birefringence under polarized light in AKG treated fish although this observation will require confirmation by quantification of the collagen. In conclusion, the results of the present study provide evidence that AKG administration modifies collagen synthesis in sea bream. Further studies are required to confirm the effect of AKG on collagen synthesis and its mechanism of action during skin and scale regeneration.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER 1 – General introduction	1
1.1 Alpha-ketoglutarate	2
1.2 Alpha-ketoglutarate supplementation	3
1.3 Alpha-ketoglutarate and synthesis of collagen	4
1.4 The skin	5
1.5 Teleosts scales	7
1.6 Collagen in teleosts skin and scales	8
1.7 Characteristics of bone tissue in higher vertebrates and teleosts	9
1.8 Calcium balance and mineral turnover in higher vertebrates	11
1.9 Calcium balance and mineral turnover in teleosts	12
1.10 Studies on calcium mobilization from fish scales and bone	13
1.11 The sea bream skin and scales as a model	13
Objectives	15
CHAPTER 2 – General materials and methods	16
2.1 Experimental animals and set up	17
2.2 Tissue sampling and processing	18
2.3 General Histology	19
2.3.1 Haematoxylin-eosin staining	19
2.3.2 Masson’s trichrome staining	19
2.3.3 Picro-sirius birefringence for collagen	20
2.3.4 Demonstration of TRAP in sea bream scales	21

2.4 Immunohistochemistry	21
2.5 mRNA tissue distribution by in situ hybridization	23
2.5.1 Riboprobe synthesis	23
2.5.1.1 Competent cells transformation	23
2.5.1.2 Plasmidic DNA extraction	24
2.5.1.3 Preparation of template DNA – linearization and purification	24
2.5.1.4 In vitro transcription	25
2.5.2 In situ hybridization	25
2.6 Plasma parameters	26
2.6.1 Determination of plasma calcium	26
2.6.2 Determination of plasma phosphorus	27
2.6.3 Radioimmunoassays for Cortisol and Estradiol	28
2.6.4 Plasma transaminases enzymatic assays	29
2.7 Sea bream aorta elasticity	30
2.7.1 Aorta preparation	30
2.7.2 Force measurements	30
2.7.3 Elastic recoil calculations	31
2.7.4 Statistical analyses	31
2.8 Analysis of gene expression	31
2.8.1 Total RNA extraction	32
2.8.2 RNA purification	34
2.8.3 cDNA synthesis	34
2.8.4 Cloning of genes of interest	35
2.8.4.1 Database search and semi-quantitative PCR	35

2.8.4.2 Confirmation of fragment identity	37
2.8.5 qPCR Primer Design	37
2.8.6 qPCR pre-run tests	38
2.8.7 Preparation of standard curve	40
2.8.8 Preparation of cDNA dilutions	42
2.8.9 qPCR	42
2.8.10 Data processing	43
2.8.11 Normalization	43
2.8.12 Statistics	43
CHAPTER 3 – Morphological characterization of sea bream skin and scales after oral administration of AKG	44
3.1 Introduction	45
3.2 Materials and Methods	46
3.2.1 Experimental animals and set up	46
3.2.2 Tissue sampling and processing	46
3.2.3 Plasma parameters	47
3.2.4 General histology	47
3.2.5 Sea bream aorta elastic recoil	47
3.3 Results	48
3.3.1 Plasma parameters	48
3.3.2 Morphology of sea bream skin	50
3.3.3 Collagen fibers birefringence	53
3.3.4 Aorta Elastic Recoil	55

3.4 Discussion	55
3.4.1 Plasma parameters	56
3.4.2 Morphology of sea bream skin	58
3.4.3 Collagen fibers birefringence	60
3.4.4 Sea bream aorta elastic recoil	60
CHAPTER 4 – Molecular characterization of sea bream skin and scales after oral administration of AKG	62
4.1 Introduction	63
4.2 Materials and Methods	64
4.2.1 Experimental animals and set up	64
4.2.2 Tissue sampling and processing	64
4.2.3 Immunohistochemical study on sea bream skin	64
4.2.4 Demonstration of TRAP activity	65
4.2.5 Expression of Collα1 and SPP1 in sea bream skin and scales by qPCR	66
4.2.6 In situ hybridization for collagen type I and osteonectin	67
4.3 Results	69
4.3.1 Immunohistochemical characterization of sea bream skin	69
4.3.1.2 Proliferating Cell Nuclear Antigene (PCNA)	69
4.3.1.3 p63	69
4.3.1.4 Osteonectin	69
4.3.2 Expression of Collα1 and SPP1 in sea bream skin and scales by qPCR	71
4.3.2.1 Collagen type I (Collα1)	72
4.3.2.2 Osteopontin (SPP1)	74
4.3.3 Cells involved in mineral turnover in sea bream scales	76

4.4 Discussion	77
4.4.1 Immunohistochemical characterization of sea bream skin	78
4.4.2 Cells involved in mineral turnover in sea bream scales	79
4.4.2.1 Interaction between epidermis and dermis	81
4.4.3 Expression of collagen I and osteopontin in sea bream skin and scales	82
CHAPTER 5	85
5. General Discussion	86
References	88
Appendix	96

LIST OF FIGURES

CHAPTER 1 – General introduction

- Figure 1. 1** – Diagram representing the tricarboxylic acid cycle. 3
- Figure 1. 2** – Schematic representation of the role of alpha-ketoglutarate in collagen production. 5
- Figure 1. 3** – Different layers of human skin. 7
- Figure 1. 4** – Scale formation in the zebrafish *Danio rerio*. 9
- Figure 1. 5** – Diagram of ontogenetic and regenerated scales of *Poecilia reticulata* (Actinopterygii, Cyprinodontiformes) showing different layers of the elasmoid scale in teleosts. 10
- Figure 1. 6** – General structure of the bone in higher vertebrates. 11

CHAPTER 2 – General materials and methods

- Figure 2. 1** – qPCR optimization of annealing temperatures for *Collα1* (in yellow) and *SPP1* (in red). 40
- Figure 2. 2** – qPCR standard curve optimization for *SPP1* gene and 5-fold test sample cDNA dilutions. 42

CHAPTER 3 – Morphological characterization of sea bream skin and scales after oral administration of AKG

- Figure 3. 1** – Plasma parameters determined for the Control ($n = 7$), AKG ($n = 7$) and Placebo ($n = 5$) groups. 49
- Figure 3. 2** – Transaminases in sea bream plasma samples. 50
- Figure 3. 3** – Transverse section of sea bream skin stained with Masson's Trichrome.. 51
- Figure 3. 4** – Longitudinal transverse sections of sea bream skin from the Control (A-C), AKG (D-F) and Placebo (G-I) groups, with the intact (original), missing or regenerated scales stained with Masson's Trichrome. 53
- Figure 3. 5** – Transversal sections of the regenerated sea bream skin from the Control (A and B), AKG (C and D) and Placebo (E and F) groups stained with sirius red and observed under polarized light. 55
- Figure 3. 6** – Aorta elastic recoil. Control ($n = 6$), AKG ($n = 5$) and Placebo ($n = 5$). 56

CHAPTER 4 – Molecular characterization of sea bream skin and scales after oral administration of AKG

- Figure 4. 1** – IHC for PCNA, p63 and osteonectin in the regenerated skin/scale of sea bream from the Control (A-C), AKG (D-F) and Placebo (G-I) groups. 71
- Figure 4. 2** – IHC for osteonectin in the regenerated skin/scale of sea bream from the Placebo group. 72
- Figure 4. 3** – Expression of *sbCollα1* in sea bream skin and scales (intact and 14 days regenerated) from the Control ($n = 7$), AKG ($n = 7$) and Placebo ($n = 5$) groups. 73
- Figure 4. 4** – Relative expression of *sbSPP1* in sea bream skin and scales (intact and 14 days regenerated) from the Control ($n = 6$), AKG ($n = 7$) and Placebo ($n = 5$) groups. 75
- Figure 4. 5** – ISH with DIG-labelled riboprobes for *sbCollα1* and *sbOSN* and demonstration of TRAP in the regenerated skin/scale of sea bream from the Control (A-C), AKG (D-F) and Placebo (G-I) groups. 78

LIST OF TABLES

CHAPTER 2 – General materials and methods

Table 2. 1 – Name of the gene, accession number and database where it is localised.	35
Table 2. 2 – Primers name, sequence, amplified fragment size (base pares) and temperature of annealing for semi-quantitative PCR.	36

CHAPTER 4 - Molecular characterization of sea bream skin and scales after oral administration of AKG

Table 4. 1 – Primary antibodies used in immunohistochemical study.	65
Table 4. 2 – Cloning vectors, restriction enzymes, RNA polimerase and size of both probes to be analysed: <i>Sparus aurata</i> alpha 1 – collagen type I and <i>Sparus aurata</i> osteonectin.	68
Table 4. 3 – Raw data from the qPCR for collagen type I.	72
Table 4. 4 – Raw data from the qPCR for oeteopontin (SPP1).	74

LIST OF ABBREVIATIONS

AKG – Alpha-ketoglutarate
TCA – Tricarboxylic Acid Cycle
NADH – reduced nicotinamide adenine dinucleotide
FADH₂ – reduced flavin adenine dinucleotide
GTP – guanosine 5-triphosphate
GDH – glutamate dehydrogenase
BCAT – branched-chain amino acid transferase
Gly – glycine
P4H – prolyl-4-hydroxylase
P5C – pyrroline 5-carboxylate
PTH – Parathyroid Hormone
PTHrP – Parathyroid Hormone-related Protein
PTHR – Parathyroid Hormone Receptor
GH – Growth Hormone
CT – Calcitonin
E₂ – 17 β -oestradiol
ER – Estrogen Receptor
Coll α 1 – alpha 1 collagen type I
SPP1 – Secreted Phosphoprotein 1
IGF-1 – Insulin-like growth factor 1
OKG – ornithine alpha-ketoglutarate
ECM – Extra cellular matrix
SPARC – Secreted Acidic Protein in Cartilage
OSN – Osteonectin
TRAP – Tartrate-resistant acid phosphatase
AST – aspartate-aminotransferase
ALT – alanine-aminotransferase
MDH - malic dehydrogenase
DNA – deoxyribonucleic acid
dsDNA – double-stranded DNA
cDNA – complementary DNA
RNA – ribonucleic acid
cRNA – complementary RNA
mRNA – messenger RNA
PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigene
PCR – Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR – real-time quantitative polymerase chain reaction
C_T – threshold cycle

T_a – annealing temperature
 T_m – melting temperature
IU – International Units
GAPDH – glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
PFA – Paraformaldehyde
PBS – Phosphate Buffer Saline
PBST – Phosphate-Triton Buffer
EDTA – Ethylenediaminetetraacetic acid
APES – 3-aminopropyltriethoxysilane
DEPC – Diethylpyrocarbonate
PRS – pararosaniline
DAB – 3,3'-diaminobenzidine
NBT – 4-nitroblue tetrazolium chloride
BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
TCT – Tris-Carrageenan Triton X-100
CHAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulphonate
HIER – Heat Induced Epitope Retrieval
MCS – Multiple Cloning Site
SDS – Sodium Dodecyl Sulphate
rpm – rotations per minute
cpm – counts per minute
PTW – Phosphate-Tween Buffer
SSC – Sodium chloride-sodium citrate buffer
ABS – absorbance
RIA – radioimmunoassay
dNTPs – deoxyribonucleotide triphosphates