

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΟΜΕΑΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ - ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ

> **ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ** ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΦΩΤΣΗΣ Καθηγητής ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ GnSAF (Παράγοντας Άμβλυσης του Κύματος των Γοναδοτροφινών)

**ΣΩΤΗΡΙΑ ΤΑΒΟΥΛΑΡΗ** ΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

### ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

IOANNINA 2005



Constant and Statement Party Comments Party States

and the second second

the second s

A REAL PROPERTY AND A REAL

Charles and the second support the work in post, the

the state of the second second

Progenieres and density of the second second the second second second second second second second second second

a server a server and the server and

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ισαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).» Ημερομηνία αιτήσεως : 13-7-2001

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής : 4519/6-11-2001

Μέλη τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής Σεφεριάδης Κωνσταντίνος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Επιβλέπων Μεσσήνης Ιωάννης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Μέλος Φριλίγγος Ευστάθιος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Μέλος

Ημερομηνία ορισμού θέματος : 20-11-2001

Ημερομηνία κατάθεσης της διδακτορικής διατριβής : 16-2-2005

Πρόεδρος της Ιατρικής Σχολής: Επαμεινώνδας Τσιάνος, Καθηγητής Παθολογίας

Μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Αγαθοκλής Τσατσούλης, Καθηγητής Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Ιωάννης Μεσσήνης, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Κωνσταντίνος Σεφεριάδης, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας Ελίζαμπεθ Τζόνσον, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ανατομίας-Ιστολογίας-Εμβρυολογίας Αναστασία Πολίτου, Επίκουρος Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας

Ευστάθιος Φριλίγγος, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Βαθμός: Άριστα

Γραμματέας της Σχολής ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΤΣΑΓΓΑΛΑ

## TEP-MINTER

and the second 

Αφιερώνεται στο Στάθη και στη Γιώτα γιατί το ζήσαμε μαζί 🐇 and the second second second

Contract of the second and the second ates 

the second state of the second 

wind the second W ANIC M the second s

A CONTRACT SERVICE AND A CONTRACT OF A CONTRACT.

#### προλογος

Ο Παράγοντας Άμβλυνσης του Κύματος των Γοναδοτροπινών είναι ένας υποθετικός ωοθηκικός παράγοντας, που συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της ωχρινοτρόπου ορμόνης (Luteinizing hormone-LH) από την υπόφυση. Η απομόνωση και ταυτοποίηση του παράγοντα αυτού από βιολογικά υγρά δεν έχει καταστεί δυνατή έως σήμερα. Στα πλαίσια προηγούμενης μελέτης απομόνωσης της δραστικότητας GnSAF από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, ο παράγοντας GnSAF συσχετίστηκε με το καρβοξυτελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA).

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε ο βιοχημικός χαρακτηρισμός ενός ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου με δραστικότητα GnSAF που αντιστοιχεί στον Cτελικό υποτομέα (IIIB) της HSA (κατάλοιπα 490-585). Τα αποτελέσματα που προέκυψαν υποστηρίζουν ότι ο υποτομέας IIIB της HSA είναι ένα δομικά ανεξάρτητο πολυπεπτίδιο, που παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF. Η δράση του στην υπόφυση είναι ειδική και δεν αποδίδεται στην πλήρη HSA ή σε άλλους τομείς αυτής.

Η παρούσα Διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Χρηματοδοτήθηκε από το Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 99 της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας, από την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και από το Πρόγραμμα "Ηράκλειτος" του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τη συμβολή τους στην περάτωση της Διατριβής μου. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή Κωνσταντίνο Σεφεριάδη, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, που με προέτρεψε να ασχοληθώ με τη μελέτη του GnSAF και μου προσέφερε τη δυνατότητα ανάληψης πρωτοβουλιών. Ευχαριστώ επίσης το μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιωάννη Μεσσήνη, για τις συμβουλές του και για τη συμμετοχή μου στο Πρόγραμμα ΠΕΝΕΔ 99.

Η ολοκλήρωση της Διατριβής αυτής θα ήταν αδύνατη χωρίς την συνεχή επίβλεψη και συμπαράσταση του μέλους της συμβουλευτικής επιτροπής Επίκουρου Καθηγητή Ευστάθιου Φριλίγγου. Τον ευχαριστώ για όσα μου δίδαξε, για τις ατελείωτες ώρες που μου αφιέρωσε, αλλά και γιατί ήταν δίπλα μου σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

H ISLANNIN

Απευθύνω επίσης τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογικής Χημείας για την συνεργασία μας και για τη βοήθεια που μου προσέφεραν οποτεδήποτε τη χρειάστηκα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Δρ. Carol Murphy και την Επίκουρο Καθηγήτρια Αναστασία Πολίτου, για τις χρήσιμες συμβουλές τους. Θα ήθελα επίσης να αναφερθώ στα μέλη του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας, Φαρμακολογίας, Ανοσολογίας και Κλινικής Χημείας που πολλές φορές διευκόλυναν την εργασία μου παρέχοντας μου τον εξοπλισμό τους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Δρ. Σοφία Ευταξία και τον Δρ. Πέτρο Μποζίδη που με δίδαξαν στα πρώτα μου βήματα στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής μου Ειδίκευσης.

Στην πρόοδο των αποτελεσμάτων της Διατριβής αυτής συνετέλεσαν η μεταπτυχιακή φοιτήτρια Χριστίνα Θεοδωράκη και η υποψήφια Διδάκτωρ Παναγιώτα Καρατζά που ασχολήθηκαν με τη μελέτη του GnSAF στα πλαίσια της Μεταπτυχιακής τους Ειδίκευσης και τις ευχαριστώ για τη συνεργασία μας. Τη φίλη μου Παναγιώτα Καρατζά ευχαριστώ θερμά γιατί με στηρίζει σε κάθε πτυχή της ζωής μου και μαζί με τους γονείς της μου προσέφερε μια δεύτερη οικογένεια. Ευχαριστώ όλους τους φίλους μου, και ιδιαίτερα τον Παύλο Βαντώλα, για την προθυμία τους να με βοηθήσουν όταν τους είχα ανάγκη. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και την αδελφή μου που υποστήριξαν τις επιλογές μου με κάθε μέσο που διέθεταν και που με έμαθαν να μην παραιτούμαι.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1	- Ο ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΩΟΘΗΚΩΝ	3
1.1.1	Στάδια εμμυνορρυσιακού κύκλου	5
1.1.2	- Η υπόφυση	9
·1.1.3	- Μηχανισμοί ρύθμισης της έκκρισης των γοναδοτροπινών LH και FSH	12
•	Η υποθαλαμική ορμόνη GnRH και η δράση της στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης	12
٠	Στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών οιστραδιόλη και προγεστερόνη	17
٠	Μη στεροειδείς ορμόνες	18
•	Ανασταλτίνη, ακτιβίνη και θυλακιοστατίνη	18
•	Παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών	20
1.2	Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟ- ΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF)	23
1.2.1	Διαφοροποίηση του GDSAF από την ανασταλτίνη	24
1.2.2	Απομόνωση δραστικότητας GnSAF από βιολογικά υγρά	25
1.3	ANΘΡΩΠΙΝΗ AABOYMINH OPOY (Human Serum Albumin-HSA)	2 <b>9</b>
1.3.1	Ο φυσιολογικός ρόλος της HSA	30
1.3.2	Η δομή της αλβουμίνης	31
1.3.3	Χαρτογράφηση θέσεων πρόσδεσης (ligand binding sites) στο μόριο της HSA	33
1.4	Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΛΒΟΥΜΙΝΩΝ	37
1.4.1	α-Εμβρυοπρωτείνη (AFP)	39
1.4.2	Πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (Vitamin-D Binding Protein, DBP)	40
1.4.3	α-Αλβουμίνη ή Αφαμίνη (AFM)	1BA) 41
1.5	ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	43
•		all's

2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	45
2.1	ΟΡΓΑΝΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	47
2.1.1	Όργανα	47
2.1.2	Χημικά αναλώσιμα	47
2.1.3	Πειραματόζωα	48
2.1.4	Στελέχη βακτηρίων και μυκήτων	48
2.1.5	Ανάπτυξη βακτηρίων	50
2.1.6	Ανάπτυξη στελεχών του ζυμομύκητα P.pastoris	50
2.1.7	Αποθήκευση στελεχών του P. pastoris	50
2.1.8	Πλασμίδια	51
2.2	ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA	53
2.2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το στέλεχος GS115/Albumin του P. pastoris	53
2.2.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)	54
2.2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)	56
2.2.4	Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA	58
2.2.5	Μετασχηματισμός της <i>E.coli</i> με πλασμιδιακό DNA	58
2.2.6	Απομόνωση DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα και προσδιορισμός αλληλουχίας	59
2.3	ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ-ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ Pichia. pastoris	61
2.3.1	Χημικός μετασχηματισμός του P. pastoris	62
2.3.2	Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων με απευθείας ανάλυση PCR	63
2.3.3	Καθορισμός φαινοτύπου σχετικά με το μεταβολισμό της μεθανόλης	64
2.3.4	Έκφραση-έκκριση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων στον P. pastoris	B651000
2.4	ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ GnSAF ΚΑΙ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΝΗΣ	67.

2.4.1	Δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων υπόφυσης επιμύων	67
2.4.2	Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF	68
2.4.3	Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας ανασταλτίνης	69
2.4.4	Συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο (ELISA)	70
2.5	<sup>-</sup> ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	73
2.5.1	-Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	73
2.5.2	Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο	74
2.5.3	Ανοσοαποτύπωση πρωτεΐνών	75
2.5.4	Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πεπτιδίων με στήλη νικελίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες	75
2.5.5	Χρωματογραφία Blue Sepharose	76
2.5.5A	Καθαρισμός πολυπεπτιδίων από υπερκείμενα καλλιέργειας του P. pastoris	77
2.5.6	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA	77
2.6	IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	78
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	<b>79</b>
3.1	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ 490- 585 ΤΗΣ HSA (ΥΠΟΤΟΜΕΑΣ ΙШΒ)	81
3.1.1	Κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pPICZaA/DIIIB και pPICZaA/DIIIB-myc- 6His	81
3.1.2	Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων του <i>Pichia pastoris</i> με απευθείας ανάλυση PCR και επιβεβαίωση του Mut <sup>+</sup> φαινοτύπου	82
3.1.3	Έκφραση του υποτομέα IIIB της HSA στο σύστημα του <i>P. pastoris</i>	84
3.1.4	Ο υποτομέας ΙΙΙΒ της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF	87
3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΟΡΟΥ (HSA) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ α-ΕΜΒΡΥΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (AFP)	93

ż,

)o

A IQANNING

ANEILISTHAN

3.2.1	Το πλήρες μόριο της HSA και της AFP δεν παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF	93
3.3	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΩΝ ΤΟΜΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΟΜΕΩΝ ΤΗΣ ΗSA ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ DIIIB	97
3.3.1	Οι τομείς Ι, ΙΙ και ΙΙΙ της HSA δεν παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF	97
3.3.2	Ο υποτομέας ΙΒ της HSA δεν παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF	100
3.4	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΈΝΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΟΥ <i>P. pastoris</i> ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	103
3.4.1	Διαχωρισμός του ενεργού πολυπεπτιδίου ΙΙΙΒ από την HSA και τον τομέα ΙΙΙ με χρωματογραφία Blue Sepharose	103
3.4.2	Καθαρισμός του ενεργού πεπτιδίου DIIIB-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni <sup>2+</sup>	105
3.4.3	Καθαρισμός του τομέα ΙΙΙ της HSA με Blue Sepharose και του III-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni <sup>2+</sup>	107
3.4.4	Έλεγχος δραστικότητας GnSAF για τον υποτομέα IIIB και τον τομέα III σε καθαρισμένα παρασκευάσματα	110
3.4.5	Σχεδιασμός και έκφραση χιμαιρικού τομέα ΙΙΙ	112
3.5	ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΠΙΒ	117
3.5.1	Τα κατάλοιπα 490-508 του Ν-τελικού άκρου του ΙΙΙΒ δεν είναι απαραίτητα για την δραστικότητα GnSAF	117
3.5.2	Η C-τελική α-έλικα του υποτομέα IIIB είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα GnSAF	120
3.5.3	Το πολυπεπτιδικό προϊόν ενός εναλλακτικού μεταγραφήματος της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF	122
3.5.4	Το μεγαλύτερο του ΙΙΙΒ πολυπεπτίδιο 464-585 που αντιστοιχεί σε C-τελικό τμήμα του τομέα ΙΙΙ παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF	125
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129
4.1	ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΙΙΙΝΩΝ ΜΕ ΤΟ C-ΤΕΛΙΚΟ 95ΠΕΠΤΙΔΙΟ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΟΡΟΥ	131
4.2	ΈΝΑΣ ΥΠΟΤΟΜΕΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΟΡΟΥ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΕΙ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΗ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ	133- 133-

4.3	ΜΕΛΕΤΉ ΣΧΕΣΕΩΝ ΔΟΜΉΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥ ΥΠΟΤΟΜΕΑ ΠΙΒ ΤΗΣ HSA	134
4.4	ΝΕΑ ΔΕΔΟΜΈΝΑ ΚΑΙ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ	138
4.5	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΥΠΟΤΟΜΈΑ ΠΙΒ ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΤΡΟΠΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ	140
5	ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	147
6	- ΑΝΑΦΟΡΕΣ	153

. .

4

- **-**

• • • • • • • • • •

...

.

HUNNING HALF BIBALOO HIKH IDANNING V.

#### ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

### Αμινοξέα:

Α ή Ala: αλανίνη Β ή Asx: ασπαραγίνη ή ασπαραγινικό οξύ C ή Cys: κυστείνη D ή Asp: ασπαραγινικό οξύ Ε ή Glu: γλουταμινικό οξύ F ή Phe: φαινυλαλανίνη G ή Gly: γλυκίνη Η ή His: ιστιδίνη Ι ή Ile: ισολευκίνη Κ ή Lys: λυσίνη L ή Leu: λευκίνη Μ ή Met: μεθειονίνη Ν ή Asn: ασπαραγίνη **Ρ** ή Pro: προλίνη Q ή Gln: γλουταμίνη R ή Arg: αργινίνη S ή Ser: σερίνη Τ ή Thr: θρεονίνη V ή Val: βαλίνη W ή Trp: τρυπτοφάνη Υή Τγι: τυροσίνη Ζή Glx: γλουταμίνη ή γλουταμινικό οξύ ActR: activin receptor, υποδοχέας ακτιβίνης AFP: alpha-fetoprotein,  $\alpha$ - εμβρυοπρωτεΐνη αALB: alpha albumin, άλφα αλβουμίνη APS: ammonium persulfate, υπερθειϊκό αμμώνιο BCA: bicinchoninic acid method, μέθοδος δικιγχονικού οξέος

1. 18 A. C.

BMGY: Buffered complex medium containing glycerol, πλήρες θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκερόλη

BMMY: Buffered complex medium containing methanol. πλήρες θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη BSA: bovine serum albumin, αλβουμίνη ορού βοός cDNA: complementary DNA, συμπληρωματικό DNA c-myc: cellular myc,  $\pi \rho \omega \tau o \sigma \gamma \kappa \sigma \gamma o \gamma \delta \omega$  c-myc DAG: diacylglycerol, διακυλογλυκερόλη dNTPs: deoxyribonoucleotides, δεοξυριβονουκλεοτίδια DMSO: dimethyl sulfoxide, διμεθυλοσουλφοξείδιο DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, φυσιολογικό ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών DTT: dithiothreitol, διθειοθρεϊτόλη EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid, αιθυλενοδιάμινοτετραοξικό οξύ ELISA: enzyme linked immunosorbent assay, avogoπροσροφητικός προσδιορισμός συνδεδεμένος με ένζυμο FCS: fetal calf serum, εμβρυικός ορός βοός FSH: follicle stimulating hormone, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSHβ: β υπομονάδα της FSH rFSH: rat FSH, FSH επίμυος GnRH: Gonadotrophin releasing hormone, ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών GnRHR: GnRH receptor, υποδοχέας 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,  $\alpha \nu \theta \rho \omega \pi i \nu \sigma \omega \theta \upsilon \lambda \alpha \kappa i \kappa \delta \upsilon \gamma \rho \delta$ HRP: horseradish peroxidase, υπεροξειδάση ραπανιού HSA: human serum albumin,  $\alpha \nu \theta \rho \omega \pi i \nu \eta \alpha \lambda \beta \sigma \nu \mu i \nu \eta$  opoù LB: Luria-Bertani medium, θρεπτικό υλικό Luria-Bertani LH: luteinizing hormone, ωχρινοτρόπος ορμόνη LHβ: β υπομονάδα της LH rLH: rat LH, LH  $\varepsilon \pi i \mu v o \varsigma$ MDH: Minimal medium containing glucose and histidine, ελάχιστο θρεπτικό μέσο που περιέχει γλυκόζη και ιστιδίνη

MMH: Minimal medium containing methanol and histidine, ελάχιστο θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη και ιστιδίνη

NaPi: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με νάτριο

NHPP: National Hormone and Pituitary Programme

NIDDK: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases

OPD: o-phenyl diamine, ορθο-φαινυλενοδιαμίνη

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis, ηλεκτροφόρηση πηκτής ακρυλαμιδίου

PBS: phosphate buffered saline, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

PCR: polymerase chain reaction, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

PKC: protein kinase C, πρωτεϊνική κινάση C

PLC: phospholipase C, φωσφολιπάση C

rpm: rounds per minute, στροφές ανά λεπτό

SDS: sodium dodecyl sulfate, θειϊκό δωδεκυλικό νάτριο

SFDM: Dulbecco's modified Eagle's medium nutrient mixture F-12 Ham, θρεπτικό μέσο SFDM

TAE: Tris acetate-EDTA

TBST: Tris buffered saline-Tween-20, ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween-20

TE: Tris-EDTA

TEMED: N,N,N,N'- tetramethylenediamine, N,N,N,N'-τετραμέθυλαιθυλενοδιαμίνη

YNB: yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids

YPD: Yeast extract-peptone-dextrose medium, θρεπτικό μέσο με εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη και γλυκόζη

YPDS: Yeast extract-peptone-dextrose-sorbitol medium, θρεπτικό μέσο με εκχύλισμα ζύμης, πεπτόνη, γλυκόζη και σορβιτόλη

v/v: volume per volume, όγκος κατ'όγκο

w/v: weigth per volume,  $\beta$ άρος κατ'όγκο



#### a la mili victor i fillioferit lit

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### 1.1 Ο ΑΞΟΝΑΣ ΥΠΟΘΑΛΑΜΟΥ-ΥΠΟΦΥΣΗΣ-ΩΟΘΗΚΩΝ

Η ρύθμιση του εμμηνορρυσιακού κύκλου στις γυναίκες πραγματοποιείται μέσω .πολύπλοκων συστημάτων θετικής και αρνητικής ανάδρασης μεταξύ υποθαλάμου (hypothalamus), υπόφυσης (pituitary) και ωοθηκών (ovary). Από τον υποθάλαμο παράγεται η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροφινών (γοναδοτροπινών) (Gonadotrophin releasing hormone-GnRH) η οποία επάγει την έκκριση της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle stimulating hormone-FSH) και της ωχρινοτρόπου ορμόνης (luteinizing hormone-LH) από τα γοναδοτροπα κύτταρα της υπόφυσης. Οι γοναδοτροπίνες LH και FSH με τη σειρά τους επάγουν την έκκριση των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλη και προγεστερόνη από τις ωοθήκες, οι οποίες δρώντας στο επίπεδο της υπόφυσης και του υποθαλάμου συμμετέχουν άμεσα στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών (**Εικόνα 1.1**).

Εκτός από τις στεροειδείς ορμόνες, οι ωοθήκες παράγουν και μη στεροειδείς παράγοντες που μετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης της LH και της FSH. Μεταξύ αυτών η ανασταλτίνη (inhibin), η ακτιβίνη (activin) και η θυλακιοστατίνη (follistatin) έχουν σχετιστεί κυρίως με τη ρύθμιση της έκκρισης της FSH. Σήμερα, υπάρχουν σαφείς πειραματικές ενδείξεις για την ύπαρξη και ενός άλλου, επίσης μη στεροειδούς παράγοντα που δρα στην υπόφυση ρυθμίζοντας τα επίπεδα της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH. Ο παράγοντας αυτός 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). Αν και η μοριακή βιοχημική βάση του GnSAF δεν είναι γνωστή, η δραστικότητα GnSAF έχει συνδεθεί με μία σειρά πίθανών πολυπεπτιδικών παραγόντων μεταξύ των οποίων είναι και το C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης (λευκωματίνης) ορού (Pappa et al., 1999).

Καθώς ο GnSAF θεωρείται ένας σημαντικός πιθανός ρυθμιστής της έκκρισης της LH, θα αναφερθούν. στη συνέχεια, γνωστοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στη ρύθμιση της έκκρισης LH και FSH από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Επίσης, θα παρατεθούν όλα τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την απομόνωση της δραστικότητας GnSAF από βιολογικά υγρά και θα δοθούν στοιχεία για την ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA) που θα συνεισφέρουν στην κατανόηση της <sup>βιΒΛ</sup>οφική πιθανής μοριακής βιολογικής συσχέτισής της με τον παράγοντα GnSAF.



Εικόνα 1.1 Σχηματική αναπαράσταση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών. Η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών (GnRH) που παράγεται από τον υποθάλαμο επάγει την παραγωγή της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH και της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH από την υπόφυση. Οι LH και FSH με τη σειρά τους επάγουν την έκκριση των στεροειδών ορμονών οιστραδιόλη και προγεστερόνη από τις ωοθήκες. Τα στεροειδή αυτά δρουν στο επίπεδο της υπόφυσης και του υποθαλάμου μετέχοντας στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών. Επίσης, στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών από την υπόφυση συμμετέχουν και μη στεροειδείς παράγοντες, όπως η ανασταλτίνη και η ακτιβίνη. Μεταξύ αυτών, θεωρείται ότι είναι και ο παράγοντας GnSAF (βλ. κείμενο), ο οποίος παράγεται στις ωοθήκες και, δρώντας στο επίπεδο της υπόφυσης, αναστέλλει το κύμα έκκρισης της LH. (τροποποιημένο από Nussey and Whitehead, 2001)

Hypothalamus, υποθάλαμος. Pituitary, υπάφυση. Ovaries, ωοθήκες. Progesterone, προγεστερόνη. Estradiol, οιστραδιόλη.

#### 1.1.1 Στάδια του εμμηνορρυσιακού κύκλου

Η εύρρυθμη λειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-ωοθηκών, που στηρίζεται σε ένα πολύπλοκο σύστημα αυστηρά ελεγχόμενης ορμονικής ρύθμισης, είναι καθοριστικής σημασίας για την ωρίμανση του ωοθυλακίου, την ωοθυλακιορρηξία και συνεπώς για τη γονιμοποίηση.

Ťα του ωοθυλακίου κρίσιμα γεγονότα της ωρίμανσης και της ωοθυλακιορρηξίας πραγματοποιούνται στις ωοθήκες στα πλαίσια του εμμηνορρυσιακού κύκλου (menstrual cycle) (Nussey and Whitehead, 2001). O εμμηνορρυσιακός κύκλος είναι η σειρά όλων των γεγονότων που συμβαίνουν μεταξύ δύο διαδοχικών εμμηνορρυσιών (menses) και αποτελείται από δύο κύρια στάδια: την ωοθυλακική φάση (follicular phase) και την ωχρινική φάση (luteal phase). Η ωοθυλακική φάση διακρίνεται στην πρώιμη ωοθυλακική φάση (early follicular phase),  $\sigma \tau \eta$  μέση (mid follicular phase) και στην περιωορρηκτική (periovulatory) που καταλήγει στην ωοθυλακιορρηξία (ovulation). Καθοριστικής σημασίας για την πορεία του κύκλου είναι η έκκριση της ωχρινοτρόπου ορμόνης LH και της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης FSH που καθορίζονται από την παλμική έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο, τις στεροειδείς ορμόνες οιστραδιόλη και προγεστερόνη και μη στεροειδείς ορμόνες όπως η ανασταλτίνη, η ακτιβίνη και ο GnSAF (βλ. κατωτέρω, Ενότητα 1.3).

Κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση τα αρχέγονα ωοθυλάκια αρχίζουν να αναπτύσσονται και να διαφοροποιούνται σε πρωτογενή (Εικόνα 1.2) υπό την επίδραση της FSH (Εικόνες 1.2 και 1.3Α). Τα κοκκώδη κύτταρα (granulosa cells) που περιβάλλουν τα ωοκύτταρα πολλαπλασιάζονται και αρχίζει να παράγεται το ωόθυλακικό υγρό (follicular fluid). Στο επόμενο στάδιο ωρίμανσης τους τα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε δευτερογενή με περιορισμό των κυττάρων της θήκης (theca cells) και των κοκκωδών κυττάρων στην περιφέρεια οπότε δημιουργείται στο κέντρο του ωοθυλακίου μια κοιλότητα που ονομάζεται άντρο (antrum) (Εικόνα 1.2). Στη συνέχεια, γύρω από το ωάριο, τα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας σχηματίζουν τον ωοφόρο δίσκο και τον ακτινωτό στέφανο (corona radiata) και κάτω από αυτό τη διαφανή ζώνη (zona pellucida) οπότε τα ωοθυλάκια έχουν πλέον μετατραπεί σε ώριμα ή γρααφιανά (Graafian follicles) (Εικόνα 1.2). Στη φάση αυτή, το ωάριο αποσπάται από τη στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων και απελευθερώνεται μέσα στο ωοθυλακικό υγρό. Κατά τη διάρκεια της πρώϊμης ωοθυλακικής φάσης, οι

παλμοί της υποθαλαμικής ορμόνης GnRH έχουν χαμηλή συχνότητα και η οιστραδιόλη επιδρά αρνητικά στην έκκριση της LH (Fowler et al., 2003) η οποία διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα (Εικόνα 1.3Α).

Κατά την μέση ωοθυλακική φάση οι παλμοί της GnRH και η ανασταλτίνη Β αυξάνονται, οδηγώντας σε ανασταλτικό έλεγχο των επιπέδων έκκρισης της FSH και επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (dominant follicle). Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια διακόπτουν την ωρίμανση τους, φαινόμενο που ονομάζεται ατρησία (atresia), και διαμεσολαβείται από αποπτωτικούς μηχανισμούς (Johnson and Bridgham, 2002).

Αφού επιλεγεί το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, ακολουθεί η περιωρρηκτική φάση που θα καταλήξει στην ωοθυλακιορρηξία. Ιδιαίτερης σημασίας για την επιτυχή ωοθυλακιορρηξία είναι η εμφάνιση του μεσοκύκλιου ή προωρρηκτικού εκκριτικού κύματος της LH (**Εικόνα 1.3**). Ιδιαίτερης σημασίας για την εμφάνιση του κύματος, είναι η αύξηση της οιστραδιόλης που αφενός, δρώντας στον υποθάλαμο, αυξάνει την ένταση και συχνότητα των παλμών της GnRH και, αφετέρου, δρώντας στο επίπεδο της υπόφυσης, αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των υποδοχέων GnRHR (Turgeon et al., 1996), με τελική συνέπεια την ενίσχυση της έκκρισης της LH από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Nussey and Whitehand, 2001; Fowler et al., 2003).

Μετά την ωοθυλακιορρηξία και την απελευθέρωση του ωαρίου, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης του κυρίαρχου ωοθυλακίου σχηματίζουν το ωχρό σωμάτιο (corpus luteum) το οποίο, εφόσον δεν υπάρξει γονιμοποίηση, τελικά εκφυλίζεται (ωχρινόλυση). Τα επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης αλλά και της ανασταλτίνης Α που παράγονται από το ωχρό σωμάτιο είναι υψηλά κατά την ωχρινική φάση (Εικόνα 1.3). Στο τέλος της ωχρινικής φάσης, η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη FSH αρχίζει να αυξάνεται ώστε να ξεκινήσει ένας νέος εμμηνορρυσιακός κύκλος.





Εικόνα 1.2 Το ωοθυλάκιο των θηλαστικών. (Α) Ωρίμανση του ωοθυλακίου. Το ώριμο ωοθυλάκιο ονομάζεται γρααφιανό (Graafian). (Β) Ηλεκτρονική μικροφωτογραφία σάρωσης του ώριμου ωοθυλακίου στους επίμυες. Το ωοκύτταρο, στο κέντρο, περιβάλλεται από τα μικρότερα κοκκώδη κύτταρα (από Gilbert, 2000).

Primordial follicle, αρχέγονο ωοθυλάκιο. Granulosa cells, κοκκώδη κύτταρα. Thecal cells, κύτταρα θήκης. Zona pellucida, διαφανής ζώνη. Corona radiata, ακτινωτός στέφανος. Antrum, άντρο. Oocyte, ωοκύτταρο. Graafian follicle, ώριμο ωοθυλάκιο.





Εικόνα 1.3 Ο ανθρώπινος εμμηνορρυσιακός κύκλος. Ο συντονισμός του κύκλου της των ωοθυλακίων (B) ρυθμίζεται από τις ορμόνες της υπόφυσης (A) και των ωοθηκών (C) (τροποποιημένο από Gilbert, 2000).

Gonadotropins, γοναδοτροπίνες, anterior pituitary, πρόσθια υπόφυση. Luteinizing hormone (LH), ωχρινοτρόπος ορμόνη. Follicle-stimulating hormone (FSH), ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη. Developing follicle, αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο. Ovulation, ωοθυλακιορρηξία. Corpus luteum, ωχρό σωμάτιο. Menses, έμμηνος ρύση. Follicular phase, ωοθυλακική φάση. Luteal phase, ωχρινική φάση. Menstrual cycle, εμμηνορρυσιακός κύκλος.



#### 1.1.2 Η υπόφυση

Όπως αναφέρθηκε ήδη, η ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών LH και FSH από την υπόφυση είναι καθοριστικής σημασίας για την ωρίμανση του ωοθυλακίου και την ωοθυλακιορρηξία. Από τους διαφορετικούς τύπους κυττάρων που αποτελούν τον αδένα της υπόφυσης παράγονται ορμόνες που ελέγχουν όχι μόνο το αναπαραγωγικό σύστημα αλλά επίσης την ανάπτυξη και το μεταβολισμό.

Η υπόφυση ευρίσκεται στο τουρκικό εφιππείο (sella turcica), στη βάση του εγκεφάλου, και αποτελείται από δύο συνιστώσες: την νευροϋπόφυση, που είναι γνωστή ως οπίσθιος λοβός και σχηματίζεται ως προέκταση του υποθαλάμου, και την αδενοϋπόφυση (Εικόνα 1.4). Το κυρίως μέρος της αδενοϋπόφυσης είναι ο πρόσθιος λοβός ενώ ο διάμεσος λοβός αποτελείται από επιθηλιακά κύτταρα και ο σωληναριακός λοβός (pars tuberalis) κυρίως από γοναδοτρόπα κύτταρα (Nussey and Whitehand, 2001).

Η αδενοϋπόφυση αποτελείται από έξι τύπους ορμονοεκκριτικών, επιθηλιακών κυττάρων που είναι γνωστά ως αδενοϋποφυσιακά κύτταρα και υποστηρίζονται τροφικά από τα θυλακιοαστροκύτταρα (folliculostellate cells). Οι κυτταρικοί αυτοί τύποι και οι ορμόνες που εκκρίνουν έχουν ως ακολούθως (Asa and Ezzat, 2002):

- Τα φλοιοτρόπα (κορτικοτρόπα) κύτταρα (corticotrophs) (15-20%) παράγουν επινεφριδιοφλοιοτροπίνη (adrenal corticotropic hormone-ACTH) που διεγείρει την παραγωγή γλυκοκορτικοειδών από τον φλοιό των επινεφριδίων.
- Τα σωματοτρόπα (somatotrophs) (40-50%) συνθέτουν αυξητική ορμόνη (growth hormone-GH) η οποία ρυθμίζει την ανάπτυξη των οστών και των μυών.
- Τα γαλακτοτρόπα (lactotrophs) (10-25%) παράγουν προλακτίνη (PRL) η οποία αναστέλλει τη δράση των γονάδων και ενεργοποιεί την παραγωγή γάλακτος κατά τη διάρκεια και μετά την εγκυμοσύνη.
- 4. Τα μαστοσωματοτρόπα (mammosomatotrohs) συνθέτουν και αυξητική ορμόνη και προλακτίνη και διαφοροποιούνται σε σωματοτρόπα κατά την ανάπτυξη και σε γαλακτοτρόπα κατά την εγκυμοσύνη.
- 5. Τα θυρεοτρόπα κύτταρα (thyrotrophs) (3-5%) συνθέτουν θυρεοτροπίνη (thyroid stimulating hormone-TSH) η οποία ενεργοποιεί τον θυρεοειδή αδένα για την παραγωγή θυρεοειδών ορμονών.

6. Τα γοναδοτρόπα κύτταρα (gonadorophs) αποτελούν το 10% περίπου των κυττάρων της υπόφυσης και παράγουν την ωχρινοτρόπο ορμόνη (luteinizing hormone-LH) και την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (follicle stimulating hormone-FSH) που ρυθμίζουν την παραγωγή στεροειδών ορμονών από τις γονάδες και την ανάπτυξη της γαμετικής σειράς. Το 35% των όγκων που παρατηρούνται στην υπόφυση αναφέρονται στον τύπο των γοναδοτρόπων κυττάρων (Asa and Ezzat, 2002).





Εικόνα 1.4 Η υπόφυση και οι κυτταρικοί τύποι της αδενοϋπόφυσης (από Asa and Ezzat, 2002).

Αριστερό σκέλος. Ανατομία της υπόφυσης, όπου φαίνονται οι δύο συνιστώσες της, αδενοϋπόφυση (πορτοκαλί χρώμα) και νευροϋπόφυση (γαλάζιο χρώμα).

Pars intermedia διάμεσος λοβός, pars tuberalis σωληνώδεις λοβός, optic chiasm, οπτικό χίασμα, mammillary body θηλώδες σώμα, third ventricle, infudibulum, χοάνη, infudibular stem, χοανώδες στέλεχος, cleft, σχισμή.

Δεξί σκέλος. Κύριοι τύποι ορμονοεκκριτικών κυττάρων της αδενοϋπόφυσης: Φλοιοτρόπα (κορτικοτρόπα) (corticotrophs) (μπλέ χρώμα), σωματοτρόπα (somatotrophs) (ροζ χρώμα), γαλακτοτρόπα (lactotrophs) (κόκκινο χρώμα), θυρεοτρόπα (thyrotrophs) (πορτοκαλί χρώμα), γοναδοτρόπα (gonadotrophs) (γαλάζιο χρώμα).

Adrenal corticotropic hormone-ACTH, επινεφριδιοφλοιοτροπίνη. Adrenal cortex, φλοιός επινεφριδίων. Growth hormone-GH, αυξητική ορμόνη. PRL, προλακτίνη. Thyroid stimulating hormone-TSH, θυρεοτροπίνη. Thyroid, θυρεοειδής αδένας. Luteinizing hormone-LH, ωχρινοτρόπος ορμόνη. Follicle stimulating hormone-FSH, ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη. ovaries, ωοθήκες. testis, όρχεις. Folliculostelate cells, θυλακιοαστροκύτταρα.

A set solution and a set of the set of the



## 1.1.3 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΕΚΚΡΙΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ LH KAI FSH

# Η υποθαλαμική ορμόνη GnRH και η δράση της στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης

Μεταξύ των ορμονών που ρυθμίζουν την έκκριση της LH και της FSH από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, κεντρικό ρόλο παίζει η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροπινών GnRH (<u>Gon</u>adotrophin <u>R</u>eleasing <u>H</u>ormone). H GnRH είναι ένα δεκαπεπτίδιο (pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH<sub>2</sub>) (Matsuo et al., 1971; Schally et al., 1971) που συντίθεται στα νευροεκκριτικά κύτταρα του υποθαλάμου, απελευθερώνεται στην πυλαία κυκλοφορία και μεταφέρεται στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Όπως ήδη αναφέρθηκε, η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο είναι παλμική. Η συχνότητα και το μέγεθος των παλμών της GnRH πρέπει να κυμαίνεται εντός συγκεκριμένων ορίων για να εξασφαλιστεί η φυσιολογική έκκριση των γοναδοτροπινών. Στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο συμμετέχουν οι στεροειδείς ορμόνες των ωσθηκών αλλά και μη στεροειδείς παράγοντες όπως ντοπαμίνη, σεροτονίνη, β-ενδορφίνη, εγκεφαλίνες, αγγειοτενσίνη ΙΙ, οξυτοκίνη (oxytocin), το νευροπεπτίδιο Υ και άλλα.

Η LH και η FSH είναι ετεροδιμερείς πρωτεΐνες που αποτελούνται από μια κοινή α υπομονάδα και μια διαφορετική β υπομονάδα που καθορίζει την ορμόνη. Η διαφορική λοιπόν ρύθμιση της έκκρισης της LH και της FSH, που αποτελεί γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό στην πορεία του κύκλου, καθορίζεται από τη διαφορική ρύθμιση της έκφρασης των υπομονάδων β.

Η συχνότητα και το μέγεθος των παλμών της GnRH έχει συσχετιστεί με τη διαφορική αυτή ρύθμιση. Συγκεκριμένα η υψηλή συχνότητα παλμών της GnRH αυξάνει την έκφραση του γονιδίου LHβ και την έκκριση της LH. Οι χαμηλότερης συχνότητας παλμοί οδηγούν σε μείωση της έκφρασης του γονιδίου LHβ και στην ενίσχυση της έκφρασης του γονιδίου FSHβ και της έκκρισης της FSH (Dalkin et al., 1989). Επίσης, υψηλή πυκνότητα υποδοχέων της GnRH (GnRHR) στην επιφάνεια των κυττάρων οδηγεί σε ενίσχυση έκφρασης της α υπομονάδας των γοναδοτροπινών και της β υπομονάδας της LH ενώ η έκφραση του γονιδίου FSHβ ενισχύεται από την παρουσία χαμηλών επιπέδων του υποδοχέα GnRHR (Kaiser et al., 1995) (**Εικόνα** 

1.5).

Στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων LHβ και FSHβ από τη GnRH είναι πιθανό να εμπλέκονται διαφορετικοί μηχανισμοί. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να σχετίζονται με την επιλεκτική χρήση διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και/ή την ενεργοποίηση διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων.

Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέα βιολογικά συστήματα, και συγκεκριμένα σταθερές σειρές γοναδοτρόπων κυττάρων που επέτρεψαν την πιο συστηματική μελέτη του μηχανισμού δράσης της GnRH. Οι κυτταρικές σειρές που έχουν εκτενέστερα μελετηθεί είναι η αT3-1 και η LβT2. Τα κύτταρα αT3-1 δημιουργήθηκαν με ογκογένεση σε διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιώντας ως διαγονίδιο (transgene) 1.8 kb της 5' ρυθμιστικής περιοχής της ανθρώπινης α υπομονάδας των γοναδοτροπινών συνδεδεμένη με την κωδικοποιούσα περιοχή του T αντιγόνου του SV40 (Windle et al., 1990). Η κυτταρική αυτή σειρά εκφράζει τον υποδοχέα της GnRH, την α υπομονάδα των γοναδοτροπινών αλλά όχι και τη β υπομονάδα της LH ή της FSH, καθώς προέρχεται από κύτταρα αT3-1 προσδένουν επίσης την ακτιβίνη Α και εκφράζουν mRNAs για τους υποδοχείς ακτιβίνης τύπου Ι, II και IIB, καθώς και για την υπομονάδα βΒ της ανασταλτίνης (Fernandez-Vazquez et al., 1996).

Τα κύτταρα LβT2 δημιουργήθηκαν επίσης με ογκογένεση σε διαγονιδιακά ποντίκια χρησιμοποιώντας όμως ως διαγονίδιο (transgene) την 5'ρυθμιστική περιοχή του γονιδίου LHβ επίμυος συνδεδεμένη με την κωδικοποιούσα περιοχή του T αντιγόνου του SV40 (Turgeon et al., 1996) και εκφράζουν τον υποδοχέα GnRHR, υποδοχείς οιστρογόνων επαγόμενους από οιστρογόνα, υποδοχείς προγεστερόνης, την α υπομονάδα των γοναδοτροπινών αλλά και τις υπομονάδες β της LH (Turgeon et al., 1996; Thomas et al., 1996) και της FSH (Pernasseti et al., 2001).

Σύμφωνα με τις μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στις παραπάνω κυτταρικές σειρές, η μεταγωγή του σήματος της GnRH ξεκινά με την πρόσδεση του δεκαπεπτιδίου στον διαμεμβρανικό υποδοχέα GnRHR (Kakar et al., 1992; Kakar et al., 1993). Ο GnRHR ανήκει στους υποδοχείς με επτά διαμεμβρανικά τμήματα που είναι συνδεδεμένοι με τριμερείς G πρωτεΐνες (<u>G</u> protein-coupled receptors, GPCRs).

είναι συνδεδεμενοι με τριμερος - τη Συγκεκριμένα, ο GnRHR είναι συνδεδεμένος με G πρωτεΐνες της οικογένειας Gq/G11α και μετά την πρόσδεση της GnRH οδηγεί σε ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC) (Hsieh et al., 1992), η οποία υδρολύει την 4,5-διφωσφορικήφωσφατιδυλο-ινοσιτόλη (PIP<sub>2</sub>) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορο-

υνοσιτόλη (IP<sub>3</sub>) για να ξεκινήσει το σηματοδοτικό μονοπάτι DAG/IP<sub>3</sub> (Lodish et al., 2004). Από πειραματικά δεδομένα στην κυτταρική σειρά αT3-1, έχει επιβεβαιωθεί ότι η IP<sub>3</sub> αλληλεπιδρά με τα κανάλια Ca<sup>2+</sup> του ενδοπλασματικού δικτύου (IP<sub>3</sub>-gated channels) και ενεργοποιεί την λειτουργία τους, προκαλώντας παροδική απελευθέρωση ιόντων Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα (Merelli et al., 1992), ενώ η πρόσδεση Ca<sup>2+</sup> στην πρωτεϊνική κινάση C (PKC) οδηγεί σε προσέλκυσή της στην πλασματική μεμβράνη και ενεργοποίησή της από την διακυλογλυκερόλη (Horn et al., 1991) (Εικόνα 1.5).

Πρόσφατες μελέτες και στις δύο αναφερόμενες κυτταρικές σειρές (αT3-1 και LβT2) έχουν δείξει ότι η GnRH, μέσω της PKC, ενεργοποιεί τα μονοπάτια των MAP κινασών (Mitogen activated protein kinases-MAPKs) που καταλήγει, μεταξύ των άλλων, στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων α και β υπομονάδας των γοναδοτροπινών (**Εικόνα 1.5**). Συγκεκριμένα, μελέτη της έκφρασης της υπομονάδας α στα κύτταρα αT3-1 έχει δείξει ότι η ενεργοποίηση του υποδοχέα της GnRH οδηγεί σε ενεργοποίηση της οικογένειας των MAP κινασών, ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) γεγονός που εξαρτάται από το Ca<sup>2+</sup> και την ενεργοποίηση της PKC (Reiss et al., 1997), καθώς και της JNK κινάσης (Jun N-Terminal kinase) μέσω της PKC, c-Src και CDC42/Rac-1 (Levi et al., 1998) και της p38 MAPK (Roberson et al., 1999).

Μελέτες σχετικά με την ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου β της LH στα κύτταρα LβT2 έδειξαν ότι ο υποκινητής του γονιδίου β ενεργοποιείται μέσω του μονοπατιού της JNK και την ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα c-Jun, ανεξάρτητα από τα ενδοκυττάρια και εξωκυττάρια επίπεδα ασβεστίου και την ενεργοποίηση της PKC (Yokoi et al., 2000). Σε μια πιο πρόσφατη μελέτη στην ίδια κυτταρική σειρά ευρέθη ότι και οι τρεις οικογένειες των MAP κινασών (ERK, JNK και p38 MAPK) ενεργοποιούνται από την GnRH με διαφορετικό ρυθμό, ενώ η φωσφορυλιωμένη ΕΡΚ μετατοπίζεται στον πυρήνα και προκαλεί την έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα c-fos και της β υπομονάδας της LH (Liu et al., 2002). Όσο αφορά στους μεταγραφικούς παράγοντες, έχει βρεθεί ότι η έκφραση του γονιδίου LHβ, ελέγχεται από τη συνεργασία των μεταγραφικών παραγόντων Egr-1 (early growth response-1) και SF-1 (steroidogenic factor-1) (Lee et al., 1996; Dorn et al., 1999) ενώ την ενεργοποίηση των c-fos, c-jun, και Egr-1, ύστερα από διέγερση με

GnRH, έχει επίσης επιβεβαιωθεί με ανάλυση μικροσυστοιχιών (microarray analysis) (Kakar et al., 2003; Wumbach et al., 2001) στα κύτταρα LβT2 (Εικόνα 1.5).

Γενικότερα οι μηχανισμοί με τους οποίους ρυθμίζεται διαφορικά η έκφραση των υπομονάδων των γοναδοτροπινών δεν είναι διευκρινισμένοι έως και σήμερα. Η μεταγραφική ενεργοποίηση των γονιδίων που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες των γοναδοτροπινών από τα κύτταρα LβT2 απαιτεί τουλάχιστον 6 ώρες επώασης με GnRH, 1-100 nM (Vasilyev et al., 2002) ενώ η έκκρισή τους επάγεται μέσα σε 4 ώρες έκθεσης σε GnRH (100 nM) (Liu et al., 2002). Νεότερα δεδομένα, μάλιστα, υποδετκνύουν σαφώς ότι η GnRH ρυθμίζει τις γοναδοτροπίνες όχι μόνο μεταγραφικά αλλά και στο επίπεδο της μετάφρασης: Συγκεκριμένα, επαγωγή με GnRH (10 nM) για 4 ώρες βρέθηκε ότι προκαλεί αύξηση στη σύνθεση της υπομονάδας LHβ και στην έκκριση της LH στα κύτταρα LβT2 χωρίς να μεσολαβεί σύνθεση νέου mRNA (Nguyen et al., 2004). Η μεταφραστική αυτή ρύθμιση φαίνεται να διαμεσολαβείται από το μονοπάτι της ERK κινάσης και συσχετίστηκε με φωσφορυλίωση των παραγόντων 4E-BP1, elF4E και elF4G που συμμετέχουν στην έναρξη της μετάφρασης (Nguyen et al., 2004).

Εξαιτίας της έλλειψης κατάλληλου πειραματικού μοντέλου έως την δημιουργία των LβT2, οι μηχανισμοί που καθορίζουν τη μεταγραφική ρύθμιση του γονιδίου της FSHβ δεν είναι εκτενώς μελετημένοι. Με διαμόλυνση κυττάρων LβT2 με τον υποκινητή του γονιδίου FSHβ, εδείχθη ότι ο υποκινητής του γονίδιο FSHβ ανταποκρίνεται στην επαγωγή από GnRH με ενεργοποίηση της PKC και του μονοπατιού των MAP κινασών και ότι εισροή Ca<sup>2+</sup> στο κυτταρόπλασμα είναι απαραίτητη αλλά όχι επαρκής για την επαγωγή. Επιπλέον η ενεργοποίηση του υποκινητή FSHβ εμπλέκει διαφορετικές ισομορφές της PKC, ενώ οι θέσεις AP-1 που εδράζονται στον υποκινητή της FSH δεν εμπλέκονται λειτουργικά με την ανταπόκριση σε GnRH (Vasilyev et al., 2002).

HANNING HANNING A



Εικόνα 1.5. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος από τον υποδοχέα GnRHR για τη ρύθμιση της έκφρασης των υπομονάδων των γοναδοτροπινών LH και FSH (με βάση στοιχεία από: Brown and McNeilly, 1999, Lee et al., 1996, Levi et al., 1998, Roberson et al., 1999, Dorn et al., 1999, Yokoi et al., 2000, Liu et al., 2002, Vasilyev et al., 2002). PLC, φωσφολιπάση C. PKC, πρωτεϊνική κινάση C. DAG, διακυλογλυκερόλη. IP<sub>3</sub>, 1,4,5-τριφωσφορο-

ινοσιτόλη. MAPK, Mitogen activated protein kinases. JNK, Jun N-Terminal kinase. ERK1/2, extracellular signal-regulated kinase 1/2. Nucleus, πυρήνας. ER, ενδοπλασματικό δίκτυο.

#### Στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών οιστραδιόλη και προγεστερόνη

Στα θηλυκά άτομα, η ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών ελέγχεται μεταξύ -άλλων με μηχανισμούς αρνητικής και θετικής ανάδρασης που ασκούν οι στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών οιστραδιόλη και προγεστερόνη.

Έχει δειχθεί ότι η οιστραδιόλη δρα τόσο στο επίπεδο του υποθαλάμου επηρεάζοντας τη συγνότητα των παλμών GnRH όσο και στην υπόφυση (Nussey and Whitehand, 2001). Στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης, τα επίπεδα της οιστραδιόλης είναι γαμηλά (Εικόνα 1.3) και η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο είναι χαμηλής συχνότητας γεγονός που συνεισφέρει στη διατήρηση των χαμηλών επιπέδων LH. Προς το τέλος της ωοθυλακικής φάσης τα επίπεδα της οιστραδιόλης που παράγονται από το κυρίαργο ωοθυλάκιο αυξάνονται εκθετικά και η οιστραδιόλη δρα θετικά στον υποθάλαμο για την έκκριση GnRH με υψηλότερη συχνότητα ενώ, παράλληλα, έχει δειχθεί ότι αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων GnRHR στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Turgeon et al., 1996), συντελώντας στην εμφάνιση του προωρρηκτικού κύματος LH. Συγχρόνως, η οιστραδιόλη μπορεί να επηρεάζει αρνητικά, σε συνδυασμό με την ανασταλτίνη, τα επίπεδα εκκρινόμενης FSH από την υπόφυση (Fowler et al., 2003). Η θετική επίδραση της οιστραδιόλης που απαιτείται για το προωρρηκτικό κύμα της LH δεν φαίνεται να σχετίζεται με απευθείας μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου LHB (Keri et al., 1994) αλλά με μεταγραφική ρύθμιση άλλων παραγόντων όπως ο υποδογέας GnRHR (Turgeon et al., 1996) ή ρύθμιση παραγόντων που συμμετέχουν στην έκκριση της LH (Currie and McNeilly, 1995; Thomas and Clarke, 1997). Téloc,  $\tau \alpha \in \pi i \pi \epsilon \delta \alpha$  the provester of the second se αυξάνονται κυρίως κατά την ωχρινική φάση του κύκλου, όπου πιθανώς η προγεστερόνη συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH.



#### Μη στεροειδείς ορμόνες

#### Ανασταλτίνη, ακτιβίνη και θυλακιοστατίνη

Η ανασταλτίνη (inhibin) και η ακτιβίνη (activin) είναι εκκρινόμενες γλυκοπρωτεΐνες της οικογένειας TGF-β. Τα περισσότερα μέλη αυτής της οικογένειας είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένα διμερή. Η ανασταλτίνη και η ακτιβίνη συγκροτούνται από σχετιζόμενες υπομονάδες. Η ακτιβίνη είναι ομοδιμερές ή ετεροδιμερές ενός εκ των πέντε υπαρχόντων β-μονομερών (A-E). Η ανασταλτίνη είναι ετεροδιμερές μιας α και μιας β υπομονάδας. Έτσι η ονοματολογία των ώριμων πρωτεϊνών αντικατοπτρίζει τα μονομερή που χρησιμοποιούνται: ακτιβίνη Α (βΑ-βΑ), ακτιβίνη Β (βΒ-βΒ), ακτιβίνη ΑΒ (βΑ-βΒ), ανασταλτίνη Α (α-βΑ), ανασταλτίνη Β (α-βΒ) κ.ο.κ.

Η ανασταλτίνη απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε με βάση την ιδιότητα της να ρυθμίζει αρνητικά την έκκριση της FSH (Ling et al., 1985; Miyamoto et al., 1985; Rivier et el., 1985; Robertson et el., 1985). Η ενεργός ανασταλτίνη είναι μια πρωτεΐνη περίπου 32 kDa που αποτελείται από τις υπομονάδες α (20 kDa) και β (14 kDa) συνδεδεμένες με δισουλφιδικούς δεσμούς. (Mattukrishna and Ledger, 2001). Οι δύο υπομονάδες κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια και αντιπροσωπεύουν το Cτελικό άκρο μεγαλύτερων πρόδρομων μορίων που υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Οι δύο ισομορφές Α και Β της ανασταλτίνης, που βασικά υπάρχουν στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, διαθέτουν την ίδια α υπομονάδα και ελαφρά διαφορετικές β υπομονάδες (βΑ και βΒ) που κωδικοποιούνται από διαφορετικά γονίδια.

Η ακτιβίνη με μοριακό βάρος περίπου 25 kDa, ρυθμίζει θετικά την έκκριση της FSH και παρουσιάζεται σε διαφορετικές μορφές που είναι διμερή δύο β αλυσίδων. Το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό φαίνεται να περιέχει τρεις ισομορφές της ακτιβίνης, την ακτιβίνη A, τη B και την AB. Η ακτιβίνη μετάγει το σήμα της με την πρόσδεση της σε έναν εκ των δύο υποδοχέων τύπου II (ActRII ή IIB) (Mathews and Vale, 1991; Mathews et al., 1992; Attisano et al., 1992) δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα που προσελκύει και ενεργοποιεί τον υποδοχέα τύπου I (Carcamo et al., 1994; Attisano et al., 1996; Lebrun and Vale, 1997) και μέσω των Smad πρωτεϊνών ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση (Wrana and Attisano, 2000; Bernard, 2004).

Ο μηχανισμός με τον οποίο δρα η ανασταλτίνη δεν είναι διευκρινισμένος. Είναι γνωστό ότι η ανασταλτίνη μπορεί να συνδέεται στον υποδοχέα τύπου ΙΙ της ακτιβίνης (Mathews and Vale, 1991; Mathews et al., 1992) και να αναστέλλει την πρόσδεση της ακτιβίνης σε αυτόν, χωρίς όμως να προκαλεί την προσέλκυση του υποδοχέα τύπου Ι (Xu et al., 1995; Lebrun and Vale, 1997; Martens et al., 1997). Παρόλα αυτά η ανασταλτίνη έχει χαμηλή συγγένεια για τον υποδοχέα της ακτιβίνης (Mathews and Vale, 1991) και για να εξηγηθεί η δράση της έχει προταθεί ότι υπάρχουν επιπλέον υποδοχείς ανασταλτίνης (Chong et al., 2000) ή άλλες πρωτεΐνες που ενισχύουν την πρόσδεση της στους ActRII και ActRIIB ώστε να ενισχύεται ο ανταγωνισμός της με την ακτιβίνη (Lewis et al., 2000) (βλ. και Εικόνα 1.6).

Η θυλακιοστατίνη (follistatin) είναι ένα μονομερές γλυκοζυλιωμένο πολυπεπτίδιο και δεν παρουσιάζει καμιά δομική ομοιότητα με την οικογένεια TGF-β. Κωδικοποιείται από ένα γονίδιο ενώ με εναλλακτική ωρίμανση του mRNA προκύπτουν δύο πρόδρομες μορφές, η FS344 και η FS317. Μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις των πολυπεπτιδίων αυτών οδηγούν στην παραγωγή έξι μορφών θυλακιοστατίνης που διαφέρουν ως προς το καρβοξυτελικό τους άκρο και την παρουσία υδατανθρακικών αλυσίδων. Η βιολογική δράση του μορίου έγκειται στη μείωση της έκκρισης της FSH (Ying, 1987; Ying, 1988). Είναι γνωστό ότι η θυλακιοστατίνη δεσμεύεται στην β υπομονάδα της ακτιβίνης και την απενεργοποιεί (Ueno et al., 1987; Nakamura et al., 1990). Μπορεί επίσης να δεσμεύεται και στην ανασταλτίνη καθώς και αυτή περιέχει β υπομονάδα, χωρίς όμως να εξουδετερώνει τη δράση της (Shimonaka et al., 1991).

Παρότι και οι τρεις πρωτεΐνες παράγονται στις ωοθήκες και απομονώθηκαν από ωοθυλακικό υγρό, με βάση την ικανότητα τους να ρυθμίζουν την έκκριση της FSH, βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι εκφράζονται και στον πρόσθιο λοβό της αδενοϋπόφυσης. Για την θυλακιοστατίνη έχει δειχθεί ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται στα γογαδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Farnworth et al., 1995; Kaiser et al., 1992; Kogawa et al., 1991). Είναι επίσης γνωστό ότι τουλάχιστον σε επίπεδο mRNA εκφράζονται στα γοναδοτρόπα κύτταρα και οι υπομονάδες α, βΑ και βΒ της ανασταλτίνης (Meunier et al., 1988; Roberts et al., 1989; Bilezikjian, 1993) αλλά και της ακτιβίνης (Fernandez-Vazquez et al., 1996; Dalkin et al., 1998; Dalkin et al., 1999).

Ενώ η δράση της ανασταλτίνης των γονάδων στην έκκριση FSH από την υπόφυση θεωρείται πλέον δεδομένη, δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία σχετικά με τη δράση της ακτιβίνης και της θυλακιοστατίνης των γονάδων στην υπόφυση. Θεωρείται ότι η ακτιβίνη και η θυλακιοστατίνη που παράγεται στην υπόφυση μπορεί να

συνεισφέρει στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροπινών ρυθμίζοντας την ευαισθησία της υπόφυσης στη GnRH, τις στεροειδείς ορμόνες και την ανασταλτίνη. Είναι γνωστό ότι η ακτιβίνη συμμετέχει στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH από τον υποθάλαμο (Gonzalez-Manchon et al., 1991) και επιπλέον δρα στα γοναδοτρόπα, σωματοτρόπα και κορτικοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Συγκεκριμένα η ακτιβίνη Α αυξάνει τα επίπεδα mRNA του υποδοχέα της GnRH στα γοναδοτρόπα κύτταρα (Fernandez-Vazquez et al., 1996). Από την άλλη πλευρά η GnRH φέρεται να ρυθμίζει διαφορικά την έκφραση του mRNA της ακτιβίνης, της ανασταλτίνης και της θυλακιοστατίνης στην υπόφυση (Bilezikjian et al., 1993; Dalkin et al., 1999; Kirk et al., 1994).

#### Παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών

Για την εμφάνιση του προωρρηκτικού κύματος της LH την κατάλληλη χρονική στιγμή (Ενότητα 1.1.1) ιδιαίτερα σημαντικός θεωρείται ένας μη στεροειδής παράγοντας των ωοθηκών, ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (GnSAF). Ο GnSAF δρά στην υπόφυση ρυθμίζοντας την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH και θα συζητηθεί εκτενώς στην Ενότητα 1.2.





Εικόνα 1.6 Ρυθμιστές της έκκρισης των γοναδοτροπινών LH και FSH από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Οι ακτιβίνες μετάγουν το σήμα τους με πρόσδεση στους υποδοχείς τους (type II,I receptors) οι οποίοι στη συνέχεια ενεργοποιούν το μονοπάτι των SMAD που οδηγεί σε έκφραση μεταγραφικών παραγόντων (FAST/FOXH) και στην επαγωγή της FSH. Η ανασταλτίνη και η θυλακιοστατίνη παρεμβαίνουν στη δράση της ακτιβίνης. Η GnRH ενεργοποιεί την παραγωγή LH και FSH οι οποίες στη συνέχεια ενεργοποιούν τα κύτταρα των γονάδων να παράγουν οιστρογόνα. Τα οιστρογόνα με τη σειρά τους δρουν στα γοναδοτρόπα συνδεόμενα σε υποδοχείς (ER-estrogen receptor) οι οποίοι ρυθμίζουν την έκκριση των γοναδοτροπινών συνδεόμενοι σε στοιχεία ανταπόκρισης (ERE-estrogen response elements) (από Asa and Ezzat, 2002).



# 1.2 Ο ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΑΜΒΛΥΝΣΗΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΠΙΝΩΝ (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF)

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός νέου ωοθηκικού παράγοντα που συμμετέγει στη ρύθμιση της έκκρισης της LH κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου, προέκυψαν τη δεκαετία του 1980. Στα πλαίσια μελετών που αφορούσαν τεχνικές εξωσωματικής γονιμοποίησης, παρατηρήθηκε ότι η εξωγενής γορήγηση γοναδοτροπινών που αποσκοπούσε στην υπερδιέγερση των ωοθηκών και την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, είγε ως αποτέλεσμα την απουσία του ενδογενούς κύματος της LH και κατά συνέπεια της ωοθυλακιορρηξίας (Busbridge et al., 1988; Messinis and Templeton, 1989; 1990a). Τα φαινόμενα αυτά αποδόθηκαν στην ύπαρξη ενός μη στεροειδούς ωοθηκικού παράγοντα, ο οποίος εδείχθη ότι υπάργει σε γοίρειο ωοθυλακικό υγρό, και ονομάστηκε παράγοντας αναστολής του κύματος των γοναδοτροπινών (gonadotrophin surge inhibiting factor-GnSIF) (Sopelak and Hodgen, 1984). Σε αντίστοιγες κλινικές μελέτες σε ανθρώπους, γυναίκες που υποβάλλονταν σε χορήγηση εξωγενούς FSH για υπερδιέγερση των ωοθηκών και πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, έδειξαν ότι το κύμα των γοναδοτροπινών είναι σημαντικά μειωμένο σε εύρος και διάρκεια (Messinis et al., 1985; 1986, Messinis and Templeton, 1986; 1987; 1988). Θεωρήθηκε ότι υπεύθυνος για τη μείωση του κύματος των γοναδοτροπινών είναι και πάλι ένας παράγοντας που παράγεται στη ωοθήκες ύστερα από την επίδραση της FSH ο οποίος ονομάστηκε παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF) (Messinis and Templeton 1989). Η δραστικότητα GnSAF ταυτίζεται ουσιαστικά με την δραστικότητα GnSIF (Sopelak and Hodgen, 1984) που είχε περιγραφεί αρχικά στο σύστημα του χοίρου.

Σε μελέτες που ακολούθησαν εδείχθη ότι η δραστικότητα GnSAF/GnSIF παίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση χαμηλών συγκεντρώσεων LH κατά την ωοθηκική φάση του κύκλου, διατηρώντας την υπόφυση σε κατάσταση χαμηλής διεγερσιμότητας σε GnRH, χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών (Messinis and Templeton 1991; Koppenaal et al., 1992; Tijssen et al., 1997). Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές, η δραστικότητα GnSAF καθορίζονταν με βάση την ικανότητα μείωσης της έκκρισης της LH από την υπόφυση μετά από διέγερση με GnRH. Τα βιολογικά συστήματα που αναπτύχθηκαν για τη μελέτη της δραστικότητας GnSAF, ήταν πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης

H ISLANNINC

προβάτων, συστήματα διαπότισης ιστού επιμύων ή προβάτων και το ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα των πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων υπόφυσης επιμύων.

Δραστικότητα GnSAF ανιχνεύθηκε στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (Busdridge et al., 1990; Fowler et al., 1990; Fowler et al., 1995; Knight et al., 1990; Mroueh et al., 1990), σε ωοθυλακικό υγρό πιθήκων (Schenken and Hodgen, 1986), επιμύων (Busbridge et al., 1988), χοίρων (Sopelak and Hodgen, 1984; Danforth and Cheng, 1995) αλλά και σε υπερκείμενα καλλιεργειών ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων (Fowler et al., 2002). Δραστικότητα GnSAF έχει επίσης ανιχνευθεί στο ορό γυναικών με υπερδιεγερμένες ωοθήκες (Byrne et al., 1995; Martinez et al., 2002) αλλά και στον ορό γυναικών με φυσιολογικό κύκλο (Byrne et al., 1993).

Η υπόθεση που επικρατεί σήμερα είναι ότι ο GnSAF παράγεται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και συγκεκριμένα από τα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου (Fowler et al., 2002) και η παραγωγή του ενεργοποιείται από την επίδραση της FSH (Messinis et al., 1986, 1991, 1993). Πρόσφατα, η ομάδα Fowler έδειξε ότι η δραστικότητα GnSAF ανιχνεύεται σε υπερκείμενα κοκκωδών/ωχρινικών κυττάρων που προέρχονται από γυναίκες με υπερδιεγερμένες ωοθήκες αλλά και σε υπερκείμενα κοκκωδών κυττάρων από μη υπερδιεγερμένες ωοθήκες (Fowler et al., 2002). Η παραγωγή GnSAF από τα κύτταρα του ωοθυλακίου έχει συσχετισθεί με το μέγεθος του ωοθυλακίου. Υψηλότερη δραστικότητα GnSAF ανιχνεύεται στο ωοθυλακικό υγρό από μικρά ωοθυλάκια υπερδιεγερμένων (διάμετρος ωοθυλακίων <11mm) (Fowler et al., 1994) και μη υπερδιεγερμένων ωοθηκών (διάμετρος ωοθυλακίων 6-8mm) (Fowler et al., 2001).

#### 1.2.1 Διαφοροποίηση του GnSAF από την ανασταλτίνη

Στη διεθνή βιβλιογραφία έχει γίνει εκτενής αναφορά στο διαχωρισμό της δραστικότητας GnSAF και της δραστικότητας ανασταλτίνης (inhibin). Παλαιότερες μελέτες υποστήριζαν ότι παρατηρούμενη δραστικότητα GnSAF μπορεί να αποδοθεί στην ίδια την ανασταλτίνη (Culler et al., 1992). Είχε υποστηριχθεί επίσης ότι ανασταλτίνη και GnSAF μπορεί να έχουν κοινές βιολογικές δραστικότητες (Campen and Vale 1988; Farworth et al., 1988).

Παρ' όλα αυτά, στη βιβλιογραφία και ιδιαίτερα στην πιο πρόσφατη, υπάρχει σαφής πειραματική μαρτυρία ότι ο GnSAF και η ανασταλτίνη είναι δύο ξεχωριστά
μόρια με διακριτές δραστικότητες. Οι δύο δραστικότητες έχουν διαχωριστεί με τη χρήση διαφορετικών προσεγγίσεων. Ένας τρόπος που έχει χρησιμοποιηθεί από πολλές ομάδες για την απομάκρυνση της ανασταλτίνης είναι η χρωματογραφία heparin-Sepharose (Danforth et al., 1987; Fowler et al., 1990; Pappa et al., 1999) καθώς η ανασταλτίνη δεσμεύεται στην ηπαρίνη. Ο διαχωρισμός των δύο δραστικοτήτων έχει επίσης επιτευχθεί με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Danforth et al., 1993), υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (Fowler et al., 1994, Danforth and Cheng 1995) και με χρωματογραφία συγγένειας με αντίσωμα έναντι της ανασταλτίνης (Knight et al., 1990). Με χρήση αντισώματος έναντι της ανασταλτίνης έχει επίσης δειχθεί ότι η δραστικότητα GnSAF συνεχίζει να είναι υπαρκτή στον ορό γυναικών με υπερδιεγερμένες ωοθήκες παρά την απενεργοποίηση της ανασταλτίνης (Byrne et al., 1995).

#### 1.2.2 Απομόνωση δραστικότητας GnSAF από βιολογικά υγρά

Επί σειρά ετών πραγματοποιήθηκαν μελέτες απομόνωσης της δραστικότητας GnSAF κατά βάση από ωοθυλακικό υγρό. Οι πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν κυρίως στον διαχωρισμό της δραστικότητας GnSAF από τη δραστικότητα ανασταλτίνης και σε σχετικό προσδιορισμό του μοριακού βάρους του μορίου που ευθύνεται για τη δραστικότητα. Συγκεκριμένα η πρώτη μελέτη κλασμάτωσης βόειου ωοθυλακικού υγρού (de Jong et al., 1979), έδειξε ότι μείωση της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH προκαλείται από το κλάσμα που περιέχει μοριακά βάρη μικρότερα των 10 kDa ενώ το ίδιο κλάσμα δεν επηρεάζει τη βασική έκκριση της FSH.

.Στην πρώτη προσπάθεια κλασμάτωσης ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού, η δραστικότητα GnSAF ευρέθη σε μοριακό βάρος μικρότερο από 10 kDa μετά από απομάκρυνση της ανασταλτίνης με χρωματογραφία συγγένειας (Knight et al., 1990).

Τα έως τότε συγκλίνοντα αποτελέσματα σχετικά με την περιοχή μοριακών βαρών στην οποία ανιχνεύεται η δραστικότητα GnSAF, ήταν σε αντίθεση με μελέτες της ομάδας Fowler σύμφωνα με την οποία σε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό από γυναίκες με υπερδιεγερμένες ωοθήκες, η δραστικότητα GnSAF ανιχνεύθηκε σε κλάσματα που αντιστοιχούν σε μοριακά βάρη από 10 έως 30 kDa αλλά και σε μεγαλύτερα από 100 kDa (Fowler et al., 1992). Σε μεγάλο εύρος μοριακών βαρών οδήγησε και η ανάλυση χοίρειου ωοθυλακικού υγρού (Danforth and Cheng, 1993). Στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε μια σειρά τεχνικών χρωματογραφίας που οδήγησε σε ανίχνευση δραστικότητας σε μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 100 kDa αλλά και σε περιοχή 10-70 kDa. Η ίδια ομάδα μελετώντας βόειο ωοθυλακικό υγρό και ακολουθώντας την ίδια πορεία κλασμάτωσης, εντόπισε το ενεργό κλάσμα σε περιοχή μοριακών βαρών 28-44 kDa (Danforth and Cheng, 1994).

Για πρώτη φορά μια αλληλουχία GnSAF προτάθηκε το 1994 (Tio et al., 1994) οπότε και αρχίζουν να παρουσιάζονται οι πρώτες μελέτες πλήρους απομόνωσης του παράγοντα από βιολογικά υγρά. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε υπερκείμενο κυττάρων Sertoli το οποίο υποβλήθηκε σε διάφορα στάδια υγρής χρωματογραφίας όπως Mono-Q, C4-, C8-, C2/C18, και στο τελικό στάδιο πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία ηλεκτροφόρησης υψηλής απόδοσης (HPEC-Applied Biosystems 230A). Η πρωτεΐνη 37 kDa που απομονώθηκε ήταν μονομερής, είχε αλληλουχία αμινοτελικού άκρου NH<sub>2</sub>-SDXXPQL (όπως προσδιορίστηκε με ανάλυση Edman) και παρουσίαζε σε μικρό βαθμό δραστικότητα ανασταλτίνης καθώς μπορούσε να αναστείλει και τη βασική έκκριση της FSH.

Η δεύτερη μελέτη αφορά στην απομόνωση, από χοίρειο ωοθυλακικό υγρό, μιας πρωτεΐνης 69 kDa με δραστικότητα GnSAF με αμινοτελικό άκρο NH<sub>2</sub>-SKPLAE (Danforth and Cheng 1995). Έναντι της πρωτεΐνης αυτής, που δεν παρουσίαζε δραστικότητα ανασταλτίνης, αναπτύχθηκαν αντισώματα με τα οποία στη συνέχεια ανιχνεύθηκαν σε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό δύο πιθανά ομόλογα του παράγοντα με δραστικότητα GnSAF με μοριακά βάρη 59 και 63 kDa (Mroueh et al., 1996).

Πρόσφατα, η δραστικότητα GnSAF συσχετίστηκε με πρωτεΐνες 60-66 kDa και pI 5.7-5.8 που ανιχνεύθηκαν σε υπερκείμενα καλλιέργειας κοκκωδών/ωχρινικών κυττάρων από υπερδιεγερμένες ωοθήκες (Fowler et al., 2002). Τα υπερκείμενα υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία Dyematrex Blue και ψευδοχρωματεστιασμό (pseudochromatofocusing-PCF) και τα ενεργά κλάσματα υποβλήθηκαν σε ηλεκτροφόρηση μίας και δύο διαστάσεων. Η κύρια ζώνη από την ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης υποβλήθηκε σε ανάλυση Edman δίνοντας την εσωτερική αλληλουχία EPQVYVHAP. Ύστερα από ηλεκτροφόρηση 2D μια από τις πρωτεϊνικές ζώνες που αναγνωρίστηκαν από αντίσωμα έναντι GnSAF υποβλήθηκε επίσης σε ανάλυση Edman δίνοντας αμινοτελική αλληλουχία NH<sub>2</sub>-XVPQGNAGN (Fowler et al., 2002).

Πλήρης απομόνωση του GnSAF από ωοθυλακικό υγρό γυναικών με υπερδιεγερμένες ωοθήκες πραγματοποιήθηκε το 1999 (Pappa et al., 1999). Στη συγκεκριμένη μελέτη αρχικά αφαιρέθηκαν τα στεροειδή με ενεργό άνθρακα, ακολούθησαν στάδια χρωματογραφίας heparin-Sepharose, ConA Sepharose, HPLC αντιστρόφου φάσεως και τέλος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση υπό μη μετουσιωτικές συνθήκες (Native-PAGE). Το ενεργό πεπτίδιο που απομονώθηκε αντιστοιχούσε σε μοριακό βάρος 12.5 kDa, δεν παρουσίαζε δραστικότητα ανασταλτίνης και αντιστοιχούσε στο C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) όπως διαπιστώθηκε με φασματοφωτομετρία μαζών (MS). Μεταξύ των μελετών απομόνωσης της δραστικότητας GnSAF από βιολογικά υλικά, η μελέτη των Pappa et al. (1999) πλεονεκτεί ως προς την ανάλυση της αλληλουχίας του ενεργδύ μορίου με φασματομετρία μαζών (MS), αλλά και διότι προτείνει για πρώτη φορά μια αλληλουχία που ταυτοποιείται ως προερχόμενη από κάποια γνωστή ανθρώπινη πρωτεΐνη (Πίνακας 1.1).

Αναφορά	Μοριακό	Αλληλουχία	Βιολογικό υλικό
	βάρος	/ομολογία	
Tio et al., 1994	37 kDa	NH <sub>2</sub> -SDXXPQL	Υπερκείμενο
		Δεν ευρέθη	κυττάρων Sertoli
•			επιμύων
Danforth and	69 kDa	NH <sub>2</sub> -SKPLAE	Χοίρειο ωοθυλακικό
Cheng 1995		Δεν ευρέθη	υγρό
Fowler et al	60-66 kDa	NH-XVPOGNAGN	νπεργείμανα
	00-00 KDa		Τλερκειμενά
2002		EPQVYVHAP	ανθρώπινων
		Δεν ευρέθη	κοκκωδών/ωχρινικών
			κυττάρων
Pappa et al.,	12.5 kDa	ALEVDETYVPK	Ανθρώπινο
1999		ALVELVK	ωοθυλακικό
		AVMDDFAAFVEK	υγρό
		C-τελικό άκρο ΗSA	

Πίνακας 1.1 Προτεινόμενες αλληλουχίες για τον παράγοντα άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (GnSAF).

and the state of the



#### 1.3 ANΘPΩΠINH AABOYMINH OPOY (Human Serum Albumin-HSA)

Η ανθρώπινη λευκωματίνη (αλβουμίνη) ορού (human serum albumin, HSA) (<u>www.albumin.org</u>) είναι μια πρωτεΐνη 585 αμινοξέων που αποτελεί το 60% της ολικής πρωτεΐνης στον ορό του αίματος και σε άλλα βιολογικά υγρά όπως το ωοθυλακικό υγρό. Με βάση λεπτομερείς μοριακές-φυλογενετικές αναλύσεις των αντίστοιχων ομόλογων αλληλουχιών DNA, θεωρείται σήμερα αποδεκτό ότι η αλβουμίνη προέρχεται εξελικτικά από κάποια αρχέγονη πρωτεΐνη 190 αμινοξέων με τριπλασιασμό του αντίστοιχου γονιδίου (Gibbs and Dugaiczyk, 1987).

Το γονίδιο της HSA ευρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος 4, στη θέση q11-22 και περιέχει 15 εξώνια που διακόπτονται από 14 ιντρόνια (εσώνια). Η κωδικοποιούσα περιοχή της HSA με τους τρεις ομόλογους τομείς (domains) που θα αναφερθούν αναλυτικά στη συνέχεια σχηματίζεται από τα 73 τελευταία νουκλεοτίδια του εξωνίου 1 (που ορίζουν τις Ν-τελικές αλληλουχίες της πρόδρομης αλβουμίνης και της προαλβουμίνης και τα 7 πρώτα νουκλεοτίδια της ώριμης HSA) και τα εξώνια 2 έως 13 μαζί με τα πρώτα 42 νουκλεοτίδια του εξωνίου 14 (που καταλήγουν στο κωδικόνιο τερματισμού TAA). Οι 5' και 3' αμετάφραστες περιοχές του mRNA (UTRs) δημιουργούνται από μέρος του εξωνίου 1 (5' UTR) και μέρος του εξωνίου 14 μαζί με ολόκληρο το εξώνιο 15 που περιέχει σήματα πολυαδενυλίωσης (3' UTR).

Η πρόδρομη μορφή της HSA που προκύπτει από την έκφραση του γονιδίου περιέχει στο N-τελικό της άκρο πεπτίδιο-οδηγό (signal peptide; Met-Lys-Trp-Val-Thr-Phe-Ile-Ser-Leu-Leu-Phe-Ser-Ser-Ala-Tyr-Ser) που λειτουργεί ως σήμα έκκρισης και κατευθύνει την αναπτυσσόμενη αλυσίδα στη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Το προϊόν που προκύπτει από την πέψη του πεπτιδίου-οδηγού στο ενδοπλασματικό δίκτυο, ονομάζεται προαλβουμίνη και φέρει έξι επιπλέον κατάλοιπα (Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg) στο N-τελικό άκρο σε σχέση με την ώριμη πρωτεΐνη (Peters, 1996). Η μετατροπή της προαλβουμίνης σε αλβουμίνη με απομάκρυνση του προπεπτιδίου είναι ένα από τα τελευταία γεγονότα που συμβαίνουν πριν η ώριμη πρωτεΐνη απελευθερωθεί από το κύτταρο και πραγματοποιείται στο trans-Golgi ή στα εκκριτικά κοκκία (Peters, 1996).

Η HSA εκφράζεται κατά μείζονα λόγο στα κύτταρα του ήπατος και απαντάται στην κυκλοφορία του αίματος σε επίπεδα 40 g/L στα ενήλικα άτομα. Η έκφραση της HSA αρχίζει σχεδόν με την εμφάνιση του εμβρυϊκού ήπατος και αυξάνεται τους

H ISLANNIN

τελευταίους μήνες της κύησης. Η αλβουμίνη, τουλάχιστον όπως συντίθεται στο ήπαρ είναι μια απλή πρωτεΐνη μη γλυκοζυλιωμένη και χωρίς άλλες μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις επί των πλευρικών ομάδων των καταλοίπων της (Peters, 1996).

#### 1.3.1 Ο φυσιολογικός ρόλος της HSA

Η HSA είναι υπεύθυνη κατά μεγάλο μέρος για την διατήρηση της ωσμωτικής πίεσης του πλάσματος αλλά κυρίως παίζει μεταφορικό ρόλο για πολυάριθμους μεταβολίτες με τους οποίους μπορεί να συνδέεται και προστατευτικό ρόλο στον οργανισμό καθώς συνδέει τοξικές ουσίες.

Περισσότερο ισχυρά προσδένονται στην αλβουμίνη υδρόφοβα οργανικά ανιόντα μεσαίου μεγέθους (100-600 Da) όπως λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, αιματίνη και χολερυθρίνη, ενώ τα μικρότερα και λιγότερο υδρόφοβα μόρια προσδένονται λιγότερο ισχυρά. Γενικότερα οι ουσίες που προσδένονται στην αλβουμίνη και μεταφέρονται από αυτή χωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

<u>Ανιοντικές και ουδέτερες</u> Σε αυτές συγκαταλέγονται λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (Long chain fatty acids-LCFAs), εκοσανοειδή, στεροειδείς ορμόνες, βιταμίνη D, χολικά άλατα, χολερυθρίνη, αιματίνη και άλλες πορφυρίνες, Site I ligands, Site II ligands (τρυπτοφάνη, θυροξίνη, οκτανοϊκό οξύ, ιόν χλωρίου, φάρμακα), πεπτίδια και πρωτεΐνες,

<u>Κατιοντικές</u> Σε αυτές συγκαταλέγονται ιόντα χαλκού και νικελίου, ασβεστίου και μαγνησίου, ψευδάργυρος, κάδμιο, υδράργυρος και κατιοντικά φάρμακα.

Εκτός από την ικανότητα της να προσδένει και να μεταφέρει διάφορα μόρια και ιόντα, η αλβουμίνη έχει συνδεθεί και με άλλες λειτουργίες όπως ενζυμική και αντιαποπτωτική δράση. Συγκεκριμένα, η HSA παρουσιάζει δράση εστεράσης (esterase-like activity) έναντι υποστρωμάτων όπως η οξική p-νιτροφαινόλη (pnitrophenyl acetate), ενώ κατάλοιπα απαραίτητα για αυτήν την ενζυμική ενεργότητα έχουν χαρτογραφηθεί στον υποτομέα ΙΙΙΑ. Η υδρολυτική δράση έναντι του συγκεκριμένου υποστρώματος έχει μελετηθεί λεπτομερώς in aμ vitro μεταλλαξιγένεση. Έχει δειχθεί έτσι, ότι η Arg410 είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα εστεράσης, ενώ σημαντική είναι και η Tyr411 (Watanade et al., 2000). Η δράση εστεράσης της HSA θεωρείται κλινικού ενδιαφέροντος καθώς μπορεί να τροποποιεί φάρμακα που προσδένονται σε αυτήν από μια μη ενεργό στην ενεργό μορφή τους (Kragh-Hansen et al., 2002). Η HSA έχει επίσης συσχετιστεί με δράση

ενολάσης και πιστεύεται ότι μπορεί να μετατρέπει την 3-κετο μορφή της διυδροτεστοστερόνης στην 3-ενολική μορφή της (Drmanovich et al., 1999).

Η αλβουμίνη έχει επίσης συσχετιστεί με το φαινόμενο της απόπτωσης αν και ο ρόλος της δεν είναι ξεκαθαρισμένος. Υπάρχουν πειραματικές μαρτυρίες, στηριζόμενες σε μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων και στο προφίλ σχάσεων του DNA (DNA laddering), ότι η αλβουμίνη, τόσο σε ανασυνδυασμένη όσο και φυσική (native) μορφή, μπορεί να προκαλέσει αντιαποπτωτικά φαινόμενα σε κύτταρα HUVEC σε συγκεντρώσεις από 5.8 μΜ και άνω (Zoellner et al., 1996). Επιπλέον, η αλβουμίνη προστατεύει Β-κύτταρα ασθενών με χρόνια Βλεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL) από απόπτωση που προκαλείται από chlorambucil και ακτινοβολίες γ (Jones et al., 2003). Από την άλλη πλευρά, σε κύτταρα της σειράς LLC-PK1 που προέρχονται από νεφρικά σωληνάρια χοίρου και σε συγκέντρωση 20 mg/mL, επάγει αποπτωτικά φαινόμενα μέσω του μονοπατιού FAS-FADD και της κασπάσης 8 (Erkan et al., 2001).

Στα πλαίσια μελετών απομόνωσης βιολογικά ενεργών παραγόντων που περιέχονται σε ορχικό υγρό επιμύων 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 προγνενολόνης από τα κύτταρα Leydig. Ίδια δράση παρουσιάζει η HSA, η αλβουμίνη βοός και επίμυος 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).

#### 1.3.2 Η δομή της αλβουμίνης

Το πλήρες ατομικό μοντέλο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού δόθηκε από τους He και Carter το 1992 με κρυστάλλωση απολιπιδιωμένης HSA και κρυσταλλογραφία σε ευκρίνεια 3.1 Å. Η αλβουμίνη αποτελείται από 9 διπλούς βρόγχους (loops 1-9) που σχηματίζονται από 17 δισουλφιδικούς δεσμούς και περαιτέρω ομαδοποιούνται σε τρεις τομείς (domains) που είναι δομικά ομόλογοι μεταξύ τους και ονομάζονται Ι, ΙΙ και ΙΙΙ (Peters, 1996). Κάθε ένας από τους 3 τομείς περιλαμβάνει δύο υποτομείς A και B, οι οποίοι επίσης εμφανίζουν δομική ομολογία, ιδιαίτερα οι τρεις υποτομείς A μεταξύ τους και οι τρεις υποτομείς B μεταξύ τους (IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB). Οι δύο πρώτοι βρόγχοι κάθε τομέα (1-2, 4-5 και 7-8)

αποτελούν τους υποτομείς ΙΑ, ΙΙΑ και ΙΙΙΑ αντίστοιχα, ενώ οι βρόγχοι 3, 6 και 9 αποτελούν τους υποτομείς ΙΒ, ΙΙΒ και ΙΙΙΒ αντίστοιχα (He and Carter, 1992) (Εικόνα 1.7).

Παλαιότερα, οι σγέσεις δομής-λειτουργίας στο μόριο της αλβουμίνης είχαν μελετηθεί αδρά με δημιουργία θραυσμάτων του μορίου με γημικούς παράγοντες ή πρωτεολυτικά ένζυμα. Οι μελέτες αυτές οδήγησαν στη συσσώρευση πληροφοριών σγετικά με τις θέσεις δέσμευσης διαφόρων μορίων στο μόριο της αλβουμίνης αλλά περιορίζονταν από το γεγονός ότι τα θραύσματα δεν διέθεταν όρια που να στηρίζονται στην δομική αρχιτεκτονική της HSA (He and Carter, 1992). Τα τελευταία χρόνια οι τομείς της HSA έχουν παραχθεί σε ανασυνδυασμένη μορφή. Αρχικά οι τομείς Ι και ΙΙΙ αλλά όχι ο ΙΙ εκφράστηκαν επιτυχώς στον S. cerevisiae και μελετήθηκε η πρόσδεση του μυριστικού (Kjeldsen et al., 1998). Περισσότερο επιτυχής κατέστη η έκφραση των τριών τομέων της HSA στο σύστημα του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα P. pastoris (Dockal et al., 1999) που είχε ήδη χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυγία για την έκφραση ολόκληρου του μορίου της HSA (Barr et al., 1992). Οι ανασυνδυασμένοι τομείς εκφράστηκαν σε εκκρινόμενη μορφή και απομονώθηκαν από το υπερκείμενο καλλιέργειας του P. pastoris με χρωματογραφία Blue Sepharose δείχνοντας έτσι ότι οι θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue υπάρχουν και στους τρεις τομείς της HSA. Στην μελέτη αυτή η ανάλυση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των τριών ανασυνδυασμένων τομέων υπέδειξε ότι η διαμόρφωση τους είναι παρόμοια με αυτήν που διαθέτουν στο περιβάλλον της HSA. Οι ανασυνδυασμένοι τομείς Ι, ΙΙ και ΙΙΙ καθώς και τα πολυπεπτίδια D12 (1-385), D12A (1-299), D23 (189-585) εκφραζόμενα στο ίδιο σύστημα, έχουν χρησιμοποιηθεί για να καθοριστούν οι θέσεις πρόσδεσης μορίων όπως η warfarin, Cibacron Blue, hemin Diazepam (Dockal et al., 1999), η ωγρατοξίνη (Il'ichev et al., 2002) αλλά και για να μελετηθούν οι μεταβολές στη διαμόρφωση των τομέων της HSA σε σχέση με το pH (Dockal et al., 2000).

Η HSA είναι πλούσια σε α-έλικες με το 67% των καταλοίπων της να συμμετέχουν σε ένα σύνολο 23 α-ελίκων, το 10% σε β στροφή και το 23% σε εκτεταμένες αλυσίδες ενώ απουσιάζουν β-πτυχωτές επιφάνειες. Η μορφή των ελίκων είναι όμοια σε καθέναν από τους τρεις τομείς. Συγκεκριμένα σε κάθε Α υποτομέα υπάρχουν 6 α-έλικες ενώ σε κάθε Β υποτομέα υπάρχουν 4 α-έλικες (Carter and Ho, 1994). Οι υποτομείς Α και Β του κάθε τομέα συνδέονται με εκτεταμένες επιφάνειες ενώ η σύνδεση μεταξύ των διαδοχικών τομέων γίνεται με περιοχές έλικας.

# 1.3.3 Χαρτογράφηση θέσεων πρόσδεσης (ligand binding sites) στο μόριο της HSA

Μετά την αρχική κρυσταλλογραφική ανάλυση του μορίου της HSA (He and Carter, 1992), έχουμε πλέον διαθέσιμη μία σειρά αναλυτικών κρυσταλλογραφικών δομών (σε ευκρίνεια της τάξης των 2.2-2.8 Å) που προέκυψαν από συγκρυστάλλωση της HSA με εκτενή σειρά ειδικών προσδεμάτων (ligands) της HSA, όπως λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας LCFAs (Bhattacharya et al., 2000), γουαρφαρίνη (warfarin), θυρεοξίνη (Petitpas et al., 2003), αιμίνη (hemin) (Monzani et al., 2001) κλπ.

Στα πλέον σημαντικά προσδέματα της HSA ανήκουν τα LCFAs (long-chain fatty acids, λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας). Για LCFAs υπάρχουν τουλάχιστον έξι θέσεις πρόσδεσης εκ των οποίων οι τρεις πιο σημαντικές, κατά αυξανόμενη συγγένεια πρόσδεσης (binding affinity), ανήκουν στον βρόγχο 3 (υποτομέα IB), στον βρόγχο 6 (υποτομέα IIB) και στους βρόγχους 8-9 στον τομέα III (Peters, 1996). Η πρόσδεση στεροειδών ορμονών στην αλβουμίνη θεωρείται ασθενής, καθώς υπάρχουν άλλες μεταφορικές πρωτεΐνες, εξειδικευμένες για αυτό το σκοπό. Η χαμηλή συγγένεια με την HSA, αντικατοπτρίζει την δυνατότητα άμεσης απελευθέρωσης των ορμονών που μεταφέρονται από αυτήν στους ιστούς. Η πρόσδεση τουλάχιστον για την τεστοστερόνη και την προγνενολόνη έχει βρεθεί ότι πραγματοποιείται στον βρόγχο 6 του τομέα II (Fisher et al., 1993). Η χολερυθρίνη, ένα από τα μόρια που υποτομέα IIA και συγκεκριμένα στην HSA, προσδένεται στον βρόγχο 4 του υποτομέα IIA και συγκεκριμένα στην Arg222.

Δύο βασικές θέσεις πρόσδεσης μορίων στην αλβουμίνη αποτελούν οι θέσεις Ι (Sudlow Site I) και II (Sudlow Site II) (Sudlow et al., 1976). Η θέση Ι εντοπίζεται στον υποτομέα IIA, στους βρόγχους 4-5 (He and Carter, 1992) και τα τυπικά προσδέματα για αυτήν είναι ετεροκυκλικά ανιόντα με το φορτίο να βρίσκεται σε κεντρική θέση του μορίου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα προσδεμάτων στη θέση Ι είναι χρωστικές όπως phenol red, bromophenol blue κ.α. και η γουαρφαρίνη (warfarin). Η θέση ΙΙ εντοπίζεται στον υποτομέα IIIA, στους βρόγχους 7-8 (He and Carter, 1992) και τα προσδέματα είναι αρωματικές ενώσεις, κυρίως ουδέτερες και στην περίπτωση που υπάρχει φορτίο είναι αρνητικό και βρίσκεται περιφερειακά του μορίου. Γνωστά προσδέματα στη θέση ΙΙ είναι φάρμακα όπως diazepam και το ΑΖΤ, το αμινοξύ τρυπτοφάνη, η θυρεοξίνη και το οκτανοϊκό οξύ. Υπάρχουν ουσίες όπως οξειδωτικά που συνδέονται ομοιοπολικά στην αλβουμίνη στην Cys34, ενώ τα κατιόντα χαλκού και νικελίου συνδέονται στο Ντελικό άκρο της αλβουμίνης στην His3.

Πολλές πεπτιδικές ορμόνες όπως μελατονίνη, γαστρίνη, κορτικοτροπίνη και ιντερφερόνες συνδέονται στη αλβουμίνη. Ιδιαίτερης κλινικής σημασίας είναι η σύνδεση στην αλβουμίνη της G πρωτεΐνης του στρεπτόκοκκου (Gordon et al., 1993; Lejon et al., 2004) και ενός υδρόφοβου πεπτιδίου της gp41 του HIV (Gordon et al., 1993).



Εικόνα 1.7 Η δομή της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού. Οι υποτομείς της HSA που διακρίνονται με διαφορετικά χρώματα αντιστοιχούν στα κατάλοιπα 1-106 (υποτομέας IAμωβ), 107-197 (υποτομέας IB μπλέ), 198-295 (υποτομέας IIA σκούρο πράσινο), 296-385 (υποτομέας IIB ανοιχτό πράσινο), 383-489 (υποτομέας IIIA πορτοκαλί) και 490-585 (υποτομέας IIIB κόκκινο) (βάσει <u>www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath</u>; Dockal et al., 1999; Tavoulari et al., 2004)



Εικόνα 1.8 Σχηματική αναπαράσταση των θέσεων πρόσδεσης μορίων στην αλβουμίνη. Ως FA συμβολίζονται τα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας και RSH τα μικτά δισουλφίδια ενώ σημειώνονται οι δύο κλασικές θέσεις πρόσδεσης υποστρωμάτων στους υποτομείς IIA και IIIA (Sudlow I και II).

and the second faire of the second second



#### 1.4 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΛΒΟΥΜΙΝΩΝ

Η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (HSA) είναι μέλος της γονιδιακής οικογένειας των αλβουμινών (albuminoid gene family) που αριθμεί τέσσερα μέλη: την αλβουμίνη (ALB) (δηλ. ως ανθρώπινο ορθόλογο, HSA), την α-εμβρυσπρωτεΐνη (α-fetoprotein-AFP) (59% ταυτόσημη προς την HSA), την πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (vitamin D-binding protein-DBP) (24% ταυτόσημη προς την HSA) και την ααλβουμίνη (ALF) ή αφαμίνη (afamin, AFM) (55% ταυτόσημη προς την HSA) (Lichēnstein et al. 1994). Τα τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τα αντίστοιχα μέλη της οικογένειας, εδράζονται, κατά διαδοχική σειρά, στη χρωμοσωμική θέση 4q11-q22 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Το γονίδιο της AFP ευρίσκεται 14.5 kb καθοδικά (downstream) του γονιδίου της HSA, ενώ 10 kb μετά το γονίδιο της AFP ακολουθεί το γονίδιο της α-αλβουμίνης (Peters, 1996). Το γονίδιο της DBP απαντάται τουλάχιστον 1.5 Mb ανοδικά (upstream) του γονιδίου της HSA και, μάλιστα, με αντίθετη κατεύθυνση μεταγραφής (Song et al, 1999): συνολικά, ακολουθείται η σειρά centromere-3'-DBP-5'-5'-ALB-3'-5'-AFP-3'-5'-AFM-3'-telomere (**Εικόνα 1.9**).

Τα μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά. Και τα τέσσερα μόρια έχουν σχήμα U, και αποτελούνται από τριπλές πρωτεϊνικές «μονάδες» δηλ. τρεις ομόλογους μοριακούς τομείς (domains). Τα κατάλοιπα Cys που διαθέτουν δημιουργούν συγκεκριμένα ζεύγη δισουλφιδικών δεσμών που οδηγούν στην χαρακτηριστική δομή με σχηματισμό βρόγχων (loops) (Εικόνες 1.8 και 1.10).





Εικόνα 1.9 Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα μέλη της οικογένειας των αλβουμινών βρίσκονται στη σειρά στο χρωμόσωμα 4 στην περιοχή 4q11-22 Τα βέλη υποδηλώνουν την κατεύθυνση της μεταγραφής (από White and Cooke, 2000).

DBP, το γονίδιο που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D. AFM το γονίδιο που κωδικοποιεί την α-αλβουμίνη/αφαμίνη. AFP το γονίδιο που κωδικοποιεί την α-εμβρυοπρωτεΐνη. ALB, το γονίδιο που κωδικοποιεί την αλβουμίνη.



Εικόνα 1.10 Μοριακές διαμορφώσεις της ανθρώπινης AFP (αριστερά), της ανθρώπινης αλβουμίνης (κέντρο) και της DBP (δεξιά) βασιζόμενες σε προβλεπόμενες δευτεροταγείς δομές. Στην DBP παρατηρείται έλλειψη του C-τελικού άκρου σε σχέση με την AFP και την HSA (από Mizejewski, 2001).

#### 1.4.1 α-Εμβρυοπρωτείνη (AFP)

Η AFP είναι η περισσότερο άφθονη πρωτεΐνη του ορού κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Έχει μοριακό βάρος 69.500 Da και μία θέση Ν-γλυκοζυλίωσης Asn-Phe-Thr στα κατάλοιπα 232-234 (υποτομέας IIA) (Peters, 1996).

Η AFP συντίθεται κυρίως στο αγγειακό ενδόδερμα, στον ωόσακκο, στο εμβρυϊκό ήπαρ και λιγότερο στο αναπτυσσόμενο έντερο. Τα επίπεδα της στην κυκλοφορία του εμβρύου φτάνουν τα 3gr/L και μειώνονται δραματικά στα 5µg/L στον πρώτο χρόνο ζωής. Τα επίπεδα της AFP κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής αυξάνονται αισθητά σε ηπατοκαρκινώματα γι'αυτό και έχει χρησιμοποιηθεί ως καρκινικός δείκτης.

Όπως και η HSA έτσι και η AFP μπορεί να προσδένει και να μεταφέρει μια πληθώρα μορίων όπως χολερυθρίνη, λιπαρά οξέα, ρετινοειδή, στεροειδή, βαρέα μέταλλα, χρωστικές, φλαβονοειδή και διάφορα φάρμακα. Σε αντίθεση όμως με την αλβουμίνη, προσδένει ασθενώς τα κορεσμένα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (LCFAs) αλλά προσδένει ισχυρά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το αραχιδονικό.

Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί σχετικά με τον φυσιολογικό ρόλο της AFP κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη πέρα από το γενικότερο μεταφορικό της ρόλο. Με βάση την παρατήρηση ότι η AFP μπορεί να συνδέει οιστρογόνα, προτάθηκε ότι μπορεί να επηρεάζει την φυλετική διαφοροποίηση του εγκεφάλου προστατεύοντας το έμβρυο από την επίδραση των κυκλοφορούντων οιστρογόνων (MacLusky and Naftolin, 1981). Έχει επίσης προταθεί ότι μπορεί να προστατεύει το έμβρυο από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας, καθώς η προσθήκη καθαρής AFP σε καλλιέργειες μονοκυττάρων από σπλήνα και μυελό των οστών έχει κατασταλτικό ρόλο στην παραγωγή αντισωμάτων (Tomasi et al., 1977). Από την άλλη πλευρά η σημασία της AFP στην ανάπτυξη του εμβρύου έχει αμφισβητηθεί από την ομάδα Gabant (Gabant et al., 2002) ύστερα από πειράματα γονιδιακής απενεργοποίησης (knock-out) σε ποντίκια. Η συγκεκριμένη ομάδα έδειξε ότι έμβρυα  $Afp^{-1}$  που στερούνται λειτουργικού γονιδίου AFP αναπτύσσονται κανονικά και είναι βιώσιμα. Επομένως, η AFP δεν είναι απαραίτητη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αντίθετα, από την ίδια πειραματική εργασία, τα θηλυκά  $Afp^{-t}$  ποντίκια που στερούνται του λειτουργικού γονιδίου AFP είναι στείρα λόγω έλλειψης ωοθυλακιορρηξίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι η AFP συνδέεται με την αναπαραγωγική ωρίμανση των θηλυκών

ζώων και τη γονιμότητα. Οι ίδιοι ερευνητές έδειξαν ότι η έλλειψη της ωοθυλακιορρυξίας δεν οφείλεται σε δυσλειτουργία των γονάδων, καθώς οι ωοθήκες των *Afp<sup>-/-</sup>* θηλυκών ζώων είναι λειτουργικές. Πιθανή θεωρήθηκε η δυσλειτουργία του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης καθώς η αναλογία LH/FSH βρέθηκε να μην είναι φυσιολογική.

Σειρά αναφορών έχουν συνδέσει την AFP με τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Θεωρείται ότι τόσο η AFP όσο και πρωτεολυτικά της θραύσματα, ανασυνδυασμένοι τομείς της και συνθετικά πεπτίδια έχουν ογκοκατασταλτική δράση. Πιστεύεται ότι η AFP μέσω ειδικών υποδοχέων εισέρχεται στα καρκινικά κύτταρα με ενεργό ενδοκύττωση (active endocytosis) (Laborda et al., 1987; Alava et al., 1999) και μετέχει στη ρύθμιση της απόπτωσης ενεργοποιώντας το μονοπάτι των κασπασών (Dudich et al., 1999; Semenkova et al., 2003). Ειδικότερα, ενεργοποιεί την κασπάση 3, παρακάμπτοντας το μονοπάτι Fas/FaL και TNF/TNFR (Dudich et al., 1999). Ο τρόπος με τον οποίο επάγει την απόπτωση σχετίζεται με το μονοπάτι του κυτοχρώματος c και τη δημιουργία του αποπτωσώματος. Ενεργοποιεί τη δημιουργία Apaf-1-αποπτωσώματος, του συμπλέγματος επάγει την προσέλευση και ενεργοποίηση της προκασπάσης 3 και ενεργοποιεί την απελευθέρωση της ενεργής κασπάσης 3 και 9 από το αποπτώσωμα, πιθανόν αλληλεπιδρώντας και μετατοπίζοντας τον cIAP-2 (cellular inhibitors of apoptosis proteins-cIAPs) (Semenkova et al., 2003).

#### 1.4.2 Πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (Vitamin-D Binding Protein, DBP)

Η DBP με 460 κατάλοιπα, διαφέρει από τα άλλα μέλη της οικογένειας ως προς τη δομή και το μέγεθος (Gibbs and Dugaiczyk, 1987). Αυτό οφείλεται στο ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί για την DBP έχει 13 εξώνια έναντι 15 των άλλων γονιδίων της οικογένειας. Τα εξώνια που απουσιάζουν είναι το 12 και 13 της αλβουμίνης που αντιστοιχούν στους βρόγχους 8 και 9 με αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να μην διαθέτει τον υποτομέα IIIB (Gibbs and Dugaiczyk, 1987). Εκτός από την έλλειψη των δύο εξωνίων το επαναλαμβανόμενο προφίλ των μεγεθών των εξωνίων ταιριάζει με αυτό της HSA και της AFP.

Η DBP πήρε το όνομα της λόγω της ικανότητας της να προσδένει και να μεταφέρει τους βασικούς μεταβολίτες της βιταμίνης D, 25-υδροξυ-βιταμίνη D και 1,25 διυδροξυ-βιταμίνη D, οι οποίοι προσδένονται στον βρόγχο 1 του τομέα I, στην

περιοχή των καταλοίπων 14-58 (Peters, 1996). Ωστόσο, μόνο ένα 5% της κυκλοφορούσας DBP φαίνεται να συνδέεται με την δέσμευση και μεταφορά των μεταβολιτών της βιταμίνης D, υποδηλώνοντας ότι η DBP εμπλέκεται και σε άλλες λειτουργίες (White and Cooke, 2000).

Είναι ενδιαφέρον, για παράδειγμα, ότι η DBP μπορεί να προσδένει μονομερή ακτίνης μεταξύ των καταλοίπων 373-405 στον τομέα ΙΙΙΑ με υψηλή συγγένεια εμποδίζοντας τον πολυμερισμό τους (Harper et a., 1987). Η λειτουργία αυτή έχει ιδιαίτερη φυσιολογική σημασία καθώς μετά από καταστάσεις τραυματισμού η ενδοκῦττάρια ακτίνη μπορεί να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία και με πολυμερισμό να προκαλέσει μικροεμβολές (White and Cooke, 2000). Η ικανότητα πρόσδεσης μονομερών ακτίνης αποτελεί ιδιαίτερο γνώρισμα της DBP που δεν απαντάται στα άλλα μέλη της οικογένειας των αλβουμινών. Η διαφορά αυτή οφείλεται σε σημαντικές διαφορές αλληλουχίας του εξωνίου 10 (που κωδικοποιεί κυρίως για την περιοχή αλληλουχίας 373-405 μεταξύ των βρόγχων 6 και 7, Εικόνα 1.9), υπεύθυνες για τον σχηματισμό της θέσης πρόσδεσης της ακτίνης (Otterbein et al., 2002).

Τέλος, η DBP έχει ευρεθεί σε επαφή με μεμβρανοσύνδετες ανοσοσφαιρίνες στα Β λεμφοκύτταρα και με τον υποδοχέα IgG Fc σε μερικά Τ λεμφοκύτταρα (Peters, 1996). Άλλοι ερευνητές (Yamamoto et al., 1996), εξάλλου, θεωρούν ότι εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των μακροφάγων, μετατρεπόμενη σε έναν παράγοντα ενεργοποίησης μακροφάγων (macrophage-activating factor, MAF) μέσω απογλυκοζυλίωσής της από γλυκοσιδάσες των B και T κυττάρων, μία δράση η οποία δεν έχει υποστηριχθεί όμως από σχετικές μελέτες σε *Dbp<sup>-/-</sup>* διαγονιδιακά ποντίκια (White and Cooke, 2000).

#### 1.4.3 α-Αλβουμίνη ή Αφαμίνη (AFM)

Η α-αλβουμίνη ή αφαμίνη (AFM), μια πρωτεΐνη 578 αμινοξέων, ανακαλύφθηκε μόλις το 1994 (Lichenstein et al. 1994; Belanger et al., 1994). Το υπολογιζόμενο μοριακό της βάρος είναι 66.576 Da αλλά σε SDS-PAGE μετακινείται στα 87.000 Da καθώς φέρεται να έχει υψηλή γλυκοζυλίωση που οφείλεται σε τέσσερις πιθανές θέσεις γλυκοζυλίωσης. Η AFM εκφράζεται φυσιολογικά στο ενήλικο και όχι στο εμβρυϊκό ήπαρ. Σε μελέτες γονιδιακής απενεργοποίησης της αεμβρυοπρωτεΐνης (knock-out) σε ποντίκια, στα  $Afp^{-/-}$  και  $Afp^{+/-}$ ζώα παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA της α-αλβουμίνης στο ήπαρ (Gabant et al., 2002). Με βάση αυτό

το δεδομένο, οι ερευνητές υπέθεσαν ότι η α-αλβουμίνη μπορεί να αναπληρώσει την απουσία της AFP κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς τα  $Afp^{-1-}$ ζώα είναι βιώσιμα.

Σχετικά με τον παθοφυσιολογικό ρόλο της AFM, η μόνη αναφορά είναι των Wu et al. (2000) που βρήκαν σημαντική καταστολή στην έκφραση της AFM σε καρκινικό ιστό από ηπατοκαρκίνωμα. Σε μία άλλη μελέτη υποστηρίχθηκε ότι η αφαμίνη έχει δυνατότητα πρόσδεσης α και γ τοκοφερόλης, δύο εκ των πιο σημαντικών μορφών της βιταμίνης Ε, τόσο στον ορό όσο και στο ωοθυλακικό υγρό στο οποίο φέρεται να υπάρχει σε αφθονία (Voegele et al., 2002).



#### 1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών είναι ένας υποθετικός, έως σήμερα, ωοθηκικός παράγοντας που θεωρείται ότι μπορεί να έχει κρίσιμο ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της έκκρισης της LH από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης (Messinis, 2003; Fowler et al., 2003). Η πληθώρα βιολογικά ενεργών μορίων στο ωοθυλακικό υγρό, όπου ανιχνεύεται η υψηλότερη δραστικότητα GnSAF, και πιθανώς η χαμηλή συγκέντρωση του παράγοντα σε αυτό, έχει καταστήσει δυσχερή την απομόνωση του, με αποτέλεσμα ο GnSAF να μην έχει ταυτοποιηθεί έως σήμερα.

Στην παρούσα εργασία, στηριζόμενοι στη συσχέτιση της δραστικότητας GnSAF με το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) (Pappa et al., 1999), ακολουθήσαμε μια διαφορετική προσέγγιση για τη μελέτη του GnSAF. Επιλέξαμε να χρησιμοποιήσουμε το ετερόλογο σύστημα έκφρασης-έκκρισης του ζυμομύκητα *P. pastoris*, για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων της HSA και θέσαμε τους ακόλουθους στόχους:

- Να εκφράσουμε το C-τελικό 95πεπτίδιο (κατάλοιπα 490-585) της HSA στο παραπάνω σύστημα, προκειμένου να διερευνήσουμε πιθανή δράση του σε κύτταρα υπόφυσης και συσχέτιση του με δραστικότητα GnSAF.
- Να διερευνήσουμε αν η δράση του πολυπεπτιδίου 490-585 της HSA στην υπόφυση είναι ειδική. Για το σκοπό αυτό θα εστιάσουμε στη σύγκριση των ιδιοτήτων του εν λόγω πολυπεπτιδίου με την αλβουμίνη, ομόλογα αυτής, τομείς και υποτομείς της, τους οποίους θα εκφράσουμε στο ίδιο σύστημα.
- Να μελετήσουμε στο ίδιο σύστημα εναλλακτικές μορφές του πολυπεπτιδίου 490-585 ώστε να προσδιορίσουμε περιοχές σημαντικές για τη δομή και τη λειτουργία του.



THERE AN EVERYTIC KARGE PATER A TAILS

54. C 14. 4 11 11

the second s the state of the second state of the March March Andrew Constant and Charles States 

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 

The second se And the second Ender State Weiner Berlin in State Manager and Man Max Monte Constant of Max and M

and the second second

in the second second

and a second second

Carlo and the second Fine Provide States and Frank States and According to the second states of the second states No. 1997 No.

the second s we and the second se 

#### 2.1 ΟΡΓΑΝΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

#### 2.1.1 Όργανα

Τα εργαστηριακά όργανα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα ακόλουθα: Μικροφυγόκεντρος eppendorf Centrifuge 5415D, επιτραπέζια φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Germany), ψυχόμενη φυγόκεντρος Sorvall RC-5B (Du Pont Instruments, Newton, Connecticut), συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών PROTEAN II xi Cell (BioRad, Hercules, California), τροφοδοτικό ρεύματος PowerPAC 3000 (BioRad, Hercules, California), συσκευή PCR Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California), ηλεκτροφορητικές συσκευές για DNA, Horizon 1114 και 58 (Gibco-BRL Life Technologies GmbH, Kalsruhe, Germany), συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας Ultraviolet transilluminator (Vilber Lourmat, Cebex, France), φωτόμετρο Spectrophotometer MBA 2000 (Perkin-Elmer, Boston, Massachusetts), μετρητής πλακιδίου ELISA τύπου Stat Fax-2100 (Awareness Technology, Palm City, Florida), φυγοκεντρικός συμπυκνωτής κενού (SpeedVac concentrator) (Savant Instruments, Hicksville, New York).

#### 2.1.2 Χημικά αναλώσιμα

Τα ολιγονουκλεοτίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή συνετέθησαν στην εταιρία Biospring GmbH (Frankfurt, Germany). Η *Pfu* DNA πολυμεράση ήταν της Stratagene (La Jolla,CA) ενώ το σύστημα Expand High Fidelity. PCR της Roche Molecular Biochemicals (Manheim, Germany). Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες ήταν της New England Biolabs (Beverly, MA) ενώ η DNA λιγάση της Invitrogen (Groningen, The Netherlands). Η LH and FSH επίμυος (rLH-RP-3, rLH-I-10, rFSH-RP-2, rFSH-I-9) και οι αντιοροί (anti-rLH-S11, antirFSH-S-11) χορηγήθηκαν από το National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) μέσω του προγράμματος National Hormones and Pituitary Program (NHPP, Baltimore, MD, USA). Η ορμόνη έκλυσης των γοναδοτροφινών, (Gonadotrophin releasing hormone-GnRH) και η ανθρώπινη αλβουμίνη ορού (human, serum albumin-HSA; catalog number A-3782) ήταν της Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) ενώ η α-εμβρυοπρωτεΐνη (α-fetoprotein-AFP; catalog number

A .....

341498) ήταν της Calbiochem, UK. Το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-myc 9E10 απομονώθηκε από το υβρίδωμα με κλασικές τεχνικές και ήταν ευγενική προσφορά της Dr. Carol Murphy. Το πολυκλωνικό αντίσωμα anti-HSA ab1217 αγοράστηκε από την εταιρία Abcam (Cambridge, UK). Τα αντισώματα anti-mouse και anti-rabbit IgG συζευγμένα με υπεροξειδάση ραπανιού (horseradish peroxidase-HRP) ήταν της Amersham Pharmacia Biotech (London, UK). Τα σφαιρίδια Blue Sepharose 6 Fast Flow ήταν επίσης της Amersham Pharmacia Biotech ενώ οι στήλες Ni<sup>2+</sup> (ProBond resin) της Invitrogen (Groningen, The Netherlands).

# 2.1.3 Πειραματόζωα

Για τη δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων υπόφυσης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί επίμυες Wistar, ηλικίας δύο μηνών, που χορηγήθηκαν από το Εκτροφείο του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Οι επίμυες θανατώθηκαν στο χώρο του Εκτροφείου με αιφνίδιο χτύπημα στο λαιμό.

# 2.1.4 Στελέχη βακτηρίων και μυκήτων

- To στέλεχος της Escherichia coli TOP10F' [F'{proAB, lacI<sup>q</sup>, lacZΔM15, Tn10(Tet<sup>R</sup>)}mcrA,Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, araD139, Δ(ara-leu)7697, galU, galK, rpsL(Str<sup>R</sup>), endA1, nupGλ] χρησιμοποιήθηκε για την ανάκτηση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε μεγάλη κλίμακα.
- Το στέλεχος του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα Pichia pastoris GS115 [his4] (Invitrogen, Groningen, Netherlands) χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής για την ετερόλογη έκφραση ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων.
- Το στέλεχος GS115/Albumin (Invitrogen), που φέρει το πλήρες cDNA της HSA ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του, (υπό τον έλεγχο του επαγόμενου από μεθανόλη υποκινητή AOX1), χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας για την εκκρινόμενη έκφραση και για την παραγωγή ανασυνδυασμένης αλβουμίνης. Επίσης γονιδιωματικό DNA του GS115/Albumin χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα στην αντίδραση PCR για την πολλαπλή αντιγραφή τμημάτων του cDNA της HSA.

Στέλεχος P. pastoris	Τμήμα cDNA της HSA της house a state of the second	
GS115	-	Invitrogen
GS115/Albumin	CDNA HSA	Invitrogen
GS115/empty vector	• ·	Tavoulari et al.,2004
GS115/DIIIB	Υπότομέας ΠΙΒ (κωδικόνια 490-585)	Tavoulari et al.,2004
GSI 15/DIIIBmyc-6His	Υποτομέας IIIB (κωδικόνια 490-585)myc-6His	Tavoulari et al.,2004
GS115/DIII	Τομέας ΙΙΙ (κωδικόνια 381-585)	Tavoulari et al.,2004
GS115/DIIImyc-6His	Τομέας ΙΙΙ (κωδικόνια 381-585) myc-6His	Tavoulari et al.,2004
GS115/DI	Τομέας Ι (κωδικόνια 1-197)	Tavoulari et al.,2004
GS115/DImyc-6His	Τομέας Ι (κωδικόνια 1-197) myc-6His	Tavoulari et al.,2004
GS115/DII	Τομέας ΙΙ (κωδικόνια 189-385)	Tavoulari et al.,2004
GS115/DIImyc-6His	Τομέας ΙΙ (κωδικόνια 189-385)	Tavoulari et al.,2004
GS115/DB	Τομέας ΙΒ (κωδικόνια 107-197)	Tavoulari unpub
• GS115/DIBmyc-6His	Υποτομέας IB (κωδικόνια 107-197) myc-6His	Tavoulari unpub. results
AS 1 OS115/DIB 1	Τομέας ΙΙΒ (κωδικόνια 296-385) <sup>471-1</sup>	Tavoulari unpub
GS115/DIIBmyc-6His	Υποτομέας IIB (κωδικόνια 296-385) myc-6His	Tavoulari unpub. results
	Ν-truncated υποτομέας IIIΒ (κωδικόνια 509-585)	Tavoulari unpub. results
GS115/(HSA509-585)myc-6His	N-truncated υποτομέας IIIB (κωδικόνια 509-585) myc-6His	Tavoulari unpub. results
GS115/(HSA495-572)	C-truncated υποτομέας IIIB (κωδικόνια 495-572)	Tavoulari unpub. result
GS115/(HSA495-572)myc-6His	C-truncated υποτομέας IIIB (κωδικόνια 495-572) myc-6His	Tavoulari unpub. results
GS115/DIIIBest	Κωδικόνια 1-23^483-585	Tavoulari unpub.
GS115/DIIIBMax	Κωδικόνια 464-585	Tavoulari unpub. results

Πίνακας 2.1: Στελέχη του ζυμομύκητα *P. pastoris* που χρησιμοποιήθηκαν για την ετερόλογη έκφραση τομέων και υποτομέων της HSA. Ως Myc-6His αναγράφονται τα στελέχη στα οποία το ενσωματούμενο cDNA της HSA φέρει στο 3΄ άκρο του, και ίδιο πλαίσιο ανάγνωσης, την αλληλουχία Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn του myc επιτόπου ακολουθούμενη από 6 κωδικόνια His (βλ. Εικόνα 2.1).

# 2.1.5 Ανάπτυξη βακτηρίων

Για την ανάπτυξη του στελέχους της *E. coli*, TOP10F' σε υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) (1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, 1% w/v NaCl), ενώ για την ανάπτυξη του σε στερεή καλλιέργεια προστίθεται επιπλέον 1.5% w/v άγαρ στο διάλυμα LB. Για τα μετασχηματισμένα στελέχη με ανθεκτικότητα στο αντιβιοτικό ζεοκίνη, χρησιμοποιήθηκε LB χαμηλής αλατότητας (1% w/v τρυπτόνη, 0.5% w/v εκχύλισμα ζύμης, <u>0.5% w/v NaCl</u>) καθώς υψηλότερη αλατότητα μπορεί να προκαλέσει απενεργοποίηση του αντιβιοτικού. Η αποθήκευση των βακτηριακών στελεχών έγινε σε θρεπτικό υλικό LB, 15% v/v γλυκερόλη στους -80  $^{0}$ C.

# 2.1.6 Ανάπτυξη στελεχών του ζυμομύκητα P.pastoris

Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του *P.pastoris* είναι 28-30 <sup>6</sup>C. Ως πλήρες θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη του μύκητα σε υγρή καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε το YPD (2% w/v πεπτόνη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v D(+) γλυκόζη). Για την επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων *P. pastoris* (Ενότητα 2.3.2) χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία επιλογής YPDS με ζεοκίνη (2% w/v πεπτόνη, 1% w/v εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v D(+) γλυκόζη, 1 M σορβιτόλη, 2% w/v άγαρ, 100 μg/mL ζεοκίνη). Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της ετερόλογης έκφρασης αναφέρονται στην Ενότητα 2.3.4.

## 2.1.7 Αποθήκευση στελεχών του P. pastoris

Τα στελέχη του P. pastoris μπορούν να αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα σε γλυκερόλη. Η διαδικασία που ακολουθείται έως την αποθήκευση είναι η ακόλουθη: Μονές αποικίες αναπτύσσονται σε πλήρες θρεπτικό υλικό (YPD) για περίπου 16 h στους 30 °C. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση και επαναιωρούνται σε YPD, που περιέχει 15% v/v γλυκερόλη, έτσι ώστε η τελική OD<sub>600</sub> να είναι 50-100 (περίπου 2.5-5 x 10<sup>9</sup> κύτταρα/mL). Στη συνέχεια τα κύτταρα καταψύχονται σε υγρό άζωτο και μεταφέρονται στους -80 °C.

#### 2.1.8 Πλασμίδια

**pPICZaA:** Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης pPICZaA (Invitrogen) που επιλέχθηκε, επιτρέπει την έκφραση ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών στον μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα *P.pastoris* αλλά και την έκκριση των πρωτεϊνών στο υπερκείμενο καλλιέργειας του μύκητα με τη χρήση της σηματοδοτικής αλληλουχίας a-factor του Saccharomyces cerevisiae. Ο φορέας επιπλέον περιλαμβάνει:

- Τμήμα 942 ζευγών βάσεων που περιέχει τον υποκινητή της αλκοολικής
  οξειδάσης (AOX1) και περιοχή ομολογίας που επιτρέπει την ενσωμάτωση στο χρωμόσωμα του μύκητα.
- Γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό ζεοκίνη.
- Επίτοπο του c-myc (Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu-Asn) και έξι κωδικόνια His που επιτρέπουν την ανίχνευση των πρωτεϊνών και τον καθαρισμό τους με τη χρήση Ni<sup>2+</sup>.



Εικόνα 2.1 : Ο πλασμιδιακός φορέας κλωνοποίησης και έκφρασης pPICZaA.

pDNR-LIB/DIIIBest: Περιέχει τον κλώνο RZPD IMAGp958K021545Q2 (RZPD IMAGE cDNA clone collection, <u>http://image.llnl.gov/image/html</u>) και χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την πολλαπλή αντιγραφή του cDNA της HSA 1-23^483-585.

Τα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν στα πλαίσια της παρούσας εργασίας παρατίθενται στον Πίνακα 2.2.

Όνομα πλασμιδίου	Ζεύγος εκκινητών
pPICZaA/DIIIB	DIIIB-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-antisense
pPICZaA/DIIIBmyc-6His	DIIIB-( <i>EcoR</i> I)-sense, DIII-( <i>NotI</i> )-6His-antisense
pPICZaA/DIII	DIII-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-antisense
pPICZαA/DIIImyc-6His	DIII-(EcoRI)-sense, DIII-(NofI)-6His-antisense
pPICZaA/DI	DI-(EcoRI)-sense, DI-(NotI)-antisense
pPICZaA/DImyc-6His	DI-(EcoRI)-sense, DI-(NorI)-6His-antisense
pPICZaA/DII	DII-(EcoRI)-sense, DII-(NotI)-antisense
pPICZaA/DIImyc-6His	DII-( <i>EcoR</i> I)-sense, DII-( <i>Not</i> I)-6His-antisense
pPICZaA/DIB	DIB-(EcoRI)-sense, DI-(NorI)-antisense
pPICZaA/DIBmyc-6His	DIB-(EcoRI)-sense, DI-(NotI)-6His-antisense
pPICZaA/DIIB	DIIB-(EcoRI)-sense, DII-(NotI)-antisense
pPICZaA/DIIBmyc-6His	DIIB-(EcoRI)-sense, DII-(NotI)-6His-antisense
pPICZaA/HSA509-585	DIIIB-(509-585)-(EcoRI)-sense, DIIIB-(509-585)-(NotI)-anti
pPICZaA/HSA509-585myc-6His	DIIIB-(509-585)-(EcoRI)-sense, DIIIB(509-585)-(Notl) 6His anti
pPICZaA/HSA495-572	DIIIB-(495-572)-(EcoRI)-sense, DIIIB-(495-572)-(NotI)-anti
pPICZaA/HSA495-572myc-6His	DIIIB-(495-572)-(EcoRI)-sense, DIIIB(495-572)-(NotI) 6His anti
pPICZaA/Best	DI-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-antisense
pPICZaA/MAX	DIIIBMAX-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-antisense
pPICZaA/IIIAXaIIIB	1 <sup>0</sup> στάδιο PCR, τμήμα IIIA: PCR DIII-(EcoRI)-sense, HSA-IIIA-anti 1 <sup>0</sup> στάδιοPCR, τμήμα IIIB: HSA-IIIB-sense, DIII-(NotI)-anti 2 <sup>0</sup> στάδιο PCR: DIII-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-anti
pPICZaA/IIIAXaIIIBmyc-6His	1 <sup>0</sup> στάδιο PCR, τμήμα IIIA: PCR DIII-(EcoRI)-sense, HSA-IIIA-anti 1 <sup>0</sup> στάδιο PCR, τμήμα IIIB: HSA-IIIB-sense, DIII-(NotI)-6His-anti 2 <sup>0</sup> στάδιο PCR: DIII-(EcoRI)-sense, DIII-(NotI)-6His-anti

Πίνακας 2.2: Ανασυνδυασμένα πλασμίδια που κατασκευάστηκαν με τη χρήση του φορέα pPICZaA. Τα ζεύγη εκκινητών που αναφέρονται, χρησιμοποιήθηκαν για την πολλαπλή αντιγραφή διαφόρων τμημάτων του cDNA της HSA προκειμένου να κλωνοποιηθούν στον φορέα pPICZaA.

1 de 18

£

#### 2.2 ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ DNA

# 2.2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το στέλεχος GS115/Albumin του *P. pastoris*

Γονιδιωματικό DNA απομονώθηκε από το στέλεχος GS115/Albumin (Invitrogen), που φέρει το πλήρες cDNA της HSA ενσωματωμένο στο γονιδίωμα του, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα στην αντίδραση PCR. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε όπως αναλύεται παρακάτω.

Το στέλεχος GS115/Albumin αναπτύχθηκε στους 30  $^{0}$ C έως οπτικής πυκνότητας OD<sub>600</sub>=10. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση (1500g, 10min, θερμοκρασία δωματίου), και εκπλύθηκαν με 10 mL ddH<sub>2</sub>O.

Δημιουργία σφαιροπλαστών και λύση των κυττάρων: Πραγματοποιήθηκε επαναιώρηση των κυττάρων σε 2 mL διαλύματος SCED (1M σορβιτόλη, 10 mM κιτρικό νάτριο pH=7.5, 10 mM EDTA, 10 mM DTT) και προσθήκη 0.3mg λυτικάσης. Ύστερα από 50 min επώαση στους 37  $^{0}$ C προέκυψαν σφαιροπλάστες σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80%. Στο σημείο αυτό, και αφού προστέθηκαν 2 mL 1% w/v SDS, έγινε ελαφρά ανάδευση, και τα κύτταρα αφέθηκαν στον πάγο για 5 min. Ακολούθησε προσθήκη 1.5 mL 5M οξικού καλίου, pH= 8.9 και ελαφρά ανάδευση. Μετά από φυγοκέντρηση σε 10000g για 10 min το υπερκείμενο συλλέχθηκε για το επόμενο στάδιο της καταβύθισης του DNA.

<u>Καταβύθιση του DNA:</u> Το υπερκείμενο του προηγούμενου σταδίου επωάστηκε με 2 όγκους αιθανόλης (15 min, θερμοκρασία δωματίου) και φυγοκεντρήθηκε για 20 min στους 4 °C. Το ίζημα που προέκυψε επαναιωρήθηκε σε 0.7 mL TE, pH 7.4. Το DNA απομονώθηκε από το εναιώρημα χρησιμοποιώντας μίγμα φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1 v/v). Η υδατική φάση συλλέχθηκε, μοιράστηκε σε δύο μέρη όπου και προστέθηκαν μισός όγκος 7.5 M οξικού αμμωνίου, pH=7.5 και δύο όγκοι αιθανόλης. Τα δείγματα αφέθηκαν στους -20 °C για 1 ώρα, φυγοκεντρήθηκαν (10000g, 4 °C, 10 min) και το ίζημα εκπλύθηκε με 1 mL 70% αιθανόλης. Μετά από την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης, το DNA επαναιωρήθηκε σε ddH<sub>2</sub>O (double-distilled) και αποθηκεύθηκε στους -20 °C μέχρι τη χρήση του.

## 2.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction-PCR)

Στην παρούσα εργασία η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε για την πολλαπλή αντιγραφή τμημάτων cDNA της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (HSA) καθώς και για την επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων του ζυμομύκητα Pichia pastoris (Ενότητα 2.3.2). Η υψηλής πιστότητας πολυμεράση Pfu (Stratagene, La Jolla, CA) χρησιμοποιήθηκε για την πολλαπλή αντιγραφή του τμήματος που κωδικοποιεί τον τομέα IIIB της HSA. Για την πολλαπλή αντιγραφή των τμημάτων που κωδικοποιούν άλλους τομείς της HSA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα υψηλής πιστότητας Expand High Fidelity PCR System (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Germany) που είναι μίγμα Pfu και Taq πολυμεράσης. Για την επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων με απευθείας ανάλυση PCR (Ενότητα 2.3.2) χρησιμοποιήθηκε Taq πολυμεράση (Promega, Madison, WI, USA).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αναφέρονται στον Πίνακα 2.3. Προκειμένου να κλωνοποιηθούν τα PCR προϊόντα στον φορέα pPICZaA, σχεδιάστηκαν για την αντίδραση PCR, εκκινητές που φέρουν στο 5' άκρο τους την θέση αναγνώρισης *EcoR*I ή *Not*I. Οι εκκινητές που αναφέρονται ως (NotI)-6His-antisense, χρησιμοποιήθηκαν για την επιπρόσθετη εισαγωγή ενός καρβοξυτελικού άκρου (2.5 kDa), που φέρει τον επίτοπο c-myc και 6 κατάλοιπα ιστιδινών (**Εικόνα 2.1**).

Η αντίδραση PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 100μl με 20 mM Tris-Cl, pH=8.0, 10 mM KCl, 6mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 % Triton X-100, 0.15 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng ή 250 ng υπόστρωμα DNA (πλασμιδιακό ή γονιδιωματικό αντίστοιχα), 0.5 μM από τον κάθε εκκινητή, 0.25 mM dNTPs και 3 Units πολυμεράση.

Πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι αντίδρασης μετά από πεντάλεπτη επώαση του μίγματος της αντίδρασης στους 94  $^{0}$ C. Η αποδιάταξη του DNA έγινε για 1 ή 2 min (πλασμιδιακό ή γονιδιωματικό αντίστοιχα), η πρόσδεση των εκκινητών σε θερμοκρασίες που κυμάνθηκαν από 50 έως 56  $^{0}$ C (ανάλογα με τις θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινητών), και η επιμήκυνση στους 72  $^{0}$ C για 1 min.



Ονομα εκκινητή	Αλληλουχία DNA
DIII-(EcoRI)-sense	S'-TTT <u>GAATTC</u> GAGCCTCAGAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTT-3'
DIIIII-(EcoRI)-sense	S'-TTT <u>GAATTC</u> GCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAG-3'
DIII-(NorI)-6His-antisense	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> TAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGCAGCAACAAGTTT-3'
DIII-(Noil)-entisense	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> TTATAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGCAGCAACAAGTTT-3'
DI-(EcoRI)-sense	5'-TTT <u>GAATTC</u> GACGCACACAAGAGCGAGG-3'
DI-(NotI)-6His-antisense	S:-AAAAGCGGCCGCTCTTTGTTTGGCAGA-3'
DI-(Noti)-antisense	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> TTATCTCTGTTTGGCAGA-3'
DII-(EcoRI)-sense	5'-TTT <u>GAATTC</u> GGGAAGGCCTCGTCTGCCAAAC-5'
DII-(Notl)-6His-antisense	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> CTGAGGTTCTTCTACAAGAG-3'
DII-(NotI)-antisense	5'AAAAGCGGCCGCTTACTGAGGTTCTTCCACAAGAG3
DIB-(EcoRI)-sense	5'- TTT <u>GAATTC</u> GACAACCCAAACCTCCCCCGA-3'
DIIB-(EcoRI)-sense	5'- TTT <u>GAATTC</u> GAGATGCCTGCTGACTTGCCT-3'
DIIIB-(495-572)-(EcoRI)-sense	5'-TTT <u>GAATTC</u> GAGACGTACGTCCCCAAAGAG-3'
DППВ-(495-572)-( <i>Notl</i> )-anti	15- AAAAGCGGCCGCTTAACCTTCTTCAGCAAAGCA3
DIIIB(495-572)-(Notl) 6His anti	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> ACCTTCTTCAGCAAAGCA-3'
DIIIB-(509-585)-(EcoRI)-sense	5'-TTT <u>GAATTC</u> TTCCACGCGGACATCTGCACAC-3'
DIIIB-(509-585)-(Not1)-anti	5'-AAAA <u>GCGGCCGC</u> TTATAAGCCTAAGGCAGCTTG -3'
DIIIB(509-585)-(Noti)- 6Hisanți	5'-AAAAGCGGCCGCTAAACCTAAAGCÁGCTTG-31
DIIIBMAX-(EcoRI)-sense	5'-TTT <u>GAATTC</u> CACGAGAAGACGCCGGTAAGTGAC-3'
HSA-IIIB-sense	5'- AGAATCGAGGGAAGGGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACG-3'
HSA-IIIA-antisense	5'- TATCCTGCCTTCGATAGCTGAAAAGCATGGTCGCCTGTT-3'

Πίνακας 2.3: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR για την επέκταση τμημάτων του cDNA της HSA. Υπογραμμίζονται οι περιοριστικές θέσεις EcoRI και NotI που έχουν δημιουργηθεί, ενώ επισημαίνονται και τα κωδικόνια λήξης (TTA) όπου έχουν εισαχθεί.

Τα προϊόντα PCR αναλύθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Οι πηκτές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0.8-1.0 % (w/v) αγαρόζης σε διάλυμα TAE (0.04 M Tris acetate, 0.001 M EDTA). Μετά το βρασμό της πηκτής, προστέθηκε σε αυτή διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 10 μg/mL. Τα δείγματα DNA αναμείχθηκαν σε αναλογία 1:5 με 6χδιάλυμα φόρτωσης (30 % γλυκερόλη και 0.25 % κυανού της βρωμοφαινόλης) και ηλεκτροφορήθηκαν σε διάλυμα TAE παράλληλα με δείκτες DNA γνωστών μοριακών βαρών. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου υπό σταθερή τάση (80V) και η παρατήρηση της ηλεκτροφορητικής εικόνας έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας. Τα προϊόντα PCR ανακτήθηκαν από την πηκτή με το πακέτο υλικών QIAquick Gel extraction της Qiagen.

# 2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) δύο σταδίων (overlap/extension)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης δύο σταδίων στηρίζεται στη χρήση εκκινητών για τη δημιουργία τμημάτων DNA με επικαλυπτόμενα άκρα (1<sup>0</sup> στάδιο) τα οποία σε ένα επόμενο στάδιο PCR υβριδίζουν λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων και με τη χρήση εξωτερικών εκκινητών επεκτείνονται (Ho et al., 1989; Shevchuk et al., 2004).

Στην παρούσα εργασία η αντίδραση PCR δύο σταδίων χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA που κωδικοποιεί για τον τομέα ΙΙΙ της HSA, ώστε να φέρει μεταξύ των υποτομέων ΙΙΙΑ και ΙΙΙΒ τρεις φορές τη θέση αναγνώρισης του παράγοντα Xa (Factor Xa).

Η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την αντίδραση PCR περιγράφεται στην Εικόνα 2.2. Το τμήμα DNA που κωδικοποιεί για την τριπλή θέση αναγνώρισης του παράγοντα Xa δημιουργήθηκε με τη χρήση των δύο μονόκλωνων, συνθετικών, συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων που αναφέρονται παρακάτω:

#### Xa sense

5'CAGGCGACCATGCTTTTCAGCTATCGAAGGCAGGATAGAAGGCAGAATCGAGGGAAGG GCTCTGGAAGTCGATGAAACATAC3'

#### <u>Xantisense</u>

5'GTATGTTTCATCGACTTCCAGAGCCCTTCCCTCGATTCTGCCTTCTATCCTGCCTTCGATA GCTGAAAAGCATGGTCGCCTG3' Συγκεκριμένα, τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια αναμείχθηκαν σε μοριακή αναλογία 1:1, επωάστηκαν για 2 min στους 94  $^{0}$ C και αφέθηκαν να επανέλθουν αργά σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να υβριδίσουν.



Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης δύο σταδίων όπως εφαρμόστηκε για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA που κωδικοποιεί για τον τομέα ΙΙΙ της HSA ώστε να φέρει μεταξύ των υποτομέων ΙΙΙΑ και ΙΙΙΒ τρεις φορές τη θέση αναγνώρισης του παράγοντα Xa (Factor Xa)



#### 2.2.4 Κατασκευή ανασυνδυασμένου DNA

Ο πλασμιδιακός φορέας (pPICZaA) και το προς ένθεση DNA επωάζονται μέχρι πλήρους πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα *EcoR*I και *Not*I. Συγκεκριμένα η αντίδραση περιορισμού πραγματοποιείται σε διάλυμα, 100 mM Tris-Cl, pH=7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.025 % v/v Triton X-10, 0.1 mg/mL BSA σε τελικό όγκο 20 μl. Τα προϊόντα της πέψης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% και ανακτώνται από την πηκτή με το πακέτο υλικών QIAquick Gel extraction της Qiagen.

Η αντίδραση σύνδεσης τμημάτων DNA στον πλασμιδιακό φορέα πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 4  $^{0}$ C για 16 h σε τελικό όγκο 20 μl σε διάλυμα 50 mM Tris-Cl, pH=7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 5% w/v πολυαιθυλενογλυκόλη-8000 με προσθήκη 2U DNA λιγάσης (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), και ποσοτήτων ενθέματος (insert) και φορέα (vector) σε μοριακή αναλογία 3:1 (insert : vector).

## 2.2.5 Μετασχηματισμός της E.coli με πλασμιδιακό DNA

#### Δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων: (Σύμφωνα με Inoue et al., 1990)

Πλήρης καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων *Escherichia coli* TOP10F' (10 mL) (ανάπτυξη σε θρεπτικό υλικό Luria Broth), αραιώνεται 1/25 (τελικός όγκος 250 mL) σε θρεπτικό μέσο SOB (0.5 % εκχύλισμα ζύμης, 2% w/v βακτοτρυπτόνη, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>).

Ακολουθεί ανάπτυξη στους 37  $^{0}$ C έως ότου η οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>) να φτάσει 0.6. Αφού τα κύτταρα αφεθούν για 10 min στον πάγο, συλλέγονται με φυγοκέντρηση (4000 rpm, 10 min, 4  $^{0}$ C) και επαναιωρούνται σε 80 mL παγωμένου διαλύματος TB (10 mM Pipes, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl). Αφήνονται εκ νέου στον πάγο για 10 min, φυγοκεντρούνται όπως ανωτέρω, και τελικά επαναιωρούνται σε 20 mL διαλύματος TB που περιέχει 7% v/v DMSO. Τα κύτταρα μπορούν να αποθηκεύονται στους -80  $^{0}$ C για τουλάχιστον 30 ημέρες.

#### Μετασχηματισμός:

Τα επιδεκτικά κύτταρα αφήνονται αρχικά να ξεπαγώσουν αργά μέσα σε πάγο. Στη συνέχεια το πλασμιδιακό DNA (όγκος 20μl) προστίθεται σε αυτά και ακολουθεί

BIBAN

επώαση για 5 min στον πάγο. Τέλος τα κύτταρα επιστρώνονται σε θρεπτικό μέσο επιλογής με αντιβιοτικό ζεοκίνη (τελική συγκέντρωση 25 μg/mL θρεπτικού υλικού).

2.2.6 Απομόνωση DNA σε μικρή και μεγάλη κλίμακα και προσδιορισμός αλληλουχίας

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA μικρής κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το πακέτο υλικών QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), ενώ για την απομόνωση του πλασμίδιακού DNA μεγάλης κλίμακας χρησιμοποιήθηκε το Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Η αλληλουχία DNA των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων επιβεβαιώθηκε, σε κάθε περίπτωση, από την θέση περιορισμού *EcoR*I έως και την *Not*I τουλάχιστον. Η ανάλυση έγινε σε αυτόματο αναλυτή DNA sequencer (MWG-Biotech, Ebersberg, Germany).

2.3 ΕΤΕΡΟΛΟΓΗ ΕΚΦΡΑΣΗ-ΕΚΚΡΙΣΗ ΣΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΤΟΥ Pichia. pastoris

Ο P. pastoris είναι ένας μεθυλοτροφικός ζυμομύκητας, ικανός να μεταβολίζει μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα. Το πρώτο στάδιο στο μεταβολισμό της μεθανόλης είναι η οξείδωση της σε φορμαλδεύδη από το ένζυμο αλκοολική οξειδάση, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο. Δύο γονίδια του P. pastoris κωδικοποιούν αλκοολική οξειδάση, τα AOX1 και AOX2, όμως η ενεργότητα αλκοολικής οξειδάσης οφείλεται κατά βάση στο προϊόν του AOX1. Ο υποκινητής (AOX1) που ρυθμίζει την έκφραση του ενζύμου είναι αυτός που χρησιμοποιείται για την ετερόλογη έκφραση πρωτεϊνών στον P. pastoris. Απώλεια του γονιδίου AOX1 οδηγεί σε στελέχη που μεταβολίζουν τη μεθανόλη σε περιορισμένο βαθμό (στελέχη Mut<sup>S</sup>: Methanol utilization slow). Αντίθετα τα στελέχη που διαθέτουν το γονίδιο AOX1 μπορούν να μεταβολίζουν μεθανόλη ως μόνη πηγή άνθρακα και ονομάζονται Mut<sup>+</sup> (Methanol utilization plus).

Όταν το στέλεχος GS115 (Mut<sup>\*</sup>), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, μετασχηματίζεται με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια πραγματοποιείται ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ της περιοχής 5' AOX1 του πλασμιδίου και της θέσεως 5' AOX1 του γονιδιωματικού DNA του μύκητα (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Εισαγωγή ευθυγραμμισμένων πλασμιδίων pPICZaA στη γενετική θέση AOX1 του γονιδιώματος του *P. pastoris* με ομόλογο ανασυνδυασμό.

BIBAR

# 2.3.1 Χημικός μετασχηματισμός του P. pastoris

Απαιτούμενα υλικά

# YPD (yeast-peptone-dextrose)

Εκχύλισμα ζύμης	1 % w/v
Πεπτόνη	2 % w/v
D(+)-γλυκόζη	2 % w/v

# Τρυβλία επιλογής YPDS -ζεοκίνη

Εκχύλισμα ζύμης	1 % w/v
Πεπτόνη	2 % w/v
D(+)-γλυκόζη	2 % w/v
Σορβιτόλη	1 M
Άγαρ	2 % w/v
Ζεοκίνη	100 μg/mL

Τα διαλύματα Ι, ΙΙ και ΙΙΙ που απαιτούνται για το μετασχηματισμό περιέχονται στο πακέτο υλικών EasyComp (Invitrogeń).

# Προετοιμασία επιδεκτικών κυττάρων

Για τη δημιουργία επιδεκτικών κυττάρων πραγματοποιείται καλλιέργεια (10 mL) του στελέχους GS115 του ζυμομύκητα *P. pastoris* σε θρεπτικό υλικό YPD στους 28-30  $^{0}$ C σε περιστροφικό αναδευτήρα (250-300 rpm). Ύστερα από 16 περίπου h η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι OD<sub>600</sub> = 0.1-0.2 σε 10 mL YPD και αφήνεται να φτάσει σε OD<sub>600</sub> = 0.6-1. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση για 5 min (500 x g) σε θερμοκρασία δωματίου και επαναιωρούνται σε 10 mL διαλύματος Ι. Ακολουθεί εκ νέου φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και επαναιώρηση σε 1 mL διαλύματος Ι. Τα επιδεκτικά πλέον κύτταρα φυλάσσονται στους -80  $^{0}$ C έως τη χρήση τους.



#### Μετασχηματισμός

Για τον αποτελεσματικότερο μετασχηματισμό του *P. pastoris*, το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο (5μg) ευθυγραμμίζεται με τη χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *Pmel* για την οποία υπάρχει μοναδική θέση αναγνώρισης εντός της περιοχής 5' *AOX1* (Εικόνα 2.1). Το ευθυγραμμισμένο DNA ηλεκτροφορείται σε πηκτή αγαρόζης όπου αφενός ελέγχεται η ευθυγράμμιση του, αφετέρου καθαρίζεται από την πηκτή με το πακέτο υλικών QIAquick Gel extraction της Qiagen. Για κάθε μετασχηματισμό, 3μg DNA (σε τελικό όγκο έως 5μl) προστίθενται σε 50 μl επιδεκτικών κυττάρων μαζί με 1 mL διαλύματος ΙΙ. Ακολουθεί έντονη ανάδευση (vortex) και επώαση των κυττάρων σε υδατόλουτρο 30 <sup>0</sup>C. Η επώαση διαρκεί συνολικά 1 ώρα ενώ κάθε 15 min επαναλαμβάνεται έντονη ανάδευση προς βελτίωση της απόδοσης του μετασχηματισμού.

Στη συνέχεια τα κύτταρα υποβάλλονται σε θερμικό σοκ, στους 42  $^{0}$ C για 10 min και έπειτα επωάζονται σε YPD σε υδατόλουτρο 30  $^{0}$ C για τουλάχιστον 2 h. Μετά την ανάρρωση, φυγοκεντρούνται για 5 min σε μικροφυγόκεντρο (3000 rpm) και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 1 mL διαλύματος III. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες και τελική επαναιώρηση των κυττάρων σε 150μl διαλύματος III. Τα κύτταρα επωάζονται σε θρεπτικό μέσο επιλογής YPDS με αντιβιοτικό ζεοκίνη και αφήνονται προς ανάπτυξη αποικιών σε επωαστικό κλίβανο 30  $^{0}$ C, 2-4 ημέρες.

#### 2.3.2 Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων με απευθείας ανάλυση PCR

Προκειμένου να ελεγχθούν κλώνοι του *Pichia pastoris* ως προς την ενσωμάτωση του ανασυνδυασμένου DNA, ακολουθήθηκε η μέθοδος της απευθείας ανάλυσης PCR (Linder et al., 1996) που περιλαμβάνει την δημιουργία κυτταρικού εκχυλίσματος και τη χρήση του ως υποστρώματος για την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

Συγκεκριμένα, για τη δημιουργία εκχυλίσματος, μία μονή αποικία εναιωρείται σε 10 μL αποστειρωμένου ddH<sub>2</sub>O και προστίθενται 15 μL του ενζύμου λυτικάση (25 U). Ακολουθεί επώαση με το ένζυμο για 10 min σε υδατόλουτρο (30  $^{0}$ C) και άμεση μεταφορά στους -80  $^{0}$ C για 10 min ακόμα.

Στη συνέχεια, 10 μL από το κυτταρικό εκχύλισμα χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα στην αντίδραση PCR (βλ. Ενότητα 2.2.2) χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα «εσωτερικά» ζεύγη εκκινητών (βλ. Πίνακα 2.2) ή το ζεύγος των «εξωτερικών» εκκινητών 5' AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') και 3' AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3').

# 2.3.3 Καθορισμός φαινοτύπου σχετικά με το μεταβολισμό της μεθανόλης

Απαιτούμενα θρεπτικά υλικά

YNB	1.34% w/v
Βιοτίνη	4x10 <sup>-5</sup> % w/v
D(+) γλυκόζη	2 % w/v
Ιστιδίνη	0.004 % w/v
Άγαρ	1.5 % w/v

## Τρυβλία MDH (Minimal Dextrose Medium and Histidine)

# Τρυβλία MMH (Minimal Methanol and Histidine)

YNB	1.34 % w/v
Βιοτίνη	- 4x10 <sup>-5</sup> % w/v
Μεθανόλη	0.5 % v/v
Ιστιδίνη	0.004 % w/v
Άγαρ	1.5 % w/v

Το στέλεχος GS115 που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι Mut<sup>+</sup> και όταν μετασχηματίζεται με τα ευθυγραμμισμένα πλασμίδια αναμένεται να προκύψουν νέα στελέχη Mut<sup>+</sup>. Παρόλα αυτά η παρουσία αλληλουχίας *AOX1* στο πλασμίδιο pPICZaA (Εικόνα 2.1) μπορεί να οδηγήσει σε ανασυνδυασμό στην περιοχή 3' *AOX1*. Στην περίπτωση αυτή το γονίδιο *AOX1* μπορεί διακοπεί και να προκύψουν στελέχη Mut<sup>S</sup>. Για το λόγο αυτό τα στελέχη Mut<sup>+</sup> διακρίνονται από τα Mut<sup>S</sup> με την ακόλουθη διαδικασία:

Μονές αποικίες μεταφέρονται από το τρυβλίο επιλογής YPDS-ζεοκίνη σε τρυβλία MMH και MDH με αριθμημένες θέσεις τα οποία επωάζονται για 48 h, στους 30  $^{0}$ C. Τα στελέχη Mut<sup>+</sup> αναπτύσσονται κανονικά και στα δύο τρυβλία. Τα στελέχη Mut<sup>S</sup>, παρουσία D(+)-γλυκόζης (τρυβλία MDH) αναπτύσσονται κανονικά, ενώ

παρουσία μεθανόλης (τρυβλία ΜΜΗ) παρουσιάζουν περιορισμένη ή καθόλου ανάπτυξη.

## 2.3.4 Έκφραση-έκκριση ανασυνδυασμένων πεπτιδίων στον P. pastoris

#### Απαιτούμενα θρεπτικά υλικά

#### **BMGY (Buffered Minimal Glycerol)**

Εκχύλισμα ζύμης	1 % w/v
Πεπτόνη	2 % w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH=6.0	100 mM
YNB	1.34% w/v
Βιοτίνη	4x10 <sup>-5</sup> % w/v
Γλυκερόλη	1 % v/v

#### **BMMY (Buffered Minimal Methanol)**

Εκχύλισμα ζύμης	1 % w/v
Πεπτόνη	2 % w/v
Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου pH=6.0	100 mM
YNB	1.34 % w/v
Βιοτίνη	4x10 <sup>-5</sup> % w/v
Μεθανόλη	0.5 % v/v

Για την ανάπτυξη και την επαγωγή της έκφρασης σε ανασυνδυασμένα στελέχη GS115, χρησιμοποιήθηκαν πλήρη θρεπτικά υλικά που περιείχαν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Συγκεκριμένα τα ανασυνδυασμένα στελέχη αναπτύσσονται (30  $^{0}$ C, ανάδευση υπό 250 rpm) αρχικά σε 5 mL BMGY, που περιέχει γλυκερόλη, για την αύξηση της βιομάζας έως OD<sub>600</sub>=2-6 οπότε και βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης (20-24 h). Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (3000 rpm, 5 min, θερμοκρασία δωματίου) και επαναιωρούνται σε θρεπτικό υλικό BMMY που περιέχει μεθανόλη, μέχρι τελικής OD<sub>600</sub> 1. Η καλλιέργεια (μέγιστος όγκος 30 mL) πραγματοποιείται σε κωνικές φιάλες των 100 mL (30  $^{0}$ C, 250 rpm) για 2 ή 3
ημέρες. Προκειμένου να διατηρούνται οι συνθήκες επαγωγής, κάθε 24 h προστίθεται 100 % μεθανόλη μέχρι τελικής συγκέντρωσης 0.5 % v/v.

Τέλος τα υπερκείμενα συλλέγονται με φυγοκέντρηση (3000 rpm για 10 min), φιλτράρονται με φίλτρα 0.2μm, παγώνουν σε υγρό άζωτο και φυλάσσονται στους -80 $^{0}$ C μέχρι τη χρήση τους.

# 2.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ Grsaf και ανασταλτινής

#### 2.4.1 Δήμιουργία πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων υπόφυσης επιμύων

#### Θρεπτικά υλικά και ρυθμιστικά διαλύματα

SFDM : DMEM nutrient mixture F-12 Ham (Sigma) στο οποίο έχει προστεθεί 10  $\mu g/mL$  ινσουλίνη, 5  $\mu g/mL$  τρανσφερίνη, 100 U/mL πενικιλίνη, 100 mg/mL στρεπτομυκίνη, 10% v/v εμβρυικός ορός μόσχου, και 2.5 mM L-γλουταμίνη,.

SFDM <sup>minus</sup> : Πρόκειται για θρεπτικό υλικό SFDM στο οποίο όμως δεν έχει προστεθεί εμβρυικός ορός μόσχου.

**DPBS**  $\overline{}$ : Dulbecco's Phosphate Buffered Saline anousia is torov Ca<sup>2+</sup> kai Mg<sup>2+</sup> (Sigma)

**DPBS** <sup>--</sup> : Πρόκειται για το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών DPBS <sup>-</sup> στο οποίο έχει προστεθεί 1g/L BSA και EDTA (0.02 mM).

**DPBS**<sup>+</sup> : Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  (Sigma) καθώς επίσης 1.36 g/L γλυκόζη, 200 U/mL πενικιλίνη, 200 mg/mL στρεπτομυκίνη.

**DPBS**<sup>+,+</sup>: Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  καθώς επίσης 1.36 g/L γλυκόζη και 1g/L BSA.

Για τη δημιουργία πρωτογενών καλλιεργειών κυττάρων υπόφυσης χρησιμοποιήθηκαν ενήλικοι θηλυκοί επίμυες Wistar, περίπου δύο μηνών, οι οποίοι θανατώθηκαν με αποκεφαλισμό. Ύστερα από κάθετη τομή του κρανίου, απομακρύνεται ο εγκέφαλος και η υπόφυση απελευθερώνεται από το τουρκικό εφιππείο (sella turcica) με τη βοήθεια νυστεριού. Οι υποφύσεις συλλέγονται σε διάλυμα DPBS<sup>+</sup> που βρίσκεται σε πάγο και η διαδικασία μεταφέρεται σε εστία κάθετης νηματικής ροής. Αρχικά, οι υποφύσεις εκπλένονται 5 φορές με διάλυμα DPBS<sup>+</sup> και ακολούθως 5 φορές με διάλυμα DPBS<sup>++</sup>. Με τη βοήθεια νυστεριού και λαβίδας, αφαιρείται η νευροϋπόφυση και η αδενοϋπόφυση τεμαχίζεται και εκπλένεται πέντε φορές με διάλυμα DPBS<sup>++</sup>. Ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση για 10 min με 15 διαλύματος θρυψίνης (4.1mg/mL θρυψίνη σε DPBS<sup>++</sup>), αφαίρεση του υπερκειμένου και νέα πέψη του ιστού για 10 min με 15 διαλύματος παγκρεατίνης (2.5mg/mL παγκρεατίνη σε DPBS<sup>++</sup>). Ο τεμαχισμένος ιστός εκπλένεται με 20 mL SFDM για την απενεργοποίηση των πρωτεασών, και επωάζεται στο ίδιο θρεπτικό υλικό, υπό ανάδευση για 15 min. Ακολουθούν πέντε πλύσεις με SFDM, πέντε με διάλυμα φωσφορικών DPBS<sup>--</sup> και μία με 20 mL διαλύματος DPBS<sup>--</sup>. Στη φάση αυτή αρχίζει η διαδικασία μηχανικής

διασποράς των κυττάρων στο διάλυμα DPBS<sup>-</sup> με τη χρήση πιππετών pasteur διαβαθμισμένης διαμέτρου, επιστρωμένων με σιλικόνη. Η διασπορά πραγματοποιείται κάθε φορά σε 5 mL DPBS<sup>-</sup> το οποίο απομακρύνεται σε άλλο σωληνάριο όταν θολώνει. Η διαδικασία συνεχίζεται έως ότου να μην παρατηρείται περαιτέρω διάσπαση του ιστού. Τα κύτταρα που έχουν συλλεχθεί φυγοκεντρούνται για 10 min (22 <sup>0</sup>C, 2500 rpm). Στη συνέχεια επαναιωρούνται σε 5 mL διαλύματος DPBS<sup>-</sup> με τη χρήση πιππέτας Gilson για να εξασφαλιστεί η πλήρης διασπορά. Ακολουθεί νέα φυγοκέντρηση (10 min, 22 <sup>0</sup>C, 1200 rpm) και επαναιώρηση σε 5 mL θρεπτικού υλικού SFDM.

Τα ζωντανά κύτταρα μετρώνται 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 0.5ml SFDM ανά φρεάτιο σε επωαστικό κλίβανο 37  $^{0}$ C και 5% CO<sub>2</sub> για 48 h.

#### 2.4.2 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF

Μετά την επικόλληση των κυττάρων στα καλλιεργητικά φρεάτια πραγματοποιούνται δύο εκπλύσεις με θρεπτικό υλικό χωρίς ορό (SFDM<sup>minus</sup>). Ακολουθεί επώαση με 0.5 mL SFDM<sup>minus</sup>, παρουσία των υπό εξέταση ουσιών, για 48 h. Η εκάστοτε υπό εξέταση ουσία δοκιμάζεται σε τρία τουλάχιστον καλλιεργητικά φρεάτια. Παράλληλα, στη φάση αυτή, σε έξι φρεάτια προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό SFDM<sup>minus</sup> προκειμένου τα αντίστοιχα κύτταρα να χρησιμοποιηθούν σαν μάρτυρες.

Στη συνέχεια τα κύτταρα πλένονται με SFDM<sup>minus</sup> και επωάζονται για 4 h στο ίδιο θρεπτικό υλικό που όμως περιέχει 0.1μM GnRH καθώς και τις υπό εξέταση ουσίες. Κατά τη διάρκεια αυτής της τελικής επώασης τρία εκ των έξι φρεατίων, που χρησιμόποιούνται σαν μάρτυρες, επωάζονται μόνο με GnRH (0.1μM GnRH σε SFDM<sup>minus</sup>) για τη μέτρηση της επαγόμενης LH και 3 επωάζονται με SFDM<sup>minus</sup> χωρίς προσθήκη άλλων ουσιών για τη μέτρηση των βασικών επιπέδων LH στη διάρκεια των τεσσάρων ωρών.

Μετά το πέρας των τεσσάρων ωρών τα υπερκείμενα συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20  $^{0}$ C έως τη μέτρηση των ορμονών με συναγωνιστική ELISA (Ενότητα 2.4.4).

#### 2.4.3 Βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας ανασταλτίνης

Πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων, προετοιμάζονται όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.4.1. Σε κάθε καλλιεργητικό φρεάτιο επιστρώνονται 200.000 κύτταρα και αφήνονται να προσκολληθούν για 48 h.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα εκπλένονται δύο φορές με θρεπτικό υλικό SFDM<sup>minus</sup> (500 μL/φρεάτιο για κάθε πλύση). Σε έξι φρεάτια προστίθεται 500 μL SFDM<sup>minus</sup> προκειμένου να μετρηθεί η βασική έκκριση της FSH και της LH. Οι προς εξέταση ουσίες, προστίθενται στο θρεπτικό μέσο των κυττάρων (500 μL SFDM<sup>minus</sup>) ενώ η καθεμία δοκιμάζεται σε 3 τουλάχιστον καλλιεργητικά φρεάτια. Τα τρυβλία τοποθετούνται για 48 h, σε επωαστικό κλίβανο (37 <sup>0</sup>C, 5 % CO<sub>2</sub>).

Μετά το πέρας των 48 h τα υπερκείμενα των κυττάρων συλλέγονται και φυλάσσονται στους -20  $^{0}$ C έως τη μέτρηση των γοναδοτροπινών με συναγωνιστική ELISA (Ενότητα 2.4.4).

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαία αναλογία επί του επιπέδου βασικής έκκρισης FSH ή LH από τα κύτταρα της υπόφυσης. Η δραστικότητα ανασταλτίνης εκφράζεται ως μείωση της βασικής έκκρισης της FSH ύστερα από την επίδραση των προς εξέταση ουσιών.



2.4.4 Συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού

συνδεδεμένου με ένζυμο (ELISA)

## Απαιτούμενα διαλύματα

## Ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, pH 9.8 (Διάλυμα επίστρωσης)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	14.1 mM
NaHCO <sub>3</sub>	34.9 mM

## Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS), pH 7.4

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1 <b>8</b> .5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	80 mM
NaCl	1.5 M

## PBST

PBS, pH=7.4, 0.05 % Tween-20

## **PBST-BSA**

PBS, pH=7.4, 0.05 % Tween-20, 0.5.% BSA

# Υπόστρωμα υπεροξειδάσης (pH 5)

Κιτρικό οξύ	0.025 M
NaHPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.05 M
ο-φαινυλενεδιαμίνη	0.04 % w/v
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.01 % v/v

\* Το παραπάνω διάλυμα παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση του σε σκοτεινό χώρο.

Για την μέτρηση των γοναδοτροπινών (LH και FSH), από υπερκείμενα πρωτογενούς καλλιέργειας κυττάρων υπόφυσης επιμύων, χρησιμοποιήθηκε η συναγωνιστική μέθοδος ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού συνδεδεμένου με ένζυμο όπως περιγράφεται στη βιβλιογραφία (Pappa et al., 1999a) με ορισμένες τροποποιήσεις. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει, αναλυτικά, ως εξής:

Αντιγόνο LH (rLH-I-10) ή αντιγόνο FSH (rFSH-I-9), 50 ng/mL σε διάλυμα ανθρακικών pH 9.8, επιστρώνεται σε πλακίδια πολυστυρενίου (200 $\mu$ L ανά μικροφρεάτιο, 16 h, 4 <sup>0</sup>C). Ακολουθεί έκπλυση των μικροφρεατίων τρεις φορές με PBST. Oi kevéç béseiç desmeúontai me 1% BSA se PBS (200 mL avá mikropréatio), 2 h, 37  $^{\rm 0}{\rm C}.$ 

Κατά την διάρκεια της επώασης για δέσμευση των κενών θέσεων (blocking), προετοϊμάζονται τα συναγωνιστικά μίγματα μεταξύ του αντισώματος έναντι της γοναδοτροπίνης και δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης γοναδοτροπίνης ή αγνώστων δειγμάτων προς μέτρηση. Συγκεκριμένα για τη μέτρηση της LH, γνωστά διαλύματα LH (sLH-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 αντιγόνουαντισώματος επωάζονται για 1 h, 37 <sup>0</sup>C.

Μετά τη δίωρη επώαση για δέσμευση των κενών θέσεων, τα πλακίδια πολυστυρενίου εκπλένονται τρεις φορές με PBST, και προστίθενται σε αυτά 100 μL μίγματος συναγωνισμού (για κάθε δείγμα αντιστοιχούν 2 θέσεις στο πλακίδιο). Ακολουθεί επώαση για 16 h στους 4  $^{0}$ C και εκ νέου έκπλυση των θέσεων με PBST. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επώαση με διάλυμα αντισώματος anti-rabbit IgG-HRP (αραίωση 1: 5000 σε PBST) για 2 h στους 37  $^{0}$ C και τρεις φορές έκπλυση με PBST.

Στο τελευταίο στάδιο, τοποθετείται στα μικροφρεάτια το υπόστρωμα της υπεροξειδάσης (100 μL/φρεάτιο) και πραγματοποιείται επώαση σε σκοτεινό χώρο έως την πλήρη ανάπτυξη του χρώματος. Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη 50 μL διαλύματος 0.5 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Η απορρόφηση μετριέται σε μήκος κύματος 492nm σε μετρητή ELISA Stat Fax-2100 (Awareness Technology, Palm City, Florida) 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 στο τελικό στάδιο.



## 2.5 ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

2.5.1 Ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) Απαιτούμενα διαλύματα Διάλυμα διαχωρισμού 1.5 M Tris-0.4 % w/v SDS, pH=8.8 Διάλυμα επιστοίβαξης 0.5 M Tris-0.4 % w/v SDS, pH=6.8 30% ακρυλαμίδιο/ Bis ακρυλαμίδιο 37.5: 1 (Biorad) Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0.025 M Tris, pH=8.3 0. 192 Μ γλυκίνη 0.1 % w/v SDS Διάλυμα υπερθειικού αμμωνίου (APS) 10 % w/v APS Διάλυμα φόρτωσης 4x 250 mM Tris, pH=6.8 9.2 % w/v SDS 0.2 % w/v  $\mu\pi\lambda\epsilon$  the brownorainolne 40 % v/v γλυκερόλη

100 mM DTT

Για την ηλεκτροφόρηση πηκτής SDS-ακρυλαμιδίου ακολουθήθηκε η διαδικασία όπως περιγράφεται από τον Laemli (1970). Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτές διαχωρισμού 15% ή 18%.

	15%	18%
30 % ακρυλαμίδιο	50 mL	60 mL
1.5 M Tris-0.4 % w/v SDS, pH=8.8	25 mL	25 mL
dH <sub>2</sub> O	24 mL	14 mL
10 % SDS	1 mL	1 mL
10 % APS	1 mL	1 mL
TEMED	0.05 mL	0.05 mL

#### Πηκτή Διαχωρισμού (100 mL)

#### Πηκτή επιστοίβαξης (30 mL)

30 % ακρυλαμίδιο	4.5 mL
0.5 M Tris-0.4 % w/v SDS, pH=6.8	7.5 mL
dH <sub>2</sub> O	17.4 mL
10 % SDS	0.3 mL
10 % APS	0.3 mL
TEMED	0.03 mL

Πριν την ηλεκτροφόρηση προστίθεται στα δείγματα διάλυμα φόρτωσης και ακολουθεί βρασμός (5 min) για την πλήρη αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PROTEAN II xi Cell (BioRad, Hercules, California).

## 2.5.2 Χρώση πηκτής πολυακρυλαμιδίου με νιτρικό άργυρο

Η κύρια μέθοδος χρώσης πηκτών πολυακρυλαμιδίου που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν αυτή του νιτρικού αργύρου λόγω της μεγάλης ευαισθησίας ανίχνευσης πρωτεϊνών (επίπεδα νανογραμμαρίων). Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η ακόλουθη:

Οι πρωτεΐνες μονιμοποιούνται στην πηκτή με επώαση σε διάλυμα 50% μεθανόλης, 10% οξικού οξέος, για 1 h υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, η πηκτή εκπλένεται με ddH<sub>2</sub>O για 1 h με συνεχείς αλλαγές υγρού. Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα 5 μg/mL DTT επί 30 min και στη συνέχεια, αφού απομακρυνθεί το DTT, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα 0.1% w/v AgNO<sub>3</sub> για 30 min. Το διάλυμα AgNO<sub>3</sub> απομακρύνεται, η πηκτή εκπλένεται δύο φορές με ddH<sub>2</sub>O και τελικά εμβαπτίζεται σε διάλυμα ανάπτυξης (3% w/v Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.0185% v/v φορμαλδεΰδη). Μόλις ολοκληρωθεί η εμφάνιση των πρωτεϊνικών ζωνών, η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος κιτρικού οξέος 2.3 M και η πηκτή φυλάσσεται σε ddH<sub>2</sub>O.



#### 2.5.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών

Μετά το πέρας του διαχωρισμού σε πηκτή SDS-ακρυλαμιδίου, οι πρωτεΐνες μεταφέρονται σε μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride) (BioTrace-PVDF; Pall Corporation, Ann Arbor, MI). Η μεταφορά πραγματοποιείται σε διάλυμα 25 mM Tris-Cl, pH=8.3, 192 mM γλυκίνη, 20 % v/v μεθανόλη, για 4 h στα 400mA. Στη συνέχεια η μεμβράνη επωάζεται για 16 h σε διάλυμα TBST-5% BSA για τη δέσμευση των κενών θέσεων.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της αλβουμίνης και ανασυνδυασμένων τομέων και υποτομέων αυτής ήταν:

A) Πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι ανθρώπινης αλβουμίνης ab1217 (Abcam Cambridge, UK) σε αραίωση 1: 15000 σε TBST-5% BSA. Μετά από δίωρη επώαση, το αντίσωμα απομακρύνεται και η μεμβράνη εκπλένεται 5 φορές με TBST. Ακολουθεί επώαση με το αντίσωμα anti-rabbit IgG συζευγμένο με HRP (horseradish peroxidase) (αραίωση 1: 5000 σε TBST-5% BSA) για 1 ώρα, εκπλύσεις με TBST και τελικά ανίχνευση των πρωτεϊνών με ενισχυμένη χημειοφωταύγεια (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

B) Για την περίπτωση των πεπτιδίων που έφεραν στο καρβοξυτελικό τους άκρο τον επίτοπο c-myc χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα 9Ε10 έναντι αυτού (αραίωση 1: 2000 σε TBST-5% BSA ). Ως δεύτερο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε το anti-mouse IgG συζευγμένο με HRP σε αραίωση 1: 5000 σε TBST-5% BSA. Οι επωάσεις με τα αντισώματα, οι εκπλύσεις με TBST όπως και η τελική ανίχνευση πραγματοποιήθηκαν όπως ανωτέρω.

2.5.4 Καθαρισμός ανασυνδυασμένων πεπτιδίων με στήλη νικελίου υπό μη αποδιατακτικές συνθήκες

Τα πολυπεπτίδια DIIImyc-6His και DIIIBmyc-6His απομονώθηκαν από υπερκείμενα καλλιέργειας των στελεχών GS115/DIIImyc-6His και GS115/DIIIBmyc-6His ύστερα από επαγωγή της έκφρασης τους με μεθανόλη. Τα έξι κατάλοιπα ιστιδινών στο καρβοξυτελικό άκρο των πολυπεπτιδίων επέτρεψαν τον καθαρισμό τους με τη χρήση κατιόντων Ni<sup>2+</sup>.

Προ του καθαρισμού των ανασυνδυασμένων πολυπεπτιδίων, τα υπερκείμενα καλλιέργειας υποβλήθηκαν δύο φορές σε διαπίδυση. Για το σκοπό αυτό το δείγμα

H ISLANNINI

τοποθετήθηκε σε μεμβράνη με μοριακό κατώφλι 3500 Da (Snakeskin, Pierce) και αφέθηκε υπό ανάδευση σε περιβάλλον 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH=7.5 με δύο αλλαγές.

<u>Στάδιο εξισορρόπησης των σφαιριδίων Ni<sup>2+</sup></u> : 2 mL σφαιριδίων Ni<sup>2+</sup> (Probond resin, Invitrogen) εκπλήθηκαν δύο φορές με 7 mL ddH<sub>2</sub>O και στη συνέχεια άλλες δύο φορές με 7 mL διαλύματος 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH=7.5.

<u>Στάδιο πρόσδεσης</u>: Τα σφαιρίδια και το προς ανάλυση δείγμα αναμίχθηκαν σε αναλογία όγκων 1:3 και αφέθηκαν υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 4  $^{0}$ C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο των σφαιριδίων, που περιέχει τις μη δεσμευμένες πρωτεΐνες, απομακρύνθηκε.

Στάδιο έκπλυσης: Ακολούθησε έκπλυση, προς απομάκρυνση των μη ειδικά προσδεδεμένων πρωτεϊνών. Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 όγκοι διαλύματος 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH=7.5 και 4 όγκοι διαλύματος 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH=6.4.

Στάδιο έκλουσης: Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια σε δύο στάδια με 2 mL διαλύματος (σε κάθε στάδιο) 500mM ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης, 20mM NaPi, 500mM NaCl, pH=6.4. Το έκλουσμα υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι 20mM NaPi (μεμβράνη διαπίδυσης με μοριακό κατώφλι 3500 Da), συμπυκνώθηκε με μικροσυμπυκνωτές Vivaspin (κατώφλι 3000 Da,) και φυλλάχθηκε στους -20  $^{0}$ C. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος μετρήθηκε με τη μέθοδο BCA.

## 2.5.5 Χρωματογραφία Blue Sepharose

Πρόκειται για το υλικό Cibacron Blue 3G, ομοιοπολικά συνδεδεμένο σε στερεό υπόστρωμα. Κλασσική εφαρμογή της χρωματογραφίας Blue Sepharose είναι η απομάκρυνση της αλβουμίνης από βιολογικά υγρά. Ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η πρόσδεση της αλβουμίνης δεν έχει διευκρινιστεί αλλά είναι γνωστό ότι και οι τρεις τομείς της HSA περιέχουν θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue (Dockal et al., 1999).

Στην παρούσα εργασία η Blue Sepharose χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του τομέα ΙΙΙ της HSA από υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους GS115/DIII, αλλά και για την απομάκρυνση της αλβουμίνης από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό.

## 2.5.5Α Καθαρισμός πολυπεπτιδίων από υπερκείμενα καλλιέργειας του P. pastoris

Το υπερκείμενο καλλιέργειας GS115/DIII υποβλήθηκε σε διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM NaPi pH=7.5, 150 mM NaCl, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.5.4.

Στάδιο εξισορρόπησης των σφαιριδίων : 2 mL σφαιριδίων (Blue Sepharose 6Fast Flow, Amersham) εκπλύθηκαν 4 φορές με 10 όγκους 20 mM NaPi pH=7.5, 150 mM NaCl.

<u>Στάδιο πρόσδεσης</u>: Τα σφαιρίδια (2 mL) και το προς ανάλυση δείγμα αναμίχθηκαν σε αναλογία όγκων 1:4 και αφέθηκαν υπό ανάδευση για 1 ώρα στους 4  $^{0}$ C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο των σφαιριδίων, που περιέχει τις μη δεσμευμένες πρωτεΐνες, απομακρύνθηκε.

Στάδιο έκπλυσης: Για την έκπλυση των σφαριδίων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 30 όγκοι διαλύματος 20mM NaPi, 150 mM NaCl, pH=7.5.

Στάδιο έκλουσης: Οι δεσμευμένες πρωτεΐνες εκλούσθηκαν από τα σφαιρίδια σε δύο στάδια με 4 mL διαλύματος 20 mM NaPi, 2 M NaCl, pH=7.5 σε κάθε στάδιο. Το έκλουσμα υποβλήθηκε σε διαπίδυση με 20 mM NaPi (μεμβράνη διαπίδυσης με μοριακό κατώφλι 3500 Da), συμπυκνώθηκε με μικροσυμπυκνωτές Vivaspin (κατώφλι 3000 Da) και φυλάχτηκε στους -20 <sup>0</sup>C. Η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού διαλύματος μετρήθηκε με τη μέθοδο BCA.

#### 2.5.6 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών με τη μέθοδο BCA

Η μέθοδος BCA (Pierce, Rockford, IL) συνδυάζει την αναγωγή του Cu<sup>2+</sup> σε Cu<sup>1+</sup> σε αλκαλικό διάλυμα (αντίδραση biuret) και τη χρωματομετρική ανίχνευση του Cu<sup>1+</sup> με το δικιγχονικό οξύ (bicinchoninic acid-BCA). Το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο που δημιουργείται από δύο μόρια BCA και ένα κατιόν χαλκού, παρουσιάζει υψηλή απορρόφηση στα 562nm.

Η καμπύλη αναφοράς κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα BSA γνωστών συγκεντρώσεων (250 μg/mL, 125 μg/mL, 50 μg/mL, 25 μg/mL, 5 μg/mL). Τόσο τα πρότυπα διαλύματα όσο και τα προς μέτρηση δείγματα αραιώνονται με dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 100μl και προστίθενται σε 2 mL αντιδραστηρίου BCA. Τα δείγματα επωάζονται για 30 min σε υδατόλουτρο 37  $^{0}$ C, αφήνονται να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου, και η απορρόφηση μετράται στα 562 nm.

#### 2.6 IN SILICO ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Για τον προσδιορισμό των καταλοίπων που αντιστοιχούν στους τομείς και υποτομείς της HSA χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα CATH (Class-Architecture-Topology-Homologous superfamily) (www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath) Για την εύρεση καταγεγραμμένων εναλλακτικών μεταγραφημάτων της HSA χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων EASED-Enhanced alternatively spliced EST database (<u>http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/cgi-bin/</u>). Η αξιολόγηση της δομικής ομοιότητας πολυπεπτιδίων της HSA, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρόγραμμα Geno3D.

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το student's *t*-test με το οποίο αξιολογήθηκαν οι διαφορές μεταξύ GnRH-επαγόμενης έκκρισης LH από κύτταρα μάρτυρες και κύτταρα που επωάστηκαν με τα προς εξέταση πολυπεπτίδια. Τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν ως μέσος όρος των τιμών ± S.E.M.



DE SADER EN CAL ANALES EN CALMARTA DE LE CALANTA DE LE 2024 ANIL 1917 DE LE CALANTER DE LE CALANTA DE LE CALANT

And the second seco

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

# 3.1 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ 490-585 ΤΗΣ ΗSA (ΥΠΟΤΟΜΕΑΣ ΙΙΙΒ)

Όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (Ενότητα 1.2), οι προσπάθειες απομόνωσης του παράγοντα GnSAF από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό γυναικών με υπερδιεγερμένες ωοθήκες έχουν οδηγήσει, πρόσφατα, σε συσχέτιση της δραστικότητας GnSAF με το C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (κατάλοιπα 490-585) (Pappa et al., 1999).

Στην παρούσα εργασία, σχεδιάστηκε η παραγωγή του πολυπεπτιδίου που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 490-585 της HSA, σε ανασυνδυασμένη μορφή, από το ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης-έκκρισης του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα *P. pastoris*. Το σύστημα του *P. pastoris* επιλέχθηκε για την έκφραση του υποτομέα IIIB ως καταλληλότερο καθώς έχει ήδη χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την έκφραση της HSA (Barr et al., 1992) και των τομέων αυτής Ι, ΙΙ και III (Dockal et al., 1999).

In silico αναλύσεις που πραγματοποιήσαμε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Cath (<u>www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath</u>) μας υπέδειξαν ότι ο υποτομέας IIIB της HSA αντιστοιχεί κατά προσέγγιση στα κατάλοιπα 495-585. Για τον λόγο αυτόν, το Cτελικό 95πεπτίδιο της HSA (490-585), το οποίο μελετήθηκε αναλυτικότερα στην παρούσα ενότητα της εργασίας (**Ενότητα 3.1**, βλ. και **Ενότητα 3.4**), θα αναφέρεται στη συνέχεια και ως υποτομέας IIIB ή DIIIB.

# 3.1.1 Κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pPICZaA/DIIIB και pPICZaA/DIIIB-myc-6His

Αρχικά η αλληλουχία cDNA που κωδικοποιεί για τα κατάλοιπα 490-585 της HSA ανακτήθηκε με τη μέθοδο της PCR χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα γονιδιωματικό DNA από το στέλεχος του *P. pastoris*, GS115/Albumin. Στη συνέχεια υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης-έκκρισης pPICZaA, μεταξύ των θέσεων *EcoRI* και Not1.

Δύο εναλλακτικά πλασμίδια σχεδιάστηκαν για την παραγωγή του C-τελικού 95πεπτιδίου της αλβουμίνης: στην πρώτη περίπτωση, ένα κωδικόνιο λήξης εισάγεται ακριβώς μετά την κωδικοποιούσα αλληλουχία για τον υποτομέα DIIIB ενώ στη δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται το κωδικόνιο λήξης του φορέα pPICZaA ώστε το καρβοξυτελικό άκρο του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου να είναι μεγαλύτερο κατά περίπου 2.5 kDa και να περιέχει τον επίτοπο του c-myc και έξι κατάλοιπα ιστιδινών (DIIIB-myc-6His). Μετά από την μοριακή κατασκευή και αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων από κύτταρα *E. coli*, οι αλληλουχίες των υποκλωνοποιημένων τμημάτων DIIIB και DIIIB-myc-6His ελέγχθηκαν με αλληλούχιση και των δύο κλώνων (dsDNA sequencing; MWG Biotech) και ευρέθη ότι περιείχαν επακριβώς την επιθυμητή αλληλουχία, σε κάθε περίπτωση.

# 3.1.2 Επιλογή ανασυνδυασμένων κλώνων του *Pichia pastoris* με απευθείας ανάλυση PCR και επιβεβαίωση του Mut<sup>+</sup> φαινοτύπου.

Μετά την επιβεβαίωση της αλληλουχίας τους, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια ευθυγραμμίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον μετασχηματισμό του στελέχους GS115 του *P. pastoris* (Ενότητα 2.3.1). Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι επιλέχθηκαν από θρεπτικό μέσο επιλογής με αντιβιοτικό ζεοκίνη και στη συνέχεια η ενσωμάτωση των πλασμιδίων στο χρωμόσωμα του μύκητα επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο της απευθείας ανάλυσης PCR (Ενότητα 2.3.2). Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης PCR για αντιπροσωπευτικούς κλώνους GS115/DIIIB και GS115/DIIIB-myc-6His. Το προϊόν PCR μεγέθους 300 ζευγών βάσεων αντιστοιχεί στο τμήμα cDNA της HSÂ που κωδικοποιεί για τον υποτοιμέα IIIB.

Οι μετασχηματισμένοι κλώνοι ελέγχθηκαν στη συνέχεια ως προς την ικανότητα τους να μεταβολίζουν μεθανόλη. Μόνο οι κλώνοι Mut<sup>+</sup> (Ενότητα 2.3.3) χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων DIIIB και DIIIB-myc-6His.





Εικόνα 3.1 Απευθείας ανάλυση PCR για την επιλογή μετασχηματισμένων κλώνων GS115/DIIIB και GS115/DIIIB-myc-6His. Δείγμα κυτταρικού εκχυλίσματος (10 μL) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με ζεύγη εκκινητών DIIIB-(*EcoR*])-sense, DIII-(*Not*])-antisense (διαδρομές 1, 2) και DIIIB-(*EcoR*])sense, DIII-(*Not*])-6His-antisense (διαδρομές 3, 4). Ως αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από το στέλεχος GS115 και υποβλήθηκε στην αντίδραση PCR με εκκινητές DIIIB-(*EcoR*])-sense, DIII-(*Not*])-antisense (διαδρομή 5). Ποσότητα (20 μL) από κάθε αντίδραση αναλύθηκε σε πηκτή αγαρόζης (1%) και η εμφάνιση του DNA έγινε με τη χρήση βρωμιούχου αιθιδίου. Οι δείκτες μοριακών βαρών (100 bp DNA ladder) παρουσιάζονται στο αριστερό μέρος της εικόνας.

#### 3.1.3 Έκφραση του υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA στο σύστημα του P. pastoris

Μετασχηματισμένοι κλώνοι GS115/DIIIB, GS115/DIIIB-myc-6His και το στέλεχος GS115 που μετασχηματίστηκε με το φορέα pPICZaA (GS115/empty vector), αναπτύχθηκαν αρχικά σε θρεπτικό υλικό BMGY και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει μεθανόλη (BMMY) για επαγωγή της έκφρασης.

Ένας πρώτος έλεγχος της έκφρασης των ανασυνδυασμένων πεπτιδίων DIIIB και DIIIB-myc-6His σε διαφορετικούς κλώνους πραγματοποιήθηκε με ανάλυση SDS-PAGE 15% και χρώση Coomassie Brilliant Blue και παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2. Οι πρωτεϊνικές ζώνες υπερέκφρασης παρουσιάζονται σε μοριακά βάρη πλησίον των 14.2 kDa του δείκτη μοριακών βαρών Sigma low range ενώ τα αναμενόμενα μοριακά βάρη των πολυπεπτιδίων DIIIB και DIIIB-myc-6His όπως υπολογίζονται θεωρητικά είναι 10.7 kDa και 13.2 kDa αντίστοιχα. Ανοσοαποτύπωση με τη χρήση του μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του επιτόπου c-myc (9E10) έδειξε ότι οι κύριες πρωτεϊνικές ζώνες στις διαδρομές 3 και 4 αντιστοιχούν στα ανασυνδυασμένα πεπτίδια DIIIB-myc-6His. Αξίζει να παρατηρηθεί ότι το υπερκείμενο καλλιέργειας του στελέχους GS115 του *P. pastoris* (Εικόνα 3.2, διαδρομή 2) παρουσιάζει ιδιαίτερα χαμηλά επίπεδα φυσικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών.

Προκειμένου να ελεγχθεί η έκφραση των πεπτιδίων ΙΙΙΒ, που δεν φέρουν Cτελικό επίτοπο, χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3 το αντίσωμα έναντι της HSA αναγνωρίζει τις πρωτεϊνικές ζώνες υπερέκφρασης σε υπερκείμενα στελεχών GS115/DIIIB (διαδρομή 1) αλλά και GS115/DIIIB-myc-6His (διαδρομές 2, 4 και 5). Οι ζώνες αυτές δεν παρουσιάζονται στο υπερκείμενο του στελέχους που έχει μετασχηματιστεί με το φορέα pPICZaA ως αρνητικός μάρτυρας (διαδρομές 3 και 6).





Εικόνα 3.2 Έκφραση του ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου 490-585 (υποτομέας IIIB) στο στέλεχος GS115 του *P. pastoris.* Υπερκείμενα (0.1 mL) από κλώνους GS115/DIIIB-myc-6His (διαδρομή 3 και 4), GS115/DIIIB (διαδρομές 5 και 6) και το στέλεχος GS115 (διαδρομή 1), υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (15%) και αναλύθηκαν με χρώση Comassie Brilliant Blue (A) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου c-myc (9E10) (B). Χρησιμοποιήθηκαν προεχρωσμένοι (Bio-Rad, low range) (διαδρομή 7) και μη εχρωσμένοι (Sigma, low range) (διαδρομή 1) δείκτες μοριακών βαρών.

bild Donard

S. 19



Εικόνα 3.3 Έκφραση του ανασυνδυασμένου πολυπεπτιδίου 490-585 (υποτομέας IIIB) στο στέλεχος GS115 του *P. pastoris.* Υπερκείμενα (0.1 mL) από αντιπροσωπευτικούς κλώνους GS115/DIIIB (διαδρομή 1), GS115/DIIIB-myc-6His (διαδρομές 2, 4 και 5) και GS115/empty vector (διαδρομές 3 και 6), υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι HSA (Abcam Ab1217) (B). Οι δείκτες μοριακών βαρών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι προεχρωσμένοι Bio-Rad, low range (A) και οι μη εχρωσμένοι Bio-Rad, broad range (B).

anti-HSA

Χρώση AgNO3



#### 3.1.4 Ο υποτομέας ΙΙΙΒ της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF

Καθώς ο υποτομέας ΙΙΙΒ της HSA εκφράζεται στον *P. pastoris* και εκκρίνεται στο υπέρκείμενο καλλιέργειας του μύκητα, προχωρήσαμε σε ανάλυση των εν λόγω υπερκειμένων ως προς τη δραστικότητα GnSAF χρησιμοποιώντας πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων. Στη βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας υποβλήθηκε ποσότητα 25 μL υπερκειμένου από διάφορους κλώνους GS115/DIIIB, GS115/DIIIB-myc-6His και από τον κλώνο GS115/empty vector. Το υπερκείμενο σε κάθε περίπτωση προέρχεται από καλλιέργειες σε θρεπτικό μέσο BMMY που ξεκινούν από την ίδια οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub> 1) και αντιστοιχούν σε ενδοκυτταρικό πρωτεϊνικό περιεχόμενο που κυμαίνεται από 0.57 σε 0.65 μg/mL.

Στην Εικόνα 3.4 παρουσιάζεται η επίδραση υπερκείμενων από 5 διαφορετικούς κλώνους που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο 490-585 (GS115/DIIIB-1, GS115/DIIIB-2, GS115/DIIIB-myc-6His-1, GS115/DIIIB-myc-6His-2, GS115/DIIIB-myc-6His-3). Όλοι οι κλώνοι μειώνουν την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH σε υψηλό βαθμό, ενώ υψηλότερη αναστολή παρουσιάζουν τα υπερκείμενα των κλώνων GS115/DIIIB-1 και GS115/DIIIB-myc-6His-1. Η μείωση της επαγόμενης έκκρισης της LH στους κλώνους αυτούς φτάνει στο 23 ± 8% (n=6; P<0.0001) και 30 ± 9% (n=3; P<0.01) του μάρτυρα. Οι άλλοι τρεις κλώνοι επίσης προκάλεσαν μείωση της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH από 51 έως 34 % του μάρτυρα.

Η δραστικότητα GnSAF υπολογίσθηκε σύμφωνα με τον τύπο [1-A/B] (%) όπου

 $\mathbf{A} = LH(ng/mL)_{[GnRH + \Delta EI\Gamma MA]} - LH(ng/mL)_{BA\Sigma IKH}$ 

 $\mathbf{B} = LH(ng/mL)_{GnRH} - LH(ng/mL)_{BA\Sigma IKH}$ 

Ως LH(ng/mL)<sub>BAΣIKH</sub> αναφέρεται η βασική έκκριση της LH (από 200,000 κύτταρα) και ως LH(ng/mL)<sub>GnRH</sub> αναφέρεται η επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH (από 200,000 κύτταρα).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, η επίδραση των κλώνων GS115/DIIIB-1 και-GS115/DIIIB-myc-6His-1, αντιστοιχεί σε δραστικότητα GnSAF 82% και 77% αντίστοιχα ενώ η δραστικότητα των τριών άλλων κλώνων ήταν από 50 έως 68%

(Πίνακας 3.1). Σε κάθε περίπτωση ελέχθησαν παράλληλα με τους προς μελέτη κλώνους, υπερκείμενα από το στέλεχος GS115/empty vector και βρέθηκαν να είναι ανενεργά (Εικόνα 3.4 A και B).

Στη συνέχεια ελέγξαμε αν υποτομέας ΙΙΙΒ πληροί τα χαρακτηριστικά που έχουν αποδοθεί στον παράγοντα GnSAF δηλαδή αν αναστέλλει την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροφινών (LH και FSH). Πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις δοσοεξάρτησης για υπερκείμενα του στελέχους GS115/DIIIB-2 σε ένα εύρος από 2.5 έως 25 μL που έδειξαν ότι η δραστικότητα GnSAF είναι μετρήσιμη από τα 15 μL και άνω (**Εικόνα 3.5A**). Σε αντίστοιχο εύρος (5-25 μL) τα υπερκείμενα αυτά δεν επηρεάζουν τη βασική έκκριση της LH και τη βασική έκκριση της FSH (**Εικόνα 3.5Γ** και Δ) αλλά ούτε και την GnRH-επαγόμενη έκκριση FSH (**Εικόνα 3.5A**). Η παρατηρούμενη δραστικότητα GnSAF δεν μπορεί να αποδοθεί σε άλλα συστατικά του υπερκειμένου της καλλιέργειας καθώς ίσοι και μεγαλύτεροι όγκοι υπερκειμένου από το στέλεχος GS115/empty vector δεν επηρεάζουν την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH (**Εικόνα 3.5B**).

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3 το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο 490-585 της HSA αναγνωρίζεται από το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) συνεπώς η δραστικότητα GnSAF που παρουσιάζει είναι πιθανόν ότι μπορεί να ανασταλεί παρουσία του αντισώματος. Υπερκείμενο (25 μL) από τον κλώνο GS115/DIIIB-2 του *P. pastoris* όπου εκφράζεται το IIIB υποβλήθηκε σε βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF με και χωρίς προεπώαση με το αντίσωμα Ab1217. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.6, η δραστικότητα GnSAF που παρουσιάζει το υπερκείμενο του στελέχους GS115/DIIIB-2 (51.38 ± 9.01% του μάρτυρα) αναστέλλεται πλήρως ύστερα από επώαση με 1μg αντισώματος. Η ποσότητα του αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε για την αναστολή της δραστικότητας αντιστοιχούσε σε αριθμό γραμμομορίων κατά προσέγγιση ίσο με αυτόν του πολυπεπτιδίου IIIB στο υπερκείμενο του μύκητα, όπως υπολογίσθηκε κατ' εκτίμηση για το IIIB βάσει της χρώσης νιτρικού αργύρου.





Εικόνα 3.4 Δραστικότητα GnSAF των υπερκειμένων του *P. pastoris* που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο 490-585 της HSA (υποτομέας IIIB) με C-τελικό επίτοπο myc-6His (B) ή χωρίς (A). Υπερκείμενα καλλιέργειας (25 μL/φρεάτιο) των στελεχών GS1115/empty vector (A και B), GS115/DIIIB-1, GS115/DIIIB-2, GS115/DIIIB-3 (A), GS115/DIIIB-myc-6His-1 ή GS115/DIIIB-myc-6His-2 (B) υποβλήθηκαν σε βιολογική δοκιμασἶα προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2. Η επίδραση τους στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH παρουσιάζεται ως επί τις εκατό ποσοστό της LH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες που επωάστηκαν μόνο με 0.1μM GnRH. Η κάθε κατακόρυφη ζώνη (bar) αντιπροσωπεύει το μέσο όρο τριών μετρήσεων ± SEM. Οι τιμές που είναι στατιστικά σημαντικές (P<0.01) σημειώνονται με αστερίσκο. Οι οριζόντιες διαγραμμισμένες ζώνες υποδηλώνουν το εύρος τιμών του μάρτυρα, δηλ. της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδηλώνουν τη βασική έκκριση της LH.



**Εικόνα 3.5** Ανάλυση της δραστικότητας GnSAF του υποτομέα IIIB της HSA. (A) Ο υποτομέας IIIB επιδρά στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH (- $\phi$ -) με δοσοεξαρτώμενο τρόπο αλλά δεν επηρεάζει την GnRH-επαγόμενη έκκριση FSH (- $\Box$ -) (B) Υπερκείμενο από κλώνο GS115/empty vector δεν επηρεάζει τη επαγόμενη έκκριση της LH. (Γ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση της LH. (Δ) Ο υποτομέας IIIB δεν επιδρά στην βασική έκκριση του στελέχους GS115/DIIIB (Δ, Γ, Δ) αναλύθηκαν σε δόσεις από 2.5 έως 25 μL ανά φρεάτιο ενώ τα υπερκείμενα του GS115/empty vector (B) αναλύθηκαν σε δόσεις 15-35 μL ανά φρεάτιο. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Οι οριζόντιες διαγραμμισμένες ζώνες υποδηλώνουν το εύρος τιμών του μάρτυρα δηλαδή της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH (Δ και B), της βασικής έκκρισης της FSH (Δ).



Εικόνα 3.6 Η δραστικότητα GnSAF του υποτομέα ΙΙΙΒ αναστέλλεται από αντίσωμα έναντι της HSA. Υπερκείμενα στελέχους GS115/DIIB (25 μL/φρεάτιο) αναλύθηκαν ως προς της δραστικότητα GnSAF σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων αφού προεπωάστηκαν παρουσία ή απουσία του πολυκλωνικού αντισώματος έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (1 μg/φρεάτιο). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων.

# 3.2 ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΛΒΟΥΜΙΝΗΣ ΟΡΟΥ (HSA) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ α-ΕΜΒΡΥΟΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (AFP)

3.2.1 Το πλήρες μόριο της HSA και της AFP δεν παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF

Στην Ενότητα 3.1 εδείχθη ότι ο υποτομέας ΙΙΙΒ της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού μπορεί να εκφραστεί ως ανεξάρτητο μόριο στο σύστημα του ζυμομύκητα *P. pastoris* και ότι υψηλή δραστικότητα GnSAF ανιχνεύεται σε υπερκείμενα διαφορετικών κλώνων που εκφράζουν το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο. Στο σημείο αυτό εύλογα δημιουργήθηκε το ερώτημα αν η παρατηρούμενη δραστικότητα του υποτομέα ΙΙΙΒ μπορεί να διατηρείται στο μόριο της αλβουμίνης.

Για να ελεγχθεί αυτό το ενδεχόμενο προχωρήσαμε στην παραγωγή ανασυνδυασμένης HSA χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα έκφρασης-έκκρισης και τις ίδιες πειραματικές συνθήκες με αυτές που εφαρμόσαμε για την παραγωγή του υποτομέα IIIB. Ο κλώνος GS115/Albumin του *P. pastoris*, που φέρει το πλήρες cDNA της HSA, αναπτύχθηκε για επαγωγή της έκφρασης και επιβεβαιώθηκε η παραγωγή της HSA στο υπερκείμενο της καλλιέργειας (Εικόνα 3.7A). Υποβάλλοντας υπερκείμενο του στελέχους GS115/Albumin (25 μL) σε βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF παράλληλα με υπερκείμενο (25μL) από το στέλεχος GS115/ empty vector δεν παρατηρήθηκε επίδραση στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH (Εικόνα 3.7B).

Στη συνέχεια καθαρή HSA ελέγχθηκε σε ένα εύρος συγκεντρώσεων ως προς τη δραστικότητα GnSAF. Επιλέχθηκαν δόσεις 0.125, 0.25, 1 και 2 μg ώστε να είναι αντίστοιχες και υψηλότερες, σε βάση γραμμομοριακής αναλογίας, από αυτές που υπολογίζονται για το ενεργό πεπτίδιο IIIB και σε καμία από αυτές δεν παρατηρήθηκε αναστολή στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH (Εικόνα 3.8A).

Σε αντίστοιχες δόσεις (0.25, 1 και 2 μg), μελετήθηκε και η δομικά ομόλογη, α-εμβρυοπρωτεΐνη (AFP) και βρέθηκε ότι δεν επηρεάζει την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH αλλά ούτε και τη βασική έκκριση της FSH (Εικόνα 3.8B).





**Εικόνα 3.7** Η ανασυνδυασμένη HSA δεν παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF. Υπερκείμενα (0.1 mL) από το στέλεχος GS115/empty vector (διαδρομή 1 και κατακόρυφη ζώνη 1) και το στέλεχος GS115/Albumin (διαδρομή 2 και κατακόρυφη ζώνη 2) αναλύθηκαν με SDS-PAGE (15%) και χρώση Coomassie (A) και υποβλήθηκαν σε δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF (25 μL/φρεάτιο) (B). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η επίδραση των υπερκειμένων στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH παρουσιάζεται ως ποσοστό % επί της LH που εκκρίνεται από κύτταρα-μάρτυρες τα οποία είχαν επωασθεί μόνο με 0.1 μM GnRH. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα, δηλ. της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH.





**Εικόνα 3.8** Ανάλυση δοσοεξάρτησης για την HSA και την AFP. Καθαρή HSA (Sigma A-3782) μελετήθηκε σε τέσσερις διαφορετικές δόσεις (0.125, 0.25, 1 και 2 μg) (A) ως προς την ικανότητα της να επιδρά στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH. Η καθαρή AFP (Calbiochem 341498) μελετήθηκε σε δόσεις 0.25, 1 και 2 μg, (B) ως προς την ικανότητα της να επιδρά στην GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH ( - $\bullet$ - ) και στη βασική έκκριση της FSH (- $\diamond$ -). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως ποσοστό % επί της GnRH-επαγόμενης έκκρισης της LH, δηλ. της LH που εκκρίνεται από κύτταρα-μάρτυρες που επωάστηκαν μόνο με 0.1 μM GnRH ή ως ποσοστό % επί της βασικής έκκρισης της FSH, δηλ. της FSH που εκκρίνεται από τα κύτταρα-μάρτυρες χωρίς επώαση με GnRH. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

# 3.3 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΑΛΛΩΝ ΤΟΜΕΩΝ ΚΑΙ ΥΠΟΤΟΜΕΩΝ ΤΗΣ ΗSA ΕΚΤΟΣ ΤΟΥ DIIIB

#### 3.3.1 Οι τομείς Ι, ΙΙ και ΙΙΙ της HSA δεν παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF

Οπως εδείχθη στην Ενότητα 3.2.1, η δραστικότητα GnSAF που παρουσιάζει ο υποτομέας IIIB φαίνεται να μην διατηρείται στο μοριακό περιβάλλον του πλήρους μορίου της HSA. Δε θα μπορούσε όμως να αποκλειστεί η πιθανότητα η δραστικότητα GnSAF να αναφέρεται σε έναν μεγαλύτερο πολυπεπτιδικό τομέα της HSA, όπως π.χ. ο τομέας III που περιέχει το ενεργό πεπτίδιο IIIB.

Είναι γνωστό ότι οι δομικά ομόλογοι τομείς Ι, ΙΙ και ΙΙΙ της HSA μπορούν να εκφραστούν ως ανεξάρτητα μόρια στο σύστημα του *P. pastoris* διατηρώντας τις γενικές ιδιότητες αναγνώρισης προσδεμάτων τους που προβλέπονται βάσει της δομής της HSA (Dockal et al., 1999). Η αλληλουχία cDNA που αντιστοιχεί στα κατάλοιπα 381-585 της HSA (τομέας III, Dockal et al., 1999), ανακτήθηκε με PCR από το γονιδιωματικό DNA του στελέχους GS115/Albumin και χρησιμοποιήθηκε και σε αυτή την περίπτωση για τη δημιουργία δύο ανασυνδυασμένων μορφών (DIII και DIII-myc-6His). Αφού επιβεβαιώθηκε η έκφραση των πολυπεπτιδίων DIII και DIIImyc-6His, (**Εικόνα 3.9A** και **B**) προχωρήσαμε σε αναλύσεις δοσοεξάρτησης υπερκειμένων των αντίστοιχων κλώνων. Σε δόσεις υπερκειμένου ίσες και μεγαλύτερες (10 έως 35 μL) από αυτές στις οποίες παρατηρήθηκε υψηλή δραστικότητα για τον υποτομέα IIIB, ο τομέας ΙΙΙ δεν επηρεάζει την επαγόμενη έκκριση LH (**Εικόνα 3.9Γ**). Επιπλέον, μεταξύ 5 διαφορετικών κλώνων GS115/DIII που ελέγχθηκαν σε κανέναν δεν ανιχνεύθηκε δραστικότητα GnSAF (**Εικόνα 3.9Δ**).

·Παράλληλα με τον τομέα ΙΙΙ εκφράστηκαν στον *P. pastoris* και οι τομείς Ι (κατάλοιπα 1-197) και ΙΙ (κατάλοιπα 189-385) της HSA. Οι αναλύσεις δοσοεξάρτησης (10-35 μL) σε υπερκείμενα κλώνων GS115/DI, GS115/DI-myc-6His, GS115/DII και GS115/DII-myc-6His όπου εκφράζονται οι τομείς Ι και ΙΙ (Εικόνα 3.10A και B) έδειξαν επίσης ότι δεν παρατηρείται ενεργότητα GnSAF σε κανέναν εκ των δύο αυτών τομέων (Εικόνα 3.10Γ).





**Εικόνα 3.9** Έκφραση του τομέα ΙΙΙ της HSA στον *P. pastoris* και έλεγχος δραστικότητας GnSAF. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/empty vector, GS115/DIII-myc-6His (A) και GS115/DIII (B) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A και B, αριστερά σκέλη) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc (A) και με αντίσωμα έναντι της HSA (B). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/DIII-1 (---) και GS115/DIII-myc-6His (----) (Γ), αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε δόσεις από 10 έως 35 μL ανά φρεάτιο. (Δ) Δείγμα υπερκειμένου (25μL) από 5 διαφορετικούς κλώνους GS115/DIII (1-3) ή GS115/DIIImyc-6His (4-5) αναλύθηκε ως προς τη δραστικότητα GnSAF. Οι έντονες κατακόρυφες ζώνες αντιπροσωπεύουν τα επίπεδα του μάρτυρα ενώ οι ανοιχτόχρωμες την επίδραση των υπερκειμένων. Σε κάθε περίπτωση οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο  $\pm$  SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη (Γ) υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.



**Εικόνα 3.10** Έκφραση των τομέων Ι και ΙΙ της HSA στον *P. pastoris* και έλεγχος της δραστικότητας GnSAF. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/empty vector, GS115/DI-myc-6His (A), GS115/DII-myc-6His (A), GS115/DI (B) και GS115/DII (B) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A και B αριστερά σκέλη) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc (A) και με αντίσωμα έναντι της HSA (B). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/DI (-Φ-) και GS115/DII (--D--) (Γ), αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε δόσεις από 15 έως 35 μL/φρεάτιο. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

#### 3.3.2 Ο υποτομέας ΙΒ της HSA δεν παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF

Σύμφωνα με τα όσα αναφέρθηκαν στις δύο προηγούμενες Ενότητες (3.1 και 3.2) η δραστικότητα GnSAF του υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA δεν διατηρείται σε μεγαλύτερα μόρια που περιέχουν το ενεργό πεπτίδιο όπως η ίδια η HSA και ο τομέας ΙΙΙ. Όπως, όμως, αναφέρθηκε ήδη, μεταξύ των υποτομέων Β της HSA (IB, IIB, IIIB) παρατηρείται δομική ομολογία όπως άλλωστε και μεταξύ των υποτομέων A (IA, IIA, IIIA). Τα παραπάνω στοιχεία μας οδηγούν στο ερώτημα αν και οι υποτομείς IB και ΙΙΒ μπορούν να παρουσιάζουν δραστικότητα αντίστοιχη του ΙΙΙΒ.

Όπως ισχύει και για τον υποτομέα ΙΙΙΒ, έκφραση των υποτομέων ΙΒ και ΙΙΒ δεν έχει καταγραφεί στη βιβλιογραφία και τα όρια μεταξύ των υποτομέων δεν είναι καθορισμένα πειραματικά. Έτσι προκειμένου να σχεδιάσουμε την έκφραση των υποτομέων ΙΒ και ΙΙΒ στον *P. pastoris* στηριχθήκαμε σε in silico αναλύσεις με βάση το πρόγραμμα Cath. Τα όρια που επιλέξαμε για τον υποτομέα ΙΒ ήταν μεταξύ των κατάλοιπων 107-197 και για τον ΙΙΒ μεταξύ των 296-385. Όπως και προηγουμένως, σχεδιάστηκε η παραγωγή δύο εναλλακτικών μορφών για το κάθε πεπτίδιο, με ή χωρίς C-τελικό επίτοπο.

Για τον τομέα ΙΙΒ, δεν κατέστη δυνατή η έκφραση του σε ικανοποιητικά επίπεδα στο σύστημα έκφρασης του *P. pastoris* παρά το γεγονός ότι το σύστημα χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία τόσο για το πλήρες μόριο της HSA όσο και για εκτενή σειρά άλλων υποτομέων και τομέων της HSA. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.11**, ύστερα από ανάλυση περισσότερων από 10 διαφορετικών κλώνων (ενδεικτικά παρουσιάζονται 4 εξ αυτών) GS115/DIIB και GS115/DIIB-myc-6His (**Εικόνα 3.11A**) δεν ανιχνεύονται πρωτεϊνικές ζώνες υπερέκφρασης. Η ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA που είχε χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ανίχνευση των άλλων πολυπεπτιδίων της HSA (Abcam Ab1217) έδειξε ότι ο υποτομέας ΙΙΒ δεν ανιχνεύεται πρακτικά σε υπερκείμενα κλώνων GS115/DIIB και GS115/DIIB-myc-6His (**Εικόνα 3.11B**).

Η έκφραση του υποτομέα ΙΒ (Εικόνα 3.12Α και Β) κατέστη δυνατή τόσο στη μορφή DIB-myc-6His (διαδρομές 1-4), όσο και στη μορφή DIB (διαδρομές 5-8). Υπερκείμενα από κλώνους GS115/DIB υποβλήθηκαν σε δοκιμασίες προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης σε δόσεις 10, 25 και 35 μL δηλ. ίσες και -μεγαλύτερες από αυτές που μελετήθηκαν για τον υποτομέα ΙΙΙΒ. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.12Γ, ο υποτομέας ΙΒ, παρά τη δομική ομοιότητα του με τον ΙΙΙΒ, δεν προκαλεί αναστολή στην επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH. Εξάλλου, δεν επηρεάζει την βασική έκκριση της FSH.



Χρώση AgNO<sub>3</sub>

anti - HSA

**Εικόνα 3.11** Έκφραση του υποτομέα IIB της HSA στον *P. pastoris*. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/DIIB-myc-6His (διαδρομές 1 και 2), GS115/DIIB (διαδρομές 3 και 4) και GS115/empty vector (διαδρομή 5), υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B).





**Енко́**va 3.12 Έκφραση του υποτομέα IB της HSA στον *P. pastoris* кан έλεγχος δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/DIB-myc-6His (διαδρομές 1-4), GS115/DIB (διαδρομές 5-8) και GS115/empty vector (διαδρομή 9), υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/DIB αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF (- $\rightarrow$ -) και τη δραστικότητα ανασταλτίνης (- $\Box$ -) (Γ) σε δόσεις από 15 έως 35 μL ανά φρεάτιο. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.



# 3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΑΠΟ ΥΠΕΡΚΕΙΜΕΝΑ ΤΟΥ *P. pastoris* ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

3.4.1 Διαχωρισμός του ενεργού πολυπεπτιδίου ΙΙΙΒ από την HSA και τον τομέα ΙΙΙ με χρωματογραφία Blue Sepharose.

- Ένας κλασικός τρόπος απομάκρυνσης της αλβουμίνης από βιολογικά υγρά, όπως ο ορός του αίματος, όπου ευρίσκεται σε αφθονία, είναι η χρωματογραφία Blue Sepharose (ή Dyematrex Blue) καθώς η αλβουμίνη φέρει θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue. Οι δύο εκ των θέσεων που υπάρχουν έχουν εντοπιστεί στους υποτομείς IIA και IIIA (Compagnini et al., 1996) ενώ τουλάχιστον μία ακόμη θέση θα πρέπει να εδράζεται στον τομέα Ι καθώς και οι τρεις τομείς της HSA έχουν καθαριστεί από υπερκείμενα κλώνων *P. pastoris* με τη χρήση Blue Sepharose (Dockal et al., 1999).

Όσο αφορά στην μελέτη της δραστικότητας GnSAF, η παρουσία της HSA στα βιολογικά υγρά μπορεί να αποτελεί έναν ιδιαίτερα ανασταλτικό παράγοντα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας ο υποτομέας IIIB της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF ενώ η ίδια η αλβουμίνη και ο τομέας III που περιέχουν το ενεργό πεπτίδιο είναι ανενεργά. Επιπλέον και τα τρία μόρια (HSA, DIII, DIIIB) αναγνωρίζονται από αντίσωμα έναντι της αλβουμίνης. Τα δεδομένα αυτά καθιστούν δυσχερή τη διάκριση, απομόνωση και μελέτη του ενεργού μορίου IIIB σε βιολογικά υγρά.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, μελετήσαμε κατά πόσο στον υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA περιέχονται θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue που θα επέτρεπαν τον καθαρισμό του ενεργού πεπτιδίου ΙΙΙΒ από υπερκείμενα κλώνων *P. pastoris* με Blue Sepharose. Υποβάλλοντας υπερκείμενα από κλώνους GS115/DIIIB, GS115/DIII και, παράλληλα, καθαρή HSA (Sigma A-3782) σε χρωματογραφία Blue Sepharose διαπιστώσαμε ότι τόσο η HSA όσο και ο τομέας ΙΙΙ προσδένονται στη στήλη και εκλούονται από αυτή με 2 M NaCl, ενώ ο υποτομέας ΙΙΙΒ δεν προσδένεται και ανακτάται πλήρως στο μη δεσμευμένο κλάσμα (Εικόνα 3.13). Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει ότι ο υποτομέας ΙΙΙΒ δεν φέρει θέσεις πρόσδεσης για Cibacron Blue και η δέσμευση του τομέα ΙΙΙ στη στήλη πραγματοποιείται μέσω του υποτομέα ΙΙΙΑ στον οποίο υπάρχει χαρακτηρισμένη θέση Cibacron Blue (Compagnini et al., 1996).



Χρώση AgNO<sub>3</sub>

Εικόνα 3.13 Σύγκριση του υποτομέα ΙΙΙΒ με τον τομέα ΙΙΙ και την ΗSA ως προς την πρόσδεση σε Cibacron Blue. Υπερκείμενα (1 mL) από διαφορετικούς κλώνους του *P. pastoris* των τύπων GS115/DIII (διαδρομές 1-4) ή GS115/DIIIB (διαδρομές 5-8) καθώς και καθαρή HSA (Sigma A-3782) (1 mg/mL) (διαδρομές 9-12), υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία Blue Sepharose. Οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με 20 mM NaPi, pH 7.5, 2 M NaCl, σε δύο διαδοχικά βήματα. Ποσότητες που αντιστοιχούν στο 10% του αρχικού δείγματος (διαδρομές 1, 5 και 9), στο 10% των μη δεσμευμένων κλασμάτων (διαδρομές 2,6 και 10) και στο 50% των πρωτεϊνών που εκλούσθηκαν στο πρώτο βήμα (διαδρομές 3, 7 και 11) και στο δεύτερο βήμα (διαδρομές 4, 8 και 12) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και χρώση νιτρικού αργύρου.



3.4.2 Καθαρισμός του ενεργού πεπτιδίου DIIIB-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας  $Ni^{2+}$ .

Προκειμένου να μελετήσουμε τον υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA ως προς τη δραστικότητα GnSAF χρησιμοποιήσαμε έως τώρα (Ενότητα 3.1) υπερκείμενα καλλιεργειών από στελέχη του P. pastoris στα οποία εκφράζεται το πολυπεπτίδιο. Θέλοντας να προσδιορίσουμε πλέον την περιοχή συγκεντρώσεων στην οποία δρα το ενεργό πεπτίδιο, διερευνήσαμε τρόπους απομόνωσης του από υπερκείμενα καλλιέργειας του μύκητα. Αρχικά επιδιώξαμε την απομόνωση του με τη χρήση γρωματογραφίας Blue Sepharose αλλά διαπιστώσαμε ότι το πολυπεπτίδιο δεν προσδένεται στη στήλη (Ενότητα 3.4.1).

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην Ενότητα 2 (βλ. και Ενότητες 3.1 και 3.3) ο υποτομέας IIIB, όπως και όλα τα άλλα πεπτίδια που μελετήθηκαν, εκφράστηκε σε μία εναλλακτική μορφή που φέρει στο C-τελικό άκρο τον επίτοπο c-myc και έξι κατάλοιπα ιστιδίνης. Εφόσον τόσο το πολυπεπτίδιο IIIB, όσο και το IIIB-myc-6His, παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF ακολουθήσαμε την δεύτερη εναλλακτική λύση, για τον καθαρισμό του δραστικού πολυπεπτιδίου IIIB-myc-6His, δηλαδή τη χρήση στήλης κατιόντων νικελίου.

Υπερκείμενα από τον κλώνο GS115/ DIIIB-myc-6His, μετά από διαπίδυση έναντι διαλύματος 20mM NaPi, pH 7.5, υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup> (ProBond resin, Invitrogen)  $\delta \pi \omega \zeta \pi \epsilon \rho_1 \gamma \rho \Delta \phi \epsilon \tau \alpha_1 \sigma \tau \eta \gamma \epsilon \nu \delta \tau \eta \tau \alpha 2.5.4$ . To πολυπεπτίδιο δεσμεύεται στη στήλη  $Ni^{2+}$  σε pH 7.5 και εκλούεται από αυτήν με 20 mM NaPi pH 6.4, 500mM ιμιδαζόλιο σε δύο διαδογικά στάδια. Μετά από την έκλουση και την διαπίδυση έναντι διαλύματος 20 mM NaPi, pH 7.5, ακολούθησε συμπύκνωση του δείγματος με ηθμούς Viva Spin (cutoff, 3000 Da). Συμπύκνωση στο 1/10 του αρχικού όγκου οδήγησε σε συγκέντρωση πρωτεΐνης 0.5  $\mu g/\mu L$ . Στην Εικόνα 3.14, παρουσιάζεται η ανάλυση SDS-PAGE και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι HSA για 1 με καθαρισμένου ΙΙΙΒ ύστερα από το στάδιο της συμπύκνωσης.




**Εικόνα 3.14** Καθαρισμός του ενεργού πολυπεπτιδίου DIIIB-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>. Υπερκείμενο (6 mL) από κλώνο GS115/ IIIB-myc-6His ύστερα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH 7.5, 500 mM NaCl, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup> (**Ενότητα 2.5.4**). Οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με 20mM NaPi pH=6.4, 500mM ιμιδαζόλιο σε δύο διαδοχικά βήματα. Τα δύο εκλούσματα συνδυάσθηκαν σε ένα δείγμα (2 mL), υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH=7.5, και συμπυκνώθηκαν 10 φορές (Viva Spin, cutoff 3000 Da). Συμπυκνωμένο δείγμα (1 μg) υποβλήθηκε σε SDS-PAGE (18%), χρώση νιτρικού αργύρου (**A**) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (**B**).

3.4.3 Καθαρισμός του τομέα ΙΙΙ της HSA με Blue Sepharose και του ΙΙΙ-myc-6His με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>.

Προκειμένου να εφαρμόσουμε προσεγγίσεις για τον καθαρισμό και τη μελέτη του υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA που αναλύονται στη συνέχεια (Ενότητα 3.4.5) προχωρήσαμε στον καθαρισμό του τομέα ΙΙΙ τόσο στη μορφή DIII/myc-6His όσο και στη μορφή που δεν φέρει τον C-τελικό επίτοπο.

Οπως αναφέρθηκε στην Ενότητα 3.4.1, ο τομέας ΙΙΙ διαθέτει θέση (ή θέσεις) πρόσδεσης σε Cibacron Blue. Ως εκ τούτου υπερκείμενα κλώνου GS115/DIII υποβλήθηκαν σε διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH 7.5, 500mM NaCl, και χρωματογραφία Blue Sepharose. Τα στάδια καθαρισμού παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.15, όπου φαίνεται ότι η πρόσδεση του υποτομέα ΙΙΙ στη στήλη δεν είναι μεν πλήρης αλλά ανέρχεται τουλάχιστον στο 50%. Η έκλουση με πραγματοποιήθηκε με 2 M NaCl σε δύο διαδοχικά βήματα (Εικόνα 3.15). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.15 (A και B, διαδρομές 3 και 4), η έκλουση των δεσμευμένων μορίων πραγματοποιείται κυρίως στο δεύτερο βήμα. Μετά από συνδυασμό και συμπύκνωση των εκλουσμάτων (από ηθμούς Viva Spin, cutoff 3000 Da), ύστερα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi, pH 7.5, η συγκέντρωση του πρωτεϊνικού παρασκευάσματος ήταν 1.2 μg/μL.

Ο καθαρισμός για τον τομέα III, στην εναλλακτική μορφή DIII-myc -6His, πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>, όπως φαίνεται αναλυτικά στην Εικόνα 3.16.





Εικόνα 3.15 Καθαρισμός του τομέα ΙΙΙ με χρωματογραφία Blue Sepharose. Υπερκείμενο (6 mL) από κλώνο GS115/DIII ύστερα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH 7.5, 500 mM NaCl, υποβλήθηκε σε χρωματογραφία Blue Sepharose (Ενότητα 2.5.5Α). Οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με 20 mM NaPi, pH 7.5, 2 M NaCl, σε δύο διαδοχικά βήματα (διαδρομές 3 και 4). Πριν την ηλεκτροφορητική ανάλυση τους, οι εκλουόμενες πρωτεΐνες είχαν υποβληθεί σε διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi, pH 7.5. Δείγματα που αντιστοιχούν στο 0.3% του αρχικού υπερκειμένου (100 μL) (διαδρομή 1), στο 0.3% του μη δεσμευμένου κλάσματος (διαδρομή 2) και σε ποσότητα 1 μg (διαδρομή 3) και 5 μg καθαρισμένης πρωτεΐνης (διαδρομή 4), υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (15%), χρώση νιτρικού αργύρου (Α) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B).

ATTACK BIBAIOGINA



Χρώση AgNO,

いないない。ための「ない」を見

anti-myc

**Εικόνα 3.16** Καθαρισμός του τομέα ΙΙΙ με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>. Υπερκείμενο (6 mL) από κλώνο GS115/DIII-myc-6His ύστερα από διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi pH=7.5, 500 mM NaCl υποβλήθηκε σε χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup> (**Ενότητα 2.5.4**). Οι πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με 20 mM NaPi, pH 7.5, 500 mM ιμιδαζόλιο, σε δύο διαδοχικά βήματα. Πριν την ηλεκτροφορητική ανάλυση τους, οι εκλουόμενες πρωτεΐνες είχαν υποβληθεί σε διαπίδυση έναντι 20 mM NaPi, pH 7.5. Δείγματα που αντιστοιχούν στο 1.6% του αρχικού υπερκειμένου (100 μL) (διαδρομή 1), 1.6% του μη δεσμευμένου κλάσματος (διαδρομή 2) και 10% της ποσότητας των πρωτεϊνών που εκλούσθηκαν στο πρώτο βήμα (διαδρομή 4) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (15%), χρώση νιτρικού αργύρου (**A**) και ανοσοαποτύπωση με το αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (**B**).



3.4.4 Έλεγχος δραστικότητας GnSAF για τον υποτομέα ΙΙΙΒ και τον τομέα ΙΙΙ σε καθαρισμένα παρασκευάσματα.

Έως τώρα παρουσιάσθηκαν αναλύσεις προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF σε υπερκείμενα κλώνων που εκφράζουν ανασυνδυασμένα πεπτίδια. Με τον τρόπο αυτό δείξαμε ότι υπερκείμενα από κλώνους GS115/DIIIB αλλά και GS115/DIIIBmyc-6His, που εκφράζουν τον υποτομέα IIIB, αναστέλλουν την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH με δοσοεξαρτώμενο τρόπο ενώ δεν επηρεάζουν τη βασική έκκριση LH ή FSH (**Ενότητα 3.1**). Αντίθετα, υπερκείμενα κλώνων GS115/DIII αλλά και GS115/DIII-myc-6His, που εκφράζουν τον τομέα III, δεν επηρεάζουν την GnRHεπαγόμενη έκφραση της LH (**Ενότητα 3.3**). Για να εξετάσουμε αναλυτικότερα και να αποκλείσουμε ή να αξιολογήσουμε την περίπτωση η ανωτέρω διαφορετικούς κλώνους ή και άλλων συστατικών του υπερκειμένου (**Εικόνες 3.2-3.3** και **3.9**), προχωρήσαμε σε μελέτες δραστικότητας σε καθαρισμένα παρασκευάσματα DIIIB και DIII.

Για τον καθαρισμό του υποτομέα ΙΙΙ, όπως είδαμε (Ενότητα 3.4.3), υπερκείμενα κλώνου GS115/DIII υποβλήθηκαν σε χρωματογραφία Blue Sepharose ενώ ο υποτομέας IIIB καθαρίστηκε από υπερκείμενα GS115/DIIIB-myc-6His με στήλες κατιόντων νικελίου (Ενότητα 3.4.2). Δείγματα καθαρισμένου υποτομέα IIIB και καθαρισμένου τομέα ΙΙΙ υποβλήθηκαν σε βιολογικές δοκιμασίες προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης (Εικόνα 3.17A και B) Δόσεις από 0.1 έως 1.25 μg (8 έως 100 pmol) του υποτομέα ΙΙΙΒ προκαλούν αναστολή της GnRHεπαγόμενης έκκρισης της LH σε επίπεδα μεταξύ 67.22 ±10.60% και 53.71 ±8.09% του μάρτυρα ενώ δεν επηρεάζουν τη βασική έκκριση FSH. Αντίθετα σε ίσες ή μεγαλύτερες, κατά γραμμομοριακή βάση, δόσεις (1-10 μg, δηλ. 40-400 pmol), ο τομέας ΙΙΙ δεν επηρεάζει την GnRH-επαγόμενη έκκριση LH, ούτε και τη βασική έκκριση FSH. Οι συγκεντρώσεις του πολυπεπτιδίου ΙΙΙΒ και του τομέα ΙΙΙ, που αντιστοιχούν στις ανωτέρω δόσεις, είναι 16-200nM και 80-800nM αντίστοιχα.

Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τα συμπεράσματα που προέκυψαν από αναλύσεις υπερκειμένων των αντίστοιχων κλώνων (Ενότητες 3.1 και 3.3). Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι το σύστημα έκφρασης-έκκρισης του *P. pastoris* θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για την περαιτέρω ανάλυση δραστικότητας και άλλων ανασυνδυασμένων πεπτιδίων της HSA.



Εικόνα 3.17. Ανάλυση δοσοεξάρτησης για τον τομέα ΙΙΙ και τον υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA. Ποσότητες καθαρισμένων παρασκευασμάτων του υποτομέα ΙΙΙΒ-myc-6His (-Δ-) (8, 40 και 100 pmol) και του τομέα ΙΙΙ ( -4- ) (40, 200, και 400 pmol) μελετήθηκαν ως προς την επίδραση τους στην GnRH-επαγόμενη έκκριση LH (A) και στη βασική έκκριση της FSH (B). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως επί τοις εκατό ποσοστό της LH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες που επωάστηκαν μόνο με 0.1 μM GnRH ή ως επί τοις εκατό ποσοστό της βασικής έκκρισης της FSH που εκκρίνεται από κύτταρα μάρτυρες. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

### 3.4.5 Σχεδιασμός και έκφραση χιμαιρικού τομέα ΙΙΙ.

Ο καθαρισμός του υποτομέα ΙΙΙΒ με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup> (Ενότητα 3.4.2) προσέφερε χαμηλή απόδοση που περιόρισε τη δυνατότητα να μελετήσουμε τη δραστικότητα του μορίου σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (Ενότητα 3.4.4). Παράλληλα, όπως διαπιστώθηκε στην πορεία των πειραμάτων, το ενεργό πεπτίδιο παρουσιάζει δυσκολία στη συντήρηση του ακόμα και σε καθαρή μορφή. Αντίθετα ο τομέας ΙΙΙ εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στον *P. pastoris*, παρουσιάζει σταθερότητα κατά τη συντήρηση και μπορεί να καθαρισθεί είτε με χρωματογραφία Blue Sepharose είτε με στήλες κατιόντων νικελίου (Ενότητα 3.4.3).

Για τους παραπάνω λόγους αναζητήσαμε έναν τρόπο ανάκτησης του υποτομέα ΙΙΙΒ από τον τομέα ΙΙΙ. Σχεδιάσαμε έτσι μια εναλλακτική μορφή του υποτομέα ΙΙΙ στην οποία μεταξύ των υποτομέων ΙΙΙΑ και ΙΙΙΒ εισήχθη εις τριπλούν η αλληλουχία αναγνώρισης του παράγοντα Χα. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκαν δύο εναλλακτικά πεπτίδια με και χωρίς C-τελικό επίτοπο myc-6His ώστε να επιτραπούν δύο, τουλάχιστον, επιπρόσθετες προσεγγίσεις για ανάκτηση του ΙΙΙΒ (**Εικόνα 3.18E**), όπως αναφέρεται ενδεικτικά στη συνέχεια:

#### Πρώτη προσέγγιση:

- Καθαρισμός με Blue Sepharose (η θέση αναγνώρισης για Cibacron Blue του τομέα III εδράζεται στον υποτομέα IIIΑ)
- 2. Πέψη με τον παράγοντα Χα
- 3. Απομάκρυνση του παράγοντα Xa (Xa Removal Resin, QIAGEN)
- Διαχωρισμός των υποτομέων IIIA και IIIB με Blue Sepharose ή με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>
- 5. Ανάκτηση του ΙΙΙΒ

## Δεύτερη προσέγγιση:

- 1. Καθαρισμός με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>
- 2. Πέψη με τον παράγοντα Χα
- 3. Απομάκρυνση του παράγοντα Xa (Xa Removal Resin, QIAGEN)
- Διαχωρισμός του IIIB-myc-6His από το IIIA με χρωματογραφία συγγένειας Ni<sup>2+</sup>
- 5. Ανάκτηση του IIIB-myc-6His

Χρησιμοποιώντας PCR δύο σταδίων (Ενότητα 2.2.3) δημιουργήθηκαν ανασυνδυασμένα cDNA που κωδικοποιούν για το πολυπεπτίδιο IIIAXaIIIB και το

IIIAXaIIIB-myc-6His. Συγκεκριμένα, το cDNA που κωδικοποιεί για τον υποτομέα IIIA και αυτό που κωδικοποιεί για τον IIIB ανακτήθηκαν από το πλασμίδιο pPICZaA/DIII σε ένα πρώτο στάδιο PCR (Εικόνα 3.18Α). Παράλληλα το τμήμα DNA που κωδικοποιεί για την τριπλή θέση αναγνώρισης Xa δημιουργήθηκε με υβριδισμό δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων κατάλληλα σχεδιασμένων ώστε γα, δημιουργούνται συμπληρωματικά άκρα με το τμήμα cDNA που αντιστοιχεί στο HIA και το τμήμα που αντιστοιχεί στο IIIB (Ενότητα 2.2.3). Σε ένα δεύτερο στάδιο PCR τα τρία τμήματα DNA υβριδίζουν λόγω των επικαλυπτόμενων άκρων και με τη χρήση εξωτερικών εκκινητών και δίνουν το επιθυμητό τελικό προϊόν 650 ζευγών βάσεων (Εικόνα 3.18B). Το ανασυνδυασμένο DNA που προκύπτει κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPICZaA (Εικόνα 3.18Γ) και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια pPICZaA/ IIIAXaIIIB pPICZaA/ IIIAXaIIIB-myc-6His και χρησιμοποιήθηκαν για το μετασχηματισμό του στελέχους GS115 του P. pastoris. Τα στελέχη GS115/ IIIAXaIIIB και GS115/ IIIAXaIIIB-myc-6His αναπτύχθηκαν παρουσία μεθανόλης για επαγωγή της έκφρασης. Υπερκείμενα από τους κλώνους που προέκυψαν αναλύθηκαν με SDS-PAGE 15% χρώση νιτρικού αργύρου και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι HSA (Abcam Ab1217). Από τους κλώνους, που αναλύθηκαν μόνο κλώνοι GS115/ IIIAXaIIIB-myc-6His βρέθηκαν θετικοί ως προς την έκφραση του ανασυνδυασμένου πεπτιδίου. Στην Εικόνα 3.18Δ, παρουσιάζεται η ανάλυση υπερκειμένου του κλώνου GS115/ IIIAXaIIIB-myc-6His που παρουσίασε την υψηλότερη έκφραση.

Παρά το γεγονός ότι το πολυπεπτίδιο IIIAXaIIIB-myc-6His εκφράζεται στον *P.* pastoris, τα επίπεδα έκφρασης δεν ήταν επαρκή ώστε να επιτρέψουν τα επόμενα στάδια καθαρισμού και πρωτεολυτικής ανάκτησης του IIIB που είχαν σχεδιαστεί.



6



Εικόνα 3.18 Κατασκευή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pPICZaA/ IIIAXaIIIB-myc-6His και έκφραση του πολυπεπτιδίου IIIAXaIIIB-myc-6His στον *P. pastoris*. Τα τμήματα cDNA που κωδικοποιούν για τους υποτομείς IIIA και IIIB ανακτήθηκαν σε ένα πρώτο στάδιο PCR (A, διαδρομές I, 3) ενώ το τμήμα DNA που κωδικοποιεί για την τριπλή θέση αναγνώρισης Xa δημιουργήθηκε με υβριδισμό δύο συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων (A, διαδρομή 2). Στο δεύτερο στάδιο PCR τα τρία τμήματα DNA υβριδίζουν και επεκτείνονται για να δώσουν το τελικό προϊόν (B). Το ανασυνδυασμένο DNA κλωνοποιήθηκε στον φορέα pPICZaA και τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια ελέγθηκαν με περιοριστική ανάλυση (Γ). Υπερκείμενο (0.1 mL) από τον κλώνο GS115/IIIAXaIIIB-myc-6His που υποβλήθηκε σε SDS-PAGE (15%), χρώση νιτρικού αργύρου (Δ, δεξιά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι HSA (Abcam Ab1217) (Δ, αριστερά).

# <u>Πρώτη προσέγγιση</u>



ことなるというというというないないないないないないないないのであっていないので

Εικόνα 3.18Ε. Σχηματική αναπαράσταση των προσεγγίσεων καθαρισμού του χιμαιρικού συρέα ΙΙΙ και της ανάκτησης του υποτομέα ΙΙΙΒ από αυτόν.

# 3.5 ΕΚΦΡΑΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΟΥ ΙΙΙΒ

# 3.5.1 Τα κατάλοιπα 490-508 του Ν-τελικού άκρου του ΙΙΙΒ δεν είναι απαραίτητα για την δραστικότητα GnSAF

•. Κατά την απομόνωση της δραστικότητας GnSAF από ωοθυλακικό υγρό γυναικών (Pappa et al., 1999), δεν εδόθη επακριβής προσδιορισμός του Ν-τελικού άκρου του δραστικού πεπτιδίου που απομονώθηκε, αν και εδείχθη ότι αντιστοιχεί στην C-τελική περιοχή αλληλουχίας της HSA. Θεωρητικοί υπολογισμοί στηριζόμενοι στο φαινόμενο μοριακό βάρος του πεπτιδίου σε συνδυασμό με προσδιορισμό ορισμένων θρυψινικών τμημάτων του με φασματομετρία μαζών (MS) υπέδειξαν ότι το πεπτίδιο αντιστοιχεί στο τελικό 95πεπτίδιο της HSA (Pappa et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, βέβαια, δείξαμε ότι το προταθέν αυτό πολυπεπτίδιο (490-585) είναι ενεργό, όταν εκφρασθεί σε ανασυνδυασμένη μορφή, και αντιστοιχεί κατά προσέγγιση στον υποτομέα IIIB της HSA (Evóτητες 3.1 και 3.4). Ωστόσο, παραμένει το ενδεχόμενο η μορφή του IIIB που απαντάται στο ωοθυλακικό υγρό να είναι στην πραγματικότητα ένα πεπτίδιο μεγαλύτερο ή μικρότερο από το 95πεπτίδιο 490-585.

Στη φάση αυτή, θελήσαμε να μελετήσουμε περαιτέρω την Ν-τελική περιοχή του υποτομέα IIIB σε σχέση με την παρατηρούμενη δραστικότητα GnSAF. Σύμφωνα με τη δομή της HSA (He and Carter, 1992, <u>www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/cath</u>), η Ντελική περιοχή του υποτομέα IIIB μεταξύ των καταλοίπων 490 και 510 συνιστά εκτεταμένη επιφάνεια (extended loop). Με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA αφαιρέσαμε τα κατάλοιπα 490-508 της Ν-τελικής εκτεταμένης επιφάνειας του IIIB δημιουργώντας μια εναλλακτική μορφή του IIIB.

Όπως και για κάθε άλλο πεπτίδιο που αναφέρθηκε έως τώρα, δημιουργήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση δύο μορφές, με και χωρίς C-τελικό επίτοπο myc-6His. Όπως φαίνεται από την ανάλυση υπερκειμένων κλώνων GS115/HSA(509-585) και GS115/HSA(509-585)-myc-6His (Εικόνα 3.19A και B), παρά την απομάκρυνση του N-τελικού άκρου τα πεπτίδια εκφράζονται στο σύστημα του *P. pastoris*.

Στη συνέχεια, ακολούθησαν βιολογικές δοκιμασίες προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης σε δόσεις αντίστοιχες με αυτές που μελετήθηκαν για τον υποτομέα IIIB (10 έως 25 μL) (Εικόνα 3.19B). Και στις δύο μορφές του πεπτιδίου [HSA(509-585) και HSA(509-585)-myc-6His] η δραστικότητα GnSAF φαίνεται ότι διατηρείται καθώς σε δόσεις 25 μL η αναστολή της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH ανέρχεται σε 47.42 ± 9.01% (n=3) και 48.74 ± 6.68% (n=6) του μάρτυρα, αντίστοιχα (δραστικότητα GnSAF, 53.51 ± 14.02% και 59.33 ± 11.46% αντίστοιχα). Στις ίδιες δόσεις, δεν παρουσιάζεται δραστικότητα ανασταλτίνης για κανένα από τα δύο πεπτίδια (Εικόνα 3.19Γ).

..... 2 . . . · • • • برجو المعرب ÷ . . . ÷. . 17 A. · · · • . :; Lo a privere . . . . · · · · · · · 

 $\left\{ i \right\}$ 



. . . .



**Εικόνα 3.19** Έκφραση του πεπτιδίου 509-585 HSA στον *P.pastoris* και έλεγχος δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους, GS115/(HSA509-585)-myc-6His (A), GS115/(HSA509-585) και GS115/empty vector (B) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A και B, αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (A και B, δεξιά). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/(HSA509-585)-myc-6His (-) και GS115/(HSA509-585) (-A —), αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε δόσεις από 10 έως 25 μL/φρεάτιο (Γ). Στις ίδιες δόσεις μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση στη βασική έκκριση της FSH (Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.



GnSAF φαίνεται ότι διατηρείται καθώς σε δόσεις 25 μL η αναστολή της επαγόμενης από GnRH έκκρισης της LH ανέρχεται σε 47.42 ± 9.01% (n=3) και 48.74 ± 6.68% (n=6) του μάρτυρα, αντίστοιχα (δραστικότητα GnSAF, 53.51 ± 14.02% και 59.33 ± 11.46% αντίστοιχα). Στις ίδιες δόσεις, δεν παρουσιάζεται δραστικότητα ανασταλτίνης για κανένα από τα δύο πεπτίδια (Εικόνα 3.19Γ).





**Εικόνα 3.19** Έκφραση του πεπτιδίου 509-585 HSA στον *P.pastoris* και έλεγχος δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους, GS115/(HSA509-585)-myc-6His (A), GS115/(HSA509-585) και GS115/empty vector (B) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A και B, αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (A και B, δεξιά). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/(HSA509-585)-myc-6His (- $\phi$ --) και GS115/(HSA509-585) (-A--), αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε δόσεις από 10 έως 25 μL/φρεάτιο (Γ). Στις ίδιες δόσεις μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση στη βασική έκκριση της FSH (Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

A Codyle

小学に書き

HUNHLEH BIBALOOHIKH

3.5.2 Η C-τελική α-έλικα του υποτομέα IIIB είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα GnSAF

Στα πλαίσια της συσχέτισης της δραστικότητας GnSAF με τη δομή του υποτομέα IIIB και του εντοπισμού περιοχών της αλληλουχίας που είναι ουσιώδεις για τη δραστικότητα προχωρήσαμε στη μελέτη της C-τελικής περιοχής του μορίου. Ο υποτομέας IIIB, στο μοριακό περιβάλλον της HSA (He and Carter, 1992), διαθέτει δύο κύριες α-έλικες που ακολουθούνται από μία τρίτη στο C-τελικό άκρο (κατάλοιπα 466-585). Είναι ενδιαφέρον ότι τμήμα της τρίτης αυτής έλικας είναι δυνατόν να μην συμπεριλαμβάνεται στον υποτομέα IIIB της HSA, βάσει in silico αναλύσεων (πρόγραμμα Cath). Προκειμένου να διερευνήσουμε τη σημασία της C-τελικής αέλικας διακόψαμε τη συνέχεια της αφαιρώντας τα κατάλοιπα 573-585 με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA (Ενότητα 2.2).

Σχεδιάσαμε την έκφραση στον *P. pastoris* του πολυπεπτιδίου 495-572 σε δύο εναλλακτικές μορφές, με ή χωρίς καρβοξυτελικό επίτοπο myc-6His και δημιουργήσαμε κλώνους GS115/HSA(495-572) και GS115/HSA(495-572)-myc-6His. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.20** (**A** και **B**), το πεπτίδιο εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα αντίστοιχα του IIIB (και στις δύο εναλλακτικές μορφές του), παρά την έλλειψη της C-τελικής α-έλικας.

Από την άλλη πλευρά η απώλεια της έλικας φαίνεται να έχει καθοριστική σημασία για τη δραστικότητα καθώς αυτή απουσιάζει εντελώς στο πολυπεπτίδιο 495-572 και στις δύο μορφές του. Αναλύσεις δοσοεξάρτησης για υπερκείμενα κλώνων GS115/(HSA495-572) και GS115/(HSA495-572)-myc-6His (Εικόνα 3.20Γ) έδειξαν ότι ακόμα και σε μεγαλύτερες δόσεις (15 έως 35 μL) σε σχέση με τον υποτομέα IIIB, το πολυπεπτίδιο 495-572 δεν παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF και δεν επηρεάζει τη βασική έκκριση της FSH (Εικόνα 3.20Γ).





**Εικόνα 3.20** Έκφραση του πεπτιδίου 495-572 HSA στον *P. pastoris* και έλεγχος δραστικότητας GnSAF. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/empty vector, GS115/(HSA495-572)-myc-6His (A) και GS115/(HSA495-572) (B) υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (A και B, αριστερά) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του επιτόπου myc (9E10) (A) και έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (B). Υπερκείμενα από τους κλώνους GS115/(HSA495-572)-myc-6His ( $-\Phi$ -) και GS115/(HSA495-572) (-A-), αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε δόσεις 15, 25 και 35 μL/φρεάτιο (Γ). Στις ίδιες δόσεις μελετήθηκε παράλληλα η επίδραση στη βασική έκκριση της FSH (Δ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ±SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

3.5.3 Το πολυπεπτιδικό προϊόν ενός εναλλακτικού μεταγραφήματος της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF

Η μελέτη του υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA ως ενός ενεργού μορίου με δραστικότητα GnSAF η οποία όμως δεν διατηρείται στο πλήρες μόριο της HSA ή σε τομείς (domains) της HSA όπως τον DIII (Ενότητες 3.1-3.4), μας προέτρεψε να διερευνήσουμε την πιθανή ύπαρξη εναλλακτικών μεταγραφημάτων (alternatively spliced forms) της HSA που να κωδικοποιούν το IIIB ή πεπτίδια αντίστοιχα του IIIB.

Αναζητώντας σε βάσεις δεδομένων (EASED-Enhanced alternatively spliced EST database; <u>http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/cgi-bin/</u>), τα καταγεγραμμένα εναλλακτικά μεταγραφήματα της HSA ανακαλύψαμε την ύπαρξη του cDNA κλώνου RZPD IMAGp958K021545Q2 (<u>www.rzpd.de/cgi-bin/products/getGene.pl.cgi</u>). Ο κλώνος αυτός αντιστοιχεί σε εναλλακτικό μεταγράφημα της HSA που περιέχει τα κωδικόνια 1-23 από τα εξώνια 1-3 και, χωρίς μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, τα κωδικόνια 483-585 από τα εξώνια 12-14 της HSA (δηλ. 1-23^483-585).

Αρχικά η αλληλουχία-στόχος ανακτήθηκε με PCR από τον φορέα pDNR-LIB όπου ήταν κλωνοποιημένη (IMAGp958K021545Q2) και υποκλωνοποιήθηκε στον φορέα έκφρασης pPICZaA. Με ανάγνωση της αλληλουχίας από την θέση περιορισμού *EcoR*I έως και την *Not*I σε αυτόματο αναλυτή (DNA sequencer, MWG-Biotech) επιβεβαιώθηκε ότι ο κλώνος RZPD IMAGp958K021545Q2 πράγματι αντιστοιχεί στα κωδικόνια 1-23^483-585 (**Εικόνα 3.21**).

Στη συνέχεια, ακολούθησε έκφραση του πολυπεπτιδίου 1-23^483-585 (το οποίο θα αποκαλούμε, για συντομία, DIIIBest) στο σύστημα του P. pastoris, αφού δημιουργήθηκαν μετασχηματισμένοι κλώνοι GS115/DIIIBest. Υπερκείμενα διαφορετικών κλώνων GS115/DIIIBest, αναλύθηκαν με SDS-PAGE (18%) και ακολούθησε χρώση νιτρικού αργύρου και ανοσοαποτύπωση με πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της HSA. Στην Εικόνα 3.22Α φαίνεται η ανάλυση υπερκειμένων τριών διαφορετικών κλώνων GS115/DIIIBest. Η χρώση με νιτρικό άργυρο δεν αποκαλύπτει υπερέκφραση για το πολυπεπτίδιο DIIIBest, αλλά όπως φαίνεται από την εικόνα της ανοσοαποτύπωσης (anti-HSA, Abcam Ab1217) το πεπτίδιο εκφράζεται σε ικανοποιητικά επίπεδα. Υπερκείμενα δύο διαφορετικών κλώνων GS115/DIIIBest υποβλήθηκαν βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού σε δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης. Όπως φαίνεται ενδεικτικά στην Εικόνα 3.22B, το πεπτίδιο DIIIBest αναστέλλει την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH

με δοσοεξαρτώμενο τρόπο. Η παρατηρούμενη αναστολή κυμαίνεται από 72.25 ± 6.46% έως και 51.2 ± 5.1% του μάρτυρα σε δόσεις από 5 έως  $25\mu$ L (δραστικότητα GnSAF στα  $25\mu$ L, 54.57 ± 5.57%). Αντίθετα, όπως και το IIIB, το πολυπεπτίδιο DIIIBest δεν επηρεάζει τη βασική έκκριση της FSH (Εικόνα  $3.22\Gamma$ ).

10 20 20 60 50 60 70 60 90 100 ЖАЕ Е ТЕЛАСА БЕС ГАТ БСТТТТСА БСТ СТ Б БАЛАБТС БАТ БАЛАСАТА С ЕТТССАЛА БА БТТТААТ БСТ БАЛАСАТТСА СС ТТССА ТБ СА БАТАТАТ БС • •

<u>a la mala mala mala mana de la cana a cana de cana de la cana de la cana de c</u>

Εικόνα 3.21 Επιβεβαίωση του κλώνου RZPD IMAGp958K021545Q2 με ανάλυση της αλληλουχίας DNA (DNA sequencer, MWG-Biotech, Ebersberg, Germany) (κωδικόνια 1-23, σειρά 1, κωδικόνια 483-585, σειρές 1-4).



Εικόνα 3.22 Έκφραση του πεπτιδίου DIIIBest (κατάλοιπα 1-23^483-585) στον *P.pastoris* και έλεγχος δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/DIIIBest υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA (A). Υπερκείμενα GS115/DIIIBest, αναλύθηκαν επίσης ως προς τη δραστικότητα GnSAF (-- $\phi$ --) σε δόσεις από 5 έως 25 μL/φρεάτιο (**B**) και ως προς τη δραστικότητα ανασταλτίνης (-- $\Delta$ --) (**Γ**). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

NEILIZTH

3.5.4 Το μεγαλύτερο του ΙΙΙΒ πολυπεπτίδιο 464-585 που αντιστοιχεί σε C-τελικό τμήμα του τομέα ΙΙΙ παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF

Οπως είδαμε (Ενότητες 3.5.1 και 3.5.3), το Ν-τελικό άκρο του υποτομέα ΙΙΙΒ μπορεί να υποστεί συγκεκριμένες τροποποιήσεις χωρίς απώλεια της δραστικότητας. Ούτε η απομάκρυνση της Ν-τελικής εκτεταμένης πτυχωτής επιφάνειας, στο πεπτίδιο 509-585 (Ενότητα 3.5.1), ούτε η παρουσία 30 επιπλέον καταλοίπων στο πεπτίδιο DIIIBest (Ενότητα 3.5.3) οδηγούν σε απώλεια δραστικότητας. Θέλοντας να διερευνήσουμε τη σημασία των 30 επιπλέον καταλοίπων που διαθέτει το πεπτίδιο DIIIBest σε σχέση με τον υποτομέα ΙΙΙΒ μελετήσαμε ένα ακόμη πεπτίδιο με αντίστοιχη επέκταση καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο. Συγκεκριμένα, επιλέξαμε να εκφράσουμε το πεπτίδιο 464-585 της HSA (ή DIIIBMAX), για το οποίο in silico avαλύσεις (Geno3D) υπέδειξαν ότι παρουσιάζει μεγάλη δομική ομοιότητα με το DIIIBest.

Όπως και προηγουμένως, δημιουργήθηκαν κλώνοι GS115/DIIIBMAX και υπερκείμενα από αυτούς, ύστερα από επαγωγή της έκφρασης, αναλύθηκαν με SDS-PAGE (18%). Η χρώση νιτρικού αργύρου που ακολούθησε, αλλά και η ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι HSA (Abcam 1217), αποκάλυψε τη ζώνη υπερέκφρασης στο αναμενόμενο μοριακό βάρος (Εικόνα 3.23Α).

Υπερκείμενα από κλώνους GS115/DIIIBMAX υποβλήθηκαν και σε αυτή την περίπτωση σε δοκιμασίες προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης σε δόσεις (5-20 μL), αντίστοιχες με αυτές που ελέγχθηκαν για τον υποτομέα IIIB και για το πεπτίδιο DIIIBest. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.23Γ, το πεπτίδιο DIIIBMAX αναστέλλει την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH σε επίπεδα μεταξύ 78.09 ± 16.56% και 56.50 ± 5.25% του μάρτυρα (δόσεις 5-20 μL). Η δραστικότητα GnSAF που παρουσιάζει η δόση των 20μL είναι 50.19 ± 6.06%. Παράλληλη μέτρηση της βασικής έκκρισης της FSH έδειξε ότι αυτή δεν επηρεάζεται από το πεπτίδιο DIIIBMAX, στις αντίστοιχες δόσεις δειγμάτων (5-20 μL).





**Εικόνα 3.23** Έκφραση του πεπτιδίου DIIIBMAX (κατάλοιπα 464-585) στον *P.pastoris* και έλεγχος δραστικότητας. Υπερκείμενα καλλιέργειας (0.1 mL) από κλώνους GS115/empty vector, GS115/DIIIMAX υποβλήθηκαν σε SDS-PAGE (18%) και αναλύθηκαν με χρώση νιτρικού αργύρου (**A**) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της HSA (Abcam Ab1217) (**B**). Υπερκείμενα από κλώνους GS115/DIIIMAX σε δόσεις από 5 έως 20μL/φρεάτιο αναλύθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF (--•-) (Γ) και ως προς τη δραστικότητα ανασταλτίνης (-Δ--) (Γ). Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ±SEM τριών μετρήσεων. Η οριζόντια διαγραμμισμένη ζώνη υποδηλώνει το εύρος τιμών του μάρτυρα.

NEILIZTH

- デーション いっしょう

Κλώνος P. pastoris	Δραστικότητα GnSAF (%)
GS115/DIIIB-1	82 ± 5 (n=6)
• GS115/DIIIB-myc-6His-1	77 ± 8 (n=3)
GS115/DIIIB-3	68 ± 5 (n=3)
GS115/(HSA509-585)-myc-6His	59 ± 11 (n=6)
GS115/DIIIBest	$56 \pm 6 (n=3)$
GS115/DIIIBmyc6His-2	56 ± 4 (n=3)
GS115/(HSA509-585)	54 ± 14 (n=3)
GS115/DIIIBMAX	$50 \pm 6 (n=3)$
GS115/DIIIB-2	$50 \pm 9 (n=3)$
GS115/empty vector	$15 \pm 7 (n=6)$
GS115/DIIImyc6His-1	$14 \pm 3 (n=3)$
GS115/DIII-1	9 ± 7 (n=3)
GS115/Albumin	4 ± 11 (n=3)

Πίνακας 3.1 Υπερκείμενα καλλιέργειας (25 μL)από κλώνους *P. pastoris* ύστερα από επαγωγή, υποβλήθηκαν σε δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF όπως περιγράφεται στα υλικά και μεθόδους.

Η δραστικότητα GnSAF υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο [1-A/B] % όπου

A= LH (ng/mL) [GRRH +  $\delta ciy \mu a$ ] - LH (ng/mL) Basuch éncritan kai

B= LH (ng/mL) GnRH- LH (ng/mL) Baoiking Exception

Οι τιμές αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ± S.E.M. από 3 έως 6 μετρήσεις, όπως αναφέρεται

AN Employees to preservation and there is an all the contract of the contract

Andreas and the second of the second secon

TYZHTHΣH

a na seconda de la constante d La constante de la constante de

A CARLES the second second and the second s W. Carlinson to the second THE REAL STREET the state of the second s ALT A DESCRIPTION OF PRESERVATION OF THE REPORT Constant and an and a constant the second ALL DOCTOR The Artes and the second TO DE TO a land the second s 

4.1 Συσχέτιση του παράγοντα άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών με το C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού

Η έρευνα για την απομόνωση και ταυτοποίηση του παράγοντα άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF) έχει εμφανώς ιδιαίτερη σημασία για την κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται στη ρύθμιση του εμμηνορυσιακού κύκλου και έντονη αξία εφαρμογής ως προς την βελτίωση των τεχνικών τεχνητής γονιμοποίησης. Παρότι όμως η ταυτοποίηση του παράγοντα αποτελεί σημαντικό ζητούμενο, οι μελέτες απομόνωσης από βιολογικά υγρά δεν οδήγησαν μέχρι σήμερα σε σαφή συμπεράσματα σχετικά με τη φύση του μορίου.

Από τις πρώτες κιόλας μελέτες, που επικεντρώθηκαν στην κλασμάτωση ωοθυλακικού υγρού και στον σχετικό προσδιορισμό του μοριακού βάρους του παράγοντα, τα αποτελέσματα ήταν αντιφατικά. Η δραστικότητα GnSAF έχει ανιχνευθεί ανά περίπτωση σε κλάσματα με μοριακό βάρος από 10 έως και περισσότερο από 100 kDa. Στις μελέτες αυτές, διέφερε τόσο το βιολογικό υλικό που ήταν ωοθυλακικό υγρό βοός (de Jong et al., 1979; Danforth and Cheng, 1994) ανθρώπου (Knight et al., 1990; Fowler et al., 1992) ή χοίρου (Danforth and Cheng, 1993), όσο και οι χρωματογραφικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Έκτοτε, πραγματοποιήθηκαν πιο συστηματικές μελέτες απομόνωσης του GnSAF που οδήγησαν σε τέσσερις διαφορετικές προτεινόμενες αλληλουχίες (Tio et al., 1994; Danforth and Cheng 1995; Pappa et al., 1999; Fowler et al., 2002). Eva βασικό μειονέκτημα στις εργασίες των Tio, Danforth and Cheng, και Fowler ήταν ότι η προσπάθεια ταυτοποίησης των απομονωμένων πρωτεϊνών στηρίχθηκε σε ανάλυση κατά Edman ενώ οι προταθείσες αλληλουχίες δεν παρουσιάζουν σημαντική ομολογία καμία αλληλουγίας ανθρώπινου προς περιοχή του γονιδιώματος (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome//seq). Etállov, το κλάσμα που απομονώθηκε από τον Τίο και τους συνεργάτες του από υπερκείμενο κυττάρων Sertoli, παρουσίαζε παράλληλα με τη δραστικότητα GnSAF και δραστικότητα ανασταλτίνης γεγονός που υποδηλώνει πως ο καθαρισμός δεν ήταν πλήρης. Σε αντίθεση με τις παραπάνω εργασίες, κατά την απομόνωση της δραστικότητας GnSAF από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (Pappa et al., 1999), η αλληλουχία του καθαρισμένου παρασκευάσματος αναλύθηκε με φασματοφωτομετρία μαζών (MS) και συσχέτισε τη

δραστικότητα με το C-τελικό 95πεπτίδιο της HSA. Τα αποτελέσματα της παρούσας Διατριβής συμφωνούν με την παραπάνω μελέτη. Για πρώτη φορά, μια από τις προτεινόμενες αλληλουχίες GnSAF, που είχε προκύψει βάσει της απομόνωσης της δραστικότητας αυτής από βιολογικό υλικό, επιβεβαιώνεται, στην παρούσα Διατριβή, με τεχνικές ανασυνδυασμένου DNA και χρήση ενός ετερόλογου συστήματος έκφρασης.

Οι διαφορετικές αλληλουχίες που είχαν προταθεί (Tio et al., 1994; Danforth and Cheng 1995; Fowler et al., 2002) μπορεί να οφείλονται σε διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ειδών και πηγών προέλευσης της δραστικότητας GnSAF ή να πρόκειται για μη σχετιζόμενες με τον GnSAF πρωτεΐνες που συνεκλούονται κατά τα στάδια χρωματογραφίας. Εν τούτοις, ένα σημαντικό ενδεχόμενο που θα πρέπει να εξεταστεί είναι η δραστικότητα GnSAF στον οργανισμό να εκδηλώνεται από περισσότερα του ενός πρωτεΐνικά μόρια.

Η παρατήρηση ότι το C-τελικό άκρο της HSA παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF δημιούργησε νέα ερωτήματα σχετικά με το μόριο της αλβουμίνης και τη δράση του. Η HSA ανήκει στην οικογένεια των αλβουμινών που περιλαμβάνει επίσης την α-εμβρυσπρωτεΐνη, την αφαμίνη και την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D. Η HSA είναι κυρίως γνωστή για την ικανότητα της να προσδένει και να μεταφέρει διάφορα μόρια όπως λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, φάρμακα, στεροειδή κ.ά. (Peters, 1996). Πέραν της πρόσδεσης και μεταφοράς μορίων στην κυκλοφορία, υπάρχουν στοιχεία και για άλλες λειτουργίες της αλβουμίνης (βλ. Εισαγωγή), που δείχνουν ότι η αλβουμίνη, αν και ιδιαίτερα μελετημένο μόριο, μπορεί να έχει άγνωστες έως σήμερα λειτουργίες. Για να αναφέρουμε ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα, η αλβουμίνη έχει συσχετιστεί με το φαινόμενο της απόπτωσης αν και ο ρόλος της δεν είναι ξεκαθαρισμένος (Zoellner et al., 1996; Erkan et al., 2001; Jones et al., 2003). Επιπρόσθετα, έχει δειχθεί ότι παρουσιάζει ενζυμική δράση σε μόρια με τα οποία συνδέεται (Watanade et al., 2000) και μπορεί να επαυξάνει την επαγόμενη από LH παραγωγή προγνενολόνης από τα κύτταρα Leydig (Melsert et al., 1988, 1989, 1991).

Σύμφωνα με in silico αναλύσεις που πραγματοποιήσαμε, το πολυπεπτίδιο που απομονώθηκε από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό ως μόριο με δραστικότητα GnSAF (Pappa et al., 1999) αντιστοιχεί στον υποτομέα IIIB της HSA. Μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί για κάποιον από τους τομείς και υποτομείς της HSA κάποια ειδική βιολογική δραστικότητα. Επιπλέον δεν είναι γνωστό αν οι υποτομείς της HSA είναι δομικά ανεξάρτητοι μόρια καθώς δεν έχει καταγραφεί στο παρελθόν η έκφραση τους. Η πιθανότητα ένας υποτομέας της HSA να είναι δομικά ανεξάρτητο μόριο και να παρουσιάζει ανεξάρτητη βιολογική δράση είναι μια ενδιαφέρουσα προοπτική που αποτέλεσε το εφαλτήριο για την παρούσα εργασία.

# 4.2 Ένας υποτομέας της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού παρουσιάζει ανεξάρτητη βιολογική δράση

Προκειμένου να διερευνήσουμε αν πράγματι ο υποτομέας ΙΙΙΒ της HSA μπορεί να παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF, ακολουθήσαμε μια εναλλακτική προσέγγιση σε σχέση με τις έως τώρα χρησιμοποιούμενες για την ταυτοποίηση του παράγοντα. Αποφασίσαμε να εκφράσουμε το εν λόγω μόριο σε ένα ετερόλογο σύστημα έκφρασης, αποφεύγοντας στη φάση αυτή τη μελέτη πολύπλοκων βιολογικών υλικών όπως το ωοθυλακικό υγρό.

Εκφράζοντας το πολυπεπτίδιο 490-585 (υποτομέας IIIB) στο ευκαρυωτικό σύστημα του *P. pastoris*, διαπιστώσαμε ότι το πεπτίδιο παράγεται σε υψηλά επίπεδα, ως ανεξάρτητο μόριο, στο υπερκείμενο καλλιέργειας του μύκητα. Δείξαμε ότι υπερκείμενα καλλιέργειας που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο προκαλούν σημαντική αναστολή της GnRH-επαγόμενης έκκρισης LH χωρίς να επηρεάζουν τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών, χαρακτηριστικά που αντιστοιχούν σε δραστικότητα GnSAF. Η παρατηρούμενη δραστικότητα GnSAF του υποτομέα IIIB δεν μπορεί να αποδοθεί σε παράγοντες που εκκρίνονται από τον μύκητα καθώς υπερκείμενα από το αρχικό στέλεχος GS115 και το στέλεχος που έχει μετασχηματιστεί μόνο με τον φορέα έκφρασης (empty vector), δεν επηρεάζουν την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH.

Ένα σημαντικό επιπλέον στοιχείο δείχνει ότι η ανωτέρω δραστικότητα GnSAF αποδίδεται αποκλειστικά στο ανασυνδυασμένο μόριο: η δραστικότητα αναστέλλεται όταν το ενεργό υπερκείμενο προεπωάζεται με αντίσωμα έναντι HSA το οποίο αναγνωρίζει τον υποτομέα IIIB. Τέλος, η δραστικότητα του πολυπεπτιδίου είναι εμφανής και σε καθαρισμένο παρασκεύασμα, όπου δείχθηκε ότι το DIIIB είναι δραστικό σε συγκεντρώσεις της τάξης των 16-200 nM, δηλ. συγκεντρώσεις παρόμοιες με αυτές που λειτουργεί η GnRH, είτε σε γοναδοτρόπα κύτταρα της σειράς LβT2 (Liu et al., 2002; Nguyen et al., 2004) είτε σε κύτταρα πρωτογενών

καλλιεργειών υπόφυσης (Pappa et al., 1999; Fowler et al., 2002; Tavoulari et al., 2004) (10-100 nM).

#### 4.3 Μελέτη σχέσεων δομής-λειτουργίας του υποτομέα ΙΙΙΒ της HSA

Προχωρώντας σε περαιτέρω ανάλυση του ενεργού πολυπεπτιδίου με το ίδιο σύστημα μελέτης, δημιουργήσαμε εναλλακτικές μορφές του υποτομέα ΙΙΙΒ (βλ. Εικόνα 4.1). Εκφράσαμε το πολυπεπτίδιο 495-572 και υποβάλλοντας το σε βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF, διαπιστώσαμε ότι είναι πλήρως ανενεργό. Κατά συνέπεια η C-τελική α-έλικα, που απουσιάζει στο πεπτίδιο αυτό (Εικόνα 4.2), φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα GnSAF.

Αντίθετα, η Ν-τελική περιοχή του υποτομέα ΙΙΙΒ μπορεί ευκολότερα να υφίσταται τροποποιήσεις χωρίς απώλεια δραστικότητας. Η απώλεια των καταλοίπων 490-508 της Ν-τελικής εκτεταμένης επιφάνειας στο ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο 509-585, δεν έχει καμία επίδραση στη δραστικότητα του μορίου. Επιπλέον με προσθήκη 26 καταλοίπων από το C-τελικό άκρο του υποτομέα ΙΙΙΑ ή 30 καταλοίπων από Ν-τελικό άκρο του τομέα Ι, εξακολουθεί να παρατηρείται σημαντική δραστικότητα (πεπτίδια DIIIBMAX και DIIIBest αντίστοιχα) (Εικόνα 4.2).

Η παρατηρούμενη δραστικότητα του ΙΙΙΒ φαίνεται να είναι ειδική, καθώς μεγαλύτερα μόρια που περιέχουν το ενεργό πεπτίδιο όπως η HSA και ο τομέας ΙΙΙ της HSA δεν παρουσιάζουν δραστικότητα GnSAF. Όταν εξετάζονται σε καθαρή μορφή, σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες με αυτές που εξετάσθηκε ο υποτομέας ΙΙΙΒ (16-200 nM), η HSA (4-60 nM) και ο τομέας ΙΙΙ (40-800 nM) δεν προκαλούν καμία επίδραση στην GnRH-επαγόμενη έκκριση LH, αλλά ούτε και στη βασική έκκριση FSH. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η δραστικότητα του ΙΙΙΒ δεν μπορεί να οφείλεται σε κάποιο από τα προσδέματα της HSA για τα οποία έχουν χαρτογραφηθεί θέσεις πρόσδεσης εντός του υποτομέα ΙΙΙΒ, δηλ. τα LCFAs (Peters, 1996) ή την θυρεοξίνη (Petitpas et al., 2003). Αντίθετα, θα μπορούσε να οφείλεται σε κάποια άγνωστη μέχρι στιγμής αλληλουχία πρόσδεσης, η οποία θα πρέπει να μην αναγνωρίζεται από το πλήρες μόριο της HSA.

Στο ίδιο σύστημα, του *P. pastoris*, εξετάσαμε αν άλλοι υποτομείς της HSA (IB και IIB) που είναι δομικά ομόλογοι προς τον IIIB (He and Carter, 1992) θα μπορούσαν να εκφρασθούν και αυτοί ως ανεξάρτητα μόρια, και να παρουσιάσουν

ανάλογη δραστικότητα GnSAF. Επιτύχαμε, πράγματι, την έκφραση του υποτομέα IB (αλληλουχία 107-197 της HSA, βάσει in silico αναλύσεων), αλλά δείξαμε ότι ο IB, αντίθετα με τον IIIB, δεν επηρεάζει την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH. Όσον αφορά στον υποτομέα IIB (αλληλουχία 296-385 της HSA, βάσει in silico αναλύσεων), δεν μπορέσαμε να επιτύχουμε ικανοποιητικά επίπεδα έκφρασης στο υπερκείμενο καλλιέργειας του μύκητα, πράγμα που δεν μας επέτρεψε τη μελέτη του μορίου. Πιθανώς ο υποτομέας αυτός να διαφέρει από τους IB και IIB ως προς τη δομική σταθερότητα, ή να απαιτούνται διαφορετικές συνθήκες, όπως διαφορετικό pH στο θρεπτικό μέσο επαγωγής (Dockal et al., 2000), ώστε να επιτευχθεί η σταθερή έκφραση του από τον *P. pastoris*.



Εικόνα 4.1 Συνοπτικός πίνακας των πολυπεπτιδίων που εκφράστηκαν στο σύστημα του *P. pastoris* και μελετήθηκαν ως προς τη δραστικότητα GnSAF. Με κόκκινο χρώμα συμβολίζονται τα ενεργά πολυπεπτίδια, ενώ με μπλέ χρώμα τα μη ενεργά.

Οι πιο χαρακτηριστικές θέσεις πρόσδεσης της HSA έχουν χαρτογραφηθεί στον υποτομέα IIA (Sublow site I, βρόγχοι 4-5) και στον υποτομέα IIIA (Sublow site II, βρόγχοι 7-8) (Sublow, 1976). Παρά την πληθώρα των αναφερόμενων προσδεμάτων της HSA, ο υποτομέας IIIB δεν έχει συσχετιστεί στη βιβλιογραφία παρά μόνο με την πρόσδεση LCFAs και την πρόσδεση θυρεοξίνης (Petitpas et al., 2003). Παρόλα αυτά, είναι πιθανό να εμπλέκεται στην πρόσδεση και άλλων, άγνωστων μέχρι στιγμής, προσδεμάτων, καθώς νέα δεδομένα προστίθενται στη βιβλιογραφία για νέες θέσεις πρόσδεσης της HSA που δεν ήταν γνωστές παλαιότερα (βλ. Lejon et al., 2004).

Ένα από τα γνωστά προσδέματα της αλβουμίνης είναι το Cibacron Blue. Η ιδιότητα αυτή έχει χρησιμοποιηθεί για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό της HSA με στήλες Blue Sepharose. Οι δύο εκ των θέσεων που υπάρχουν έχουν εντοπιστεί στους υποτομείς ΙΙΑ και ΙΙΙΑ (Compagnini et al., 1996) ενώ τουλάγιστον μία ακόμη θέση θα πρέπει να εδράζεται στον τομέα Ι καθώς και οι τρεις τομείς της HSA έχουν καθαριστεί από υπερκείμενα κλώνων P. pastoris με τη χρήση Blue Sepharose (Dockal et al., 1999). Στην παρούσα εργασία, η χρωματογραφία Blue Sepharose γρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό του τομέα ΙΙΙ από υπερκείμενα κλώνων P. pastoris. Παράλληλα, μελετώντας τον υποτομέα ΙΙΙΒ, διαπιστώσαμε ότι δεν φέρει θέσεις πρόσδεσης για Cibacron blue καθώς δεν συνδέεται σε Blue Sepharose. Τα αποτελέσματα αυτά αιτιολογούν τα ευρήματα άλλων ερευνητών (Fowler et al., 2002), οι οποίοι, αφού απομάκρυναν την HSA από ενεργά υπερκείμενα κοκκωδών κυττάρων με Dyematrex Blue (Blue Sepharose), έδειξαν ότι η δραστικότητα GnSAF διατηρείται εξ ολοκλήρου στο μη δεσμευμένο κλάσμα. Βάσει των αποτελεσμάτων της παρούσας διατριβής, είναι πράγματι αναμενόμενο ότι η δραστικότητα GnSAF δεν θα μπορούσε να αποδοθεί στο πλήρες μόριο της HSA (που δεσμεύεται στην Blue Sepharose). Αντίθετα, το ενεργό πολυπεπτίδιο ΙΙΙΒ δεν μπορεί να δεσμευθεί στην στήλη Blue Sepharose, είτε διότι η HSA δεν διαθέτει αντίστοιχη θέση πρόσδεσης εντός της περιοχής IIIB είτε διότι το IIIB λαμβάνει διαφορετική διαμόρφωση όταν εκφράζεται ως δομικά ανεξάρτητο μόριο. A BIBAIOG

Συνδυάζοντας τα παραπάνω δεδομένα, πιστεύουμε ότι η χρωματογραφία Blue Sepharose μπορεί να αποτελέσει χρήσιμο πειραματικό εργαλείο για τον διαχωρισμό της δραστικότητας GnSAF από την αλβουμίνη ή μεγάλα θραύσματα της από βιολογικά υγρά όπως το ωοθυλακικό υγρό. Το μη δεσμευμένο κλάσμα, στο οποίο σύμφωνα με τα παραπάνω αναμένεται να ανιχνεύεται η δραστικότητα GnSAF, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα απλουστευμένο και εμπλουτισμένο υλικό για την απομόνωση και ταυτοποίηση του ενεργού πεπτιδίου.

#### Δράση του υποτομέα IIIB στην υπόφυση

Η αδυναμία απομόνωσης δραστικών μορίων από βιολογικά υλικά δεν έχει επιτρέψει την μελέτη του μηχανισμού δράσης του παράγοντα GnSAF στην υπόφυση. Τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του DIIIB στο ετερόλογο σύστημα του *P. pastoris* και η απομόνωση του πολυπεπτιδίου από το σύστημα αυτό δίνουν για πρώτη φορά τη δυνατότητα παραγωγής και μελέτης ενός μορίου με δραστικότητα GnSAF σε ανασυνδυασμένη μορφή.

Παρά το ότι η μελέτη του μηχανισμού δράσης δεν ήταν στόχος της παρούσας εργασίας, τα πειράματα μας επιτρέπουν την εξαγωγή κάποιων αρχικών συμπερασμάτων για τον τρόπο δράσης του μορίου που θα διευκολύνουν την περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού και ως εκ τούτου αξίζει να αναφερθούν.

Καταρχήν, το πολυπεπτίδιο IIIB δεν είναι πιθανό να έχει μία μη ειδική επίδραση στα κύτταρα της υπόφυσης, εφόσον επηρεάζει ειδικά τα επίπεδα GnRHεπαγόμενης έκκρισης της LH και όχι αυτά της GnRH-επαγόμενης έκκρισης FSH. Βάσει των ανωτέρω, εξάλλου, η ειδική δράση του ΙΙΙΒ θα πρέπει να εκδηλώνεται στα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης. Θεωρητικά, ένα πιθανό ενδεχόμενο σχετικά με τον τρόπο δράσης του είναι να εμπλέκεται στη μεταγωγή σήματος της GnRH συναγωνιζόμενος την πρόσδεση της στον υποδοχέα GnRHR. Προκαταρτικά, ωστόσο, δεδομένα από τα πειράματά μας, υποδηλώνουν ότι αυτό δεν είναι το πιθανότερο ενδεχόμενο: Σύμφωνα με τη βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας που χρησιμοποιούμε, το ενεργό πολυπεπτίδιο προεπωάζεται με τα κύτταρα για 48 ώρες και στη συνέχεια πραγματοποιείται επαγωγή με GnRH παρουσία του πολυπεπτιδίου. Παρατηρήσαμε ότι η προεπώαση των κυττάρων με το ενεργό πεπτίδιο (48 ώρες) είναι επαρκής για την εμφάνιση δραστικότητας και δεν απαιτείται περαιτέρω προσθήκη του κατά τη διάρκεια της επαγωγής με GnRH. Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι το πολυπεπτίδιο IIIB δεν είναι πιθανό να συναγωνίζεται τη GnRH για την πρόσδεση της στον υποδοχέα GnRHR ούτε και να εμπλέκεται στο μονοπάτι καθοδικά της ενεργοποίησης του υποδοχέα. Σε μια τέτοια περίπτωση, η συνεπώαση της GnRH με το πολυπεπτίδιο' ΙΙΙΒ θα ήταν απαραίτητη για την ανίχνευση δραστικότητας.

Περισσότερο πιθανό φαίνεται ότι το DIIIB μετάγει σήματα μέσω πρόσδεσης σε άλλους, ειδικούς υποδοχείς στην επιφάνεια των γοναδοτρόπων κυττάρων.

Καθώς ο GnSAF αναστέλλει την GnRH-επαγόμενη έκκριση της LH, αλλά όχι αυτήν της FSH, η δράση του θα πρέπει να σχετίζεται με τη διαφορική ρύθμιση των β υπομονάδων των γοναδοτροπινών. Ένα πιθανό ενδεχόμενο είναι ο GnSAF να ρυθμίζει τον αριθμό υποδοχέων GnRHR. Αύξηση του αριθμού υποδοχέων GnRHR οδηγεί σε ενίσχυση της έκφρασης της β υπομονάδας της LH (Kaiser et al., 1995). Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα που παρουσιάστηκαν, σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης, ο υποτομέας IIIB της HSA αναστέλλει την GnRHεπαγόμενη έκκριση LH γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογηθεί από την μείωση των υποδοχέων GnRHR.

# 4.4 Νέα δεδομένα και προοπτικές για τη μελέτη του παράγοντα άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών

Το σύστημα που επιλέξαμε για την έκφραση του C-τελικού 95πεπτιδίου της HSA ήταν το ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης-έκκρισης που χρησιμοποιεί τον μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα *P. pastoris*. Το σύστημα του *Pichia pastoris* έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την εκκρινόμενη έκφραση ανθρώπινων και όχι μόνο πρωτεϊνών όπως η ανθρώπινη CD38 (Fryxell et al., 1995), η εντεροκινάση (Vozza et al., 1996), η καρβοξυπεπτιδάση B (Despreaux and Manning, 1993) και άλλες. Καθοριστικής σημασίας για την επιλογή του συστήματος ήταν το γεγονός ότι έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για την έκφραση του μορίου της HSA (Barr et al., 1992) και των τομέων της I, II και III (Dockal et al., 1999). Εκτός από τα υψηλά επίπεδα έκφρασης οι τομείς I, II και III εκφραζόμενοι στο συγκεκριμένο σύστημα διατηρούν τη διαμόρφωση που διαθέτουν στο περιβάλλον της HSA καθώς και τις ιδιότητες πρόσδεσης διαφόρων προσδεμάτων.

Ένα ακόμα πλεονέκτημα του συστήματος που αποδείχθηκε καθοριστικό για την πορεία της παρούσας μελέτης είναι τα πολύ χαμηλά επίπεδα φυσικών εκκρινόμενων πρωτεϊνών του μύκητα. Όπως δείξαμε, τα υπερεκφρασμένα πεπτίδια αποτελούν το συντριπτικό ποσοστό του συνολικού πρωτεϊνικού περιεχομένου στο υπερκείμενο καλλιέργειας. Επιπλέον, σε σχέση με το σύστημα του Saccharomyces cerevisiae που έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την έκφραση της HSA, στο σύστημα του *P. pastoris* δεν παρατηρείται υπεργλυκοζυλίωση των εκκρινόμενων πρωτεϊνών. Το γεγονός ότι η δραστικότητα GnSAF ανιχνεύεται σε υπερκείμενα καλλιέργειας κλώνων *P. pastoris* είναι μια ιδιαίτερα σημαντική παρατήρηση. Μας δίνει η δυνατότητα να μελετήσουμε τη δραστικότητα GnSAF ενεργών πολυπεπτιδίων (IIIB και εναλλακτικές μορφές του IIIB: (HSA509-585) DIIIBest και DIIIBMAX) σε υπερκείμενα των αντίστοιχων κλώνων. Κατά συνέπεια το σύστημα του *P. pastoris* μπορεί να αποτελέσει ένα απλό και αποτελεσματικό σύστημα για να μελετηθούν σχέσεις δομής-λειτουργίας του υποτομέα IIIB καθώς επιτρέπει τον άμεσο έλεγχο δραστικότητας μεταλλαγμένων μορφών του IIIB στο υπερκείμενο ανασυνδυασμένων κλώνων. Επιπλέον η δυνατότητα που προσφέρει για την παραγωγή ενός GnSAF δραστικού μορίου σε υψηλές συγκεντρώσεις θα επιτρέψει στο μέλλον τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του GnSAF.

Μέχρι σήμερα η δραστικότητα GnSAF έχει μελετηθεί σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης που όπως ήδη αναφέρθηκε συνιστούν ένα μικτό πληθυσμό διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός δράσης του στα γοναδοτρόπα κύτταρα, απαιτείται η χρήση σταθερών κυτταρικών σειρών. Τα τελευταία χρόνια, η ανάπτυξη των κυτταρικών σειρών αT3-1 και LβT2 (Windle et al., 1990; Turgeon et al., 1996) επέτρεψε τη μελέτη του μηχανισμού δράσης της GnRH στην υπόφυση. Τα κύτταρα LβT2 θεωρούνται καταλληλότερο πειραματικό σύστημα καθώς εκφράζουν την υπομονάδα α και β υπομονάδα της LH και γενικότερα προσομοιάζουν τις ιδιότητες των ώριμων γοναδοτρόπων.

Τα κύτταρα LβT2 σύμφωνα με την ερευνητική ομάδα που τα παρήγαγε φέρονται να παρουσιάζουν δυσλειτουργία ως προς το μηχανισμό έκκρισης της LH και για τη διέγερση τους απαιτείται η χορήγηση παλμών GnRH (Turgeon et .al., 1996). Σε προκαταρτικές μελέτες που πραγματοποιήσαμε παρατηρήθηκε ότι πράγματι τα κύτταρα αυτά συμπεριφέρονται διαφορετικά από τις πρωτογενείς καλλιέργειες ως προς την έκκριση της LH. Παρά τη χορήγηση παλμών, η έκκριση της LH είναι περιορισμένη και δεν μπορεί να μετρηθεί με ευαισθησία με τη μέθοδο συναγωνιστικής ELISA. Οι ερευνητικές ομάδες που έχουν ασχοληθεί με το μηχανισμό δράσης GnRH στα LβT2 επικεντρώνουν τις μελέτες τους στη μεταγραφική ενεργοποίηση γονιδίων μετά από την επίδραση GnRH. Τα συστήματα που έχουν αναπτυχθεί στηρίζονται στη χρήση γονιδίων αναφοράς υπό τον έλεγχο του υποκινητή LHβ (Yokoi et al., 2000; Liu et al., 2002). Πρόσφατα, μια διαφορετική προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο έλεγχος της έκφρασης της υπομονάδαςLHβ με τη χρήση αντισωμάτων (Nguyen et al., 2004). Τα συστήματα που έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη της δράσης της GnRH στις παραπάνω κυτταρικές σειρές καθώς και το σύστημα έκφρασης του *P. pastoris* που αναπτύξαμε για την παραγωγή ενεργών GnSAF μορίων μπορούν να αποτελέσουν στο μέλλον τη βάση για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του παράγοντα GnSAF.

#### 4.5 Φυσιολογική σημασία του υποτομέα ΙΙΙΒ και πιθανοί τρόποι παραγωγής του

Στην παρούσα εργασία, δείξαμε ότι ο υποτομέας ΙΙΙΒ της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού, παραγόμενος στο ετερόλογο σύστημα έκφρασης του ζυμομύκητα *P. pastoris*, παρουσιάζει δραστικότητα GnSAF. Παρότι τα αποτελέσματα μας στηρίζονται σε ετερόλογη έκφραση, το γεγονός ότι το ενεργό αυτό πολυπεπτίδιο έχει απομονωθεί από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό (Pappa et al., 1999), υποστηρίζει ότι το μόριο μπορεί να έχει φυσιολογική σημασία στον οργανισμό.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα προς αυτή την κατεύθυνση είναι και η παρατήρηση ότι φυσιολογικά στον οργανισμό ανιχνεύονται εναλλακτικά μεταγραφήματα του mRNA της HSA. Συγκεκριμένα από ένα εναλλακτικό μεταγράφημα της HSA, που έχει καταγραφεί σε cDNA βιβλιοθήκη ήπατος, καταφέραμε να εκφράσουμε ένα πολυπεπτίδιο που προσομοιάζει με το IIIB, και να δείξουμε ότι παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα GnSAF.

Βασικό ερώτημα σχετικά με τον GnSAF είναι με ποιον τρόπο μπορεί να προκύπτει μια τέτοια δραστικότητα. Καθώς η αλβουμίνη υπάρχει σε υψηλές συγκεντρώσεις τόσο στο ωοθυλακικό υγρό όσο και στον ορό του αίματος, θα μπορούσε να υποτεθεί ότι η δραστικότητα του υποτομέα ΙΙΙΒ αποδίδεται στο ίδιο το μόριο της HSA ή σε άλλες ομόλογες προς αυτήν πρωτεΐνες. Από την άλλη πλευρά, ένα τέτοιο δραστικό πολυπεπτίδιο θα μπορούσε να παράγεται είτε με μηχανισμούς εναλλακτικής ωρίμανσης του mRNA της HSA είτε με πρωτεολυτική σχάση του μορίου. Οι περιπτώσεις αυτές θα συζητηθούν στη συνέχεια.

## Η δραστικότητα GnSAF δεν αποδίδεται στην αλβουμίνη και σε ομόλογα αυτής

Μελετώντας την επίδραση της HSA τόσο σε καθαρή μορφή όσο και σε ανασυνδυασμένη μορφή από υπερκείμενα καλλιεργειών του *P. pastoris*, διαπιστώσαμε ότι δεν επηρεάζει την επαγόμενη από GnRH έκκριση της LH, ακόμα και σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν κατά πολύ αυτές στις οποίες ο υποτομέας IIIB παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα. Από την άλλη πλευρά εφόσον η HSA είναι μέλος μιας οικογένειας τεσσάρων ομόλογων πρωτεϊνών που απαντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα, αναρωτηθήκαμε αν η παρατηρούμενη δραστικότητα μπορεί να αποδοθεί σε κάποιο άλλο μέλος της οικογένειας των αλβουμινών (AFP, DBP, AFM).

Η α-εμβρυοπρωτεΐνη (AFP) είναι ένα δομικό ομόλογο της HSA, που εκφράζεται υπό φυσιολογικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ στην ενήλικη ζωή ανιχνεύεται σε χαμηλά επίπεδα και η έκφραση της αυξάνεται σε ηπατοκαρκινώματα. Όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή, η AFP έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στο φαινόμενο της απόπτωσης (Dudich et al., 1999; Semenkova et al., 2003). Παράλληλα είναι γνωστό, και θα συζητηθεί εκτενώς στη συνέχεια, ότι στο φαινόμενο της απόπτωσης αποδίδεται η ατρησία των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων στις ωοθήκες (Khan et al., 2000; Johnson and Bridgham, 2002). Επιπλέον η AFP έχει συσχετιστεί με τον αναπαραγωγικό κύκλο στην πορεία μελετών γονιδιακής απενεργοποίησης (knock-out) σε ποντίκια. Τα θηλυκά  $Afp^{-1}$  ζώα παρουσιάζουν στειρότητα που φαίνεται να οφείλεται σε διαταραχή στο επίπεδο της υπόφυσης και συγκεκριμένα σε διαταραχή της φυσιολογικής αναλογίας LH/FSH (Gabant et al., 2002). Για τους παραπάνω λόγους μελετήσαμε παράλληλα με την HSA την επίδραση της AFP σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων στις ίδιες συγκεντρώσεις, αλλά καμία επίδραση της AFP δεν παρατηρήθηκε τόσο στα επίπεδα της LH όσο και της FSH.

Όσο αφορά στα άλλα δύο μέλη της οικογένειας των αλβουμινών δηλαδή στην πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D (DBP) και της αφαμίνης (AFM), δεν προχωρήσαμε σε αναλύσεις δραστικότητας GnSAF. Η αφαμίνη είναι μια πρόσφατα χαρακτηρισμένη πρωτεΐνη που δεν διατίθεται στο εμπόριο, γεγονός που μας εμπόδισε στην παρούσα φάση να τη μελετήσουμε. Από την άλλη πλευρά η DBP διαφέρει από τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας ως προς την έλλειψη του υποτομέα IIIB (Gibbs and Dugaiczyk, 1987).

Συνοπτικά, τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η δραστικότητα του υποτομέα-ΙΙΙΒ δεν αποδίδεται στην ίδια την HSA αλλά ούτε και στην ομόλογη AFP και δεν αποκαλύπτεται στο περιβάλλον του πλήρους μορίου της HSA ή του μεγαλύτερου τομέα ΙΙΙ (βλ. Ενότητα 4.1). Οταν ο ΙΙΙΒ εκφράζεται ως ανεξάρτητο μόριο είναι δυνατόν να αποκαλύπτονται κατάλοιπα σημαντικά για τη δραστικότητα, είτε λόγω μιας διαφορετικής διαμόρφωσης του μορίου είτε λόγω της απουσίας του γειτονικού τομέα ΙΙΙ.

#### Το mRNA της HSA μπορεί να υφίσταται εναλλακτική ωρίμανση

Εφόσον η δραστικότητα GnSAF του υποτομέα IIIB δεν αποδίδεται στα μεγαλύτερα μόρια που εμπεριέχουν το IIIB, θα πρέπει να υποτεθεί ότι το ενεργό πεπτίδιο παράγεται με κάποιον μηχανισμό ως ανεξάρτητο μόριο.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, για την HSA έχουν καταγραφεί διάφορα εναλλακτικά μεταγραφήματα χωρίς μέχρι σήμερα να έχει αποδοθεί σε αυτά κάποιος φυσιολογικός Πραγματοποιώντας in silico αναλύσεις επιλέξαμε μεταξύ κλώνων ρόλος. κατατεθειμένων στην Ηλεκτρονική Τράπεζα EASED (Enhanced Alternatively Spliced ESTs Database) (http://eased.bioinf.mdc-berlin.de/cgi-bin), tov RZPD IMAGp958K021545Q2 που προέργεται από cDNA βιβλιοθήκη ήπατος. Βάσει της ανάλυσης EST, ο κλώνος αυτός εθεωρείτο ότι περιέγει τα κωδικόνια 1-23 από τα εξώνια 1-3 και, χωρίς μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, τα κωδικόνια 483-585 από τα εξώνια 12-14 της HSA (1-23^483-585). Αφού επιβεβαιώσαμε την αλληλουγία του κλώνου, προχωρήσαμε σε έκφραση του πολυπεπτιδίου (DIIIBest) που κωδικοποιείται από το αντίστοιχο cDNA και πραγματοποιώντας βιολογικές δοκιμασίες προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και ανασταλτίνης, διαπιστώσαμε ότι παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα GnSAF χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση the FSH.

Η παρατήρηση αυτή αποτελεί ένδειξη ότι ένα πεπτίδιο της HSA, αντίστοιχο του υποτομέα IIIB, θα μπορούσε να παράγεται φυσιολογικά στον οργανισμό με εναλλακτική ωρίμανση του mRNA. Η πιθανότητα το ενεργό μόριο να παράγεται με εναλλακτική ωρίμανση είναι σύμφωνα με τα παραπάνω άξια να διερευνηθεί στο μέλλον. Υπάρχουν εξάλλου πειραματικές ενδείξεις ότι τουλάχιστον η αλβουμίνη εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου (Messinis et al., 2003) από όπου θεωρείται ότι παράγεται ο GnSAF (Fowler et al., 2002). Θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να μελετηθεί αν επίσης ανιχνεύονται και εναλλακτικά μεταγραφήματα της HSA στα κοκκώδη κύτταρα κατά την πρώϊμη και μέση ωοθυλακική φάση όπου ο GnSAF παρουσιάζει την υψηλότερη δραστικότητα (Fowler et al., 2002).

## Θα μπορούσε ο υποτομέας ΙΙΙΒ να παράγεται με πρωτεολυτική σχάση της HSA;

Είναι γνωστά από τη βιβλιογραφία παραδείγματα πολυπεπτιδίων που αποτελούν τμήματα μεγαλύτερων πρωτεϊνών και παρουσιάζουν διαφορετική βιολογική δράση από τις πρωτεΐνες από τις οποίες προέρχονται. Χαρακτηριστικά, οι αναστολείς της αγγειογένεσης, αγγειοστατίνη (38 kDa) (O'Reilly et al., 1994) και
ενδοστατίνη (20 kDa) (O'Reilly et al., 1997), αποτελούν η μεν πρώτη εσωτερικό πεπτίδιο που προκύπτει με πρωτεολυτική σχάση του πλασμινογόνου, η δε δεύτερη το C-τελικό άκρο του κολλαγόνου.

Η παραγωγή του υποτομέα IIIB από την HSA με πρωτεολυτική σχάση αποτελεί ένα σημαντικό ενδεχόμενο. Πραγματοποιώντας in silico αναλύσεις αναζητήσαμε πιθανές θέσεις αναγνώρισης για πρωτεολυτικά ένζυμα μεταξύ των υποτομέων IIIA και IIIB που θα μπορούσαν να δικαιολογούν την παραγωγή του ενεργού πολυπεπτιδίου από το μόριο της HSA.

Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι μεταξύ του υποτομέα ΙΙΙΑ και ΙΙΙΒ, και συγκεκριμένα στα κατάλοιπα 491-494, υπάρχει θέση LEVD που αναγνωρίζεται από κασπάσες. Οι κασπάσες είναι μια ομάδα ενδοκυττάριων πρωτεασών (cysteine proteases) η δράση των οποίων συνδέεται με την έναρξη και την εξέλιξη της απόπτωσης σε όλους τους τύπους κυττάρων. Αν και η θέση αυτή έχει καταγραφεί ως πιθανή θέση αναγνώρισης για την κασπάση 4 (ή κασπάση 11) (Talanian et al., 1997) εν τούτοις στη βιβλιογραφία οι ακριβείς θέσεις αναγνώρισης της κάθε κασπάσης δεν είναι διευκρινισμένες. Χαρακτηριστικά, έχει δειχθεί ότι θέση LEVD εντοπίζεται στην πρωτεΐνη TRAF1 η οποία αλληλεπιδρά με την κυτταροπλασματική ουρά υποδοχέων TNF (tumor necrsis factor) και τους συνδέει με μονοπάτια μεταγωγής σημάτων απόπτωσης. Η θέση LEVD στην TRAF1, αναγνωρίζεται in vitro από τις κασπάσες 3, 6, 8 και 10, ενώ in vivo σε κύτταρα Jurkat, υπεύθυνη για τη σχάση της TRAF1 φαίνεται να είναι η κασπάση 8 (Leo et al., 2001).

Προκειμένου να αξιολογήσουμε αν η παρουσία της θέσης αναγνώρισης κασπασών LEVD στην HSA, στα όρια του υποτομέα IIIB, μπορεί να σχετίζεται με παραγωγή του IIIB στα ωοθυλάκια, ανατρέξαμε σε βιβλιογραφικά δεδομένα.

Το φαινόμενο της απόπτωσης αποτελεί φυσιολογική διαδικασία μέσω της οποίας το πλεόνασμα ή τα μη βιώσιμα γαμετικά και κοκκώδη κύτταρα περιορίζονται νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Επίσης πραγματοποιείται στην ενήλικη ζωή κατά τη διάρκεια κάθε εμμηνορυσιακού κύκλου. Φαινόμενα απόπτωσης κατά τη διάρκεια του κύκλου πραγματοποιούνται κατά την πρώιμη και μέση ωοθυλακική φάση με σκοπό την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου, αλλά και κατά την ωχρινική φάση για την υποστροφή του ωχρού σωματίου (Johnson and Bridgham, 2002). Οι κασπάσες 2, 3, 9, 11 και 12 έχουν συσχετιστεί άμεσα με το φαινόμενο της απόπτωσης σε κύτταρα

των ωοθηκών με βάση γενετικά μοντέλα γονιδιακής απενεργοποίησης (knock out) σε ποντίκια (Bergeron et al, 1998; Matikainen et al., 2001; Morita et al., 2001).

Κατά την πρώιμη ωοθυλακική φάση και συγκεκριμένα κατά τη μετάβαση από τα πρωτογενή ωοθυλάκια (primordial follicles) στο στάδιο πριν την εμφάνιση του άντρου (preantral follicles), η ατρησία εκκινείται με απόπτωση του ωοκυττάρου που οδηγεί και σε απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν. Τα αποπτωτικά φαινόμενα στο στάδιο αυτό εξαρτώνται από την κασπάση 2 (Morita et al., 2001).

Αντίθετα, η ατρησία κατά τη μετάβαση από το στάδιο πριν την εμφάνιση του άντρου στα προωρρηκτικά ωοθυλάκια (τέλος πρώιμης-μέση ωοθυλακική φάση) εκκινείται με απόπτωση στα κοκκώδη κύτταρα η οποία οδηγεί και σε θάνατο του ωοκυττάρου (Morita and Tilly, 1999; Tilly, 2001). Τα αποπτωτικά φαινόμενα στο στάδιο αυτό εξαρτώνται, σύμφωνα με μελέτες γονιδιακής απενεργοποίησης (knock out) σε ποντίκια, από την ενεργότητα των κασπασών 3 και 7 (Matikainen et al., 2001).

Επιπλέον οι ωοθήκες από caspase 9<sup>-/-</sup> ποντίκια, περιέχουν μεγάλο αριθμό αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων που δεν μπορούν να προχωρήσουν σε ατρησία προφανώς διότι δεν πραγματοποιείται απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων (Maravei et al., 2001). Παρότι οι μηχανισμοί πρόκλησης απόπτωσης μέσω υποδοχέων (death receptors) δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς στις ωοθήκες, υπάρχουν στοιχεία για την έκφραση και ενεργότητα της κασπάσης 8 στα κοκκώδη κύτταρα (Hu et al., 2001).

Είναι αξιοπρόσεκτο ότι η αύξηση της δραστικότητας GnSAF στην πορεία του κύκλου συσχετίζεται χρονικά με την πραγματοποίηση του φαινομένου της απόπτωσης. Η υψηλότερη δραστικότητα εμφανίζεται κατά την πρώιμη και τη μέση ωοθυλακική φάση (Fowler et al., 2002). Στις φάσεις αυτές, όπως ήδη αναφέρθηκε πραγματοποιείται απόπτωση κοκκωδών κυττάρων από τα οποία θεωρείται ότι παράγεται ο GnSAF (Fowler et al., 2001).

Ένα άλλο ζήτημα που προκύπτει είναι ότι, για να υποτεθεί σχάση της HSA από κασπάσες και απελευθέρωση του υποτομέα IIIB από αυτήν, βασική προϋπόθεση είναι η είσοδος της HSA εντός του κυττάρου. Είναι γνωστό ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων φέρουν ειδικούς υποδοχείς για την HSA μέσω των οποίων η HSA ενδοκυτταρώνεται (trancytosis) (Schnitzer et al., 1988 a, b; Dobrila et al., 1992; Antohe et al., 1992; Schnitzer et al., 1992; Schnitzer and Oh, 1994) και προκαλεί αντιαποπτωτικά φαινόμενα. Η HSA μπορεί επίσης να εισέρχεται στα

κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων (kidney proximal tubules) (Erkan et al., 2001), όπου έχει αναφερθεί ότι υπάρχουν υποδοχείς της (Bire et al., 2000). Τέλος, η HSA συνδέεται στην επιφάνεια κυττάρων ασθενών με χρόνια Β λεμφοκυτταρική λευχαιμία (CLL) και εισέρχεται σε αυτά (Jones et al., 2003).

Τα παραπάνω δεδομένα, σχετικά με τα αποπτωτικά φαινόμενα στα κοκκώδη κύτταρα. σε συνδυασμό με την ύπαρξη θέσης αναγνώρισης LEVD μεταξύ των υποτομέων IIIA και IIIB της HSA, δημιουργούν μια ενδιαφέρουσα υπόθεση για πιθανή συμμετοχή των κασπασών στην παραγωγή του ενεργού πεπτιδίου IIIB.

"一种爱好人"

el rah

: A. S.

i,≯⊷

12-

4. A. W. S. S.

3.

2

1.12

 $\sim$ 



## DIIIB

<sup>490</sup>ALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAF VEKCCKADDKETCEATEGKKLVAASQAALGL<sup>585</sup>

#### N-restricted IIIB

509TFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCKADDKETCFAEEG KKLVAASQAALGL<sup>385</sup>

#### **C-restricted IIIB**

<sup>495</sup>ETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCCK ADDKETCHAFIG<sup>572</sup>

Εικόνα 4.2 Άνω: Στερεοσκοπική απεικόνιση των δομών του υποτομέα IIIB (αριστερά) και των εναλλακτικών μορφών του. [Ν-περιορισμένο IIIB (κέντρο) και C-περιορισμένο IIIB (δεξιά)].

Κάτω: Αλληλουχία αμινοξέων του υποτομέα IIIB, του Ν-περιορισμένου IIIB και του Cπεριορισμένου IIIB. Με πορτοκαλί χρώμα υποδηλώνεται το τμήμα της C-τελικής α-έλικας του IIIB που δεν διατηρείται στο C-περιορισμένο IIIB. Με κόκκινο χρώμα υποδηλώνονται τα όρια των πολυπεπτιδίων, ενώ υπογραμμίζεται η θέση αναγνώρισης κασπασών (LEVD).



### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

# ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΟΛΥΠΕΠΤΙΔΙΚΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ ΜΕ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ GnSAF (GONADOTROPHIN SURGE ATTENUATING FACTOR)

## ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ ΤΑΒΟΥΛΑΡΗ ΣΩΤΗΡΙΑΣ

•

۳.,

Ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροπινών (Gonadotrophin surge attenuating factor-GnSAF) είναι ένας μη στεροειδής, μη ταυτοποιημένος, ωοθηκικός παράγοντας που στα θηλυκά άτομα παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της LH ώστε να καταστεί δυνατή η εμφάνιση του μεσοκύκλιου εκκριτικού κύματος της. Ο GnSAF δρα αναστέλλοντας την επαγόμενη από GnRH έκκριση LH χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών. Δραστικότητα GnSAF έχει ανιχνευθεί στο ωοθυλακικό υγρό πολλών ειδών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Σε μια προηγούμενη εργασία, κατά την απομόνωση της δραστικότητας GnSAF από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, ο παράγοντας αυτός συσχετίστηκε με στο C-τελικό 95πεπτίδιο της ανθρώπινης αλβουμίνης ορού (Human serum albumin-HSA).

Η HSA, μια πρωτεΐνη 585 αμινοξέων, είναι γνωστή για την ικανότητα της να προσδένει και να μεταφέρει διάφορα προσδέματα, όπως λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας, φάρμακα, πεπτιδικές ορμόνες κ. α. Η HSA ανήκει στην οικογένεια των αλβουμινών που επίσης περιλαμβάνει την α-εμβρυοπρωτεΐνη (AFP), την αφαμίνη (AFM) και την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D (DBP). Τα μέλη της οικογένειας παρουσιάζουν ομοιότητες ως προς τη δομή τους και την ικανότητα πρόσδεσης κάποιων προσδεμάτων. Το μόριο της HSA αποτελείται από τρεις δομικά ομόλογους τομείς, καθένας από τους οποίους αποτελείται από δύο υποτομείς A και B, που ονομάζονται IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB. Ιδιαίτερα ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι ο υποτομέας IIIB αντιστοιχεί στο C-τελικό 95πεπτίδιο της HSA που σε προηγούμενη εργασία είχε συσχετιστεί με τη δραστικότητα GnSAF.

Στην παρούσα εργασία ακολουθήσαμε μια διαφορετική προσέγγιση για τη μελέτη του GnSAF. Επιλέξαμε το ετερόλογο σύστημα έκφρασης-έκκρισης του μεθυλοτροφικού ζυμομύκητα Pichia pastoris για να παράγουμε ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια της HSA και να τα μελετήσουμε ως προς τη δραστικότητα GnSAF σε πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων. Εκφράσαμε στο σύστημα αυτό το C-τελικό 95πεπτίδιο της HSA (υποτομέας IIIB) σε εκκρινόμενη μορφή σε υπερκείμενα του μύκητα. Δείζαμε ότι τα υπερκείμενα, που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο IIIB, παρουσιάζουν σημαντική δραστικότητα GnSAF. Συγκεκριμένα αναστέλλουν την GnRH-επαγόμενη έκκριση LH αλλά δεν επηρεάζουν την GnRH-επαγόμενη έκκριση FSH και τη βασική έκκριση των γοναδοτροπινών. Η δραστικότητα των υπερκειμένων αυτών αναστέλλεται από αντίσωμα έναντι HSA το οποίο αναγνωρίζει τον υποτομέα IIIB.

Δείξαμε επίσης ότι η παρατηρούμενη δραστικότητα του υποτομέα ΙΙΙΒ είναι ειδική. Η πλήρης HSA, η ομόλογη προς αυτήν AFP, καθώς και οι τομείς Ι (1-197), ΙΙ (189-385) και ΙΙΙ (381-585) της HSA είναι ανενεργοί. Καθαρισμένα παρασκευάσματα του υποτομέα ΙΙΙΒ και του τομέα ΙΙΙ υποβλήθηκαν σε βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις. Ενώ ο ΙΙΙΒ παρουσιάζει σημαντική δραστικότητα σε συγκεντρώσεις 16-200 nM ο τομέας ΙΙΙ είναι ανενεργός σε συγκεντρώσεις 40-400 nM.

Επιπλέον, μια εναλλακτική Ν-περιορισμένη μορφή του ΙΙΙΒ (κατάλοιπα 509-585) παρουσιάζει, αντίστοιχη προς αυτόν, δραστικότητα GnSAF υποδηλώνοντας ότι η εκτεταμένη επιφάνεια 490-508 δεν είναι σημαντική για τη δραστικότητα. Αντίθετα, μια άλλη εναλλακτική μορφή, το C-περιορισμένο ΙΙΙΒ (κατάλοιπα 495-572), είναι πλήρως ανενεργό υποδηλώνοντας ότι η C-τελική α-έλικα του ΙΙΙΒ είναι απαραίτητη για τη δραστικότητα.

Πραγματοποιώντας in silico αναλύσεις εντοπίσαμε ένα εναλλακτικό μεταγράφημα της HSA σε ανθρώπινη cDNA βιβλιοθήκη ήπατος. Το εναλλακτικό αυτό μεταγράφημα περιλαμβάνει τα κωδικόνια 1-23 από τα εξώνια 1-3 και, χωρίς μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, τα κωδικόνια 483-585 από τα εξώνια 12-14 της HSA (1-23^483-585). Το πολυπεπτιδικό προϊόν που αντιστοιχεί σε αυτό το μεταγράφημα εκφράστηκε στο σύστημα του *P. pastoris*, υποβλήθηκε σε βιολογική δοκιμασία προσδιορισμού δραστικότητας GnSAF και εδείχθη ότι παρουσιάζει σημαντική δραστικότητα. Το ανασυνδυασμένο πολυπεπτίδιο 464-585 της HSA που φέρει 26 επιπλέον κατάλοιπα στο αμινοτελικό του άκρο σε σχέση με το IIIB είναι επίσης ενεργό. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι ο υποτομέας ΙΙΙΒ της HSA είναι ένα δομικά ανεξάρτητο πολυπεπτίδιο που παρουσιάζει ειδική δραστικότητα GnSAF στην αδενοϋπόφυση. Η δραστικότητα αυτή δεν αποδίδεται στην πλήρη HSA ή σε μεγαλύτερους τομείς της. Τα παραπάνω δεδομένα καθώς και το σύστημα έκφρασης του *P. pastoris* θα είναι χρήσιμα στο μέλλον για την μελέτη των σχέσεων δομής-λειτουργίας του υποτομέα ΙΙΙΒ και για τη μελέτη του μηχανισμού δράσης του στην υπόφυση.

1.1.1.1

CON STATES

Section 1.

1.1

.....

Set 1

19**1**4

الوي في الم

12434 2 2 2

5743

11. 新学校 大学

1

發播發出版

BIBAN

What BIBA/O

the second state of the se

A State of the second stat

41

### SUMMARY

# BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF A POLYPEPTIDIC FACTOR WITH GnSAF BIOACTIVITY · (GONADOTROPHIN SURGE ATTENUATING FACTOR)

# DOCTORATE THESIS BY TAVOULARI SOTIRIA

Gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) is a non steroidal, as yet unidentified, ovarian factor that plays a key role in the control of LH secretion during the mid-cycle surge in the female. GnSAF acts on the anterior pituitary by reducing its responsiveness to gonadotrophin releasing hormone (GnRH) without affecting basal gonadotrophin secretion. GnSAF bioactivity has been identified in ovarian follicular fluid of many species including humans. In a previous study, for the isolation of GnSAF bioactivity from human follicular fluid, GnSAF was related to the C-terminal 95peptide of human serum albumin (HSA).

Interestingly, HSA, a 585-amino acid protein, displays binding capacity of several ligands, including long chain fatty acids, drugs and peptide hormones. HSA belongs to the albumin gene family together with alpha-fetoprotein (AFP), afamin (AFM) and vitamin D binding protein (DBP) that are similar in domain architecture and in several ligand binding sites. The molecule is composed of three structurally similar domains each of which consists of two subdomains, named IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB. Strikingly enough, the IIIB domain corresponds to the C-terminal 95peptide of HSA that was isolated from human follicular fluid as an active polypeptide.

In the present study we followed a new approach for the research of GnSAF. We chose the heterologous expression-secretion system of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* to produce recombinant HSA polypeptides and analyzed them for activity on rat pituitary primary cell cultures. We produced the C-terminal 95peptide of HSA (subdomain IIIB), in recombinant form, from culture supernatants of *P. pastoris*. We showed that supernatants containing the polypeptide possess significant GnSAF bioactivity as they inhibit GnRH-induced LH secretion without affecting GnRH-induced FSH secretion and basal gonadotrophin levels. GnSAF activity of supernatants were blocked by anti-HSA antibody that immunoreacts with IIIB.

GnSAF activity of IIIB was found to be specific. Full length HSA and AFP, as well as domains I (1-197), II (189-385), III (381-585), are inactive. Moreover subdomain IB, structural counterpart of IIIB, is also inactive. Purified IIIB and domain III of HSA were tested for GnSAF activity in equivalent concentrations. Whereas IIIB presents significant bioactivity from 16-200nM, DIII is inactive from 40-800nM.

In addition, an engineered N-terminal deletion mutant of IIIB (509-585) displayed equivalent GnSAF bioactivity, showing that sequence 490-508 is dispensable for activity. In contrast, an engineered C-terminal deletion mutant (495-572) is completely inactive showing that the C-terminal a-helix of IIIB is crucial for activity.

We found by in silico analysis that an alternative spliced form of HSA mRNA, present in human liver cDNA library, compromises IIIB molecular weight and structure. It includes. codons 1-23 from exons 1-3 and, in the same open reading frame, codons 483-585 from exons 12-14 of HSA (1-23^483-585). The corresponding encoded polypeptide was expressed in *P. pastoris* system, subjected to GnSAF bioassay, and found to possess significant GnSAF activity. The recombinant polypeptide 464-585 of HSA, carrying 26 extra amino acids in its N-terminus, compared to IIIB, was also active.

Our findings show that subdomain IIIB of HSA is a stuctrurally independent polypeptide that displays specific GnSAF activity in the anterior pituitary. This activity is not derived from intact HSA or larger HSA domains. The above findings and the *P. pastoris* expression system will be useful for structure-function analysis of subdomain IIIB and for studying its action on the pituitary.



Contraction of the second of the second state of the second second and the second 

The Robert P. Landerson A. Statistics N. S. Statistics in Think A design of the second se 

a second se A CARLEND CONTRACT OF A CARLEND ΑΝΑΦΟΡΕΣ

÷.

A CARLES AND A CARLE

The second s the second s

n silaan **i bir da** a**s (12), seb**saalii

Market Constraint Cons A CARL AND A CALLER AND A DESCRIPTION The second states of the second The second states of the second states in the secon

the second se the second second data was a second 

the state of the state of the

- Alava, M.A., Iturralde, M., Lampreave, F., Pineiro, A. (1999) Specific uptake of alpha-fetoprotein and albumin by rat Morris 7777 hepatoma cells. *Tumour Biol.*, 20, 52-64.
- 2. 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.
- Asa, S.L. and Ezzat, S. (2002) The pathogenesis of pituitary tumours. Nature. Reviews. Cancer., 2, 836-49.
- Attisano, L., Wrana, J.L., Cheifetz, S. and Massague, J. (1992) Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell.*, 68, 97-108.
- 5. Attisano, L., Wrana, J.L., Montalvo, E. and Massague, J. (1996) Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 1066-73.
- 6. Barr, K.A., Hopkins, S. A., and Sreekrishna, K. (1992) Protocol for efficient secretion of HSA developed from *Pichia Pastoris*. *Pharm. Eng.*, **12**, 48-51.
- .7. Belanger, L., Roy, S. and Allard, D. (1994) New albumin gene 3' adjacent to the alpha 1-fetoprotein locus. J. Biol. Chem., 269, 5481-4.
- 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.
- 9. Bernard, D.J., (2004) Both SMAD2 and SMAD3 mediate activin-stimulated expression of the follicle-stimulating hormone beta subunit in mouse
  gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol.*, 18, 606-23.

- 10. Bhattacharya, A.A., Grune, T., Curry, S. J. (2000) Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Mol. Biol.*, **303**, 721-32.
- Bilezikjian, L.M., Vaughan, J.M., Vale, W.W. (1993) Characterization and the regulation of inhibin/activin subunit proteins of cultured rat anterior pituitary cells. *Endocrinology.*, 133, 2545-53.
- 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.
- 13. Brown, P., McNeilly, A.S. (1999) Transcriptional regulation of pituitary gonadotrophin subunit genes. *Rev. Reprod.*, **4**, 117-24
- 14. Busbridge, N.J., Buckley, D.M., Cornish, M. and 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.
- Busbridge, N.J., Chamberlain, G.V.P, Griffiths, A. and Whitehead, S.A. (1990) Non-steroidal follicular factors attenuate the self-priming action of gonadotropin-releasing hormone on the pituitary gonadotroph. *Neuroendocrinology*, 51, 493-499.
- Byrne, B., Fowler, P.A., Fraser, M., Culler, M.D. and Templeton, A. (1995) Gonadotropin surge-attenuating factor bioactivity in serum from superovulated women is not blocked by inhibin antibody. *Biol. Reprod.*, 52, 88-95.
- 17. 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.

A BIBALOG

- Carcamo, J., Weis, F.M., Ventura, F., Wieser, R., Wrana, J.L., Attisano, L. and Massague, J. (1994) Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 3810-21.
- 19: Carter, D.C., Ho, J.X. (1994) Structure of serum albumin. Adv. Protein Chem., 45, 153-203.

3**.**+

- Chong, H., Pangas, S.A., Bernard, D.J., Wang, E., Gitch, J., Chen, W., Draper, L.B., Cox, E.T. and Woodruff, T.K. (2000) Structure and expression of a membrane component of the inhibin receptor system. *Endocrinology.*, 141, 2600-7.
- Compagnini, A., Fisichella, S., Foti, S., Maccarrone, G., Saletti, R. (1996) Isolation by gel-permeation chromatography of a non-covalent complex of Cibacron Blue F3G-A with human serum albumin. J. Chromatogr. A., 736, 115-23.
- 22. Culler, M.D. (1992) In vivo evidence that inhibin is a gonadotropin surgeinhibiting/attenuating factor. *Endocrinology.*, 131, 1556-8.
- 23. Currie, R.J., McNeilly, A.S. (1995) Mobilization of LH secretory granules in gonadotrophs in relation to gene expression, synthesis and secretion of LH during the preovulatory phase of the sheep oestrous cycle. J. Endocrinol., 147, 259-70.
- Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Gilrain, J.T., Aylor, K., Yasin, M., Marshall, J.C. (1998) Regulation of pituitary follistatin and inhibin/activin subunit messenger ribonucleic acids (mRNAs) in male and female rats: evidence for inhibin regulation of follistatin mRNA in females. *Endocrinology.*, 139, 2818-23.

- 25. Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Gilrain, J.T., Aylor, K., Yasin, M., Marshall, J.C. (1999) Gonadotropin-releasing hormone regulation of gonadotropin subunit gene expression in female rats: actions on follicle-stimulating hormone beta messenger ribonucleic acid (mRNA) involve differential expression of pituitary activin (beta-B) and follistatin mRNAs. *Endocrinology.*, 140, 903-8.
- 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.
- Danforth, D.R. and Cheng, C.Y. (1995) Purification of a candidate gonadotropin surge inhibiting factor from porcine follicular fluid. *Endocrinology*, 136, 1658-1665.
- Danforth, D.R., 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.
- Danforth, D.R., Sinosich, M.J., Anderson, T.L., Cheng, C.Y., Bardin, C.W. and Hodgen, G.D. (1987) Identification of gonadotropin surge-inhibiting factor (GnSIF) in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol. Reprod.*, 37, 1075-1082.
- 30. de Jong, F.H., Welschen, R., Hermans, W.P., Smith, S.D. and van der Molen, H.J. (1979) Effects of factors from ovarian follicular fluid and Sertoli cell culture medium on in-vivo and in-vitro release of pituitary gonadotrophins in the rat: an evaluation of systems for the assay of inhibin. J. Reprod. Fertil. Suppl., 26, 47-59.
- 31. Despreaux, C.W., Manning, R.F. (1993) The dacA gene of Bacillus stearothermophilus coding for D-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in Escherichia coli and Pichia pastoris. *Gene.*, **131**, 35-41.

BIBAIO

- 32. Dobrila, L., Antohe, F., Heltianu, C., Simionescu, M. (1992) Albumin binding proteins of endothelial cells identified by anti-idiotypic antibodies. Int. Immunol., 4, 789-96.
- 33. Dockal M., Carter D.C. and Ruker F. (1999) The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. J. Biol. Chem., 274, 29303-29310.
- 34. Dockal, M., Carter, D.C. and Ruker, F. (2000) Conformational transitions of the three recombinant domains of human serum albumin depending on pH. J. Biol. Chem., 275, 3042-50.
- 35. Dorn, C., Ou, Q., Svaren, J., Crawford, P.A. and Sadovsky, Y. (1999) Activation of luteinizing hormone beta gene by gonadotropin-releasing hormone requires the synergy of early growth response-1 and steroidogenic factor-1. J. Biol. Chem., 274, 13870-6.
- 36. 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.
- .37. Dudich, E., Semenkova, L., Dudich, I., Gorbatova, E., Tochtamisheva, N., Tatulov, E., Nikolaeva, M. and Sukhikh, G. (1999) alpha-fetoprotein causes apoptosis in tumor cells via a pathway independent of CD95, TNFR1 and TNFR2 through activation of caspase-3-like proteases. *Eur. J. Biochem.*, 266, 750-61.
- 38. 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, Physiol.
- 39. 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.

- Farnworth, P.G., Thean, E., Robertson, D.M., Schwartz, J. (1995) Ovine anterior pituitary production of follistatin in vitro. *Endocrinology.*, 136, 4397-406.
- Fernandez-Vazquez, G., Kaiser, U.B., Albarracin, C.T. and Chin, W.W. (1996) Transcriptional activation of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene by activin A. *Mol. Endocrinol.*, 10, 356-66.
- Fischer, M.J., Bos, O.J., van der Linden, R.F., Wilting, J., Janssen, L.H. (1993) Steroid binding to human serum albumin and fragments thereof. Role of protein conformation and fatty acid content. *Biochem. Pharmacol.*, 45, 2411-6.
- 43. Fowler P.A., Sorsa-Leslie T., Cash P., Dunbar B., Melvin W., Wilson Y., Mason H.D. and 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.
- 44. 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.
- 45. 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.
- 46. Fowler, P.A., Messinis, I.E. and Templeton, A.A. (1990) Inhibition of LHRHinduced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. J. Reprod. Fertil., 90, 587-594.

ABIBAIC

- 47. 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, 1353-8.
- 48: 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.

f\* \*

- 49. Fowler, P.A., Townsend, C., Messinis, I.E., Cunningham, P. and Templeton, A. (1992) Gonadotrophin surge attenuating factor attenuates *in vitro* LH secretion induced by gonadotrophin releasing hormone from cultured ovine pituitary cells only during the breeding season. J. Endocrinol., 135, 221-227.
- 50. Fryxell, K.B., O'Donoghue, K., Graeff, R.M., Lee, H.C., Branton, W.D. (1995) Functional expression of soluble forms of human CD38 in Escherichia coli and Pichia pastoris. *Protein. Expr. Purif.*, 6, 329-36.
- 51. Gabant, P., Forrester, L., Nichols, J., Van Reeth, T., De Mees, C., Pajack, B., Watt, A., Smitz, J., Alexandre, H., Szpirer, C. and Szpirer, J. (2002) Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 12865-70.
- 52. 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.
- 53. Gilbert S. F. (2000) Developmental Biology, Sinauer associates, Inc., Massachusetts, S.A.

- 54. Gonzalez-Manchon, C., Bilezikjian, L.M., Corrigan, A.Z., Mellon, P.L. and Vale, W. (1991) Activin-A modulates gonadotropin-releasing hormone secretion from a gonadotropin-releasing hormone-secreting neuronal cell line. *Neuroendocrinology.*, 54, 373-7.
- 55. Gordon, L.M., Curtain, C.C., McCloyn, V., Kirkpatrick, A., Mobley, P.W., Waring, A.J. (1993) The amino-terminal peptide of HIV-1 gp41 interacts with human serum albumin. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 9, 1145-56.
- 56. Harper, K.D., McLeod, J.F., Kowalski, M.A., Haddad, J.G. (1987) Vitamin D binding protein sequesters monomeric actin in the circulation of the rat. J. Clin. Invest., 79, 1365-70.
- 57. He, X.M. and Carter, D.C. (1992) Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, **358**, 209-215.
- 58. Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989) Sitedirected mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene.*, 77, 51-9.
- 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.
- 60. Hsieh, K.P. and Martin, T.F. (1992) Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. Mol. Endocrinol., 6, 1673-81.
- 61. 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.

- 62. Il'ichev, Y.V., Perry, J.L., Ruker, F., Dockal, M. and 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.
- 63. Ihoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96, 23-28.
- 64. Johnson, A.L., Bridgham, J.T. (2002) Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction.*, **124**, 19-27.
- 65. 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.
- Kaiser, U.B., Lee, B.L., Carroll, R.S., Unabia, G., Chin, W.W., Childs, G.V. (1992) Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology.*, 130, 3048-56.
- 67. Kaiser, U.B., Sabbagh, E., Katzenellenbogen, R.A., Conn, P.M. and Chin,
  W.W. (1995) A mechanism for the differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 12280-4.
- 68. 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.
- 69. 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.

- 70. Kakar, S.S., Winters, S.J., Zacharias, W., Miller, D.M. and Flynn, S. (2003) Identification of distinct gene expression profiles associated with treatment of LbetaT2 cells with gonadotropin-releasing hormone agonist using microarray analysis. *Gene*, **308**, 67-77.
- 71. Keri, R.A., Wolfe, M.W., Saunders, T.L., Anderson, I., Kendall, S.K., Wagner, T., Yeung, J., Gorski, J., Nett, T.M., Camper, S.A., et al. (1994) The proximal promoter of the bovine luteinizing hormone beta-subunit gene confers gonadotrope-specific expression and regulation by gonadotropin-releasing hormone, testosterone, and 17 beta-estradiol in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 8, 1807-16.
- 72. Kirk, S.E., Dalkin, A.C., Yasin, M., Haisenleder, D.J., Marshall, J.C. (1994) Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology.*, **135**, 876-80.
- 73. Kjeldsen, T., Pettersson, A.F., Drube, L., Kurtzhals, P., Jonassen, I., Havelund, S., Hansen, P.H. and Markussen, J. (1998) Secretory expression of human albumin domains in Saccharomyces cerevisiae and their binding of myristic acid and an acylated insulin analogue. *Protein Expr. Purif.*, 13, 163-9.
- 74. Knight, P.G., Lacey, M., Peter, J.L.T. and 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.
- 75. Kogawa, K., Nakamura, T., Sugino, K., Takio, K., Titani, K., Sugino, H. (1991) Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology.*,128, 1434-40.
- 76. Koppenaal, D.W., Tijssen, A.M.I. and 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.

- 77. 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.
- 78. Laborda, J., Naval, J., Allouche, M., Calvo, M., Georgoulias, V., Mishal, Z., Uriel, J. (1987) Specific uptake of alpha-fetoprotein by malignant human lymphoid cells. *Int. J. Cancer.*, 40, 314-8.
- 79. Laemmli, U.K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- 80. Lebrun, J.J. and Vale, W.W. (1997) Activin and inhibin have antagonistic effects on ligand-dependent heteromerization of the type I and type II activin receptors and human erythroid differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 1682-91.
- Lee, S.L., Sadovsky, Y., Swirnoff, A.H., Polish, J.A., Goda, P., Gavrilina, G. and Milbrandt, J. (1996) Luteinizing hormone deficiency and female infertility in mice lacking the transcription factor NGFI-A (Egr-1). Science., 273, 1219-21.
- •82. Lejon, S., Frick, I.M., Bjorck, L., Wikstrom, M., Svensson, S. (2004) Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin. J. Biol. Chem., 279, 42924-8.
- 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.
- 84. Levi, N.L., Hanoch, T., Benard, O., Rozenblat, M., Harris, D., Reiss, 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.

- 85. Lewis, K.A., Gray, P.C., Blount, A.L., MacConell, L.A., Wiater, E., Bilezikjian, L.M. and Vale, W. (2000) Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. *Nature.*, 404, 411-4.
- 86. Lichenstein, H.S., Lyons, D.E., Wurfel, M.M., Johnson, D.A., McGinley, M.D., Leidli, J.C., Trollinger, D.B., Mayer, J.P., Wright, S.D. and Zukowski, M.M. (1994) Afamin is a new member of the albumin, alpha-fetoprotein, and vitamin D-binding protein gene family. J. Biol. Chem., 269, 18149-54.
- 87. Linder, S., Schliwa, M. and Kube-Granderath, E. (1996) Direct PCR screening of *Pichia pastoris* clones. *Biotechniques*, **20**, 980-982.
- 88. Ling, N., Ying, S.Y., Ueno, N., Esch, F., Denoroy, L. and Guillemin, R. (1985) Isolation and partial characterization of a Mr 32,000 protein with inhibin activity from porcine follicular fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 7217-21.
- 89. Liu, F., Austin, D.A., Mellon, P.L., Olefsky, J.M. and Webster, N.J. (2002) GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of c-fos and LHbeta protein expression in LbetaT2 cells. *Mol. Endocrinol.*, 16, 419-434.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, L. S., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J. (2004) *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, Inc., USA.
- 91. MacLusky, N.J., Naftolin, F. (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.*, 211, 1294-302.
- 92. Martens, J.W., de Winter, J.P., Timmerman, M.A., McLuskey, A., van Schaik, R.H., Themmen, A.P. and de Jong, F.H. (1997) Inhibin interferes with activin signaling at the level of the activin receptor complex in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology.*, 138, 2928-36.

- 93. Martinez, F., Barri, P.N., Coroleu, B., Tur, R., Sorsa-Leslie, T., Harris, W.J., Groome, N.P., Knight, P.G. and Fowler, P.A. (2002) Women with poor response to IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles. *Hum.*\* Reprod., 17, 634-40.
- 94. Mathews, L.S. and Vale, W.W. (1991) Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell.*, 65, 973-82.
- 95. Mathews, L.S., Vale, W.W. and Kintner, C.R. (1992) Cloning of a second type of activin receptor and functional characterization in Xenopus embryos. *Science.*, 255, 1702-5.
- 96. 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.
- 97. Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R.M., Arimura, A. and 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.
- .98. Mattukrishna S. and Ledger W. (2001) Inhibin, Activin and Follistatin in Human Reproductive Physiology, Imperial College Press, London, UK.
- 99. 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.

- 100. 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.
- Melsert, R., Hoogerbrugge, J.W., Rommerts, F.F. (1989) Albumin, a biologically active protein acting on Leydig cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 64, 35-44.
- Merelli, F., Stojilkovic, S.S., Iida, T., Krsmanovic, L.Z., Zheng, L., Mellon,
   P.L. and Catt, K.J. (1992) Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. *Endocrinology.*, 131, 925-32.
- Messinis, I.E. (2003) Modulatory effect of the ovary on LH secretion. Ann.
   N. Y. Acad. Sci., 997, 35-41.
- 104. 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.
- Messinis, I.E. and Templeton A.A. (1990b) *In-vivo* bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin. Endocrinol.*, 33, 213-218.
- 106. Messinis, I.E. and Templeton, A.A. (1989) Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. J. Reprod. Fertil., 87, 633-639.
- 107. 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.
- 108. Messinis, I.E., Hirsch, P., Templeton, A.A. (1991) Follicle stimulating hormone stimulates the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in vivo. Clin. Endocrinol., 35, 403-7.

- 109. Messinis, I.E., Lolis, D., Papadopoulos, L., Tsahalina, T., Papanikolaou,, N., Seferiadis, K. and Templeton, A.A. (1993) Effect of varying concentrations of follicle stimulating hormone on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in women. *Clin. Endocrinol.*, **39**, 45-50.
- 110. Messinis, I.E., Templeton, A. (1986) The effect of pulsatile follicle
  stimulating hormone on the endogenous luteinizing hormone surge in
  women. Clin. Endocrinol., 25, 633-40.
- 111. Messinis, I.E., Templeton, A., Baird, D.T. (1985) Endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with sequential use of clomiphene citrate and pulsatile human menopausal gonadotropin. J. Clin. Endocrinol. Metab., 61, 1076-80.
- 112. Messinis, I.E., Templeton, A., Baird, D.T. (1986) Relationships between the characteristics of endogenous luteinizing hormone surge and the degree of ovarian hyperstimulation during superovulation induction in women. *Clin. Endocrinol.*, 25, 393-400.
- 113. Messinis, I.E., Templeton, A.A. (1987) Endocrine and follicle characteristics of cycles with and without endogenous luteinizing hormone surges during superovulation induction with pulsatile follicle-stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, 2, 11-6.
- 114. Messinis, I.E., Templeton, A.A. (1988) The endocrine consequences of multiple folliculogenesis. J. Reprod. Fertil. Suppl., 36, 27-37.
- 115. Meunier, H., Rivier, C., Evans, R.M., Vale, W. (1988) Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 247-51.

HBIBAL

116. Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Fukuda, M., Nomura, M., Igarashi, M., Kangawa, K. and Matsuo, H. (1985) Isolation of porcine follicular fluid inhibin of 32K daltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 396-403.

- Mizejewski, G.J. (2001) Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp. Biol. Med.* (Maywood)., 226, 377-408.
- Monzani, E., Bonafe, B., Fallarini, A., Redaelli, C., Casella, L., Minchiotti, L., Galliano, M. (2001) Enzymatic properties of human hemalbumin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1547, 302-12.
- 119. 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.
- 120. Morita, Y., Tilly, J.L. (1999) Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Dev. Biol.*, 213, 1-17.
- 121. Mroueh, J.M., Arbogast, L.K., Fowler, P., Templeton, A.A., Friedman, C.I. and Danforth, D.R. (1996) Identification of gonadotrophin surge-inhibiting factor (GnSIF)/attenuin in human follicular fluid. *Hum. Reprod.*, 11, 490-496.
- 122. Nakamura, T., Takio, K., Eto, Y., Shibai, H., Titani, K. and Sugino, H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.*, 247(4944), 836-8.
- 123. 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.

- 124. Nussey, S. and Whitehead S. (2001) Endocrinology: An Integrated Approach, BIOS Scientific Publishers Ltd, London, UK.
- 125. 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.
- 126. 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.
- 127. Otterbein, L.R., Cosio, C., Graceffa, P., Dominguez, R. (2002) Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin:
  structural basis of the actin-scavenger system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 8003-8.
- Pappa, A., Seferiadis, K., Fotsis, T., Shevchenko, A., Marselos, M., Tsolas, O. and Messinis, I.E. (1999) Purification of a candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid. *Hum. Reprod.*, 14, 1449-1456.
- 129. Pappa, A., Seferiadis, K., Marselos, M., Tsolas, O. and Messinis, I.E. (1999a) Development and application of competitive ELISA assays for rat LH and FSH. *Theriogenology*, 51, 911-926.
- 130. Pearl, F.M., Lee, D., Bray, J.E., Sillitoe, I., Todd, A.E., Harrison, A.P., Thornton, J.M. and Orengo, C.A. (2000) Assigning genomic sequences to CATH. Nucleic Acids Res., 28, 277-282.
- 131. Pernasetti, F., Vasilyev, V.V., Rosenberg, S.B., Bailey, J.S., Huang, H.J., Miller, W.L., Mellon, P.L. (2001) Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone-beta by activin and gonadotropin-releasing

hormone in the LbetaT2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology.*, **142**, 2284-95.

- 132. Peters, T., Jr. (1996) All about albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications., Academic Press, Inc., Orlando, FL.
- 133. Petitpas, I., Petersen, C.E., Ha, C.E., Bhattacharya, A.A., Zunszain, P.A., Ghuman, J., Bhagavan, N.V., Curry S. (2003) Structural basis of albuminthyroxine interactions and familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 6440-5.
- 134. 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.
- 135. Rivier, J., Spiess, J., McClintock, R., Vaughan, J. and Vale, W. (1985) Purification and partial characterization of inhibin from porcine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133, 120-7.
- 136. Roberson, M.S., Zhang, T., Li, H.L. and Mulvaney, J.M. (1999) Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by gonadotropinreleasing hormone.
- 137. Roberts, V., Meunier, H., Vaughan, J., Rivier, J., Rivier, C., Vale, W., Sawchenko, P. (1989) Production and regulation of inhibin subunits in pituitary gonadotropes. *Endocrinology.*, 124, 552-4.
- 138. Robertson, D.M., Foulds, L.M., Leversha, L., Morgan, F.J., Hearn, M.T., Burger, H.G., Wettenhall, R.E. and de Kretser, D.M. (1985) Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 220-6.

- 139. 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.*, 173,1036-8.
- 140: 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.
- 141. Schnitzer, J.E., Carley, W.W., Palade, G.E. (1988) Specific albumin binding to microvascular endothelium in culture. *Am. J. Physiol.*, **254**, 425-37.
- 142. Schnitzer, J.E., Oh, P. (1992) Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium. Am. J. Physiol., 263, 1872-9.
- 143. Schnitzer, J.E., Sung, A., Horvat, R., Bravo, J. (1992) Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism. J. Biol. Chem., 267, 24544-53.
- 144. Semenkova, L., Dudich, E., Dudich, I., Tokhtamisheva, N., Tatulov, E., Okruzhnov, Y., Garcia-Foncillas, J., Palop-Cubillo, J.A. and Korpela, T. (2003) Alpha-fetoprotein positively regulates cytochrome c-mediated caspase activation and apoptosome complex formation. *Eur. J. Biochem.*, 270, 4388-99.
- 145. Shevchuk, N.A., Bryksin, A.V., Nusinovich, Y.A., Cabello, F.C., Sutherland, M., Ladisch, S. (2004) Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic.* Acids Res., 32, 19.



- 146. Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S., Ling, N. (1991) Follistatin binds to both activin and inhibin through the common subunit. *Endocrinology.*, 128, 3313-5.
- 147. Song, Y.H., Naumova, A.K., Liebhaber, S.A., Cooke, N.E. (1999) Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11-q13 encompassing the vitamin D binding protein DBP/Gc-globulin and albumin multigene cluster. *Genome Res.*, 9, 581-7.
- 148. 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.
- Sudlow, G., Birkett, D.J. and Wade, D.N. (1976) Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.*, 12, 1052-1061.
- 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.
- 151. Tavoulari, S., Frillingos, 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**.
- 152. Thomas, P., Mellon, P.L., Turgeon, J. and Waring, D.W. (1996) The L beta T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology.*, 137, 2979-89.
- 153. Thomas, S.G., Clarke, I.J. (1997) The positive feedback action of estrogen mobilizes LH-containing, but not FSH-containing secretory granules in ovine gonadotropes. *Endocrinology.*, 138, 1347-50.

- 154. 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.
- 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, 1229-1236.
- 156. Tio, S., van Dieten, J.A. and de Koning, J. (1998) Immunoneutralization of follicle stimulating hormone does not affect gonadotrophin surge-inhibiting factor/attenuating factor bioactivity during the rat ovarian cycle. *Hum. Reprod.*, 13, 2731-2737.
- 157. Tomasi, T.B. Jr. (1977) Structure and function of alpha-fetoprotein. Annu. Rev. Med., 28, 453-65.
- 158. Turgeon, J.L., Kimura, Y., Waring, D.W. and Mellon, P.L. (1996) Steroid and pulsatile gonadotropin releasing hormone (GnRH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol. Endocrinol.*, 10, 439-450.
- 159. Ueno, N., Ling, N., Ying, S.Y., Esch, F., Shimasaki, S. and Guillemin, R. (1987) Isolation and partial characterization of follistatin: a single-chain Mr 35,000 monomeric protein that inhibits the release of follicle-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 8282-6.
  - 160. Vasilyev, V.V., Pernasetti, F., Rosenberg, S.B., Barsoum, M.J., Austin, D.A., Webster, N.J. and Mellon, P.L. (2002) Transcriptional activation of the ovine follicle-stimulating hormone-beta gene by gonadotropin-releasing hormone involves multiple signal transduction pathways. *Endocrinology.*, 143, 1651-9.

- 161. Voegele, A.F., Jerkovic, L., Wellenzohn, B., Eller, P., Kronenberg, F., Liedl, K.R., and Dieplinger, H. (2002) Characterization of the vitamin E-binding properties of human plasma afamin. *Biochemistry.*, 41, 14532-8.
- 162. Vozza, L.A., Wittwer, L., Higgins, D.R., Purcell, T.J., Bergseid, M., Collins-Racie, L.A., LaVallie, E.R., Hoeffler, J.P. (1996) Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *Biotechnology* (N Y)., 14, 77-81.
- 163. 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.
- 164. White, P., Cooke, N. (2000) The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 320-7.
- 165. Windle, J.J., Weiner, R.I., Mellon, P.L. (1990) Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. *Mol. Endocrinol.*, 4, 597-603.
- 166. Wrana, J.L. and Attisano, L. (2000) The Smad pathway. Cytokine Growth Factor Rev., 11, 5-13.
- 167. Wu, G.X., Lin, Y.M., Zhou, T.H., Gao, H. and Pei, G. (2000) Significant down-regulation of alpha-albumin in human hepatoma and its implication. *Cancer Lett.*, 160, 229-36.
- 168. Wurmbach, E., Yuen, T., Ebersole, B.J. and Sealfon, S.C. (2001) Gonadotropin-releasing hormone receptor-coupled gene network organization. J. Biol. Chem., 276, 47195-201.



- 169. Xu, J., McKeehan, K., Matsuzaki, K. and McKeehan, W.L. (1995) Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. J. Biol. Chem., 270, 6308-13.
- 170. Yamamoto, N., Naraparaju, V.R. (1996) Vitamin D3-binding protein as a
  precursor for macrophage activating factor in the inflammation-primed
  macrophage activation cascade in rats. *Cell Immunol.*, 170, 161-7.
- 171. Ying, S.Y. (1988) Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocr. Rev.*, 9, 267-293.
- 172. Ying, S.Y., Becker, A., Swanson, G., Tan, P., Ling, N., Esch, F., Ueno, N., Shimasaki, S. and Guillemin, R. (1987) Follistatin specifically inhibits
  pituitary follicle stimulating hormone release in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 133-9.
- 173. Yokoi, T., Ohmichi, M., Tasaka, K., Kimura, A., Kanda, Y., Hayakawa, J., Tahara, M., Hisamoto, K., Kurachi, H. and Murata, Y. (2000) Activation of the luteinizing hormone beta promoter by gonadotropin-releasing hormone requires c-Jun NH2-terminal protein kinase. J. Biol. Chem., 275, 21639-47.
- 174. 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.
- 175. Zoellner, H., Hou, J.Y., Lovery, M., Kingham, J., Srivastava, M., Bielek, E., Vanyek, E., Binder, B.R. (1999) Inhibition of microvascular endothelial apoptosis in tissue explants by serum albumin. *Microvasc. Res.*, 57, 162-73.

