

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
“ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ”

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη απομόνωσης
και παραγωγής πολυπεπτιδίων
της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού
με δραστικότητα GnSAF**

**ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΘΕΟΔΩΡΑΚΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**



ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2005



UNIVERSITY OF IOANNINA
MEDICAL SCHOOL

LABORATORY OF GENERAL BIOLOGY

ΠΡΟΣΚΛΗΣΗ

Στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Βιοτεχνολογία», η κ. Χριστίνα Θεοδωράκη θα παρουσιάσει τα αποτελέσματα της εργασίας της, για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος εξειδίκευσης την Τρίτη 5 Ιουλίου 2005 στις 13.00 στην αίθουσα 8 του συγκροτήματος αιθουσών διδασκαλίας της Ιατρικής Σχολής.

Παρακαλούμε να παρευρεθείτε.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

« ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ »

Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη απομόνωσης και παραγωγής πολυπεπτιδίων της
ανθρώπινης αλβουμίνης ορού με δραστικότητα GnSAF**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΘΕΟΔΩΡΑΚΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2005

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Βιοτεχνολογία».

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Σεφεριάδη που μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ ερευνητικά με τον παράγοντα GnSAF, αρχικά στα πλαίσια της πτυχιακής και κατά κύριο λόγο της μεταπτυχιακής μου εργασίας. Ιδιαίτερος ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή Ευστάθιο Φριλίγγο, ο οποίος επέβλεψε τη συγκεκριμένη εργασία και ήταν πάντα πρόθυμος και παρών στα ερωτήματα και τους προβληματισμούς μου. Του οφείλω πολλές από τις επιστημονικές γνώσεις που έχω αποκομίσει όλα τα χρόνια των πανεπιστημιακών σπουδών μου.

Ευχαριστώ όλους τους καθηγητές του Π.Μ.Σ. «Βιοτεχνολογία» για το πλήθος των γνώσεων που μου μετέδωσαν όλο αυτό το διάστημα. Συνετέλεσαν στη διεύρυνση των επιστημονικών μας οριζόντων, παρά το γεγονός ότι κάποιες φορές η μεγάλη πίεση που μας ασκήθηκε αποτέλεσε αναστολέα και όχι αρωγό στην προσπάθειά μας. Θεωρώ ανάγκη μου να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την αρμονική συνεργασία που είχαμε.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Σωτηρία Ταβουλάρη που από τις πρώτες στιγμές μου στον εργαστηριακό χώρο ήταν κοντά μου, με δίδαξε με υπομονή και μου μετέδωσε τον ενθουσιασμό της για τη συγκεκριμένη ερευνητική δουλειά. Τη Ρούλα Ταβουλάρη και τη Γιώτα Καρατζά ευχαριστώ για τη στήριξη και τη φιλία τους μέσα και έξω από το χώρο του εργαστηρίου καθώς επίσης και τους φίλους μου που ήταν και είναι κοντά μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από την καρδιά μου τον Πάνο που είναι πλάι μου σε όλες τις δύσκολες και ευχάριστες στιγμές της ζωής μου. Η συνεχής παρουσία και υποστήριξή του συνέβαλε ουσιαστικά στο να μη χάνω τους στόχους μου και να βρίσκομαι εδώ σήμερα. Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερος τις αδερφές και τους γονείς μου, που μου δίνουν απλόχερα την αγάπη τους, είναι κοντά σε κάθε απόφασή μου, με στηρίζουν πάντα και μου δίνουν τη δύναμη να συνεχίζω να προσπαθώ.

Αφιερώνεται
στους γονείς μου
και στον Πάνο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (GnSAF) είναι ένας μη στεροειδής, μη ταυτοποιημένος μέχρι σήμερα ωθητικός παράγοντας, ο οποίος δρα στην υπόφυση ρυθμίζοντας την έκκριση της LH. Σε προηγούμενες μελέτες ο παράγοντας αυτός έχει συσχετιστεί με το C-τελικό 95πεπτιδίο της HSA, το οποίο παρήχθη σε ανασυνδυασμένη μορφή στο σύστημα έκφρασης-έκκρισης του *Pichia pastoris* και δείχθηκε ότι σε επίπεδο υπερκειμένων εμφανίζει δραστικότητα GnSAF.

Στην παρούσα μελέτη απομονώσαμε για πρώτη φορά τον ανασυνδυασμένο υποτομέα IIIB της HSA από υπερκείμενα καλλιέργειών του ζυμομύκητα *P. pastoris* σε καθαρή μορφή. Μελετήσαμε το παρασκεύασμα αυτό ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επίμυων και διαπιστώσαμε ότι είναι ενεργό. Δηλαδή αναστέλλει την επαγόμενη από την GnRH έκκριση LH χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών ή την GnRH-επαγόμενη έκκριση της FSH. Δείξαμε επίσης ότι τομέας III σε ανασυνδυασμένη καθαρή μορφή αλλά και ολόκληρη η HSA, που περιέχουν τον υποτομέα IIIB είναι ανενεργά μόρια.

Επιπλέον αναπτύξαμε μια τεχνική που περιλαμβάνει δυο στάδια χρωματογραφίας Blue Sepharose για την απομάκρυνση της αλβουμίνης από το ανθρώπινο ωθυλακικό υγρό. Με τον τρόπο αυτό εξαλείφονται οι πιθανές επιπλοκές που προκαλεί η HSA στην ανίχνευση της δραστικότητας από τα βιολογικά υγρά.

Τέλος ασχοληθήκαμε με τον πιθανό φυσιολογικό τρόπο παραγωγής του ενεργού πολυπεπτιδίου στο κύτταρο. Προσεγγίσαμε το ενδεχόμενο παραγωγής του ενεργού υποτομέα IIIB μέσω σχάσης της HSA παρουσία πρωτεολυτικών ενζύμων. Η πιθανότητα οι κασπάσες να παίζουν ρόλο στην παραγωγή του παράγοντα GnSAF είναι ιδιαίτερος ενδιαφέρονσα και χρήζει περαιτέρω μελέτης.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- APS (ammonium persulfate) = υπερθειϊκό αμμώνιο
- BCA (bicinchonic acid) = δικιγγονικό οξύ
- BMGY (Buffered complex medium containing glycerol)
- BMMY (Buffered complex medium containing methanol)
- BSA (bovine serum albumin) = αλβουμίνη ορού βοός
- cDNA (complementary DNA) = συμπληρωματικό DNA
- c-myc (cellular myc) = πρωτοογκογονίδιο c-myc
- competent ELISA (competent enzyme linked immunosorbent assay) = συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο
- DAG (diacylglycerol) = διακυλογλυκερόλη
- DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) = φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- DTT (dithiothreitol) = διθειοθρεϊτόλη
- EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) = αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
- FCS (fetal calf serum) = εμβρυϊκός ορός μόσχου
- FSH (Follicle stimulating hormone) = ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη
- FSHβ = β υπομονάδα της FSH
- GnRH (Gonadotrophin releasing hormone) = ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών
- GnRHR (Gonadotrophin releasing hormone receptor) = υποδοχέας της GnRH
- GnSAF (Gonadotrophin surge attenuating factor) = παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών
- GnSIF (Gonadotrophin surge inhibiting factor) = παράγοντας αναστολής του κύματος των γοναδοτροπινών
- hFF (human follicular fluid) = ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό
- HRP (horseradish peroxidase) = υπεροξειδάση ραπανιού
- HSA (Human serum albumin) = ανθρώπινη αλβουμίνη ορού
- LH (Luteinizing hormone) = ωχρινοτρόπος ορμόνη
- LHβ = β υπομονάδα της LH
- MAPK (Mitogen activated protein kinase) = πρωτεϊνική κινάση ενεργοποιούμενη από μιτογόνα

- NaPi = ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με νάτριο
- OPD (o-phenylene diamine) = ορθο-φαινυλενεδιαμίνη
- PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) = ηλεκτροφόρηση επί πήγματος πολυακρυλαμιδίου
- PBS (phosphate buffered saline) = ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών
- PBST (phosphate buffered saline-Tween 20) = ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με Tween 20
- PCR (polymerase chain reaction) = αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης
- PKC (protein kinase C) = πρωτεϊνική κινάση C
- PLC (phospholipase C) = φωσφολιπάση C
- PVDF (polyvinylidene fluoride) = πολυβινυλιδενικό φθορίδιο
- rFSH (rat FSH) = FSH επίμυος
- rLH (rat LH) = LH επίμυος
- SDS (sodium dodecyl sulphate) = δωδεκυλοθειϊκό νάτριο
- TBST (Tris buffered saline-Tween 20) = ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween 20
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine = N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενο-διαμίνη
- YPDS (Yeast extract peptone-dextrose-sorbitol medium) = θρεπτικό μέσο εκχυλίσματος ζύμης πεπτόνης-γλυκόζης-σορβιτόλης
- v/v (volume per volume) = όγκος κατ' όγκο
- w/v (weight per volume) = βάρος κατ' όγκο

Αμινοξέα

A (Ala) = αλανίνη	M (Met) = μεθειονίνη
C (Cys) = κυστεΐνη	N (Asn) = ασπαραγίνη
D (Asp) = ασπαραγινικό οξύ	P (Pro) = προλίνη
E (Glu) = γλουταμινικό οξύ	Q (Gln) = γλουταμίνη
F (Phe) = φαινυλαλανίνη	R (Arg) = αργινίνη
G (Gly) = γλυκίνη	S (Ser) = σερίνη
H (His) = ιστοιδίνη	T (Thr) = θρεονίνη
I (Ile) = ισολευκίνη	V (Val) = βαλίνη
K (Lys) = λυσίνη	W (Trp) = τρυπτοφάνη
L (Leu) = λευκίνη	Y (Tyr) = τυροσίνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΩΟΘΗΚΩΝ	2
1.2 Η ΟΡΜΟΝΗ ΕΚΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Releasing Hormone-GnRH)	4
1.3 Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor,GnSAF)	7
1.4 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΟΡΟΥ (Human Serum Albumin-HSA)	9
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	13
2.1 ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	14
2.1.1 Όργανα.....	14
2.1.2 Χημικά αναλώσιμα	14
2.1.3 Βιολογικά υγρά-Πειραματόζωα.....	15
2.1.4 Στέλεχος μυκήτων-Πλασμίδια.....	16
2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA ΠΟΥ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΕ ΑΝΕΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ HSA	17
2.3 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ-ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ <i>Pichia pastoris</i>	17
2.3.1 Χημικός μετασχηματισμός του <i>P. pastoris</i>	17
2.3.2 Έκφραση-έκκριση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων στον <i>P. pastoris</i>	18
2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GnSAF ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΝΗΣ	19
2.4.1 Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επίμυων	19
2.4.2 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστηρότητας GnSAF.....	20
2.4.3 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστηρότητας ανασταλτίνης.....	21

2.4.4	Συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (competent ELISA).....	22
2.5	ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ.....	24
2.5.1	Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE).....	24
2.5.2	Χρώση πήγματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου.....	25
2.5.3	Ανοσοαποτύπωση (Western blotting).....	25
2.5.4	Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων με στήλη νικελίου.....	26
2.5.5	Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία Blue Sepharose.....	27
2.5.5.1	Καθαρισμός του τομέα III της HSA από υπερκείμενα καλλιέργειας του <i>P. pastoris</i>	27
2.5.5.2	Απομάκρυνση της αλβουμίνης από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό.....	28
2.5.6	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA.....	29
2.6	ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΣΧΑΣΗΣ ΤΗΣ HSA ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ III.....	30
2.6.1	Πρωτόκολλο πρωτεολυτικής σχάσης από την καθεψίνη B.....	30
2.6.2	Πρωτόκολλο πρωτεολυτικής σχάσης από κασπάσες.....	30
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	32
3.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ DIII ΚΑΙ DIIIb-myc-6His ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΟΥ <i>P. pastoris</i>.....	33
3.1.1	Καθαρισμός του πολυπεπτιδίου DIIIb-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni ²⁺	33
3.1.2	Καθαρισμός του τομέα III με χρωματογραφία Blue Sepharose.....	37
3.1.3	Απομάκρυνση της HSA από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό.....	39
3.2	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GnSAF ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΤΟΜΕΑ IHB-myc-6His, ΤΟΝ ΤΟΜΕΑ III ΚΑΙ ΤΗΝ HSA.....	41
3.2.1	Προσδιορισμός δραστικότητας GnSAF του DIIIb-myc-6His και του DIII σε καθαρισμένα παρασκευάσματα.....	41
3.2.2	Προσδιορισμός δραστικότητας GnSAF για τον τομέα III και την HSA σε μεγάλες συγκεντρώσεις.....	43

3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΣΧΑΣΗΣ ΤΗΣ ΗSA ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ ΙΙΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ	45
3.3.1 Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της ΗSA και του τομέα ΙΙΙ παρουσία καθεψίνης Β.....	45
3.3.2 Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της ΗSA παρουσία κασπασών.....	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
5. ΑΝΑΦΟΡΕΣ	62

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΑΞΟΝΑ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΩΟΘΗΚΩΝ

Ο εμμηνορρυσιακός κύκλος περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια την ωοθυλακική φάση (follicular phase) και την ωχρινική φάση (luteal phase). Η ωοθυλακική φάση διακρίνεται στην πρώιμη ωοθυλακική φάση, στη μέση και στην περιοωρηκτική που καταλήγει στην ωοθυλακιορρηξία. Η ομαλή εξέλιξη των κρίσιμων γεγονότων του κύκλου, εξαρτάται από τη ρύθμιση μιας σειράς πολύπλοκων μηχανισμών θετικής και αρνητικής ανάδρασης ανάμεσα στον υποθάλαμο, την υπόφυση και τις ωοθήκες. Στη ρύθμιση αυτή συμμετέχουν τόσο στεροειδείς όσο και μη στεροειδείς ορμόνες.

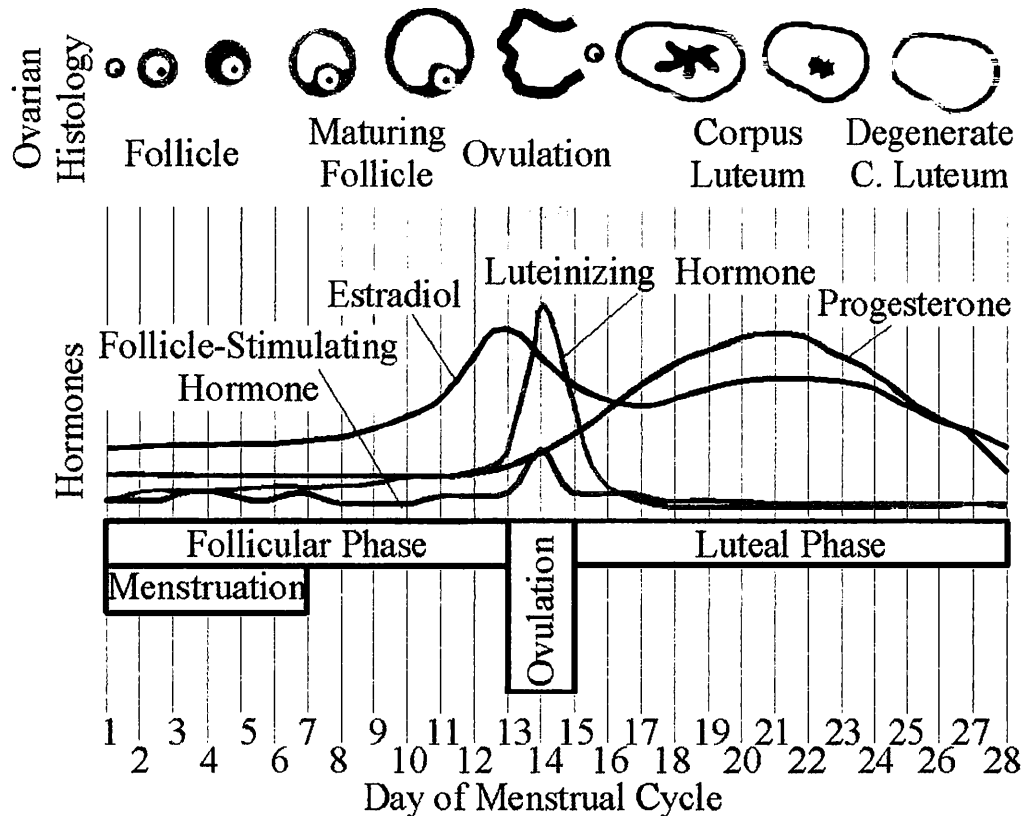
Η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin releasing hormone-GnRH), παράγεται από τον υποθάλαμο και επάγει την έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου (follicle stimulating hormone-FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone-LH) από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης.

Οι LH και FSH επάγουν την έκκριση των στεροειδών ορμονών, οιστραδιόλης και προγεστερόνης, από τις ωοθήκες. Η οιστραδιόλη με τη σειρά της επιδρά στη συχνότητα παλμών GnRH στον υποθάλαμο και συμβάλλει στην εμφάνιση του μεσοκύκλιου ή προωρηκτικού κύματος της LH (Nussey and Whitehead, 2001) (**Εικόνα 1.1**). Στην υπόφυση, σε συνδυασμό με την ανασταλτίνη, επηρεάζει αρνητικά τα επίπεδα έκκρισης της FSH (Fowler *et al.*, 2003). Η άλλη στεροειδής ορμόνη, η προγεστερόνη, αυξάνεται κατά την ωχρινική φάση και φαίνεται να παίζει ρόλο στην έκκριση της GnRH (Nussey and Whitehead, 2001) (**Εικόνα 1.1**).

Από τις ωοθήκες παράγονται επίσης και μη στεροειδείς ορμόνες που συντελούν στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Σε αυτές ανήκουν η ανασταλτίνη, η ακτιβίνη και η θυλακιοστατίνη. Οι δυο πρώτες αποτελούν εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας TGF- β . Η ανασταλτίνη δρα αρνητικά ενώ η ακτιβίνη θετικά στη ρύθμιση της έκκρισης της FSH. Η θυλακιοστατίνη είναι ένα γλυκοζυλιωμένο πολυπεπίδιο, με δράση την ελάττωση της έκκρισης της FSH.

Εκτός από τους προαναφερθέντες, υπάρχουν σημαντικές ενδείξεις σε πειραματικό επίπεδο, για την ύπαρξη ενός άλλου, μη στεροειδούς παράγοντα, ο οποίος ονομάστηκε παράγοντας αναστολής ή άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin Surge Inhibiting Factor-GnSIF ή Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF) (Sopelak and Hodgen, 1984, Messinis and

Templeton, 1989). Ο παράγοντας αυτός δρα στην υπόφυση, όπου ρυθμίζει τα επίπεδα της επαγόμενης από τη GnRH έκκρισης της LH.



Εικόνα 1.1 : Ο ανθρώπινος εμμηνορρυσιακός κύκλος. Ρύθμιση του κύκλου των ωοθυλακίων από τις ορμόνες της υπόφυσης (FSH και LH) και των ωοθηκών (οιστραδιόλη και προγεστερόνη) (τροποποιημένο από http://en.wikipedia.org/wiki/Menstrual_cycle).

Ovarian Histology, ιστολογία ωοθήκης. Maturing Follicle, ώριμο ωοθυλάκιο. Ovulation, ωοθυλακιόρρηξη. Corpus Luteum, ωρό σωματίο. Degenerate C. Luteum, εκφυλισμένο ω. σωματίο. Follicle-Stimulating Hormone (FSH), ωοθυλακιότροπος ορμόνη. Estradiol, οιστραδιόλη. Luteinizing Hormone (LH), ωχρινότροπος ορμόνη. Progesterone, προγεστερόνη. Menstruation, εμμηνορρυσία. Follicular Phase, ωοθυλακική φάση. Luteal Phase, ωχρινική φάση. Day of Menstrual Cycle, μέρα του εμμηνορρυσιακού κύκλου.

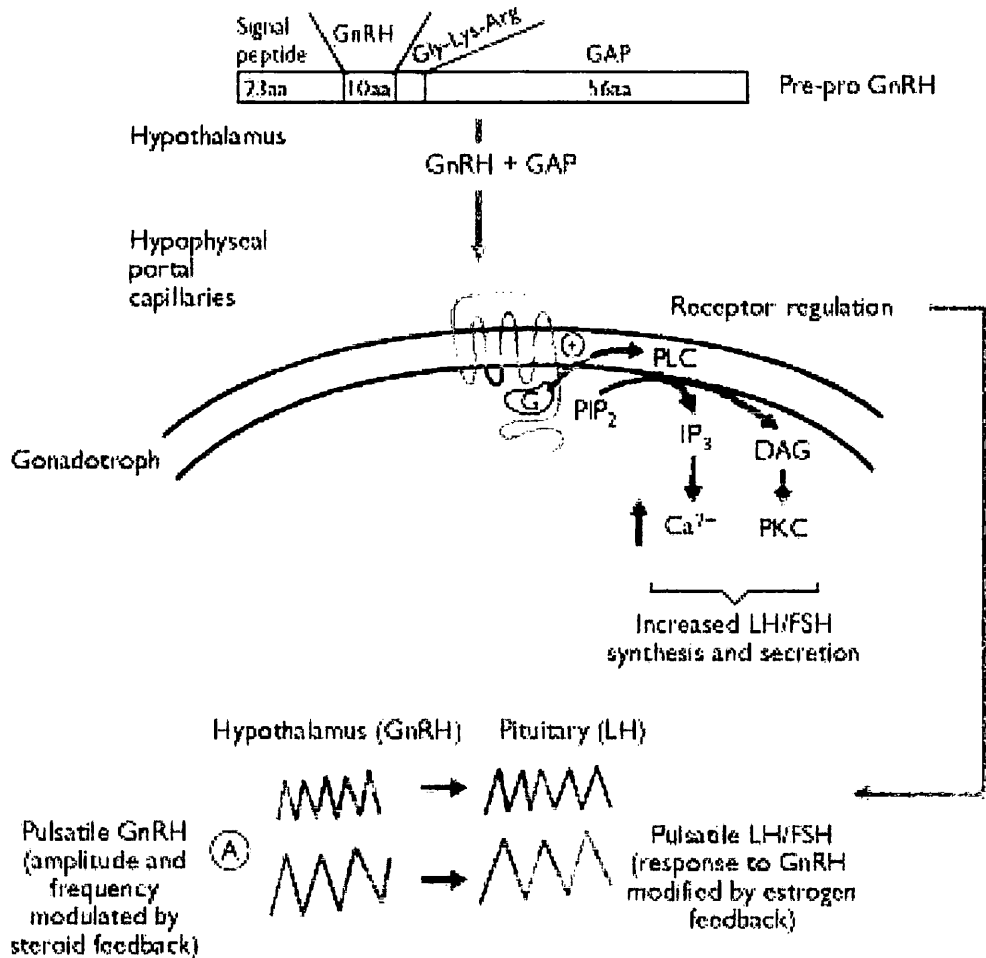
1.2 Η ΟΡΜΟΝΗ ΕΚΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Releasing Hormone-GnRH)

Καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών LH και FSH, έχει η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών GnRH. Πρόκειται για ένα δεκαπεπτίδιο H_3N^+ -GPRLGYSWHE-COO⁻ (Matsuo *et al.*, 1971, Schally *et al.*, 1971), το οποίο παράγεται κατά κύματα από τον υποθάλαμο και στη συνέχεια μεταφέρεται, μέσω της πυλαίας κυκλοφορίας, στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης.

Οι LH και FSH αποτελούν ετεροδιμερείς πρωτεΐνες των οποίων η α υπομονάδα είναι ταυτόσημη, ενώ η β υπομονάδα διαφέρει και είναι αυτή που προσδίδει εξειδίκευση. Επομένως η διαφορική ρύθμιση στην έκφραση των β υπομονάδων, καθορίζει τη διαφορική ρύθμιση των δυο ορμονών κατά τη διάρκεια του κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, η υψηλή συχνότητα παλμών της GnRH αυξάνει την έκφραση του γονιδίου της υπομονάδας β (LHβ) και ακολούθως την έκκριση της LH (Dalkin *et al.*, 1989). Από την άλλη, η χαμηλή συχνότητα παλμών μειώνει την έκφραση του LHβ, ενώ αυξάνει την έκφραση του FSHβ γονιδίου και συνεπώς την έκκριση της FSH (Dalkin *et al.*, 1989). Ακόμη η υψηλή πυκνότητα υποδοχέων της GnRH (GnRHR) στην επιφάνεια των κυττάρων ενισχύει την έκφραση του γονιδίου της υπομονάδας α των γοναδοτροπινών και του LHβ, ενώ η χαμηλή πυκνότητα GnRHR αυξάνει την έκφραση του FSHβ γονιδίου (Kaiser *et al.*, 1995).

Οι μηχανισμοί οι οποίοι συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων LHβ και FSHβ από την GnRH, είναι πιθανό να χρησιμοποιούν διαφορετικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος και ενδεχομένως να ενεργοποιούν διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες (Burger *et al.*, 2004). Σύμφωνα με μελέτες (Kakar *et al.*, 1992, Kakar *et al.*, 1993) αρχικά η GnRH δεσμεύεται στον επτα-διαμεμβρανικό υποδοχέα της (GnRHR). Ο τελευταίος αλληλεπιδρά με την ετεροτριμερή πρωτεΐνη G_q , προκαλώντας την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) και το σχηματισμό της 1, 4, 5 – τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) και της διακυλογλυκερόλης (DAG), έπειτα από υδρόλυση της 4,5-διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (PIP_2). Έτσι ξεκινά το σηματοδοτικό μονοπάτι DAG/ IP_3 (Lodish *et al.*, 2004). Η IP_3 ενεργοποιεί τα κανάλια Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου, με αποτέλεσμα την παροδική απελευθέρωση ιόντων Ca^{2+} στο κυτταρόπλασμα (Merelli *et al.*, 1992). Ιόντα Ca^{2+} προσδένονται στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC), η οποία οδηγείται στην

κυτταροπλασματική μεμβράνη, όπου ενεργοποιείται από την DAG (Horn *et al.*, 1991) (Εικόνα 1.2). Έχει γίνει πρόσφατα γνωστό, ότι η GnRH, μέσω της PKC, ενεργοποιεί τα μονοπάτια των MAP κινασών (mitogen activated protein kinases-MAPKs) που καταλήγουν, μεταξύ των άλλων, στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της α και β υπομονάδας των γοναδοτροπινών (Reiss *et al.*, 1997, Levi *et al.*, 1998, Roberson *et al.*, 1999).



Εικόνα 1.2 : Σύνθεση και δράση της GnRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (τροποποιημένο από Nussey and Whitehead, 2001).

GnRH, ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών. Signal peptide, σηματοδοτικό πεπτίδιο. Hypothalamus, υποθάλαμος. Hypophysial portal capillaries, υποφυσιακά τριχοειδή μεταφοράς. GAP, πεπτίδιο συνδεδεμένο με την GnRH. Gonadotroph, γοναδοτρόπο. Receptor regulation, ρύθμιση του υποδοχέα. PIP₂, 4,5-διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-inosιτόλης. PLC, φωσφολιπάση C. PKC, πρωτεϊνική κινάση C. IP₃, 1,4,5-τριφωσφορο-inosιτόλη. DAG, διακυλογλυκερόλη. Increased LH/FSH synthesis and secretion, αυξημένη LH/FSH σύνθεση και έκκριση. Pituitary, υπόφυση. Pulsatile, παλμοειδής.

1.3 Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor, GnSAF)

Μέσα από έρευνες που αναφέρονταν σε τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης, παρατηρήθηκε ότι, έπειτα από αγωγή χορήγησης γοναδοτροπινών εξωγενώς, που γινόταν με στόχο την υπερδιέγερση των ωοθηκών και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, το ενδογενές κύμα της LH αναστελλόταν και συνεπώς δεν πραγματοποιείτο ωοθυλακιορρηξία (Busbridge *et al.*, 1988, Messinis and Templeton, 1989, 1990a). Υπεύθυνος για το φαινόμενο αυτό θεωρήθηκε ένας νέος μη στεροειδής παράγοντας, ο οποίος ονομάστηκε παράγοντας αναστολής (Sopelak and Hodgen, 1984) ή άμβλυνσης (Messinis and Templeton, 1989) του εκκριτικού κύματος των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin Surge Inhibiting or Attenuating Factor, GnSIF/AF).

Στη συνέχεια, έρευνες έδειξαν ότι η δραστηριότητα GnSAF/GnSIF είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση της LH σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατά την ωοθυλακική φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Αυτό επιτυγχάνεται με διατήρηση της υπόφυσης σε κατάσταση χαμηλής διεγερσιμότητας σε GnRH, χωρίς παράλληλα να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών (Messinis and Templeton 1991; Korpenaal *et al.*, 1992; Tijssen *et al.*, 1997). Η δραστηριότητα GnSAF καθορίζονταν με βάση την ικανότητα μείωσης της έκκρισης της LH από την υπόφυση μετά από διέγερση με GnRH. Μέσα από πολλές έρευνες η δραστηριότητα αυτή έχει ανιχνευθεί στο ωοθυλακικό υγρό διαφόρων ειδών (Schenkøen and Hodgen, 1986, Busbridge *et al.*, 1988, Sopelak and Hodgen, 1984, Danforth and Cheng, 1995) συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου (Fowler *et al.*, 1990, Knight *et al.*, 1990, Fowler *et al.*, 1995).

Στο παρελθόν υποστηρίχθηκε ότι η ανασταλίνη μπορεί να έχει τη δραστηριότητα GnSAF που παρατηρείται (Culler *et al.*, 1992), καθώς και ότι ανασταλίνη και GnSAF μπορεί να έχουν κοινές βιολογικές δραστηριότητες (Campen and Vale 1988, Farworth *et al.*, 1988). Όμως βάσει πλήθους πειραματικών εργασιών, γίνεται σαφές ότι η ανασταλίνη και ο GnSAF, είναι δυο διαφορετικά μόρια με διαχωρισμένες δραστηριότητες (Danforth *et al.*, 1987, Fowler *et al.*, 1990, Knight *et al.*, 1990, Danforth *et al.*, 1993, Fowler *et al.*, 1994, Danforth *et al.*, 1995, Byrne *et al.*, 1995, Pappa *et al.*, 1999).

Σε ό,τι αφορά την απομόνωση του παράγοντα και την αναφορά κάποιας αλληλουχίας, έχει πραγματοποιηθεί μια σειρά μελετών. Η πρώτη από αυτές αναφέρει την απομόνωση κάποιου παράγοντα με δραστικότητα GnSAF από υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων Sertoli επίμυων (Tio *et al.*, 1994). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής ο παράγοντας που απομονώθηκε αντιστοιχεί σε μια πρωτεΐνη 37 kDa, με αλληλουχία αμινοτελικού άκρου NH₂-SDXXPQL. Η επόμενη αναφορά περιγράφει την απομόνωση μιας πρωτεΐνης με δραστικότητα GnSAF από χοίρειο ωοθυλακικό υγρό (Danforth and Cheng, 1995), MW 69 kDa και η αλληλουχία στο αμινοτελικό της άκρο είναι NH₂-SKPLAE. Τελευταία η δραστικότητα GnSAF συσχετίστηκε με πρωτεΐνες 60-66 kDa, που ανιχνεύθηκαν σε υπερκείμενα καλλιέργειας κοκκωδών/ωχρινικών κυττάρων από υπερδιεγερμένες ωοθήκες (Fowler *et al.*, 2002). Δόθηκε μια εσωτερική αλληλουχία EPQVYVHAP και μια αμινοτελική αλληλουχία NH₂-XVPQGNAGN.

Η πρώτη φορά που αναφέρεται η απομόνωση του GnSAF από ωοθυλακικό υγρό γυναικών με υπερδιεγερμένες ωοθήκες είναι σε μελέτη του 1999 (Pappa *et al.*, 1999). Η αναφερόμενη πρωτεΐνη μοριακού βάρους 12.5 kDa, δεν παρουσιάζει δραστικότητα ανασταλτίνης και αντιστοιχεί στο C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA), όπως διαπιστώθηκε με φασματοφωτομετρία μαζών (MS). Η συγκεκριμένη εργασία είναι η πρώτη στην οποία γίνεται ταυτοποίηση μιας αλληλουχίας ως προερχόμενης από κάποια γνωστή ανθρώπινη πρωτεΐνη. Επιπλέον είναι η μόνη που επιβεβαιώνεται με βάση μια πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη (Tavoulari *et al.*, 2004). Στην τελευταία, ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια της HSA παρήχθησαν με χρησιμοποίηση του ετερόλογου συστήματος έκφρασης-έκκρισης του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *Pichia pastoris* και στη συνέχεια ελέγχθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF. Εδείχθη ότι το C-τελικό 95πεπτίδιο (υποτομέας IIIB) της HSA (κατάλοιπα 490-585) μπορεί να εκφραστεί ως ανεξάρτητο μόριο και εμφανίζει ειδική δραστικότητα GnSAF στην αδενούπόφυση. Σε αντίθεση με τον υποτομέα IIIB, οι τομείς I, II, III καθώς και ολόκληρο το μόριο της HSA είναι ανενεργά.

1.4 Η ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗ ΟΡΟΥ (Human Serum Albumin-HSA)

Η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA) είναι μια πρωτεΐνη με 585 κατάλοιπα αμινοξέων, η οποία αποτελεί το 60% των πρωτεϊνών του ορού του αίματος. Βρίσκεται επίσης σε υψηλές ποσότητες σε άλλα βιολογικά υγρά, όπως το ωοθυλακικό. Η HSA εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα κύτταρα του ήπατος και στα ενήλικα άτομα υπάρχει στην αιματική κυκλοφορία, σε συγκεντρώσεις 40 g/L. Στην ώριμή της μορφή, πρόκειται για μια μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη χωρίς μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις στις πλευρικές ομάδες των καταλοίπων της (Peters *et al.*, 1996).

Σύμφωνα με αναλύσεις σε μοριακό και φυλογενετικό επίπεδο των αντίστοιχων ομόλογων αλληλουχιών DNA, πιστεύεται ότι η αλβουμίνη προέκυψε εξελικτικά με τριπλασιασμό του γονιδίου κάποιας αρχέγονης πρωτεΐνης 190 αμινοξέων (Gibbs and Dugaiczky, 1987). Η ώριμη HSA προκύπτει από την προαλβουμίνη με την απομάκρυνση ενός αμινοτελικού όπεπτιδίου, διαδικασία που λαμβάνει χώρα στο trans-Golgi ή στα εκκριτικά κοκκία και στη συνέχεια η πρωτεΐνη απελευθερώνεται από το κύτταρο (Peters *et al.*, 1996).

Η HSA συμβάλλει στη διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης του πλάσματος, προστατεύει τον οργανισμό με τη σύνδεσή του με τοξικά μόρια και κυρίως συνδέεται με διάφορους μεταβολίτες, τους οποίους μεταφέρει. Στην αλβουμίνη είναι δυνατόν να προσδένονται ανιοντικά, ουδέτερα και κατιοντικά μόρια. Ορισμένα από αυτά είναι λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, στεροειδείς ορμόνες, αιματίνη, βιλιρουβίνη, χολικά άλατα, ιόντα χαλκού, μαγνησίου, νικελίου, ασβεστίου, κατιοντικά φάρμακα. Επιπλέον έχει δειχθεί ότι έχει ενζυμική (Watanabe *et al.*, 2000, Kragh-Hansen *et al.*, 2002, Drmanovich *et al.*, 1999) και αντιαποπτωτική δράση (Zoellner *et al.*, 1996, Jones *et al.*, 2003, Erkan *et al.*, 2001). Ακόμη η αλβουμίνη συσχετίστηκε με τον αναπαραγωγικό κύκλο στα αρσενικά ζώα. Συγκεκριμένα, η αλβουμίνη απομονώθηκε από το ορχικό υγρό ως παράγοντας που επαυξάνει την επαγόμενη από LH παραγωγή προγνεολόνης από τα κύτταρα Leydig. Ίδια δράση παρουσιάζει η HSA, η αλβουμίνη βοός και επίμπος αλλά και το πεπτιδικό θραύσμα 1-387. Αντίθετα η αλβουμίνη όρνιθας και το ανθρώπινο πεπτιδικό θραύσμα 198-585 βρέθηκαν ανενεργά (Melsert *et al.*, 1988, 1989, 1991).

Το πλήρες ατομικό μοντέλο της HSA δόθηκε έπειτα από κρυσταλλογραφία απολιπιδιωμένης πρωτεΐνης (He and Carter, 1992). Η HSA (Εικόνα 1.3) αποτελείται από τρεις δομικά ομόλογους τομείς I, II, III (Peters *et al.*, 1996), καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει δυο υποτομείς A και B, με τους τρεις A (IA, IIA, IIIA) και ανάλογα τους τρεις B (IB, IIB, IIIB) να είναι δομικά ομόλογοι μεταξύ τους. Το μόριο της αλβουμίνης περιέχει κατά 67% α-έλικες, 10% β-στροφές και το 23% εκτεταμένες αλυσίδες, ενώ απουσιάζουν β-πτυχωτές επιφάνειες. Η μορφή των ελίκων είναι όμοια σε καθέναν από τους τρεις τομείς. Συγκεκριμένα σε κάθε A υποτομέα υπάρχουν 6 α-έλικες ενώ σε κάθε B υποτομέα υπάρχουν 4 α-έλικες (Carter and Ho, 1994). Οι υποτομείς A και B του κάθε τομέα συνδέονται με εκτεταμένες επιφάνειες ενώ η σύνδεση μεταξύ των διαδοχικών τομέων γίνεται με περιοχές έλικας.

Παλαιότερα με πρωτεολυτική ή χημική σχάση της HSA λαμβάνονταν θραύσματα από τα οποία προέκυπταν πληροφορίες σχετικά με τις θέσεις δέσμευσης διαφόρων μορίων στο μόριο της αλβουμίνης. Το μειονέκτημα όσον αφορά τα θραύσματα, ήταν η μη ύπαρξη ορίων με βάση τη δομή της HSA (He and Carter, 1992). Σε έρευνες των τελευταίων ετών, έχουν παραχθεί οι τομείς της HSA σε ανασυνδυασμένη μορφή. Στην πιο σημαντική από αυτές, πραγματοποιήθηκε έκφραση των τριών τομέων της HSA στο σύστημα του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *P. pastoris* (Dockal *et al.*, 1999), στο οποίο παλαιότερα είχε εκφραστεί επιτυχώς ολόκληρο το μόριο της HSA (Barr *et al.*, 1992). Οι ανασυνδυασμένοι τομείς της HSA εκφράστηκαν σε εκκρινόμενη μορφή και απομονώθηκαν από το υπερκείμενο καλλιέργειας του *P. pastoris* με χρωματογραφία Blue Sepharose, έτσι διαπιστώθηκε ότι και τρεις διαθέτουν θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue. Με ανάλυση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής τους, στην ίδια μελέτη, διαπιστώθηκε ότι η διαμόρφωσή τους είναι παρόμοια με εκείνη που έχουν στο περιβάλλον της HSA. Οι ανασυνδυασμένοι τομείς I, II και III καθώς και τα πολυπεπίδια D12 (1-385), D12A (1-299), D23 (189-585) εκφραζόμενα στο ίδιο σύστημα, έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθοριστούν οι θέσεις πρόσδεσης μορίων όπως τα Cibacron Blue, γουαφαρίνη, αιμίνη, diazepam (Dockal *et al.*, 1999), ωχρατοξίνη (Il'ichev *et al.*, 2002). Αξίζει να σημειωθεί ότι ο υποτομέας IIIB της HSA είναι ο μοναδικός υποτομέας που έχει εκφραστεί στο σύστημα του *P. pastoris* ως ανεξάρτητο μόριο (Tavoulari *et al.*, 2004).

Είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι έχουν μελετηθεί οι ανασυνδυασμένοι τομείς I, II, III και η καθαρή HSA ως προς τη διαμόρφωσή τους σε διαφορετικά pH (Dockal *et al.*, 2000). Συγκεκριμένα, μελετώνται οι δομικές

μεταπτώσεις σε τρία εύρη pH, 5.0-3.5, κάτω από 3.5 και 7.0-9.0. Σε pH 5.0-3.5, η αστάθεια στη δομή της HSA ξεκινά πρώτα από τον τομέα III αυτής.



Εικόνα 1.2 : Η δομή της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού. Με κόκκινο χρώμα διακρίνεται ο υποτομέας IIIB που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 490-585 (με βάση <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath>, Dockal *et al.*, 1999, Tavoulari *et al.*, 2004).

1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η παρούσα εργασία στηρίζεται σε προηγούμενη μελέτη (Tavoulari *et al.*, 2004), όπου έδειξε το πολυπεπίδιο IIIB της HSA μπορεί να εκφραστεί σε ανασυνδυασμένη μορφή σε υπερκείμενα *P. pastoris* και παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF. Συγκεκριμένα οι στόχοι μας είναι :

- Να απομονώσουμε τα ανασυνδυασμένα πολυπεπίδια DIII και DIIIB-myc-6His της HSA από υπερκείμενα του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *Pichia pastoris*.
- Να ελέγξουμε ως προς τη δραστικότητα GnSAF των υποτομέα IIIB-myc-6His σε σύγκριση με τον τομέα III, σε καθαρά παρασκευάσματα.
- Να διερευνήσουμε την πιθανότητα παραγωγής του ενεργού μορίου με πρωτεολυτική σπάση της HSA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΟΡΓΑΝΑ, ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Όργανα

Τα εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής: συσκευή αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California), ηλεκτροφορητικές συσκευές για DNA Horizon 11'14 και 58 (Gibco-BRL Life technologies GmbH, Kalsruhe, Germany), Συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Ultraviolet transilluminator (Vilber Lourmat, Cedex, France), DNA Photographic Transilluminator System (Fotodyne, New Berlin, Winsconsin), συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, Hercules, California), τροφοδοτικό ρεύματος PowerPAC 3000 (Bio-Rad, Hercules, California), επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany), φυγόκεντρος Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut), επιτραπέζια φυγόκεντρος για μικροσωληνάρια τύπου Eppendorf (Centrifuge 5415D), φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (SpeedVac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York), φωτόμετρο Spectrophotometer MBA 2000 (Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts), μετρητής πλακιδίου ELISA τύπου Stat Fax-2100 (Awareness Technology, Palm City, Florida), επωαστήρας τύπου C25 incubator shaker (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey).

2.1.2 Χημικά αναλώσιμα

Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-HSA ab1217 αγοράστηκε από την εταιρεία Abcam (Cambridge, UK). Το δεύτερο αντίσωμα που συνδέεται με το ένζυμο υπεροξειδάση, είναι το antirabbit Ig, peroxidase-linked species-specific F(ab')₂ fragment (from donkey), από την εταιρεία Amersham Biosciences (Backinghamshire, UK).

Για τη χρωματογραφία Blue Sepharose χρησιμοποιούνται σφαιρίδια (Blue Sepharose 6 Fast Flow) (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). Για τον

καθαρισμό ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών που περιέχουν πολυϊστιδινική ουρά, χρησιμοποιείται χρωματογραφία σφαιριδίων νικελίου και συγκεκριμένα το σύστημα ProBond™ Purification System (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

Η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (human serum albumin, HSA) καθώς και η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών (GnRH) είναι της Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Τα αντιγόνα επίμυος LH (rLH-RP-3, rLH-I-10), FSH (rFSH-RP-2, rFSH-I-9) και οι αντιοροί anti-rLH-S-11, anti-rFSH-S-11 προέρχονται από το National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), μέσω του προγράμματος National Hormones and Pituitary Program (NHPP, Baltimore, MD).

Η καθεψίνη Β από ανθρώπινο ήπαρ, καθώς και η κασπάση 4 (caspase-4, human, recombinant, E. coli), είναι από την εταιρεία Calbiochem (Darmstadt, Germany). Οι ενεργοποιημένες κασπάσες 1-10 (MultiCaspPak™-4: Active Caspases 1-10, AK-010) προέρχονται από την εταιρεία Biomol (Plymouth Meeting, PA).

2.1.3 Βιολογικά υγρά-Πειραματόζωα

Το ανθρώπινο υγρό που χρησιμοποιείται λαμβάνεται από γυναίκες που συμμετέχουν σε πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης και μας χορηγείται από τη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (τα δείγματα αυτά προσφέρθηκαν ευγενώς από τον Αναπλ. Καθηγητή Ι. Γεωργίου και την ερευνήτρια Ε. Χατζή).

Για τη δημιουργία πρωτογενών καλλιιεργειών κυττάρων υπόφυσης, χρησιμοποιούνται ενήλικοι θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας δύο μηνών, οι οποίοι χορηγούνται από το Εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι επίμυες θανατώνονται στο χώρο του Εκτροφείου με αιφνίδιο χτύπημα στον αυχένα.

2.1.4 Στέλεχος μυκήτων-Πλασμίδια

Στο σύστημα ετερόλογης έκφρασης των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων, χρησιμοποιείται ως ξενιστής το στέλεχος GS115 του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Invitrogen, Groningen, The Netherlands).

Ως πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης επιλέγεται ο pPICZaA, ο οποίος περιλαμβάνει ένα τμήμα 942 ζευγών βάσεων, που περιέχει τον υποκινητή της αλκοολικής οξειδάσης AOX1 και επιτρέπει τη μεθανολο-επαγομένη έκφραση στον *P. pastoris*. Το τμήμα αυτό παρουσιάζει ομολογία με το γονίδιο AOX1 και με ομόλογο ανασυνδυασμό πραγματοποιείται η ενσωμάτωση του πλασμιδίου στο γονιδίωμα του *P. pastoris*. Ακόμη έχει ένα σήμα έκκρισης, του *Saccharomyces cerevisiae*, για τις ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες (a-factor), έναν πολυσυνδέτη, έναν καρβοξυτελικό επίτοπο myc, μια καρβοξυτελική πολυιστιδινική ουρά, γονίδιο που προσδίνει ανθεκτικότητα έναντι στη ζεοκίνη, ένα σήμα έναρξης της αντιγραφής που επιτρέπει την αντιγραφή του πλασμιδίου στο *E.coli* (ColE1 origin) και επιπλέον μοναδικές περιοριστικές θέσεις που επιτρέπουν την ευθυγράμμιση των πλασμιδίων στην περιοχή AOX1 για την ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του *P. pastoris*.

2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ DNA ΠΟΥ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΙ ΣΕ ΑΝΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΑ ΤΜΗΜΑΤΑ ΤΗΣ HSA

Αρχικά τα επιλεγόμενα τμήματα DNA λαμβάνονται με τη μέθοδο του PCR, με τη χρήση των κατάλληλων υποστρώματος-εκμαγείου και εκκινητών. Έπειτα από διεργασία με περιοριστικές ενδονουκλεάσες (EcoRI, NotI) του πλασμιδιακού φορέα και των ενθεμάτων DNA, γίνεται ανασύνδεση αυτών.

Ακολουθεί δημιουργία επιδεικτικών κυττάρων, διαδικασία που στηρίζεται στη μέθοδο Inoue (Inoue *et al.*, 1990) και μετασχηματισμός του στελέχους TOP10F' της *Escherichia coli* με το πλασμιδιακό DNA.

Η απομόνωση του DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα πραγματοποιείται, σύμφωνα με τα αντίστοιχα πακέτα υλικών, QiAprep Spin Mini Prep Kit και Plasmid Maxi Kit της εταιρείας Qiagen (GmbH, Hilden, Germany). Στη συνέχεια η αλληλουχία DNA των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων ελέγχεται πλήρως, με αυτοματοποιημένη αλληλούχιση του DNA (DNA sequencing) (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany).

2.3 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ-ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ *Pichia pastoris*

Ο *Pichia pastoris* είναι ένας μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας, ικανός να μεταβολίζει μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα. Το μεγάλο πλεονέκτημα της ετερόλογης έκφρασης πρωτεϊνών ως εκκρινόμενες, έγκειται στο γεγονός ότι ο *P. pastoris* εκκρίνει πολύ χαμηλά επίπεδα ενδογενών πρωτεϊνών.

2.3.1 Χημικός μετασχηματισμός του *P. pastoris*

Στην αρχή δημιουργούνται επιδεικτικά κύτταρα του στελέχους GS115 του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Το ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA, ευθυγραμμίζεται με την περιοριστική ενδονουκλεάση PmeI, στην αντίστοιχη θέση της περιοχής 5' AOX1 και μεταφέρεται στα επιδεικτικά κύτταρα GS115, με χημικό μετασχηματισμό

σύμφωνα με το πρωτόκολλο που δίνεται από την εταιρεία Invitrogen. Τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό μέσο επιλογής YPDS με αντιβιοτικό ζεοκίνη (1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 2% w/v γλυκόζη, 1 M σορβιτόλη, 2% w/v άγαρ, 100 µg/mL ζεοκίνη) και αφήνονται προς ανάπτυξη αποικιών σε επωαστικό κλίβανο 30 °C, 2-4 ημέρες.

2.3.2 Έκφραση-έκκριση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων στον *P. pastoris*

Απαραίτητα θρεπτικά υλικά

▪ BMGY (Buffered Minimal Glycerol)

1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 6.0, 1.34% w/v YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % w/v βιοτίνη, 1% v/v γλυκερόλη

▪ BMMY (Buffered Minimal Methanol)

1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v πεπτόνη, 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH 6.0, 1.34% w/v YNB, $4 \cdot 10^{-5}$ % w/v βιοτίνη, 0.5% v/v μεθανόλη

Κύτταρα GS115 που περιέχουν το ανασυνδυασμένο DNA εμβολιάζονται σε 5 mL θρεπτικού υλικού BMGY και η καλλιέργεια αφήνεται να αναπτυχθεί υπό ανάδευση σε επωαστήρα 30 °C, με σκοπό την αύξηση της βιομάζας. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται στη λογαριθμική φάση, $OD_{600}=3-6$, συλλέγονται με φυγοκέντρηση (3000 g, 5 min, 25 °C) και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό BMMY που περιέχει μεθανόλη, μέχρι τελικής $OD_{600}=1$. Η καλλιέργεια (μέγιστος όγκος 30 mL), τοποθετείται σε κωνικές φιάλες των 100 mL και αναπτύσσεται υπό ανάδευση στους 30 °C για δύο ημέρες. Προκειμένου να διατηρούνται οι συνθήκες επαγωγής, κάθε 24 ώρες προστίθεται 100% μεθανόλη, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση στην καλλιέργεια να είναι 0.5% v/v. Τέλος η κυτταρική καλλιέργεια φυγοκεντρείται (4000 rpm, 10 min, 4 °C) και το υπερκείμενο συλλέγεται, διηθείται με φίλτρα 0.2 µm και διατηρείται στους -80 °C.

2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ G_nSAF ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΝΗΣ

2.4.1 Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επίμυων

Απαραίτητα διαλύματα και θρεπτικά υλικά

Όλα τα διαλύματα που αναφέρονται ετοιμάζονται, υπό στείρες συνθήκες, σε κλίβανο κάθετης νηματικής ροής.

- DPBS⁺ : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma), στο οποίο προστίθενται 200 U/mL πενικιλίνη, 200 mg/mL στρεπτομυκίνη (Gibco) και 1.36 g/L γλυκόζη.
- DPBS⁺⁺ : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺, καθώς επίσης 1 g/L BSA και 1.36 g/L γλυκόζη.
- DPBS⁻ : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που δεν περιέχει ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Sigma).
- DPBS⁻ : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών DPBS⁻ στο οποίο προστίθενται 1 g/L BSA και 0.02 mM EDTA (Sigma).
- SFDM^{minus} : DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham serum free culture medium, Sigma), στο οποίο προστίθενται 100 U/mL πενικιλίνη, 100 mg/mL στρεπτομυκίνη, 5 μg/mL τρανσφερίνη (Sigma), 10 μg/mL ινσουλίνη (Sigma), 2.5 mM L-γλουταμίνη (PAA Laboratories GmbH).
- SFDM : Πρόκειται για SFDM^{minus} στο οποίο προστίθεται 10% v/v εμβρυϊκός ορός μόσχου (FCS, Gibco).

Στάδια δημιουργίας πρωτογενών καλλιιεργειών

Χρησιμοποιούνται ενήλικες θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας περίπου δύο μηνών, οι οποίοι θανατώνονται ακαριαία με αποκεφαλισμό. Γίνεται μια κάθετη τομή στο κρανίο, αφαιρείται ο εγκέφαλος και λαμβάνεται η υπόφυση. Όλες οι υποφύσεις που λαμβάνονται τοποθετούνται σε διάλυμα DPBS⁺ σε πάγο. Στο εξής όλα τα βήματα λαμβάνουν χώρα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής, υπό στείρες συνθήκες και οι όγκοι που χρησιμοποιούνται, αναφέρονται σε υποφύσεις 15 επίμυων.

Αρχικά οι υποφύσεις εκπλένονται 5 φορές με διάλυμα DPBS⁺. Έπειτα απομακρύνονται οι νευροϋποφύσεις και οι αδενοϋποφύσεις τεμαχίζονται και

εκπλένονται 5 φορές με διάλυμα DPBS⁺⁺. Στη συνέχεια επωάζονται υπό ανάδευση για 10 min με 15 mL διαλύματος τρυψίνης (4.1 mg/mL τρυψίνη (Sigma) σε DPBS⁺⁺), αφαιρείται το υπερκείμενο και γίνεται νέα επώαση για 10 min με 15 mL διαλύματος παγκρεατίνης (2.5 mg/mL παγκρεατίνη (Sigma) σε DPBS⁺⁺), για πέψη του ιστού. Ακολούθως απομακρύνεται το διάλυμα του ενζύμου και ο τεμαχισμένος ιστός επωάζεται, για 10 min υπό ανάδευση, με 15 mL διαλύματος SFDM για την απενεργοποίηση των ενζύμων. Πραγματοποιούνται 5 εκπλύσεις με 20 mL διαλύματος SFDM, 5 πλύσεις με 20 mL διαλύματος DPBS⁻ και μια με 20 mL διαλύματος DPBS⁻. Στο σημείο αυτό χρησιμοποιούνται πιπέτες pasteur διαβαθμισμένης διαμέτρου, επιστρωμένες με σιλικόνη, για τη μηχανική διασπορά των κυττάρων, σε διάλυμα DPBS⁻. Κάθε φορά προστίθενται 4 mL DPBS⁻ και όταν το διάλυμα θολώσει μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο. Σταδιακά γίνεται χρήση πιπετών μικρότερης διαμέτρου και η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν πλέον δεν παρατηρείται περαιτέρω διάσπαση του ιστού. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 3000 rpm, για 10 min στους 22 °C και επαναιώρηση σε 5 mL θρεπτικού μέσου SFDM με τη χρήση πιπέτας, για πλήρη διασπορά των κυττάρων. Γίνεται μια νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό και τα κύτταρα επαναιωρούνται πλήρως σε άλλα 5 mL SFDM.

Τέλος γίνεται μέτρηση των ζωντανών κυττάρων σε αιμοκυτταρόμετρο, παρουσία χρωστικής trypan blue και επιστρώνονται σε καλλιεργητικά δοχεία των 24 φρεατίων (200.000 ζωντανά κύτταρα / φρεάτιο). Η επώαση για την επικόλληση των κυττάρων, πραγματοποιείται με 0.5 mL SFDM ανά φρεάτιο σε επωαστικό κλίβανο 37 °C και 5% CO₂ για 48 ώρες.

2.4.2 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστηκότητας GnSAF

Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης δημιουργούνται όπως αναφέρεται ανωτέρω. Έπειτα από 48 ώρες και εφόσον τα κύτταρα έχουν επικόλληθεί στα φρεάτια καλλιεργητικών δοχείων, εκπλένονται εις διπλούν με 0.5 mL θρεπτικού υλικού SFDM^{minus}, το οποίο δεν περιέχει ορό. Ακολουθεί επώαση με 0.5 mL SFDM^{minus}, παρουσία των υπό εξέταση ουσιών, για 48 ώρες (37 °C, 5% CO₂). Κάθε δείγμα που μελετάται, δοκιμάζεται σε τρία φρεάτια, ενώ σε έξι φρεάτια προστίθεται

μόνο θρεπτικό υλικό SFDM^{minus} προκειμένου τα αντίστοιχα κύτταρα να χρησιμοποιηθούν ως μάρτυρες.

Ακολουθώς τα κύτταρα εκπλένονται με SFDM^{minus} και έπειτα επωάζονται για 4 ώρες με 0.1 μmol/L GnRH στο ίδιο θρεπτικό μέσο, παρουσία ή μη (μάρτυρες) των ουσιών που ελέγχονται. Σε τρία από τα έξι φρεάτια που χρησιμοποιούνται σαν μάρτυρες, γίνεται επώαση με SFDM^{minus} χωρίς προσθήκη άλλων ουσιών, για τη μέτρηση των βασικών επιπέδων LH ή FSH στη διάρκεια των τεσσάρων ωρών.

Μετά την πάροδο των τεσσάρων ωρών, τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20 °C έως τη μέτρηση των ορμονών με μέθοδο συναγωνιστικής ELISA. Ως δραστηκότητα GnSAF, αναφέρεται η καταστολή της επαγόμενης από την GnRH έκκρισης της LH, κατά τη διάρκεια του διαστήματος των τεσσάρων ωρών.

2.4.3 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστηκότητας ανασταλτίνης

Πρωτογενείς καλλιιεργειες κυττάρων υπόφυσης προετοιμάζονται, όπως αναφέρεται ανωτέρω. Εφόσον τα κύτταρα έχουν επικολληθεί στα φρεάτια, εκπλένονται δυο φορές με 0.5 mL θρεπτικού μέσου SFDM^{minus}. Σε έξι φρεάτια προστίθενται 0.5 mL SFDM^{minus}, προκειμένου να μετρηθεί η βασική έκκριση της FSH και της LH. Κάθε προς εξέταση ουσία δοκιμάζεται σε τρία φρεάτια, σε καθένα από τα οποία προστίθεται η ουσία παρουσία 0.5 mL SFDM^{minus}. Ακολουθεί επώαση σε κλίβανο 37 °C, 5% CO₂ για 48 ώρες.

Με το πέρας των 48 ωρών, τα υπερκείμενα των καλλιιεργειών συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20 °C, έως ότου πραγματοποιηθούν οι μετρήσεις των ορμονών με μέθοδο της συναγωνιστικής ELISA. Ως δραστηκότητα ανασταλτίνης εκφράζεται η μείωση της βασικής έκκρισης της FSH ύστερα από την επίδραση των προς εξέταση ουσιών.

2.4.4 Συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (competent ELISA)

Απαραίτητα διαλύματα

- Διάλυμα επιστροφής (Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών)

14.1 mM Na₂CO₃ / 34.9 mM NaHCO₃, pH 9.8

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS)

8 mM Na₂HPO₄ / 0.15 M NaCl, pH 7.4

- Διάλυμα έκπλυσης (PBST)

PBS, pH 7.4 / 0.05% v/v Tween-20

- PBST-BSA

PBS, pH 7.4 / 0.05% v/v Tween-20 / 0.5% w/v BSA

- PBS-BSA

PBS, pH 7.4 / 1% w/v BSA

- Υπόστρωμα υπεροξειδάσης (pH 5)

0.025 M κιτρικό οξύ / 0.05 M Na₂HPO₄ / 0.04% w/v ο-φαιτυλενεδιαμίνη / 0.01% v/v H₂O₂

Το ανωτέρω διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του σε σκοτεινό χώρο.

- Διάλυμα H₂SO₄ 0.5 M

Στάδια ELISA

Για την μέτρηση των γοναδοτροπινών (LH και FSH), από υπερκείμενα πρωτογενούς καλλιέργειας κυττάρων υπόφυσης επιμύων, χρησιμοποιείται η συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο, όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Pappa *et al.*, 1999a) με ορισμένες τροποποιήσεις. Στη συνέχεια περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθείται.

Αρχικά, αντιγόνο LH (rLH-I-10) ή αντιγόνο FSH (rFSH-I-9), 50 ng/mL σε διάλυμα ανθρακικών pH 9.8, επιστρώνεται σε πλακίδια πολυστυρενίου (200μL ανά μικροφρέατιο) και ακολουθεί επώαση για 16 ώρες στους 4 °C. Στη συνέχεια τα μικροφρέατια πλένονται τρεις φορές με 200 μL PBST και οι κενές θέσεις δεσμεύονται με επώαση 2 ωρών στους 37 °C, με το διάλυμα PBS-BSA (200 μL ανά μικροφρέατιο).

Κατά την διάρκεια της επώασης για δέσμευση των κενών θέσεων (blocking), προετοιμάζονται τα συναγωνιστικά μίγματα του αντισώματος έναντι της γοναδοτροπίνης και δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης γοναδοτροπίνης ή αγνώστων δειγμάτων προς μέτρηση. Συγκεκριμένα για τη μέτρηση της LH, διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων LH (rLH-RP-3) ή άγνωστα δείγματα αραιώνονται σε PBST-BSA σε τελικό όγκο 120μL. Σε αυτά προστίθεται ίσος όγκος αντισώματος LH (anti-LH-S-11) αραιωμένο 1:50000 σε PBST-BSA. Για τη μέτρηση της FSH τα γνωστά διαλύματα FSH (rFSH-RP-2) και τα άγνωστα δείγματα αραιώνονται σε PBST-BSA μέχρι τελικού όγκου 160 μL και σε αυτά προστίθενται 80 μL αντισώματος FSH (anti-FSH-S-11) αραιωμένου 1:10000 σε PBST-BSA. Σε κάθε περίπτωση τα μίγματα συναγωνισμού αντιγόνου-αντισώματος επωάζονται για 1 ώρα, 37 °C.

Μετά το πέρας της επώασης των δυο ωρών, τα πλακίδια εκπλένονται εις τριπλούν με 200 μL PBST και σε κάθε θέση προστίθενται 100 μL συναγωνιστικού μίγματος. Για κάθε δείγμα υπάρχουν δυο θέσεις στο πλακίδιο. Ακολουθεί νέα επώαση για 16 ώρες στους 4 °C.

Τα μικροφρεάτια εκπλένονται τρεις φορές με 200 μL PBST, έπειτα επωάζονται με διάλυμα αντισώματος anti-rabbit IgG-HRP (αραίωση 1: 5000 σε PBST-BSA) για 2 ώρες στους 37 °C και εκπλένονται άλλες τρεις φορές.

Τέλος προστίθενται σε κάθε μικροφρεάτιο 100 μL υποστρώματος υπεροξειδάσης, σε σκοτεινό δωμάτιο, και έπεται επώαση έως την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη του διαλύματος H₂SO₄ (50 μL ανά μικροφρεάτιο). Η απορρόφηση μετράται σε μήκος κύματος 492nm σε μετρητή ELISA Stat Fax-2100, χρησιμοποιώντας ως μήκος κύματος αναφοράς τα 630 nm. Ως τυφλό δείγμα χρησιμοποιείται μικροφρεάτιο στο οποίο δεν έχει γίνει καμία κατεργασία και έχει μόνο προστεθεί υπόστρωμα υπεροξειδάσης και H₂SO₄ στο τελικό στάδιο.

2.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου-δωδεκυλθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE)

Οι ηλεκτροφορήσεις γίνονται σε αποδιατακτικές συνθήκες όπου οι πρωτεΐνες μετακινούνται με βάση το μοριακό τους βάρος.

Απαραίτητα είναι τα ακόλουθα διαλύματα :

- Διάλυμα διαχωρισμού

1.5 M Tris-HCl, 0.4% w/v SDS, pH 8.8

- Διάλυμα επιστοίβαξης

0.5 M Tris-HCl, 0.4% w/v SDS, pH 6.8

- Υδατικό διάλυμα δωδεκυλθειϊκού νατρίου

10% w/v SDS

- Υδατικό διάλυμα υπερθειϊκού αμμωνίου

10% w/v APS

- Διάλυμα 30% ακρυλαμιδίου/N,N'-μεθυλενο-δισ ακρυλαμιδίου

Διάλυμα αναλογίας 37.5:1 της εταιρείας Bio-Rad (Hercules, California)

- Ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης (4x)

250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 9.2% w/v SDS, 40% v/v γλυκερόλη, 0.2% w/v κυανούν της βρωμοφαινόλης, 100 mM DTT

- Διάλυμα ροής της ηλεκτροφόρησης

25 mM Tris-base, 0.192 M γλυκίνη, 0.1% w/v SDS

Στην παρούσα εργασία, το πήγμα διαχωρισμού είναι 15% σε ακρυλαμίδιο και το πήγμα επιστοίβαξης 5%. Τα ανωτέρω πηγματο φτιάχνονται ως εξής :

Πήγμα διαχωρισμού (15%, 100 mL)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% w/v	50 mL
Διάλυμα διαχωρισμού	25 mL
Δισαπεσταγμένο H ₂ O	24 mL
SDS 10% w/v	1 mL
APS 10% w/v	1 mL
TEMED	50 μL

Πήγμα επιστοιβαξης (4.5%, 30 ml)

Διάλυμα ακρυλαμιδίου 30% w/v	4.5 mL
Διάλυμα επιστοιβαξης	7.5 ml
Δισαπεσταγμένο H ₂ O	17.4 mL
SDS 10% w/v	300 μL
APS 10% w/v	300 μL
TEMED	30 μL

Στα δείγματα προστίθεται διάλυμα φόρτωσης, υφίστανται βρασμό (5min, 95°C) ώστε να γίνει πλήρης αποδιάταξη και ακολουθεί φόρτωση αυτών στο πήγμα και ηλεκτροφόρηση.

2.5.2 Χρώση πηγματος πολυακρυλαμιδίου με διάλυμα νιτρικού αργύρου

Όλα τα στάδια της συγκεκριμένης μεθόδου πραγματοποιούνται υπό ανακίνηση. Αρχικά γίνεται μονιμοποίηση των πρωτεϊνών στο πήγμα με διάλυμα 50% v/v μεθανόλης – 10% v/v οξικού οξέος για τουλάχιστον μια ώρα. Ακολουθούν συχνές πλύσεις του πηγματος με δισαπεσταγμένο νερό για μια ώρα το ελάχιστο. Το πήγμα επωάζεται με διάλυμα DTT 5 μg/mL για μισή ώρα, απομακρύνεται το διάλυμα αυτό και προστίθεται αμέσως για τον ίδιο χρόνο διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃) 0.1% w/v. Στη συνέχεια απομακρύνεται το διάλυμα AgNO₃, το πήγμα εκπλένεται εις διπλούν με νερό και εμβαπτίζεται στο διάλυμα ανάπτυξης (3% w/v ανθρακικού νατρίου, 0.0185% v/v φορμαλδεΰδη), μέχρις ότου εμφανιστούν οι ζώνες των πρωτεϊνών. Η ανάπτυξη σταματά με διάλυμα κιτρικού οξέος 2.3 M. Το πήγμα φυλάσσεται σε δισαπεσταγμένο νερό.

2.5.3 Ανοσοαποτύπωση (Western blotting)

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται από το πήγμα σε μεμβράνη πολυβινυλιδενικού φθοριδίου (PVDF) (Pall Corporation, Ann

Arbor, Missouri). Η ηλεκτροφορητική μεταφορά πραγματοποιείται σε διάλυμα 25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM γλυκίνη, 20% v/v μεθανόλη, για 4-5 ώρες σε σταθερά 400 mA. Ακολούθως η μεμβράνη επωάζεται σε διάλυμα 5% w/v BSA σε TBST (διάλυμα Western), υπό ανακίνηση για 16 ώρες σε ψυχρό θάλαμο. Στο στάδιο αυτό δεσμεύονται οι μη ειδικές αντιγονικές θέσεις που είναι πιθανόν να αντιδράσουν στη συνέχεια με το αντίσωμα.

Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ανθρώπινης αλβουμίνης ab1217, το οποίο αραιώνεται 1: 15000 σε διάλυμα Western, για 2 ώρες. Ακολουθούν 6-8 εκπλύσεις με TBST για να απομακρυνθεί η περίσσεια αντισώματος και επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για μια ώρα. Πρόκειται για το αντίσωμα anti-rabbit IgG συζευγμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση (HRP, horseradish peroxidase) που χρησιμοποιείται σε αραιώση 1: 5000 σε διάλυμα Western. Η μεμβράνη εκπλένεται ως ανωτέρω με TBST και τελικώς η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Amersham Biosciences, Backinghamshire, UK).

2.5.4 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων με στήλη νικελίου

Τα πολυπεπτίδια που έχουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο έξι κατάλοιπα ιστιδίνης, μπορούν να καθαριστούν με τη χρήση κατιόντων νικελίου (Ni^{2+}).

Τα πολυπεπτίδια DIII_B-myc-6His απομονώνονται από υπερκείμενα καλλιέργειας των αντίστοιχων στελεχών GS115/DIII_B-myc-6His, έπειτα από επαγωγή της έκφρασής τους με μεθανόλη. Αρχικά τα υπερκείμενα συλλέγονται, περνούν από ηθμούς 0.2 μm και τοποθετούνται σε μεμβράνη με μοριακό κατώφλι 3500 Da (Snakeskin, Pierce, Rockford, Illinois). Υφίστανται διαπίδυση με δυο αλλαγές σε διάλυμα NaPi 20 mM / NaCl 500 mM, pH 7.5, υπό ήπια ανάδευση στον ψυχρό θάλαμο. Ο καθαρισμός γίνεται υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες και όλα τα στάδια του πραγματοποιούνται στους 4 $^{\circ}\text{C}$ ως ακολούθως :

- Εξισορρόπηση των σφαιριδίων Ni^{2+} : Έκπλυση 2 mL σφαιριδίων Ni^{2+} δυο φορές με 7 ml ddH₂O και δυο φορές με 7 mL διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 500 mM, pH 7.5.

- Πρόσδεση : Ανάμιξη των σφαιριδίων με το δείγμα σε αναλογία όγκων 1 : 3 και επώαση υπό ανάδευση για μια ώρα. Απομάκρυνση του υπερκειμένου που περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν προσδένονται στα σφαιρίδια.
- Έκπλυση : Γίνεται για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών. Πρώτα με 4 όγκους διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 500mM, pH 7.5 και στη συνέχεια με 4 όγκους διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 500 mM, pH 6.0.
- Έκλουση : Δυο φορές με 1 όγκο διαλύματος έκλουσης (NaPi 20 mM / NaCl 500 mM / ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης 500 mM, pH 6.0.

Το έκλουσμα τοποθετείται σε μεμβράνη (μοριακό κατώφλι 3500 Da) και υποβάλλεται σε διαπίδυση με διάλυμα NaPi 20 mM, pH 7.5. Ακολουθεί συμπύκνωση με μικροσυμπυκνωτές Vivaspin (μοριακό κατώφλι 3000 Da) και φύλαξη του στους -20°C .

2.5.5 Καθαρισμός πρωτεϊνών με χρωματογραφία Blue Sepharose

Το υλικό που χρησιμοποιείται στην τεχνική αυτή είναι το Cibacron Blue 3G, ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε στερεό υπόστρωμα. Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι σε καθέναν από τους τρεις τομείς της HSA υπάρχουν θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue (Dockal *et al.*, 1999). Επίσης η χρωματογραφία Blue Sepharose αποτελεί κλασική μέθοδο απομάκρυνσης της αλβουμίνης από βιολογικά υγρά.

Στην παρούσα εργασία η Blue Sepharose χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του τομέα III της HSA από υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους GS115/DIII, καθώς και για την απομάκρυνση της αλβουμίνης από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό. Όλα τα στάδια πραγματοποιούνται στους 4°C .

2.5.5.1 Καθαρισμός του τομέα III της HSA από υπερκείμενα καλλιέργειας του *P. pastoris*

Το υπερκείμενο καλλιέργειας GS115/DIII διηθείται από φίλτρα $0.2\ \mu\text{m}$ και υφίσταται διαπίδυση έναντι διαλύματος NaPi 20 mM / 150 mM NaCl, pH 7.5 όπως περιγράφεται ανωτέρω.

- Εξισορρόπηση των σφαιριδίων : Έκπλυση 2 mL σφαιριδίων Blue Sepharose, 4 φορές με 10 όγκους διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 150 mM, pH 7.5.
- Πρόσδεση : Ανάμιξη των σφαιριδίων με το δείγμα σε αναλογία όγκων 1 : 6 και επώαση υπό ανάδευση για μιάμιση ώρα. Απομάκρυνση του υπερκειμένου που περιέχει τις πρωτεΐνες που δεν προσδέονται στα σφαιρίδια.
- Έκπλυση : Με 20 όγκους διαλύματος NaPi 20mM / NaCl 150mM, pH 7.5. Γίνεται για την απομάκρυνση των μη ειδικά δεσμευμένων πρωτεϊνών.
- Έκλουση : Δυο φορές με 2 όγκους διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 2M, pH 7.5.

Το έκλουσμα τοποθετείται σε μεμβράνη (μοριακό κατώφλι 3500 Da) και υποβάλλεται σε διαπίδυση σε διάλυμα NaPi 20 mM, pH 7.5. Ακολουθεί διήθησή του από ηθμό 0.2 μm, συμπύκνωση με μικροσυμπυκνωτές Vivaspin (μοριακό κατώφλι 3000 Da) και φύλαξή του στους -20 °C.

2.5.5.2 Απομάκρυνση της αλβουμίνης από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό

Το υγρό αρχικά διηθείται από ηθμό διαμέτρου πόρων 0.2 μm. Αραιώνεται 4 φορές με διάλυμα NaPi 20 mM / NaCl 150 mM, pH 7.5 και υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι του ίδιου διαλύματος, με δυο αλλαγές. Στη συνέχεια αραιώνεται εκ νέου με αναλογία όγκων 1 : 1 με το προαναφερθέν διάλυμα, με αποτέλεσμα τελικά να έχει αραιωθεί 8 φορές.

- Εξισορρόπηση των σφαιριδίων : 4 ml από τα σφαιρίδια Blue Sepharose εκπλένονται 4 φορές με δεκαπλάσιο όγκο διαλύματος NaPi 20 mM / 150 mM NaCl, pH 7.5.
- Πρόσδεση : Τα σφαιρίδια αναμιγνύονται με το αραιωμένο υγρό σε αναλογία όγκων 1 : 2 και επωάζονται υπό ήπια ανάδευση για 16 ώρες.

Ακολούθως συλλέγεται το υπερκείμενο, αναμιγνύεται όπως προηγουμένως με νέα εξισορροπημένα σφαιρίδια και αφήνονται υπό ανάδευση για 1.5 ώρα. Το υγρό περιέχει μεγάλη ποσότητα αλβουμίνης, οπότε αυτό το στάδιο κρίνεται απαραίτητο για πιο πλήρη απομάκρυνσή της.

Το υπερκείμενο υποβάλλεται σε διαπίδυση με δυο αλλαγές έναντι διαλύματος NaPi 20 mM, pH 7.5.

- Έκπλυση : Τα πρώτα σφαιρίδια εκπλένονται εις διπλούν με 10 όγκους διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 150 mM, pH 7.5, ενώ τα δεύτερα 2 φορές με 5 όγκους.

▪ Έκλυση : Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλύονται στα μεν πρώτα σφαιρίδια 3 φορές με 1 όγκο διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 2 M, pH 7.5, στα δε δεύτερα 2 φορές με 1 όγκο.

Όλα τα στάδια έκλυσης ενώνονται και υφίστανται διαπίδυση όπως το υπερκείμενο.

Τέλος τόσο το υπερκείμενο όσο και το έκλουσμα, υποβάλλονται σε διήθηση, συμπυκνώνονται μέσω μοριακού κατωφλιού 3000 Da και φυλάσσονται στους -20°C .

2.5.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Οι πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις προσδιορίζονται με τη μέθοδο του δικιγχονικού οξέος (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην αναγωγή του δισθενούς χαλκού (Cu^{2+}) σε μονοσθενή (Cu^{1+}) από πρωτεΐνη, σε αλκαλικό διάλυμα και στη μετέπειτα χρωματομετρική ανίχνευση του υδατοδιαλυτού συμπλέγματος δυο μορίων BCA με ένα κατιόν χαλκού, που δίνει υψηλή απορρόφηση στα 562 nm.

Αρχικά κατασκευάζεται μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς, με διαλύματα αλβουμίνης ορού βοός (BSA), συγκεντρώσεων 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Χρησιμοποιούνται 100 μL από κάθε πρότυπο διάλυμα και επίσης τα προς μελέτη δείγματα, αραιώνονται στον ίδιο όγκο με ddH_2O . Σε καθένα προστίθενται 2 mL αντιδραστηρίου BCA, αναδεύονται ελαφρώς και επωάζονται σε υδατόλουτρο 37°C για 30 min. Στη συνέχεια αφήνονται να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούνται στα 562 nm.

2.6 ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΣΧΑΣΗΣ ΤΗΣ HSA ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ ΙΙΙ

2.6.1 Πρωτόκολλο πρωτεολυτικής σχάσης από την καθεψίνη Β

Αρχικά το δείγμα, η HSA (Sigma, A-3782) ή ο καθαρισμένος όπως περιγράφεται παραπάνω τομέας ΙΙΙ, επωάζεται παρουσία οξικού νατρίου (0.2 M ή 1 M, pH 4.0-5.0), σε θερμοκρασία δωματίου για 5-30 min, για την απομάκρυνση λιπαρών οξέων (με βάση την αναφορά Peters and Hawn, 1967).

Το ένζυμο καθεψίνη Β, αφήνεται να ενεργοποιηθεί στο μίγμα της αντίδρασης, για 30 min στους 4 °C (Kukor *et al.*, 2002 με τροποποιήσεις). Το προαναφερθέν μίγμα έχει ως εξής :

<u>ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ</u>
CH ₃ COONa	0.1 M, 0.2 M, 1 M pH 4-5
EDTA	1 mM, 5 mM
DTT	0.2 mM, 1 mM, 5 mM

Η αναλογία pmol μορίου και U ενζύμου που κατά κύριο λόγο χρησιμοποιείται, τόσο για την HSA όσο και για τον τομέα ΙΙΙ, είναι 50 pmol : 0.1 U.

Κατάλληλη ποσότητα από το απολιπιδωμένο δείγμα προστίθεται στο μίγμα της αντίδρασης και επωάζεται για διαφορετικούς χρόνους σε υδατόλουτρο 37 °C. Μετά την επώαση, ακολουθεί εξουδετέρωση του όξινου pH με 1 N διαλύματος NaOH. Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήγμα πολυακρυλαμιδίου- SDS 15%.

2.6.2 Πρωτόκολλο πρωτεολυτικής σχάσης από κασπάσες

Σε ό,τι αφορά την αλβουμίνη, στην αρχή πραγματοποιείται απολιπιδίωσή της (0.5 % w/v HSA σε διάλυμα CH₃COONa όξινου pH), για 5-30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Έπεται εξουδετέρωση του pH με 1 N διαλύματος NaOH. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο ακόλουθο μίγμα :

<u>ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ</u>	<u>ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ</u>
NaCl	100 mM
CHAPS	0.1% w/v
EDTA	1 mM
DTT	10 mM
γλυκερόλη	10% v/v
HEPES pH 7.4	50 mM

Η αναλογία ενζύμου-υποστρώματος που χρησιμοποιείται, ποικίλλει ως ακολούθως:

1 U : 1 pmol, 1 U : 0.3 pmol, 1 U : 0.15 pmol.

Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 37⁰ C για χρόνους 10 min, 1 h και SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση σε πήγμα 15%.

Εναλλακτικά πραγματοποιούνται ανάλογα πειράματα για τον καθαρό τομέα III, με μόνη διαφορά ότι δεν λαμβάνει χώρα το στάδιο της απολιπιδίωσης και οι επώσεις γίνονται στους 25⁰ C.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ DIII ΚΑΙ DIII_B-myc-6His ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΟΥ *P. pastoris*

Σε πρόσφατη ερευνητική εργασία (Tavoulari *et al.*, 2004), έχουν παραχθεί δυο εναλλακτικές μορφές του τελικού 95πεπτιδίου της HSA καθώς και ο τομέας III της HSA στο στέλεχος GS115 του ζυμομύκητα *P. pastoris*. Σε ό,τι αφορά τον υποτομέα III_B, η μια μορφή περιέχει τα κατάλοιπα 490-585 που αποτελούν τον DIII_B, ενώ η δεύτερη έχει επιπλέον στο καρβοξυτελικό άκρο τον επίτοπο c-myc και έξι κατάλοιπα ιστιδίνης (DIII_B-myc-6His). Έγινε επαγωγή της έκφρασης και διαπιστώθηκε η υπερέκφραση των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων στα υπερκείμενα των παραπάνω κλώνων. Έλεγχος ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε επίπεδο υπερκειμένων έδειξε ότι και οι δυο μορφές του τομέα III_B παρουσιάζουν δραστικότητα σε αντίθεση με τον τομέα III. Στην παρούσα μελέτη, τίθεται ως στόχος η ανάκτηση σε καθαρή μορφή του υποτομέα III_B, έτσι ώστε να ελεγχθεί η ενεργότητα του παρασκευάσματος σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις.

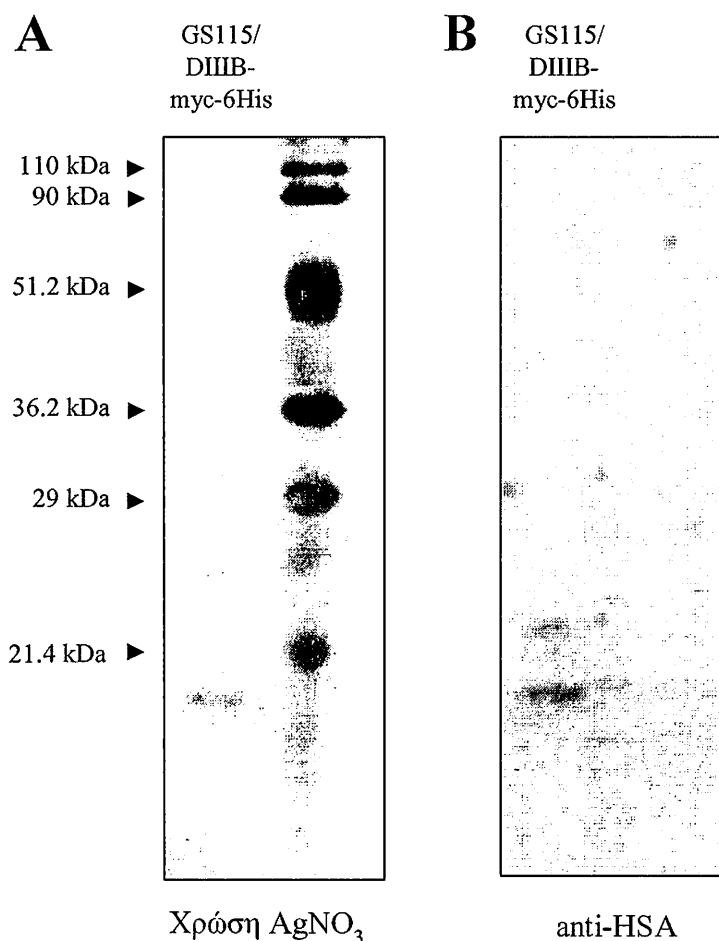
3.1.1 Καθαρισμός του πολυπεπτιδίου DIII_B-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺

Σε πρόσφατη μελέτη (Tavoulari *et al.*, 2004), έγιναν προσπάθειες καθαρισμού του υποτομέα III_B από υπερκείμενα κλώνων του *P. pastoris*, με χρωματογραφία Blue Sepharose. Διαπιστώθηκε ότι ο DIII_B δε δεσμεύεται στη στήλη και εμφανίζεται πλήρως στο μη δεσμευμένο κλάσμα. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο υποτομέας III_B δε φέρει θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue.

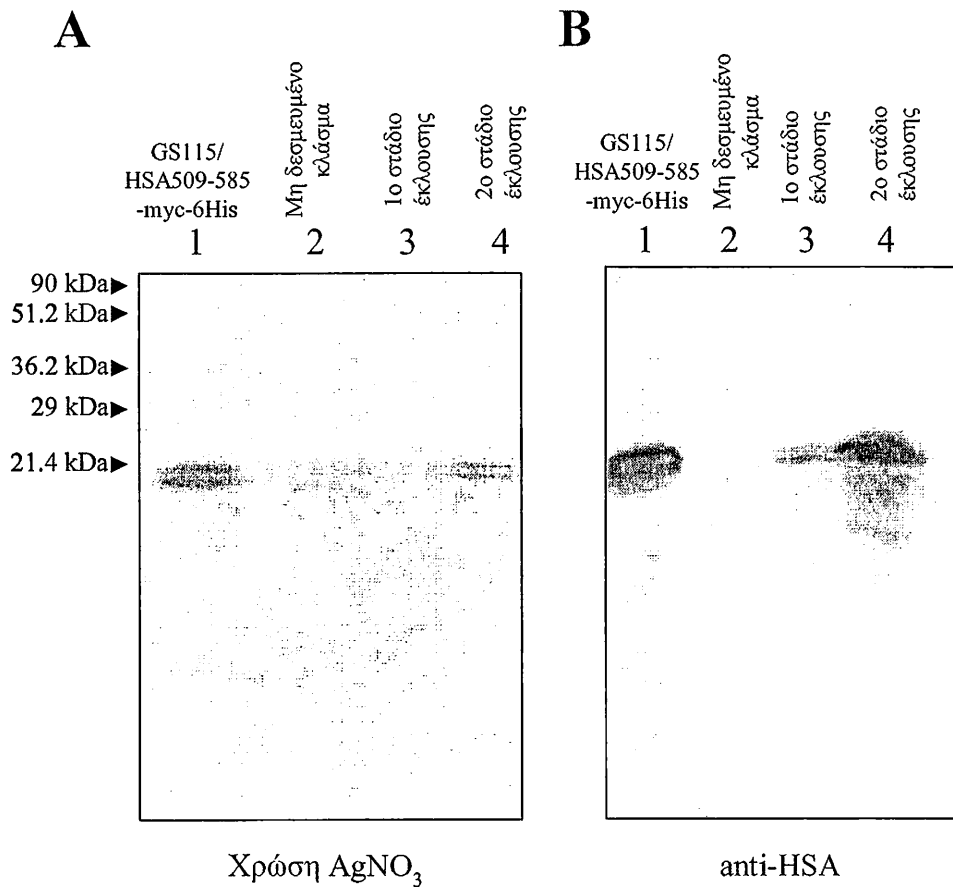
Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη ελέγχεται η εναλλακτική μορφή του υποτομέα III_B, που έχει επιπλέον την καρβοξυτελική ουρά των 2.5 kDa (DIII_B-myc-6His). Στη μορφή αυτή το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο είναι δυνατόν να υποστεί καθαρισμό, με τη χρήση στήλης Ni²⁺.

Αρχικά συλλέγονται τα υπερκείμενα από τον κλώνο GS115/DIII_B-myc-6His και υφίστανται διαπίδυση έναντι διαλύματος NaPi 20 mM / NaCl 500 mM, pH 7.5. Ακολουθεί χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni²⁺, όπως αναφέρεται στα Υλικά και Μεθόδους. Το έκλουσμα υποβάλλεται σε διαπίδυση έναντι διαλύματος NaPi 20

mM, pH 7.5 και ακολουθεί συμπύκνωση με μικροσυμπυκνωτές Vivaspin (μοριακό κατώφλι 3000 Da). Με τη μέθοδο αυτή επιτύχαμε απομόνωση καθαρού πολυπεπτιδίου IIIB σε συγκέντρωση 0.5 mg/mL και απόδοση 16.67 μ g ανά mL υπερκειμένου *P. pastoris* GS115/DIII_B-myc-6His. Στην **Εικόνα 3.1** παρουσιάζεται η ανάλυση SDS-PAGE για 1 μ g καθαρισμένου IIIB έπειτα από το στάδιο της συμπύκνωσης. Στην **Εικόνα 3.2** παρουσιάζεται ενδεικτικά η πορεία καθαρισμού ενός ενεργού πεπτιδίου IIIB, στην περίπτωση αυτή του 509-585-myc-6His, με τα στάδια έκλουσης.



Εικόνα 3.1 : Καθαρισμός του πολυπεπτιδίου DIIIb-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺. Υπερκείμενο (6 mL) από κλώνο GS115/ DIIIb-myc-6His έπειτα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi / 500 mM NaCl pH 7.5, υποβάλλεται σε χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺ (Υλικά και Μέθοδοι). Οι πρωτεΐνες εκλύονται με 20 mM NaPi pH 6.4, 500 mM ιμιδαζόλιο σε δύο διαδοχικά βήματα. Τα δύο εκλούσματα συνδυάζονται σε ένα δείγμα (2 mL), υφίστανται διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH 7.5, και συμπυκνώνονται 10 φορές (Viva Spin, cutoff 3000 Da). Συμπυκνωμένο δείγμα (1 µg) υποβάλλεται σε SDS-PAGE (18%), χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Ως δείκτες πρότυπων μοριακών βαρών, χρησιμοποιούνται οι προεχρωσμένοι Low Range (BioRad).

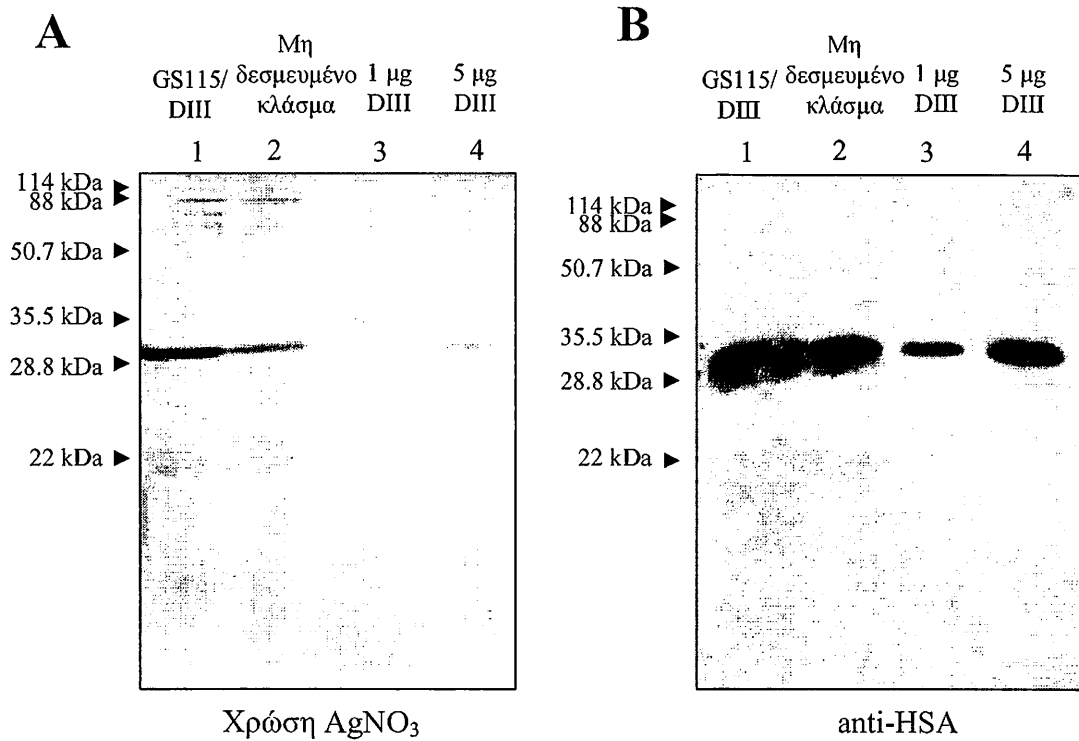


Εικόνα 3.2 : Ενδεικτικός καθαρισμός ενός ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου με χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺. Έξι (6) mL υπερκευμένο από κλώνο GS115/ HSA509-585-myc-6His έπειτα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi / 500 mM NaCl pH 7.5, υποβάλλονται σε χρωματογραφία συγγένειας Ni²⁺ (Υλικά και Μέθοδοι). Οι πρωτεΐνες εκλύονται σε δυο στάδια με 20 mM NaPi pH 6.4, 500 mM ιμιδαζόλιο. Ενενήντα (90) μL από το αρχικό υπερκείμενο, 90 μL από το μη δεσμευμένο κλάσμα και 90 μL από κάθε έκλουσμα, υποβάλλονται σε SDS-PAGE (18%), χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B).

3.1.2 Καθαρισμός του τομέα III με χρωματογραφία Blue Sepharose

Στην εργασία των Tavoulari *et al.*, 2004 έχει δειχθεί ότι υπερκείμενα κλώνων που εκφράζουν τον τομέα III της HSA, δεν έχουν δραστικότητα GnSAF. Ως συνέχειά της στην παρούσα μελέτη πραγματοποιείται καθαρισμός του DIII. Σκοπός είναι ο μετέπειτα έλεγχος του καθαρού παρασκευάσματος ως προς τη δραστικότητα GnSAF και η σύγκριση με ανάλογες συγκεντρώσεις καθαρού DIII. Είναι γνωστό από άλλες μελέτες (Dockal *et al.*, 1999), ότι καθένας από τους τρεις τομείς της HSA (I, II, III) έχει από μία τουλάχιστον θέση δέσμευσης Cibacron Blue και μπορεί να δεσμεύεται σε στήλη Blue Sepharose. Για το λόγο αυτό, ο καθαρισμός του τομέα III γίνεται με χρωματογραφία Blue Sepharose.

Υπερκείμενο του κλώνου GS115/DIII του *P. pastoris* συλλέγεται έπειτα από 48 ώρες επαγωγής της έκφρασης. Στη συνέχεια υφίσταται διαπίδυση με δυο αλλαγές σε διάλυμα 20 mM NaPi / 500 mM NaCl, pH 7.5 και ακολουθεί καθαρισμός της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με χρωματογραφία Blue Sepharose (Υλικά και Μέθοδοι). Στην **Εικόνα 3.3** φαίνονται τα διάφορα στάδια καθαρισμού έπειτα από χρώση με νιτρικό άργυρο (**A**) και έπειτα από ανοσοαποτύπωση (**B**). Όπως διαπιστώνεται η δέσμευση στη στήλη δεν είναι πλήρης, όμως δεσμεύεται σε αυτή ποσότητα ικανή για ακόλουθο έλεγχο της δραστικότητας GnSAF διαφορετικών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης. Το σύνολο του εκλούσματος υπόκειται σε διαπίδυση (20 mM NaPi, pH 7.5), ακολουθεί συμπύκνωση (46 φορές) με πέρασμα από στήλη με μοριακό κατόφλι 3000 Da και ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεΐνης. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται απομόνωση καθαρού πολυπεπτιδίου III σε συγκέντρωση 1.18 mg/mL και απόδοση 19.18 μg ανά mL υπερκειμένου του *P. pastoris* GS115/DIII.



Εικόνα 3.3 : Καθαρισμός του DIII με χρωματογραφία Blue Sepharose. Υπερκειμένο (40 mL) καλλιέργειας από κλώνο GS115/DIII, έπειτα από διαπίδυση σε διάλυμα 20 mM NaPi / 150 mM NaCl, pH 7.5, υφίσταται χρωματογραφία Blue Sepharose. Το έκλουσμα συμπυκνώνεται 46 φορές (cutoff 3000 Da). Ενενήντα (90) μ L (0.225 %) του αρχικού υπερκειμένου (διαδρομή 1), 90 μ L (0.225%) του μη δεσμευμένου κλάσματος (διαδρομή 2), ποσότητες 1 μ g (0.13%) και 5 μ g (0.65%) καθαρισμένης πρωτεΐνης (διαδρομές 3 και 4), υποβάλλονται σε SDS-PAGE (15 %). Ακολουθεί χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Ως πρότυπα μοριακά βάρη χρησιμοποιούνται τα Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range (BioRad).

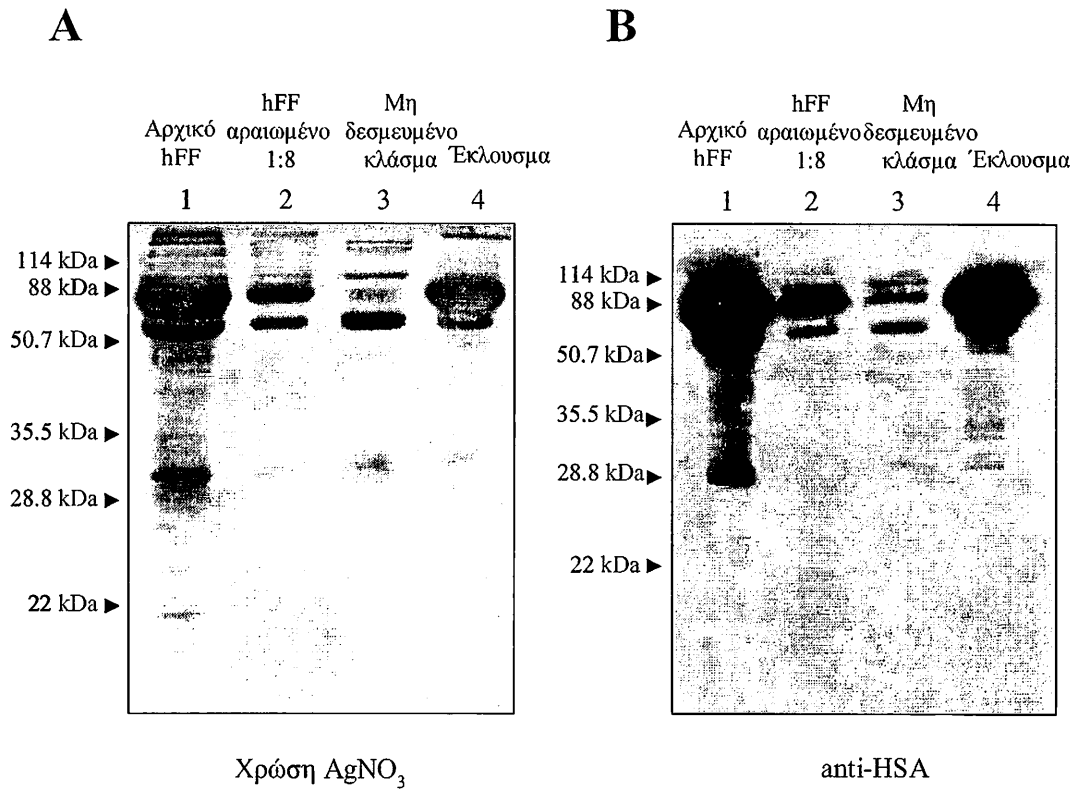
3.1.3 Απομάκρυνση της HSA από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό

Το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (hFF) περιέχει πολύ υψηλές ποσότητες HSA. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό να επηρεάζει την ανίχνευση του ενεργού παράγοντα και τη μελέτη της δραστηριότητάς του, διότι η συγκέντρωσή του αναμένεται ελάχιστη σε σχέση με την HSA.

Στην προσπάθεια απομάκρυνσης της αλβουμίνης, καταλήξαμε στη μέθοδο των δυο διαδοχικών σταδίων χρωματογραφίας Blue Sepharose, η οποία περιγράφεται λεπτομερώς στα Υλικά και Μεθόδους.

Ένα (1) mL ωοθυλακικού υγρού, αραιώνεται 8 φορές με διάλυμα 20 mM NaPi / 150 mM NaCl, pH 7.5 και υποβάλλεται σε διαπίδυση. Ακολουθεί χρωματογραφία Blue Sepharose και το μη δεσμευμένο κλάσμα συνεπωάζεται εκ νέου με σφαιρίδια Blue Sepharose. Το πέρασμα από τις δυο διαδοχικές στήλες, είναι αναγκαίο για την πληρέστερη απομάκρυνση από το δείγμα των μεγάλων ποσοτήτων HSA. Το μη δεσμευμένο κλάσμα και το συνολικό έκλουσμα, υφίστανται διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi, pH 7.5 και συμπυκνώνονται (cutoff 3000 Da). Ακολουθεί SDS-PAGE για 1 μ L κάθε δείγματος, χρώση με AgNO₃ (**Εικόνα 3.4A**) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (**Εικόνα 3.4B**).

Διαπιστώνεται ότι ενώ η διπλή χρωματογραφία Blue Sepharose απομακρύνει από το ωοθυλακικό υγρό όλη την HSA, παραμένουν στο μη δεσμευμένο κλάσμα ορισμένα μικρότερου MW πολυπεπίδια που αντιδρούν με το αντίσωμα έναντι της HSA και θα μπορούσε να συνδέονται με την ενεργότητα GnSAF, εφόσον στο κλάσμα αυτό έχειδειχθεί ότι εντοπίζεται όλη η ενεργότητα GnSAF του hFF (Fowler *et al.*, 2002). Για το λόγο αυτό οι αντίστοιχες ζώνες νιτρικού αργύρου αποκόπηκαν από το ηλεκτροφόρημα και απεστάλησαν για ανάλυση φασματομετρίας μαζών (MS) στο Εργαστήριο Πρωτεϊνικής Βιοχημείας του Ινστιτούτου Φλέμινγκ (Δρ. Γ. Παναγιώτου). Τα αποτελέσματα όμως δεν ήταν σαφή λόγω προσμίξεων κερατίνης I (P13645).



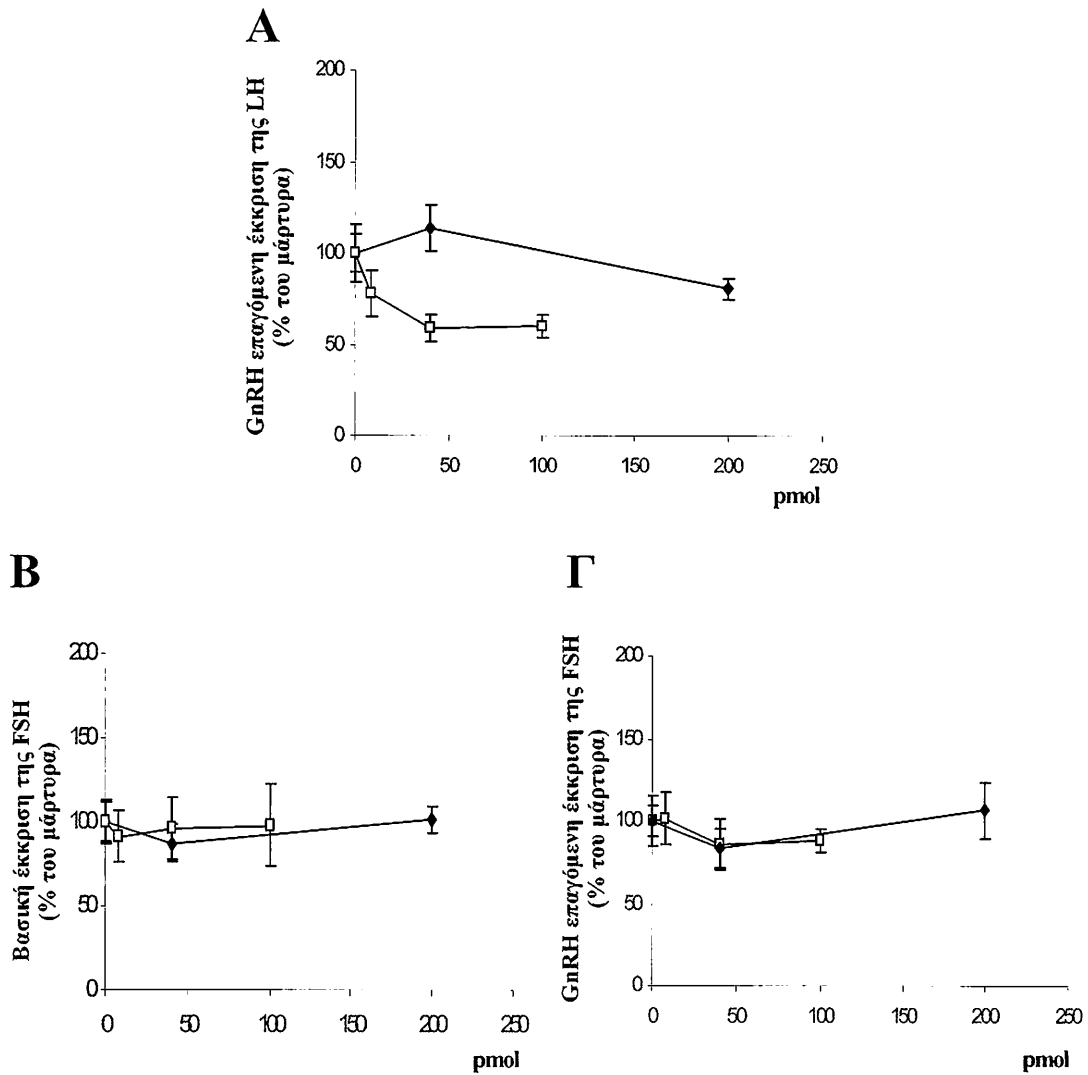
Εικόνα 3.4 : Απομάκρυνση της HSA από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (hFF), με χρωματογραφία Blue Sepharose (Υλικά και Μέθοδοι). 1 mL hFF αραιώνεται 1:8, σε διάλυμα 20 mM NaPi / 150 mM NaCl, pH 7.5. Ακολουθεί πέρασμα αυτού από δυο διαδοχικές στήλες Blue Sepharose. Τελικά τόσο το μη δεσμευμένο κλάσμα όσο και το συνδυαστικό έκλουσμα και από τις 2 διαδοχικές χρωματογραφίες, υποβάλλονται σε διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi, pH 7.5 και συμπυκνώνονται (μοριακό κατώφλι 3000 Da). Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15%, ενός μL από κάθε δείγμα, όγκος που αντιστοιχεί στο 0.1% του αρχικού ωοθυλακικού, 0.0125% του αραιωμένου, 0.18% του μη δεσμευμένου κλάσματος και 0.18% του εκλούσματος. Έπεται χρώση νιτρικού αργύρου (**A**) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (**B**). Ως δείκτες μοριακών βαρών, χρησιμοποιούνται οι προεχρωσμένοι Low Range (BioRad).

3.2 ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GnSAF ΓΙΑ ΤΟΝ ΥΠΟΤΟΜΕΑ IIIB-myc-6His, ΤΟΝ ΤΟΜΕΑ III ΚΑΙ ΤΗΝ HSA

3.2.1 Προσδιορισμός δραστηριότητας GnSAF του DIIIB-myc-6His και του DIII σε καθαρισμένα παρασκευάσματα

Υπερκείμενα κλώνων GS115/ DIIIB-myc-6His, που εκφράζουν τον τομέα IIIB, αναστέλλουν την GnRH επαγόμενη έκκριση της LH, ενώ δεν επηρεάζουν τη βασική έκκριση των LH και FSH. Από την άλλη, υπερκείμενα κλώνων GS115/ DIII, που εκφράζουν τον τομέα III, δεν επηρεάζουν την GnRH επαγόμενη έκκριση της LH. Τα προαναφερθέντα αποτελέσματα (Tavoulari *et al.*, 2004) στηρίζονται στη μελέτη αντίστοιχου εύρους όγκων για τις δυο κατηγορίες υπερκειμένων. Σημαντικό όμως είναι να ελεγχθεί ανάλογο εύρος συγκεντρώσεων για τις καθαρές μορφές από τις ανωτέρω ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες, έτσι ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα η ανωτέρω διαφορά να οφείλεται σε διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στους διαφορετικούς κλώνους ή σε άλλες ουσίες των υπερκειμένων. Η παράλληλη μελέτη των δυο παρασκευασμάτων κρίνεται αναγκαία, εφόσον ο υποτομέας IIIB περιέχεται στον τομέα III.

Ο τομέας III προέρχεται από καθαρισμό του αντίστοιχου υπερκειμένου με χρωματογραφία Blue Sepharose, ενώ ο υποτομέας IIIB-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας με στήλη Ni²⁺. Διαφορετικές ποσότητες από τα καθαρισμένα δείγματα υποβάλλονται σε βιολογικές δοκιμασίες προσδιορισμού δραστηριότητας GnSAF και ανασταλτικής (**Εικόνα 3.5**), όπως αναφέρεται αναλυτικά στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Διαπιστώνεται ότι 8 pmol, 40 pmol και 100 pmol DIIIB προκαλούν αναστολή της GnRH επαγόμενης έκκρισης της LH σε επίπεδα $78.11 \pm 12.37\%$, $60.26 \pm 6.11\%$ και $58.92 \pm 7.42\%$ αντίστοιχα (**Εικόνα 3.5A**). Από την άλλη ποσότητες 40 και 200 pmol DIII δεν έχουν καμία επίδραση στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH. (**3.5A**). Επιπλέον τόσο οι προαναφερθείσες ποσότητες DIIIB, όσο και DIII δεν επηρεάζουν ούτε τη βασική (**Εικόνα 3.5B**), ούτε την GnRH επαγόμενη έκκριση της FSH (**Εικόνα 3.5Γ**).

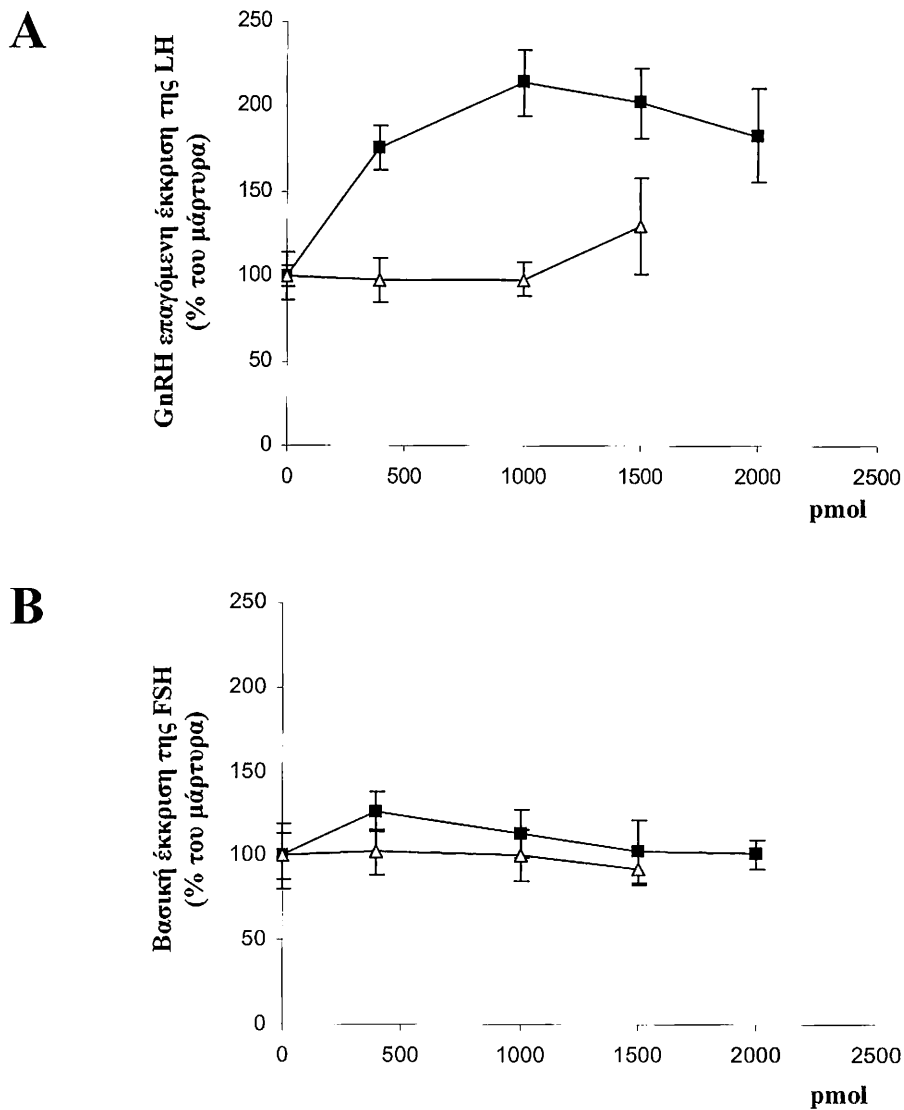


Εικόνα 3.5 : Ανάλυση δοσοεξάρτησης του υποτομέα III B και του τομέα III της HSA. Διαφορετικές ποσότητες καθαρισμένων πολυπεπτιδίων του υποτομέα III B-myc-6His (-□-) (8, 40, 100 pmol) και του τομέα III (-◆-) (40, 200 pmol), μελετώνται ως προς την επίδρασή τους, στην επαγόμενη από την GnRH έκκριση της LH (Α), στη βασική έκκριση της FSH (Β) καθώς και στην επαγόμενη από την GnRH έκκριση της FSH (Γ). Κάθε τιμή αποτελεί μέσο όρο \pm SEM τριών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ποσοστό της LH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες, τα οποία επωάζονται με 0.1 μ M GnRH (Α) ή ως ποσοστό % της βασικής έκκρισης FSH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες. Το εύρος τιμών του μάρτυρα φαίνεται με τη σκιασμένη οριζόντια ζώνη.

3.2.2 Προσδιορισμός δραστηριότητας GnSAF για τον τομέα III και την HSA σε μεγάλες συγκεντρώσεις

Ανάλυση δοσοεξάρτησης για την καθαρή HSA, σε ποσότητες 0.125 μg (1.88 pmol), 0.25 μg (3.76 pmol), 1 μg (15.04 pmol) και 2 μg (30.08 pmol), δείχνει ότι η HSA δεν επηρεάζει την επαγόμενη από την GnRH έκκριση της LH (Tavoulari *et al.*, 2004). Επίσης ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει στην παρούσα μελέτη, σε ό,τι αφορά τον τομέα III, για δόσεις μέχρι 400 pmol, όπως αναφέρεται προηγούμενα. Όμως είναι γνωστό ότι στα ανθρώπινα ώοθυλακικά υγρά οι συγκεντρώσεις HSA είναι υψηλές, γεγονός που μας οδηγεί στη ανάλυση μεγαλύτερων δόσεων αυτής. Παράλληλα αναλύονται αντίστοιχες ποσότητες καθαρού παρασκευάσματος DIII για να ελεγχθεί εάν συνεχίζει να είναι ανενεργό.

Ο τομέας III που χρησιμοποιείται προκύπτει από καθαρισμό υπερκειμένου με χρωματογραφία Blue Sepharose, ενώ σε ό,τι αφορά την HSA, πρόκειται για καθαρή αλβουμίνη του εμπορίου (Sigma A-3782). Ένα εύρος συγκεντρώσεων DIII και HSA, υποβάλλονται σε βιολογικές δοκιμασίες προσδιορισμού δραστηριότητας GnSAF και ανασταλτικής (**Εικόνα 3.6**). Δόσεις 400 pmol, 1000 pmol και 1500 pmol του DIII διαπιστώνεται ότι δεν επηρεάζουν, ούτε τη επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH ούτε τη βασική έκκριση της FSH (**Εικόνα 3.6 A και B**). Από την άλλη αντίστοιχες δόσεις, 400, 1000 pmol, 1500 pmol και 2000 pmol της HSA, φαίνεται να προκαλούν αύξηση της GnRH επαγόμενης έκκρισης της LH σε επίπεδα από $175.45 \pm 13.16\%$ έως $214.35 \pm 19.57\%$, ενώ δεν επηρεάζουν τα βασικά επίπεδα έκκρισης της FSH (**Εικόνα 3.6 A και B**).



Εικόνα 3.6 : Ανάλυση δοσοεξάρτησης του τομέα III και της HSA. Διαφορετικές ποσότητες καθαρισμένων πολυπεπτιδίων του τομέα III (-Δ-) (400, 1000, 1500 pmol) και καθαρής HSA (-■-) (400, 1000, 1500, 2000 pmol), μελετώνται ως προς την επίδρασή τους, στην επαγόμενη από την GnRH έκκριση της LH (A) καθώς και στη βασική έκκριση της FSH (B). Κάθε τιμή αποτελεί μέσο όρο \pm SEM τριών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως % ποσοστό της LH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες, τα οποία επωάζονται με 0.1 μ M GnRH (A) ή ως ποσοστό % της βασικής έκκρισης FSH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες. Το εύρος τιμών του μάρτυρα φαίνεται με τη σκιασμένη οριζόντια ζώνη.

3.3 ΔΟΚΙΜΕΣ ΠΡΩΤΕΟΛΥΤΙΚΗΣ ΣΧΑΣΗΣ ΤΗΣ HSA ΚΑΙ ΤΟΥ ΤΟΜΕΑ III ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΚΤΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ

Τα έως τώρα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο υποτομέας IIIB έχει δραστικότητα GnSAF, σε αντίθεση με τον τομέα III και την HSA. Συνεπώς δημιουργείται ένα εύλογο ερώτημα, πως δηλαδή προκύπτει αυτό το ενεργό μόριο υπό φυσιολογικές συνθήκες.

Στα πλαίσια της προσέγγισης του ερωτήματος που προκύπτει, αν δηλαδή ο ενεργός υποτομέας IIIB είναι πιθανό να παράγεται έπειτα από πρωτεολυτική σχάση της HSA, γίνονται αναλύσεις της πεπτιδικής αλληλουχίας της τελευταίας για την εύρεση πιθανών θέσεων αναγνώρισης πρωτεολυτικών ενζύμων ανάμεσα στους υποτομείς IIIA και IIIB. Ένα τέτοιο ενδεχόμενο θα μπορούσε να δικαιολογήσει την παραγωγή του δραστικού IIIB από την HSA.

3.3.1 Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της HSA και του τομέα III παρουσία καθεψίνης B

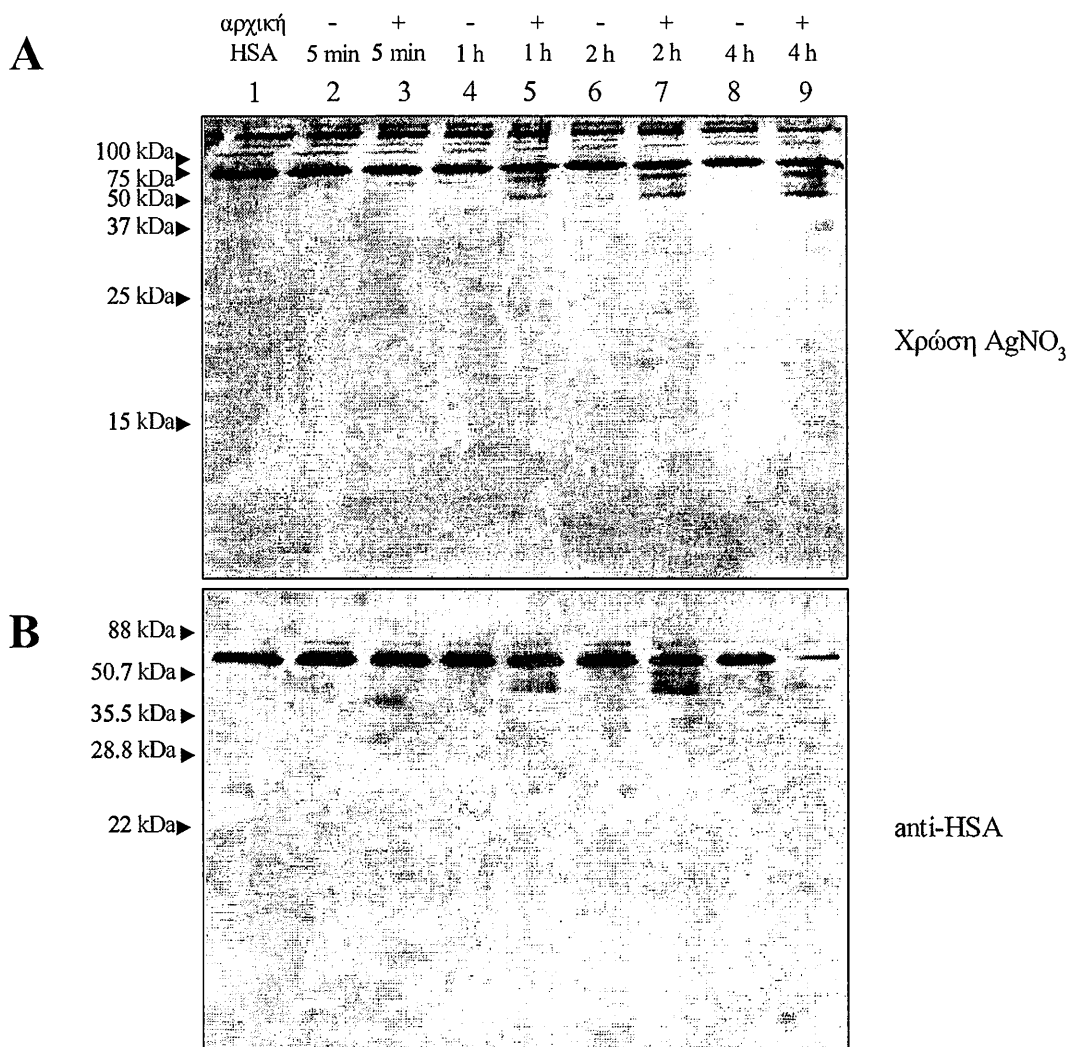
Με αναλύσεις της αλληλουχίας των πεπτιδίων παρατηρείται ότι η HSA, έχει τρεις θέσεις αναγνώρισης (Arg-Arg) για την καθεψίνη B. Είναι ιδιαίτερης σημασίας το γεγονός ότι μία από αυτές βρίσκεται στα κατάλοιπα 484-485, πριν τα όρια που διαχωρίζουν τον υποτομέα IIIA από τον IIIB. Συνεπώς είναι πιθανό να αποτελεί έναν τρόπο να λαμβάνεται ο υποτομέας IIIB από την HSA.

Στην **Εικόνα 3.7** φαίνεται το αποτέλεσμα επίδρασης της καθεψίνης B (Calbiochem) σε καθαρή HSA (Sigma) σε διαφορετικούς χρόνους. Στην αρχή η HSA επωάζεται με 1 M CH₃COONa, pH 4.0 για την αποδέσμευση των λιπαρών οξέων από τη δομή της (Peters et al., 1967). Στη συνέχεια 100 pmol HSA επωάζονται σε διάλυμα CH₃COONa 1 M pH 4.0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM στους 37 °C για διαφορετικούς χρόνους (Kooistra et al., 1982). Ακολουθεί εξουδετέρωση του pH και SDS-PAGE. Από τα 5 min φαίνεται ότι αρχίζει να σχάζεται η HSA με αισθητή μείωση της ποσότητάς της στις 2 h και 4 h, όμως δεν ανιχνεύεται κάποια ζώνη γύρω στα 11 kDa, θέση στην οποία αναμένεται το DIIIIB. Η έντονη ζώνη λίγο κάτω από των 25 kDa οφείλεται στην καθεψίνη B.

Στη συνέχεια γίνονται προσπάθειες πρωτεολυτικής σχάσης του τομέα III, διότι όπως διαπιστώνεται από τη μελέτη της αλληλουχίας, στον τομέα αυτόν υπάρχει μόνο μια θέση αναγνώρισης για την καθεψίνη B, οπότε πιθανώς θα είναι απλούστερη η εξήγηση του αποτελέσματος.

Αρχικά γίνεται η πειραματική διαδικασία όπως προαναφέρεται για την HSA. Διπλασιάζονται οι ποσότητες DIII και καθεψίνης B και μειώνονται οι χρόνοι επώασης για να αποφευχθεί παραμονή του DIII σε όξινο pH για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.8A**, η ποσότητα του τομέα III μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου τόσο στα δείγματα συνεπώασης με το ένζυμο, όσο, σε μικρότερο βαθμό, και στους αντίστοιχους μάρτυρες. Θεωρούμε λοιπόν ότι πιθανώς το χαμηλό pH να επιδρά έτσι ώστε να αποικοδομείται ο DIII. Γνωρίζουμε επίσης από μελέτες (Dockal *et al.*, 2000), ότι στην περιοχή των pH 5.0-3.0, ο τομέας III υφίσταται μεταπτώσεις στη δομή του, οι οποίες είναι πιο έντονες σε pH 4 και μικρότερα. Για το λόγο αυτό γίνονται δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης σε διαφορετικά pH μεγαλύτερα του 4 και σε εύρος τέτοιο όπου να δρα η καθεψίνη B. Το DIII υφίσταται απολιπιδίωση με επώαση για 5 min σε 0.2 M CH₃COONa διαφορετικών pH (4.0, 4.5, 4.8). Ακολουθεί επώασή του (200 pmol) σε μίγμα που περιέχει CH₃COONa 0.2 M αντίστοιχου pH, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, για 30 min 37 °C. Στα δείγματα μάρτυρες φαίνεται ότι όσο το pH μίγματος αυξάνεται, τόσο μικρότερος είναι ο βαθμός επηρεασμού της ζώνης του DIII. Ακόμη στα δείγματα που συνεπώάζονται με το ένζυμο η ποσότητα DIII σχεδόν εξαφανίζεται, χωρίς να ανιχνεύονται άλλες ζώνες (**Εικόνα 3.8B**).

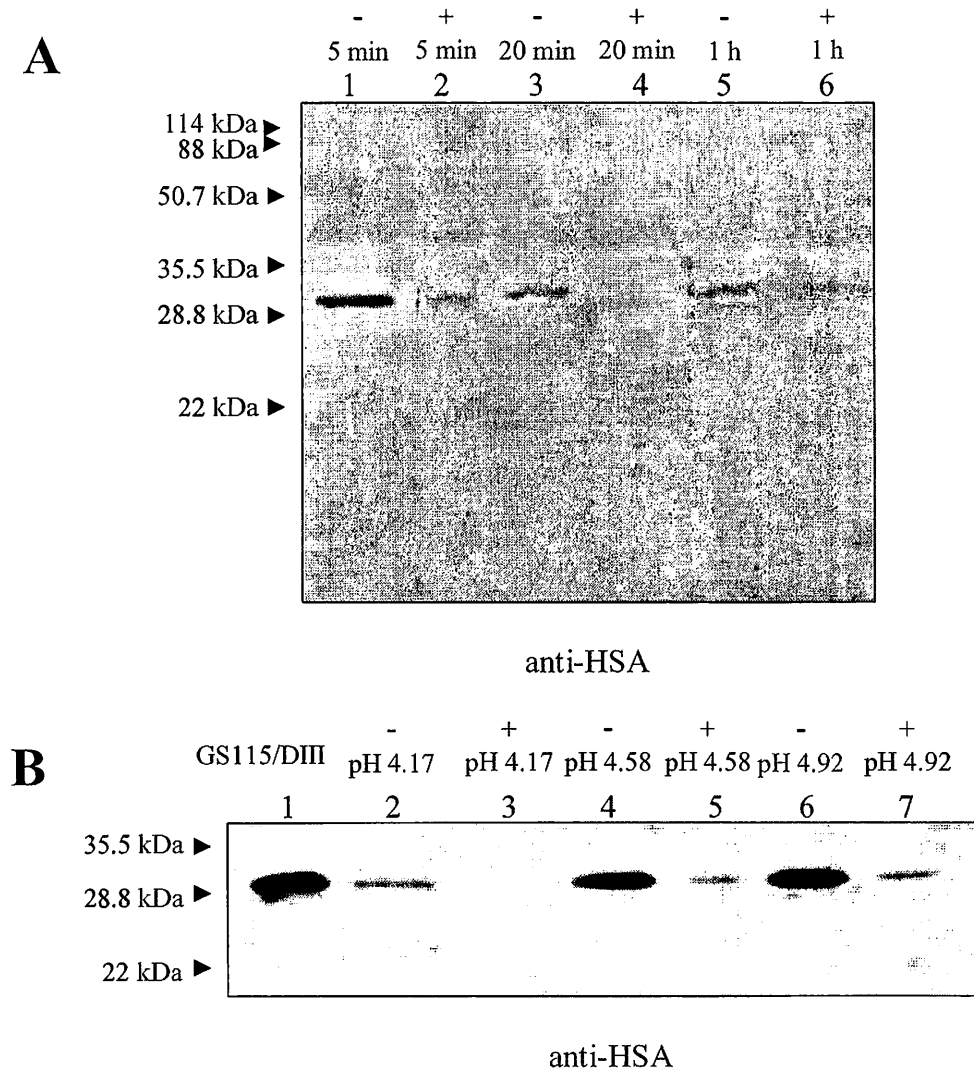
Στην **Εικόνα 3.9** συνοψίζεται η σταθερότητα του καθαρού παρασκευάσματος DIII σε διαφορετικές συνθήκες pH (4.2-7.5), θερμοκρασίας (25-37 °C) και χρόνων επώασης (30 min-16 h), βάσει της ανάλυσης των αντίστοιχων δειγμάτων σε SDS-PAGE ακολουθούμενη από ανοσοαποτύπωση.



Εικόνα 3.7 : Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της HSA, παρουσία καθεψίνης B.

HSA 0.5% w/v σε διάλυμα CH₃COONa 1 M pH 4.0 επωάζεται για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια 100 pmol HSA επωάζονται σε μίγμα που περιέχει CH₃COONa 1 M pH 4.0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, απουσία (-, διαδρομές 2, 4, 6, 8) ή παρουσία (+, διαδρομές 3, 5, 7, 9) καθεψίνης B (0.2 U) για διαφορετικούς χρόνους στους 37 °C. Στη διαδρομή 1 αντιστοιχούν 100 pmol από το αρχικό διάλυμα της HSA που υφίσταται απολιπιδίωση.

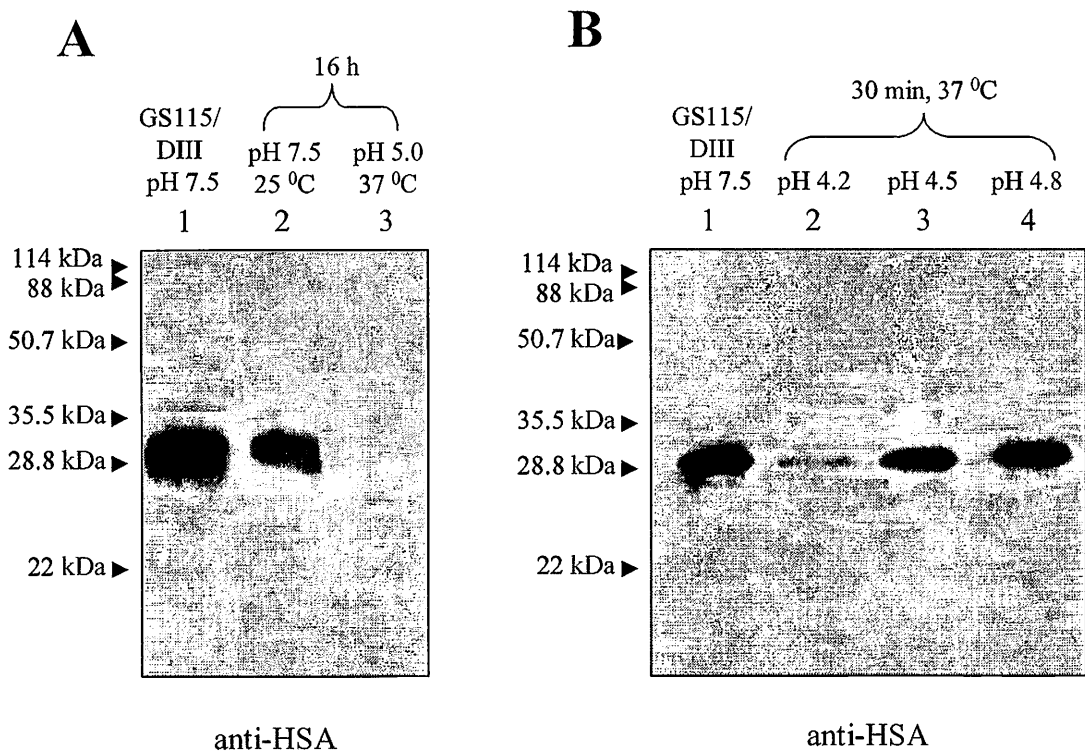
Στη συνέχεια ακολουθεί εξουδετέρωση του pH, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και έπεται χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Ως δείκτες μοριακών βαρών, χρησιμοποιούνται οι μη εχρωσμένοι Unstained Precision Standards Broad Range (BioRad) (A) και ο προεχρωσμένοι Low Range (BioRad) (B).



Εικόνα 3.8 : Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης του DIII, παρουσία καθεψίνης B.

A : Αρχικά ποσότητα DIII επωάζεται σε 1 M CH_3COONa , pH 4.0 (30 min, θερμοκρασία δωματίου). Στη συνέχεια 200 pmol DIII επωάζονται σε μίγμα που περιέχει CH_3COONa 1 M pH 4.0, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, απουσία (-, διαδρομές 1, 3, 5) ή παρουσία (+, διαδρομές 2, 4, 6) καθεψίνης B (0.4 U). Η επώαση γίνεται στους 37 °C, για 5 min, 20 min, 1 h.

B : Στην αρχή ποσότητες DIII επωάζονται, για 5 min, παρουσία 0.2 M CH_3COONa διαφορετικών pH (4.0, 4.5, 4.8). Ακολουθεί επώαση του DIII (200 pmol) σε μίγμα που περιέχει CH_3COONa 0.2 M αντίστοιχου pH, EDTA 5 mM, DTT 5 mM, απουσία (-, διαδρομές 2, 4, 6) ή παρουσία (+, διαδρομές 3, 5, 7) καθεψίνης B (0.4 U), για 30 min 37 °C. Στη διαδρομή 1 αντιστοιχούν 200 pmol του αρχικού DIII, που βρίσκονται σε διάλυμα pH 7.5. Η ηλεκτροφόρηση και στις 2 περιπτώσεις (A και B) γίνεται σε SDS-PAGE 15% και ακολουθεί ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217). Ως πρότυπα μοριακά βάρη χρησιμοποιούνται οι προεχρωσμένοι Low Range (BioRad).



Εικόνα 3.9 : Σταθερότητα του τομέα III σε διαφορετικές συνθήκες, βάσει της συμπεριφοράς σε ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (15%).

A : 50 pmol DIII επωάζονται για 16 h σε pH 7.5 (25 °C) και pH 5.0 (37 °C) (διαδρομές **2A** και **3A** αντίστοιχα).. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήγμα μικρού μεγέθους.

B : 200 pmol DIII επωάζονται για 30 min, στους 37 °C σε pH 4.2, 4.5, 4.8 (διαδρομές **2**, **3** και **4** αντίστοιχα). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε πήγμα μεγάλου μεγέθους, πάχους 1.5 mm.

Στις διαδρομές **1A** και **1B** ηλεκτροφορούνται 50 pmol και 200 pmol DIII που βρίσκονται σε διάλυμα pH 7.5 και αποτελούν μάρτυρες. Στα όξινα διαλύματα προηγείται της ηλεκτροφόρησης επαναφορά του pH στο 7.

3.3.2 Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της HSA παρουσία κασπάσων

Η πιθανότητα σχάσης της HSA, ώστε να προκύψει ο υποτομέας IIIB, μας οδηγεί σε μια ακόμη σημαντική παρατήρηση σε ό,τι αφορά πιθανές θέσεις αναγνώρισης από πρωτεολυτικά ένζυμα. Διαπιστώνεται ότι υπάρχει μια θέση LEVD (κατάλοιπα 491-494) στην HSA, στα όρια του υποτομέα IIIA με τον IIIB. Το τετραπεπτίδιο αυτό αναγνωρίζεται από κασπάσες (Talanian *et al.*, 1997, Leo *et al.*, 2001, He *et al.*, 2003).

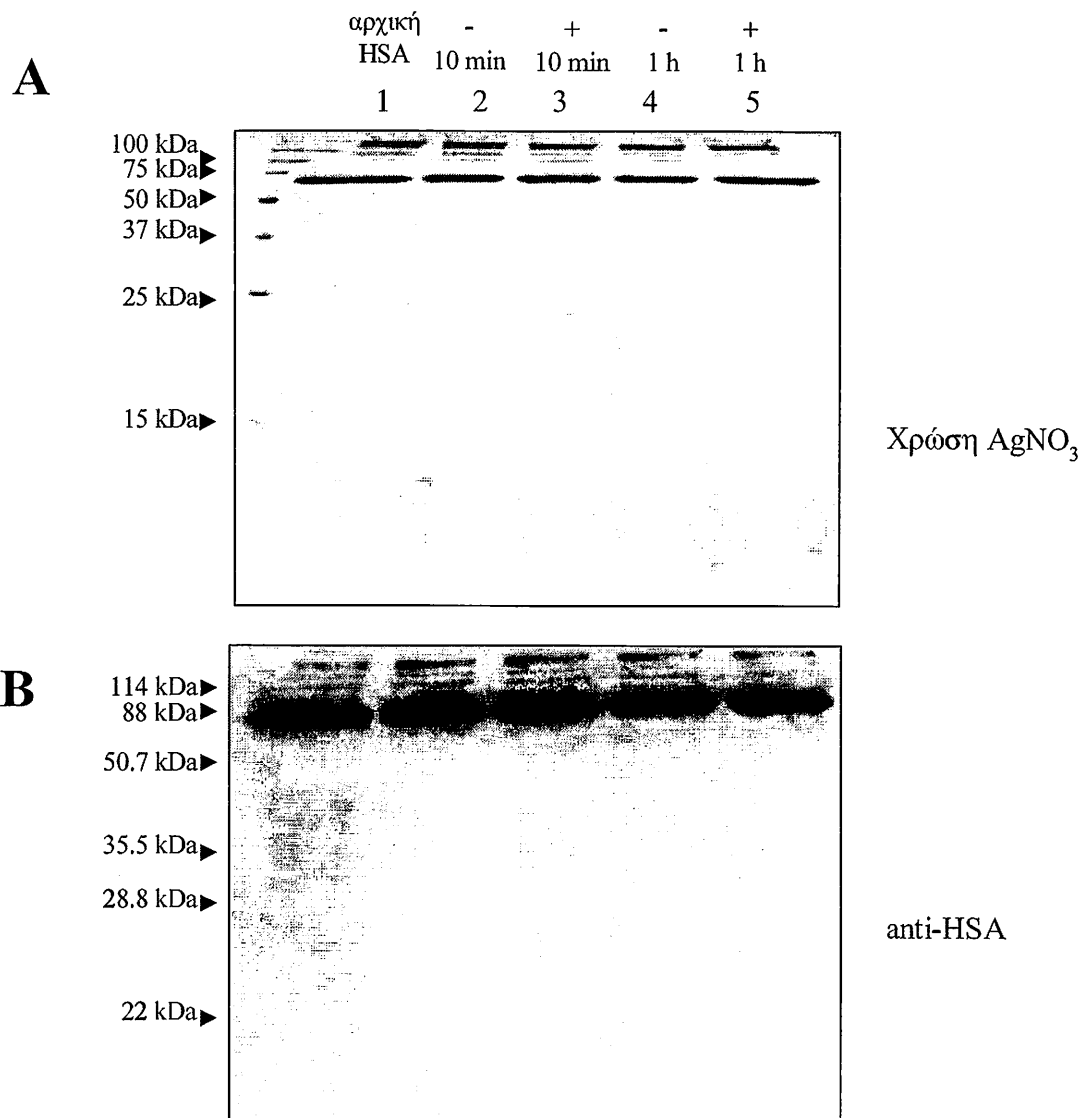
Σύμφωνα βιβλιογραφικές αναφορές (Talanian *et al.*, 1997) η κασπάση 4 προτιμά ως υπόστρωμα το τετραπεπτίδιο LEVD. Στηριζόμενοι στα ανωτέρω, γίνονται δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης της καθαρής HSA, παρουσία της κασπάσης 4 (Calbiochem).

Η HSA υφίσταται απολιπιδίωση σε διάλυμα 0.2 M CH₃COONa, pH 4.0, γίνεται επαναφορά του pH στο 7 και στη συνέχεια επωάζεται στο μίγμα της αντίδρασης (NaCl 100 mM, CHAPS 0.1% w/v, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, γλυκερόλη 10% v/v, HEPES 50 mM pH 7.4) για διαφορετικούς χρόνους (10 min, 1 h). Για 60 pmol HSA χρησιμοποιούνται 200 U ενζύμου. Στην **Εικόνα 3.10** διαπιστώνεται ότι η HSA δε φαίνεται να σχάζεται πρωτεολυτικά. Οι δυο ζώνες που εμφανίζονται με τη χρώση νιτρικού αργύρου, πρέπει να οφείλονται στην κασπάση 4 που είναι ένα ετεροδιμερές (19 και 10 kDa).

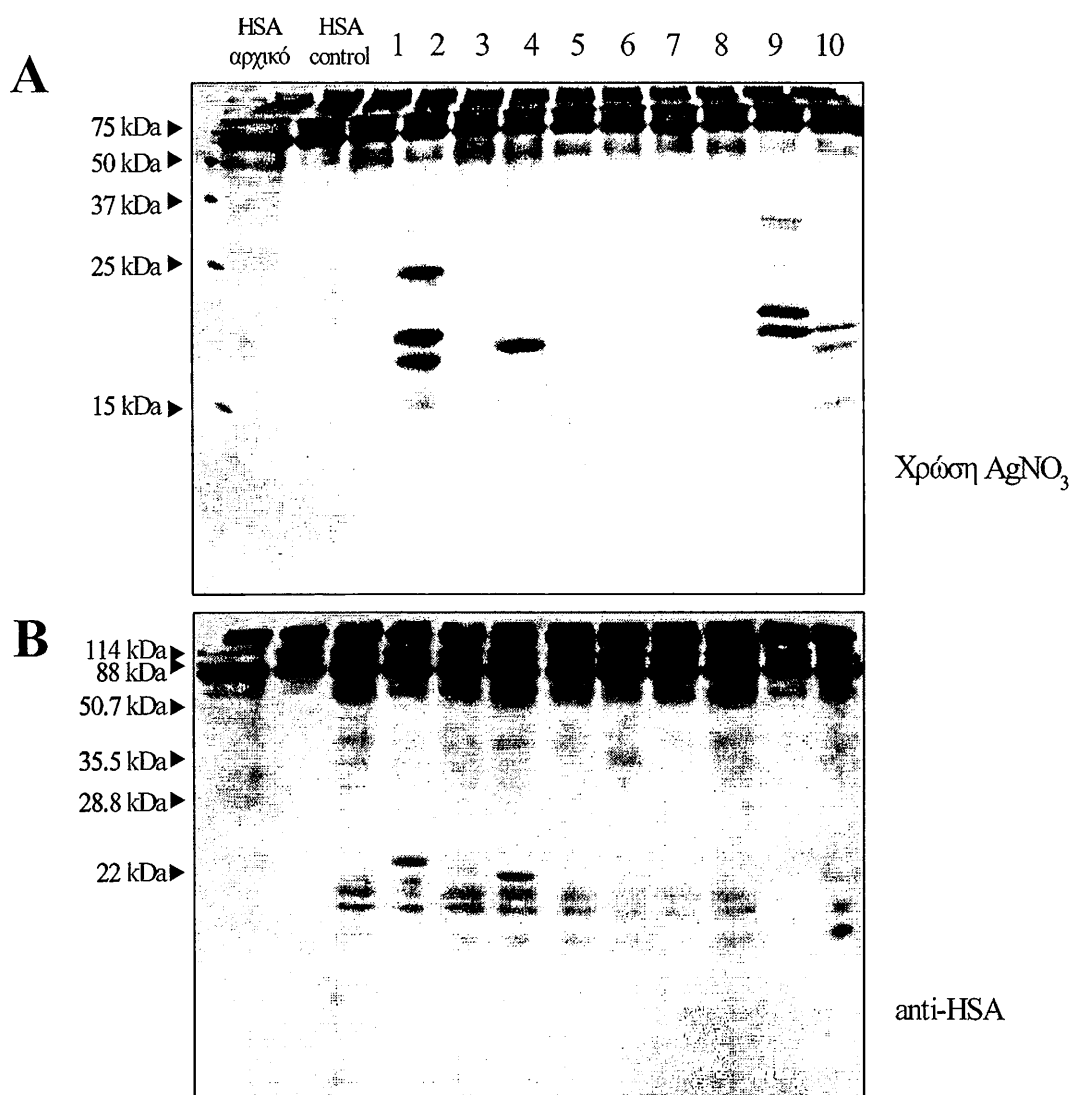
Ακολουθεί πειραματική διαδικασία όπως προηγουμένως, με τη διαφορά ότι 60 pmol HSA επωάζονται για 1 h με 400 U από καθεμία από τις κασπάσες 1-10 (Biomol) (**Εικόνα 3.11**).

Από την **Εικόνα 3.11** παρατηρούμε τα ακόλουθα : Σε όλες τις περιπτώσεις 1-10 παρατηρούνται πολυπεπτίδια σε χαμηλότερες ζώνες MW από την HSA (66 kDa), τα οποία αναγνωρίζονται από το anti-HSA αντίσωμα (ab1217), δεν εμφανίζονται στην αντίστοιχη διαδρομή ελέγχου (HSA control) και θα μπορούσαν να αποτελούν προϊόντα ειδικής πρωτεολυτικής σχάσης. Συγχρόνως όμως είναι εμφανής σε ορισμένες περιπτώσεις (διαδρομές 2, 4, 9, 10) η περίσσεια των αντίστοιχων ενεργών τμημάτων των κασπάσων (στα 18-20 kDa αλλά και στα ~10 kDa) η οποία μειώνει την ευκρίνεια της εικόνας. Έλεγχος με φασματομετρία μαζών (MS) (Δρ. Γ. Παναγιώτου, Ινστιτούτο Φλέμινγκ) έδειξε ότι οι έντονες ζώνες στις διαδρομές 2 (τρεις) και 4 (μια) προέρχονται πράγματι από κασπάση 2 και κασπάση 4 αντίστοιχα,

ενώ οι τρεις μικρού MW ζώνες (κάτω του δείκτη 22 kDa) των διαδρομών 4 και 8 δεν έδωσαν σαφή αποτελέσματα λόγω ανεπαρκούς ποσότητας δείγματος που επισκιάστηκε από κοινές προσμίξεις κερατινών και σε μια περίπτωση αιμοσφαιρίνης (Γ. Παναγιώτου, προσωπική επικοινωνία).



Εικόνα 3.10 : Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης HSA παρουσία κασπάσης 4. HSA (0.5% w/v) επωάζεται σε διάλυμα 0.2 M CH₃COONa, pH 4.0 για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου και ακολουθεί εξουδετέρωση του όξινου pH. 60 pmol HSA επωάζονται σε μίγμα που περιέχει NaCl 100 mM, CHAPS 0.1% w/v, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, γλυκερόλη 10% v/v, HEPES pH 7.4 50 mM, απουσία (-) ή παρουσία (+) της κασπάσης 4 (200U) για 10 min και 1h, 37 °C. Στη διαδρομή 1, είναι ως μάρτυρας, 60 pmol από το αρχικό διάλυμα της απολιπιδωμένης HSA. Την ηλεκτροφόρηση επί πήγματος 15% , ακολουθεί χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Ως δείκτες χρησιμοποιούνται οι μη εχρωσμένοι Broad Range (BioRad) (A) και οι προεχρωσμένοι Low Range (BioRad) (B).



Εικόνα 3.11 : Δοκιμές πρωτεολυτικής σχάσης HSA παρουσία κασπασών 1-10. Αρχικά επωάζονται 0.5 % w/v HSA σε διάλυμα 0.2 M CH₃COONa, pH 4.0 για 30 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί εξουδετέρωση του όξινου pH και έπειτα 60 pmol HSA επωάζονται σε μίγμα που περιέχει NaCl 100 mM, CHAPS 0.1% w/v, EDTA 1 mM, DTT 10 mM, γλυκερόλη 10% v/v, HEPES 50 mM pH 7.4, απουσία (δεύτερη διαδρομή) ή παρουσία (διαδρομές 1-10) της αντίστοιχης κασπάσης (Biomol AK-010) (400 U) για 1h, 37 °C. Στην πρώτη διαδρομή αντιστοιχούν 60 pmol από το αρχικό διάλυμα της HSA που υφίσταται απολιπιδίωση. Στη συνέχεια πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE 15% και έπεται χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση κατά Western με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Ως δείκτες χρησιμοποιούνται οι μη εχρωσμένοι Broad Range (BioRad) (A) και οι προεχρωσμένοι Low Range (BioRad) (B).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Απομόνωση του ενεργού ανασυνδυασμένου υποτομέα ΙΙΒ σε καθαρή μορφή

Η παρούσα έρευνα συνεισφέρει σημαντικά στη μελέτη του παράγοντα άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (GnSAF). Ο υποτομέας ΙΙΒ της HSA παράγεται μέσω τεχνικών ανασυνδυασμένου DNA και ενός ευκαρυωτικού συστήματος ετερόλογης έκφρασης-έκκρισης με χρήση του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *P. pastoris* και σε επίπεδο υπερκειμένων καλλιέργειών παρουσιάζει ειδική δραστηριότητα GnSAF (Tavoulari *et al.*, 2004). Σε συνέχεια των ανωτέρω στη μελέτη που πραγματοποιήσαμε εδείχθη ότι ο ανασυνδυασμένος ενεργός υποτομέας ΙΙΒ μπορεί να απομονωθεί σε καθαρή μορφή, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας εφόσον είναι η πρώτη φορά που αποκτάται καθαρός ανασυνδυασμένος παράγοντας GnSAF.

Ο DIIIB παρουσιάζει δραστηριότητα GnSAF σε συγκεντρώσεις 16-200 nM, επίπεδα συγκεντρώσεων παρόμοια με εκείνα στα οποία δρα η GnRH σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης (Pappa *et al.*, 1999, Fowler *et al.*, 2002, Tavoulari *et al.*, 2004) ή σε γοναδοτρόπα κύτταρα της σειράς LβT2 (Nguyen *et al.*, 2004). Σε ανάλογες συγκεντρώσεις ο τομέας ΙΙΙ σε καθαρή μορφή και η HSA δεν έχουν ενεργότητα.

Η απομόνωση σε καθαρή μορφή του υποτομέα ΙΙΒ, ο οποίος παρουσιάζει ειδική δραστηριότητα GnSAF, είναι ιδιαίτερης σημασίας διότι επιτρέπει τη μελέτη καθαρού παρασκευάσματος DIIIB σε πειράματα δοσοεξάρτησης και την αναγωγή σε συγκεκριμένες μονάδες ενεργότητας ανά μmol (units/ μmol). Επίσης ανοίγει το δρόμο για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του παράγοντα GnSAF σε κυτταρικές σειρές, όπως στα κύτταρα LβT2 που έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί στη μελέτη του μηχανισμού δράσης της GnRH.

Συνεισφορά στη μελέτη του ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού

Στη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας προσεγγίστηκε το ερώτημα κατά πόσο μπορεί να ανιχνευθεί το ενεργό πολυπεπίδιο σε βιολογικά υγρά. Γνωρίζουμε ότι το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (hFF) περιέχει υψηλές ποσότητες HSA, ενώ το ενεργό πολυπεπίδιο αναμένεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Επομένως θεωρήθηκε απαραίτητη η απομάκρυνση της HSA έτσι ώστε να εμπλουτιστεί το

ωοθυλακικό υγρό με τον ενεργό παράγοντα και να απαλειφθούν τα προβλήματα στην ανίχνευση της δραστικότητας GnSAF.

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις της καθαρής HSA (0.8-4 μ M) παρατηρήθηκε αύξηση της GnRH επαγόμενης έκκρισης της LH, επίδραση που δε φαίνεται να είναι ειδική και δεν παρατηρήθηκε σε μικρές συγκεντρώσεις, ανάλογες με αυτές που είναι ενεργό το DIIIB. Θεωρήθηκε επομένως πιθανό οι υψηλές συγκεντρώσεις αλβουμίνης που υπάρχουν στα hFF, να επηρεάζουν τη βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF. Επιπροσθέτως σε προηγούμενες μελέτες (Fowler *et al.*, 2002) αναφέρεται ότι η απομόνωση της ενεργότητας GnSAF γίνεται σε hFF από το οποίο έχει απομακρυνθεί η αλβουμίνη ορού.

Λαμβάνοντας υπόψη τα ανωτέρω αναπτύξαμε ένα πρωτόκολλο μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε με επιτυχία η πλήρης απομάκρυνση της HSA από το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό. Η διαδικασία αυτή στηρίζεται στο χρωματογραφική επεξεργασία του hFF μέσα από δυο διαδοχικές στήλες Blue Sepharose. Με τον τρόπο αυτό πολυπεπίδια της αλβουμίνης μικρότερου μοριακού βάρους που πιθανώς να συνδέονται με τη δραστικότητα GnSAF παραμένουν στο μη δεσμευμένο κλάσμα, στο οποίο σύμφωνα και με τη μελέτη των Fowler *et al.*(2002) εντοπίζεται όλη η ενεργότητα.

Πώς παράγεται φυσιολογικά ο ενεργός υποτομέας IIIB;

Παρότι δεν έχει γίνει έως σήμερα γνωστός ο φυσιολογικός τρόπος παραγωγής του ενεργού πολυπεπτιδίου προκύπτουν διάφορες υποθέσεις. Είναι γνωστό ότι στον οργανισμό υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν βρεθεί διάφορα εναλλακτικά μεταγραφήματα της HSA, τα οποία δεν έχουν μέχρι στιγμής συσχετιστεί με κάποια φυσιολογική λειτουργία. Σε πρόσφατη μελέτη (Ταβουλάρη Σ., Διδακτορική Διατριβή, 2005) από ένα εναλλακτικό μεταγράφημα που έχει καταγραφεί σε cDNA βιβλιοθήκη ήπατος, εκφράστηκε ένα πολυπεπίδιο αντίστοιχο του IIIB (αλληλουχία 1-23⁴⁸³-585 της HSA) και εδείχθη ότι έχει δραστικότητα GnSAF. Τα ανωτέρω αποτελούν μια ένδειξη ότι το ενεργό μόριο μπορεί να παράγεται μέσω μηχανισμών εναλλακτικής ωρίμανσης του mRNA της HSA.

Προκαταρκτικά πειράματα RT-PCR σε κοκκώδη κύτταρα, έδειξαν ότι τόσο το εναλλακτικό μεταγράφημα που προαναφέρεται όσο και η HSA δεν εκφράζονται σε ανιχνεύσιμα επίπεδα (Ταβουλάρη Σ., αδημοσίευτα αποτελέσματα). Επειδή έχει δειχθεί ότι η δραστηριότητα GnSAF εντοπίζεται σε ωοθυλάκια μικρού μεγέθους (Fowler *et al.*, 2001), αξίζει να γίνει μελέτη ωοθυλακίων σε διάφορα στάδια ανάπτυξης.

Διερευνήσαμε ωστόσο και άλλα ενδεχόμενα, για παράδειγμα αν είναι πιθανό ο υποτομέας IIIB να προκύπτει με πρωτεολυτική σχάση της HSA. Ήδη με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα είναι γνωστή η ύπαρξη πολυπεπτιδίων που έχουν διαφορετική βιολογική λειτουργία από τις πρωτεΐνες από τις οποίες σχάζονται. Παραδείγματος χάρη ένα εσωτερικό πρωτεολυτικό θραύσμα του πλασμινογόνου που ονομάζεται αγγειοστατίνη (O'Reilly *et al.*, 1994) και ένα καρβοξυτελικό τμήμα του κολλαγόνου XVIII που λέγεται ενδοστατίνη (O'Reilly *et al.*, 1997), αποτελούν αναστολείς της αγγειογένεσης.

Για την προσέγγιση ενός αντίστοιχου ενδεχομένου, αρχικά με αναλύσεις της πεπτιδικής αλληλουχίας της HSA προσπαθήσαμε να βρούμε πιθανές θέσεις πρωτεολυτικής σχάσης που να αιτιολογούν την παραγωγή του ενεργού πολυπεπτιδίου από ολόκληρο το μόριο. Βρέθηκαν τρεις θέσεις αναγνώρισης (Arg-Arg) για την καθεψίνη B, με μία από αυτές πριν τα όρια που χωρίζουν τον υποτομέα IIIB από το υπόλοιπο μόριο της αλβουμίνης (κατάλοιπα 484-485) (Εικόνα 4.1).

Η καθεψίνη B είναι ένα μέλος της οικογένειας των λυσοσωμικών κυστεϊνικών πρωτεασών. Σε διάφορες πειραματικές μελέτες έχει δειχθεί ότι η καθεψίνες B, H, K, L, S, με βάση τη κατανομή των mRNAs που τις κωδικοποιούν, παράγονται στις ωοθήκες του ανθρώπου και του ποντικού, συχνά σε σχετικά υψηλά επίπεδα (Petanceska and Devi, 1992, Bromme and Okamoto, 1995, Rantakokko *et al.*, 1996, Soderstrom *et al.*, 1999, Oksjoki *et al.*, 2001). Είναι ακόμη γνωστό ότι σε άλλους ιστούς οι καθεψίνες σε συνδυασμό με τις μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) παίζουν ενεργό ρόλο στη αποικοδόμηση του στρώματος (extracellular matrix, ECM), συμπεριλαμβανομένων των κολλαγόνων (Maciewicz and Wotton, 1991, Kakegawa *et al.*, 1993, Bossard *et al.*, 1996). Επίσης θεωρείται ότι η αποικοδόμηση του ECM παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των ωοθηκών. Η διαφοροποίηση των βλαστικών κυττάρων σε αρχέγονα ωοθυλάκια, η περαιτέρω ανάπτυξή τους σε ώριμα ωοθυλάκια και η ρήξη τους, ο σχηματισμός του ωχρού σωματίου και η επακόλουθη

ατρησία, περιλαμβάνουν μετακίνηση και εκτόπιση κυττάρων καθώς και καταστροφή και επιδιόρθωση του ECM (Woessner, 1982, 1991).

Η καθεψίνη Β εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο βλαστικό επιθήλιο των ωοθηκών και ιδιαιτέρως στα σημεία όπου αυτό έρχεται σε επαφή με το ώριμο ωοθυλάκιο (Graafian follicle) και βάσει αυτού πιστεύεται ότι το συγκεκριμένο ένζυμο εμπλέκεται στη ρήξη του ωοθυλακίου (Oksjoki *et al.*, 2001). Αυτή η λειτουργία θα μπορούσε να είναι άμεση ή έμμεση εφόσον έχει δειχθεί ότι συντελεί στην ενεργοποίηση των MMPs (Kostoulas *et al.*, 1999).

Πειράματα που έλαβαν χώρα κατά την παρούσα εργασία έδειξαν ότι η HSA παρουσία καθεψίνης Β σχάζεται χωρίς να υπάρχουν σε ανιχνεύσιμα επίπεδα ζώνες σε χαμηλά μοριακά βάρη, ενώ σε ό,τι αφορά τον DIII διαπιστώσαμε την αστάθειά του σε όξινο pH (Dockal *et al.*, 2000) χωρίς να ανιχνεύονται πρωτεολυτικές ζώνες. Η πολυπλοκότητα των αποτελεσμάτων όσον αφορά την HSA λόγω των πολλών πιθανών πρωτεολυτικών θραυσμάτων και η αστάθεια του DIII στα pH δράσης της καθεψίνης Β αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην περαιτέρω μελέτη.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ύπαρξη μιας θέσης LEVD στα όρια μεταξύ των υποτομών IIIA και IIIB (κατάλοιπα 491-494) (Εικόνα 4.1). Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές το τετραπεπτίδιο αυτό αναγνωρίζεται από κασπάσες (Talanian *et al.*, 1997, Leo *et al.*, 2001, He *et al.*, 2003) οι οποίες αποτελούν ενδοκυττάριας κυστεϊνικές πρωτεάσες που δρουν κατά τη διάρκεια της απόπτωσης.

Η αλληλουχία LEVD έχει βρεθεί ότι περιέχεται στην TRAF1, μέλος της οικογένειας των πρωτεϊνών TRAF (TNF receptor associated factor) οι οποίες αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TNF (tumor necrosis factor) και ρυθμίζουν την απόπτωση. Συγκεκριμένα το τετραπεπτίδιο LEVD της TRAF1 αναγνωρίζεται από την κασπάσες 3, 6, 8, 10 σε πειράματα *in vitro* και μόνο από την κασπάση 8 *in vivo*, η πρωτεΐνη σχάζεται σε δύο τμήματα τα οποία παίζουν ρόλο στην απόπτωση (Leo *et al.*, 2001). Επιπλέον η LEVD χρησιμοποιείται για τη δημιουργία ενός χμιαϊρικού πολυπεπτιδίου (CFP-LEVD-YFP) ευαίσθητου στις κασπάσες 3, 6, 8, και 10, σε μια μέθοδο μεταφοράς ενέργειας συντονισμού με βάση το φθορισμό (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) που επινοήθηκε πρόσφατα για να ανιχνεύεται η αποπτωτική δραστηριότητα ζωντανών κυττάρων (He *et al.*, 2003).

Σε συνδυασμό με όσα προαναφέρονται αξίζει να σημειωθεί το ενδεχόμενο ενδοκυττάρωσης της HSA. Όπως έχει γίνει γνωστό μέσα από πειραματικές μελέτες, η HSA ενδοκυττάρωνεται μέσω ειδικών υποδοχέων που υπάρχουν στα ενδοθηλιακά

κύτταρα των τριχοειδών αγγείων (Antohe *et al.*, 1993, Schnitzer and Oh, 1994) και στα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων (Birn *et al.*, 2000, Erkan *et al.*, 2001).

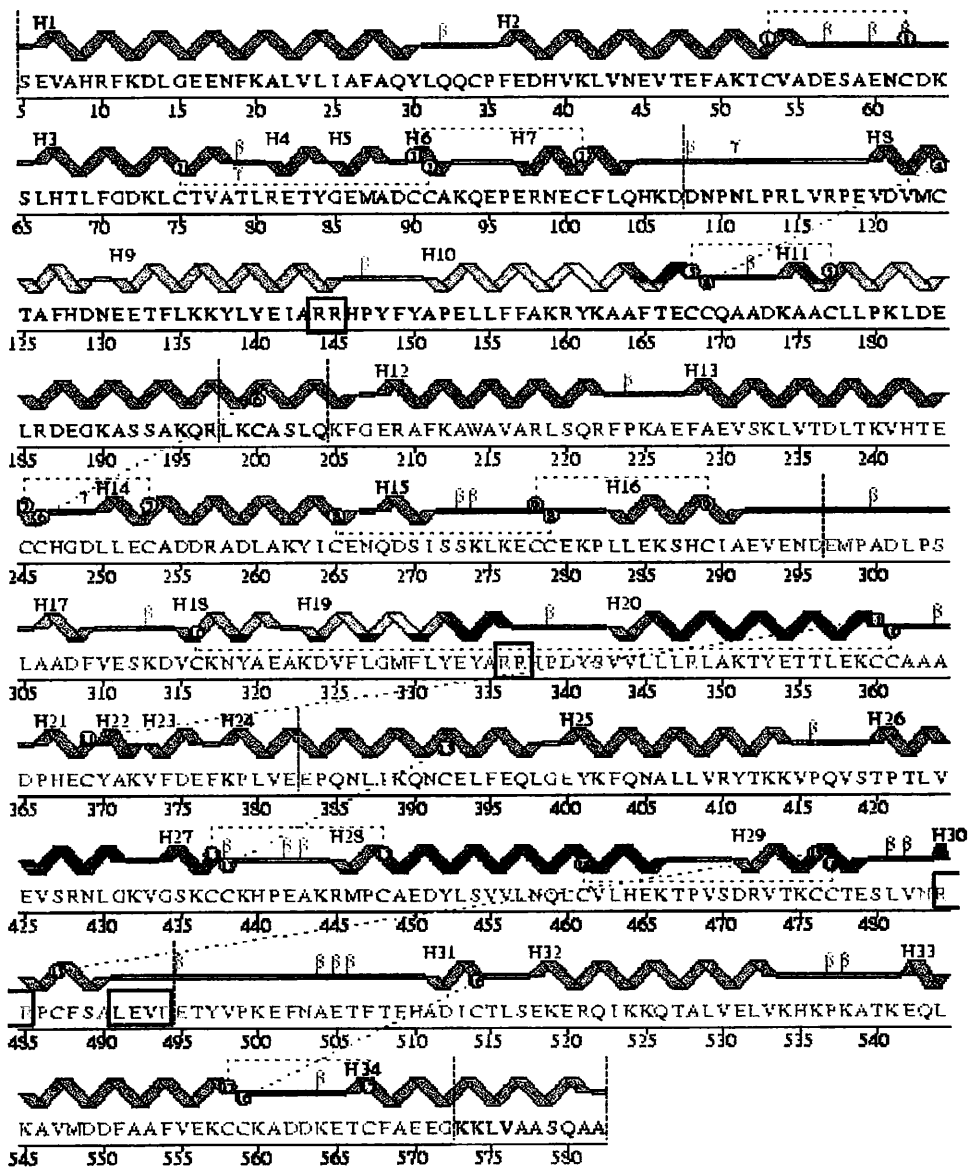
Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος περιλαμβάνει πολλά στάδια στα οποία συμμετέχει ένα πλήθος ενδοκυττάρων πρωτεϊνών με μέλη της οικογένειας των κασπασών να κατέχουν κεντρικό ρόλο. Στις ωσθήκες η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία μέσω της οποίας η περίσσεια ή τα μη βιώσιμα γαμετικά και τα κοκκώδη κύτταρα απαλείφονται κατά την οντογένεση καθώς και κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής σε κάθε εμμηνορρυσιακό κύκλο. Συγκεκριμένα φαινόμενα απόπτωσης εμφανίζονται κατά την ωοθυλακική φάση όπου ωριμάζει ένα μόνο ωοθυλάκιο, το κυρίαρχο, ενώ τα υπόλοιπα υποστρέφονται (ατρησία) και κατά την ωχρινική φάση κατά τη διαδικασία υποστροφής του ωχρού σωματίου (Guyton and Hall, 1997, Johnson and Bridgham, 2002).

Οι κασπάσες 2, 3, 9, 11 και 12 εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης σε κύτταρα των ωσθηκών όπως προκύπτει με χρήση γενετικών μοντέλων γονιδιακής απενεργοποίησης σε ποντίκια (Bergeron *et al.*, 1998, Matikainen *et al.*, 2001, Morita *et al.*, 2001). Η απόπτωση που ξεκινά στα ωοκύτταρα κατά τη μετάβαση από τα πρωτογενή στα προ του άντρου ωοθυλάκια (πρώιμη ωοθυλακική φάση) εξαρτάται από την κασπάση 2 (Morita *et al.*, 2001). Η απόπτωση του ωοκυττάρου οδηγεί σε απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν, με αποτέλεσμα την ατρησία. Αντιθέτως κατά τη μετάβαση από το στάδιο πριν από το σχηματισμό του άντρου στα προωρρηκτικά ωοθυλάκια (πρώιμη-μέση ωοθυλακική φάση) η ατρησία ξεκινά με ταχεία απόπτωση της στοιβάδας των κοκκωδών κυττάρων, η οποία τελικά οδηγεί σε απόπτωση του ωοκυττάρου (Morita and Tilly, 1999, Tilly, 2001). Στη φάση αυτή η απόπτωση εξαρτάται από την ενεργότητα των κασπασών 3 και 7 (Matikainen *et al.*, 2001). Επιπροσθέτως έχει δείχθει ότι οι ωσθήκες από ποντίκια που έχουν γονιδιακά απενεργοποιημένη την κασπάση 9, περιέχουν πολυάριθμα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, τα οποία αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν την ατρησία εξαιτίας μιας προφανούς αδυναμίας απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων (Maravei *et al.*, 2001). Πρέπει ακόμη να σημειωθεί ότι παρόλο που δεν έχουν μελετηθεί λεπτομερώς τα μονοπάτια κασπασών που συνδέονται με απόπτωση μέσω υποδοχέων (death receptors), υπάρχουν στοιχεία τα οποία δείχνουν έκφραση και ενεργότητα της κασπάσης 8 στα κοκκώδη κύτταρα (Hu *et al.*, 2001).

Στο σημείο αυτό είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο GnSAF θεωρείται ότι παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα (Fowler *et al.*, 2001) και ότι η δραστηριότητά του

εμφανίζεται πιο αυξημένη κατά το πρώτο μισό της ωοθυλακικής φάσης (Fowler *et al.*, 2002). Λαμβάνοντας υπόψη όσα αναφέρθηκαν προηγουμένως για τη δράση των κασπασών, φαίνεται ότι η παραγωγή και η δράση του GnSAF κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου σχετίζεται με την απόπτωση στις ωοθήκες τουλάχιστον σε ό,τι αφορά το χρόνο.

Πειράματα που πραγματοποιήσαμε με τη χρήση των ανθρώπινων κασπασών 1-10 κατά τη διάρκεια της παρούσας ερευνητικής εργασίας έδωσαν πιθανά προϊόντα ειδικής πρωτεολυτικής σχάσης, όμως όπως διαπιστώθηκε έπειτα από φασματομετρία μαζών (MS) η περίσσεια ενεργών τμημάτων των κασπασών μείωσαν την ευκρίνεια της εικόνας και σε ορισμένες περιπτώσεις κοινές προσμίξεις κερατινών επισκίασαν τις μικρές ποσότητες δειγμάτων. Επομένως έχει ενδιαφέρον να εξετασθεί περαιτέρω η πρωτεολυτική σχάση από κασπάσες και ιδιαίτερα χρησιμοποιώντας σημασμένη HSA, για παράδειγμα βιοτινυλιωμένη ή ραδιοσημασμένη όπως στην περίπτωση της TRAF1 (Leo *et al.*, 2001) για την ανίχνευση ακόμη και μικρών ποσοτήτων πρωτεολυτικών θραυσμάτων της αλβουμίνης.



Εικόνα 4.1 : Οι δομικές περιοχές της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA). Με διαφορετικά χρώματα στην αλληλουχία διακρίνονται διαδοχικά οι υποτομείς IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB. Οι θέσεις αναγνώρισης (RR) για την καθεψίνη Β διακρίνονται σε πράσινο πλαίσιο. Η θέση LEVD που αναγνωρίζεται από κασπάσες διακρίνεται σε κόκκινο πλαίσιο (βάσει του <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases>).

5. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Antohe, F., Dobrila, L., Heltianu, C., Simionescu, N., Simionescu, M. (1993) Albumin-binding proteins function in the receptor-mediated binding and transcytosis of albumin across cultured endothelial cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 60, 268-75.
2. Barr, K.A., Hopkins, S. A., Sreekrishna, K. (1992) Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia Pastoris*. *Pharm. Eng.*, 12, 48-51.
3. Bergeron, L., Perez, G.I., Macdonald, G., Shi, L., Sun, Y., Jurisicova, A., Varmuza, S., Latham, K.E., Flaws, J.A., Salter, J.C., Hara, H., Moskowitz, M.A., Li, E., Greenberg, A., Tilly, J.L., Yuan, J. (1998) Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. *Genes Dev.*, 12, 1304-14.
4. Birn, H., Fyfe, J.C., Jacobsen, C., Mounier, F., Verroust, P.J., Orskov, H., Willnow, T.E., Moestrup, S.K., Christensen, E.I. (2000) Cubilin is an albumin binding protein important for renal tubular albumin reabsorption. *J. Clin. Invest.*, 105, 1353-61.
5. Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Thompson, S.K., Amegadzie, B.Y., Hanning, C.R., Jones, C., Kurdyla, J.T., McNulty, D.E., Drake, F.H., Gowen, M., Levy, M.A. (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. *J Biol Chem.*, 271, 12517-12524.
6. Bromme, D. and Okamoto, K. (1995) Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 376, 379-84.
7. Burger, L.L., Haisenleder, D.J., Dalkin, A.C, Marshall, J.C. (2004) Regulation of gonadotropin subunit gene transcription. *J. Mol. Endocrinol.*, 33, 559-584.
8. Busbridge, N.J., Buckley, D.M., Cornish, M., Whitehead, S.A. (1988) Effects of ovarian hyperstimulation and isolated preovulatory follicles on LH responses to GnRH in rats. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 329-336.
9. Byrne, B., Fowler, P.A., Fraser, M., Culler, M.D., Templeton, A. (1995) Gonadotropin surge-attenuating factor bioactivity in serum from superovulated women is not blocked by inhibin antibody. *Biol. Reprod.*, 52, 88-95.

10. Campen, C.A. and Vale, W. (1988) Interaction between purified ovine inhibin and steroids on the release of gonadotropins from cultured rat pituitary cells. *Endocrinology*, 123, 1320-8.
11. Carter, D.C. and Ho, J.X. (1994) Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 45, 153-203.
12. Culler, M.D. (1992) In vivo evidence that inhibin is a gonadotropin surge-inhibiting/attenuating factor. *Endocrinology*, 131, 1556-8.
13. Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., Marshall, J.C. (1989) The frequency of gonadotropin-releasing-hormone stimulation differentially regulates gonadotropin subunit messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinology*, 125, 917-24.
14. Danforth, D.R. and Cheng, C.Y. (1995) Purification of a candidate gonadotropin surge inhibiting factor from porcine follicular fluid. *Endocrinology*, 136, 1658-1665.
15. Danforth, D.R. and Cheng, C.Y. (1993) The identification of gonadotrophin surge inhibiting factor and its role in the regulation of pituitary gonadotrophin secretion. *Hum. Reprod.*, 8, 117-22.
16. Danforth, D.R., Sinosich, M.J., Anderson, T.L., Cheng, C.Y., Bardin, C.W., Hodgen, G.D. (1987) Identification of gonadotropin surge-inhibiting factor (GnSIF) in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol. Reprod.*, 37, 1075-1082.
17. Dockal, M., Carter, D.C., Ruker, F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.*, 274, 29303-29310.
18. Dockal, M., Carter, D.C., Ruker, F. (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. *J. Biol. Chem.*, 275, 3042-50.

19. Drmanovic, Z., Voyatzi, S., Kouretas, D., Sahpazidou, D., Papageorgiou, A., Antonoglou, O. (1999) Albumin possesses intrinsic enolase activity towards dihydrotestosterone which can differentiate benign from malignant breast tumors. *Anticancer Res.*, 19, 4113-24.
20. Erkan, E., De Leon, M., Devarajan, P. (2001) Albumin overload induces apoptosis in LLC-PK(1) cells. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 280, 1107-14.
21. Farnworth, P.G., Robertson, D.M., de Kretser, D.M., Burger, H.G. (1988) Effects of 31 kDa bovine inhibin on FSH and LH in rat pituitary cells in vitro: antagonism of gonadotrophin-releasing hormone agonists. *J. Endocrinol.*, 119, 233-41.
22. Fowler, P.A., Fahy, U., Culler, M.D., Knight, P.G., Wardle, P.G., McLaughlin, E.A., Cunningham, P., Fraser, M., Hull, M.G., Templeton, A. (1995) Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum. Reprod.*, 10, 68-74.
23. Fowler, P.A., Fraser, M., Cunningham, P., Knight, P.G., Byrne, B., McLaughlin, E.A., Wardle, P.G., Hull, M.G., Templeton, A. (1994) Higher gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is found in small follicles from superovulated women. *J. Endocrinol.*, 143, 33-44.
24. Fowler, P.A., Messinis, I.E., Templeton, A.A. (1990) Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 587-594.
25. Fowler, P.A., Sorsa-Leslie, T., Cash, P., Dunbar, B., Melvin, W., Wilson, Y., Mason, H.D., Harris, W. (2002) A 60-66 kDa protein with gonadotrophin surge attenuating factor bioactivity is produced by human ovarian granulosa cells. *Mol. Hum. Reprod.*, 8, 823-832.
26. Fowler, P.A., Sorsa, T., Harris, W.J., Knight, P.G., Mason, H.D. (2001) Relationship between follicle size and gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women. *Hum. Reprod.*, 16, 1353-58.

27. Fowler, P.A., Sorsa-Leslie, T., Harris, W., Mason, H.D. (2003) Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction*, 126, 689-99.
28. Gibbs, P.E. and Dugaiczyk, A. (1987) Origin of structural domains of the serum-albumin gene family and a predicted structure of the gene for vitamin D-binding protein. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 364-379.
29. Guyton, A.C. and Hall, J.E. (1997) Human physiology and mechanisms of disease. *W.B. Saunders Co.*, Pennsylvania, PH.
30. He, X.M. and Carter, D.C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358, 209-215.
31. He, L., Olson, D.P., Wu, X., Karpova, T.S., McNally, J.G., Lipsky, P.E. (2003) A flow cytometric method to detect protein-protein interaction in living cells by directly visualizing donor fluorophore quenching during CFP→YFP Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). *Wiley-Liss, Inc.*, 55A, 71-85.
32. Horn, F., Bilezikjian, L.M., Perrin, M.H., Bosma, M.M., Windle, J.J., Huber, K.S., Blount, A.L., Hille, B., Vale, W., Mellon, P.L. (1991) Intracellular responses to gonadotropin-releasing hormone in a clonal cell line of the gonadotrope lineage. *Mol. Endocrinol.*, 5, 347-55.
33. Hu, X., Christian, P.J., Thompson, K.E., Sipes, I.G., Hoyer, P.B. (2001) Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biol. Reprod.*, 65, 87-93.
34. Il'ichev, Y.V., Perry, J.L., Ruker, F., Dockal, M., Simon, J.D. (2002) Interaction of ochratoxin A with human serum albumin. Binding sites localized by competitive interactions with the native protein and its recombinant fragments. *Chem. Biol. Interact.*, 141, 275-93.
35. Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.

36. Jones, D.T., Ganeshaguru, K., Anderson, R.J., Jackson, T.R., Bruckdorfer, K.R., Low, S.Y., Palmqvist, L., Prentice, H.G., Hoffbrand, A.V., Mehta, A.B., Wickremasinghe, R.G. (2003) Albumin activates the AKT signaling pathway and protects B-chronic lymphocytic leukemia cells from chlorambucil- and radiation-induced apoptosis. *Blood*, 101, 3174-80.
37. Kakar, S.S., Musgrove, L.C., Devor, D.C., Sellers, J.C., Neill, J.D. (1992) Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 189, 289-95.
38. Kakar, S.S., Rahe, C.H., Neill, J.D. (1993) Molecular cloning, sequencing, and characterizing the bovine receptor for gonadotropin releasing hormone (GnRH). *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10, 335-42.
39. Kakegawa, H., Nikawa, T., Tagami, K., Kamioka, H., Sumitani, K., Kawata, T., Drobnic-Kosorok, M., Lenarcic, B., Turk, V., Katunuma, N. (1993) Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett.*, 321, 247-50.
40. Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M., Chin, W.W. (1995) A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 12280-84.
41. Knight, P.G., Lacey, M., Peter, J.L.T., Whitehead, S.A. (1990) Demonstration of a nonsteroidal factor in human follicular fluid that attenuates the self-priming action of gonadotropin-releasing hormone on pituitary gonadotropes. *Biol. Reprod.*, 42, 613-618.
42. Kooistra, T., Millard, P.C., Lloyd, J.B. (1982) Role of thioles in degradation of protein by cathepsins. *Biochem. J.*, 204, 471-477.
43. Koppelaar, D.W., Tijssen, A.M.I., de Koning, J. (1992) The effect of gonadotrophin surge-inhibiting factor on the self-priming action of gonadotrophin-releasing hormone in female rats *in vitro*. *J. Endocrinol.*, 134, 427-436.
44. Kostoulas, G., Langa, A., Nagaseb, H., Baicia, A. (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett.*, 455, 286-290.

45. Kragh-Hansen, U., Chuang, V.T., Otagiri, M. (2002) Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, 25, 695-704.
46. Kukor, Z., Mayerle, J., Kruger, B., Toth, M., Steed, P.M., Halangk, W., Lereh, M.M., Sabln-Toth, M. (2002) Presence of cathepsin B in the human pancreatic secretory pathway and its role in trypsinogen activation during hereditary pancreatitis. *J. Biol. Chem.*, 277, 21389-96.
47. Leo, E., Deveraux, Q.L., Buchholtz, C., Welsh, K., Matsuzawa, S., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Reed, J.C. (2001) TRAF1 is a substrate of caspases activated during tumor necrosis factor receptor-alpha-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 276, 8087-93.
48. Levi, N.L., Hanoch, T., Benard, O., Rozenblat, M., Harris, D., Relss, N., Naor, Z. and Seger, R. (1998) Stimulation of Jun N-terminal kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary alpha T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol. Endocrinol.*, 12, 815-24.
49. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2004) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc., USA.
50. Maciewicz, R.A. and Wotton, S.F. (1991) Degradation of cartilage matrix components by the cysteine proteinases, cathepsins B and L. *Biomed. Biochim. Acta*, 50, 561-564.
51. Maravei, D.V., Morita, Y., Kuida, K., Tilly, J.L. (2001) Pre- and postnatal ovarian apoptosis defects in caspase-9-deficient mice. *Endocrine Society Annual Meeting 2001*, Abstract 2037.
52. Matikainen, T., Perez, G.I., Zheng, T.S., Kluzak, T.R., Rueda, B.R., Flavell, R.A., Tilly, J.L. (2001) Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*, 142, 2468-80.
53. Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A., Schally, A.V. (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 43, 1334-9.

54. Melsert, R., Bos, O.J., van der Linden, R.F., Fischer, M.J., Wilting, J., Janssen, L.H., Hoogerbrugge, J.W., Rommerts, F.F. (1991) The stimulatory effect of albumin on luteinizing hormone-stimulated Leydig cell steroid production depends on its fatty acid content and correlates with conformational changes. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 82, 23-32.
55. Melsert, R., Hoogerbrugge, J.W., Rommerts, F.F. (1988) The albumin fraction of rat testicular fluid stimulates steroid production by isolated Leydig cells *Mol. Cell. Endocrinol.*, 59, 221-31.
56. Melsert, R., Hoogerbrugge, J.W., Rommerts, F.F. (1989) Albumin, a biologically active protein acting on Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 64, 35-44.
57. Merelli, F., Stojilkovic, S.S., Iida, T., Krsmanovic, L.Z., Zheng, L., Mellon, P.L., Catt, K.J. (1992) Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. *Endocrinology*, 131, 925-32.
58. Messinis, I.E. and Templeton A.A. (1990a) Superovulation induction in women suppresses luteinizing hormone secretion at the pituitary level. *Clin. Endocrinol.*, 32, 107-114.
59. Messinis, I.E. and Templeton, A.A. (1989) Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. *J. Reprod. Fertil.*, 87, 633-639.
60. Messinis, I.E. and Templeton, A.A. (1991) Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin. Endocrinol.*, 34, 259-263.
61. Morita, Y., Maraveim D.V., Bergeron, L., Wang, S., Perez, G.I., Tsutsumi, O., Taketani, Y., Asano, M., Horai, R., Korsmeyer, S.J., Iwakura, Y., Yuan, J., Tilly, J.L. (2001) Caspase-2 deficiency prevents programmed germ cell death resulting from cytokine insufficiency but not meiotic defects caused by loss of ataxia telangiectasia-mutated (Atm) gene function. *Cell Death Differ.*, 8, 614-20.
62. Morita, Y. and Tilly, J.L. (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.*, 213, 1-17.

-
63. Nguyen, K.A., Santos, S.J., Kreidel, M.K., Diaz, A.L., Rey, R. and Lawson, M.A. (2004) Acute regulation of translation initiation by gonadotropin-releasing hormone in the gonadotrope cell line LbetaT2. *Mol. Endocrinol.*, 18, 1301-12.
64. Nusscy, S. and Whitehead S. (2001) *Endocrinology: An Integrated Approach*, BIOS Scientific Publishers Ltd, London, UK.
65. Oksjoki, S., Soderstrom, M., Vuorio, E., Antilla, L. (2001) Differential expression patterns of cathepsins B, H, K, L and S in the mouse ovary. *Mol. Hum. Repr.*, 7, 27-34.
66. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R. and Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-285.
67. O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H. and Folkman, J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79, 315-328.
68. Pappa, A., Seferiadis, K., Fotsis, T., Shevchenko, A., Marselos, M., Tsolas, O., Messinis, I.E. (1999b) Purification of a candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid. *Hum. Reprod.*, 14, 1449-56.
69. Pappa, A., Seferiadis, K., Marselos, M., Tsolas, O. and Messinis, I.E. (1999a) Development and application of competitive ELISA assays for rat LH and PSH. *Theriogenology*, 51, 911-926.
70. Petanceska, S. and Devi, L. (1992) Sequence analysis, tissue distribution, and expression of rat cathepsin S. *J. Biol. Chem.*, 267, 26038-43.
71. Peters, T., Jr. (1996) All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications., *Academic Press, Inc.*, Orlando, FL.
72. Peters, T., Jr. and Hawn, S. (1967) Isolation of two large peptide fragments from the amino- and carboxyl-terminal positions of bovine serum albumin. *J. Biol. Chem.*, 242, 1566-73.

73. Rantakokko, J., Aro, H.T., Savontaus, M., Vuorio, E. (1996) Mouse cathepsin K: cDNA cloning and predominant expression of the gene in osteoclasts, and in some hypertrophying chondrocytes during mouse development. *FEBS Lett.*, 16, 307-313.
74. Roberson, M.S., Zhang, T., Li, H.L. and Mulvaney, J.M. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 140, 1310-18.
75. Reiss, N., Llevi, L.N., Shacham, S., Harris, D., Seger, R. and Naor, Z. (1997) Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by gonadotropin-releasing hormone in the pituitary of alphaT3-1 cell line: differential roles of calcium and protein kinase C. *Endocrinology*, 138, 1673-82.
76. Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M., Debeljuk, L. and White, W.F. (1971) Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*, 173, 1036-38.
77. Schenken, R.S. and Hodgen, G.D. (1986) Follicle-stimulating hormone blocks estrogen-positive feedback during the early follicular phase in monkeys. *Fertil. Steril.*, 45, 556-560.
78. Schnitzer, J.E. and Oh, P. (1994) Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.*, 269, 6072-82.
79. Soderstrom, M., Salminen, H., Glumoff, V., Kirschke, H., Aro, H., Vuorio, E. (1999) Cathepsin expression during skeletal development. *Biochim. et Biophys. Acta*, 1446, 35-46.
80. Sopelak, V.M. and Hodgen, G.D. (1984) Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys: a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 41, 108-113.
- 81.) Tavoulari, S., Prilingos, S., Karatza, P., Messinis, I.E., Seferiadis, K. (2004) The recombinant subdomain IIIB of human serum albumin displays activity of gonadotrophin surge attenuating factor. *Hum. Reprod.*, 19, 849-858.

82. Talanian, R.V., Quinlan, C., Trautz, S., Hackett, M.C., Mankovich, J.A., Banach, D., Ghayur, T., Brady, K.D., Wong, W.W. (1997) Substrate specificities of caspase family proteases. *J. Biol. Chem.*, 272, 9677-82.
83. Tijssen, A.M., Helder, M.N., Chu, Z.W. and de Koning, J. (1997) Intracellular antagonistic interaction between GnRH and gonadotrophin surge-inhibiting/attenuating factor bioactivity downstream of second messengers involved in the self-priming process. *J. Reprod. Fertil.*, 111, 235-242.
84. Tilly, J.L. (2001) Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 838-848.
85. Tio, S., Koppenaal, D., Bardin, C.W. and Cheng, C.Y. (1994) Purification of gonadotropin surge-inhibiting factor from Sertoli cell-enriched culture medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199, 1229-36.
86. Watanabe, H., Tanase, S., Nakajou, K., Maruyama, T., Kragh-Hansen, U., Otagiri, M. (2000) Role of arg-410 and tyr-411 in human serum albumin for ligand binding and esterase-like activity. *Biochem. J.*, 349, 813-9.
87. Woessner, J.F. Jr. (1982) Uterus, cervix and ovary. In Weiss, J.B. and Jayson, M.I.V. (eds), *Collagen in Health and Disease*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 506-527.
88. Woessner, J.F. Jr. (1991) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *FASEB J.*, 5, 2145-54.
89. Zoellner, H., Hofler, M., Beckmann, R., Hufnagl, P., Vanyek, E., Bielek, E., Wojta, J., Fabry, A., Lockie, S., Binder, B.R. (1996) Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. *J. Cell. Sci.*, 109, 2571-80.