

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ: ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ**

**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

**ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ
ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ (GONADOTROPHIN SURGE
ATTENUATING FACTOR - GnSAF) ΑΠΟ ΤΑ
ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ**

**ΚΑΡΛΙΓΚΙΩΤΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2006



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

Αριθ. Εισ.: 7316/1
Ημερ. Εισ.: 04-08-2009
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
573.665
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000083646



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ: ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: **ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ**

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑ
ΑΜΒΛΥΝΣΕΩΣ ΤΟΥ ΚΥΜΑΤΟΣ ΤΩΝ
ΓΟΝΑΔΟΤΡΟΦΙΝΩΝ (GONADOTROPHIN SURGE
ATTENUATING FACTOR - GnSAF) ΑΠΟ ΤΑ
ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ

ΚΑΡΛΙΓΚΙΩΤΟΥ ΕΛΕΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΥΠΟΒΛΗΘΗΚΕ ΣΤΟ ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2006

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ

● ΜΕΣΣΗΝΗΣ Ε ΙΩΑΝΝΗΣ

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

● ΜΕΣΣΗΝΗΣ Ε ΙΩΑΝΝΗΣ

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

● ΜΕΣΣΗΝΗΣ Ε ΙΩΑΝΝΗΣ

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΑΡΒΑΝΙΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Παθολογικής Ανατομίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΣΑΚΕΛΛΑΡΙΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

Καθηγητής Φαρμακολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΛΛΙΑ ΠΑΝΑΓΟΥΛΑ

Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΟΥΚΟΥΛΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Ενδοκρινολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

● ΚΑΛΛΙΤΣΑΡΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

*Στους γονείς μου,
Αντώνη και Δέσποινα Καρλιγκιώτη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1. Γενικά	9
2. Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος και η ρύθμιση του	11
2.1 Η ωοθυλακική φάση ή φάση ωρίμανσης του ωοθυλακίου	12
2.2 Διακυκλική περίοδος	15
2.3 Περιοωοθυλακιορρηκτική φάση	16
2.4 Η ωχρινική φάση.	17
3. Το μεσοκύκλιο εκκριτικό κύμα των γοναδοτροφινών και η ρύθμισή του	18
3.1 Η υποθαλαμική ορμόνη GnRH	18
3.2 Ωοθηκικές στεροειδείς ορμόνες	20
3.3 Μη στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης	21
3.3.1 Ανασταλίνη	21
3.3.2 Ακτιβίνη και φολιστατίνη	21
4. GnSAF	23
4.1.1 In vivo μελέτες	23
4.1.2 In vitro μελέτες	28
4.2 Ρόλος του GnSAF	28
4.3 Απομόνωση του παράγοντα GnSAF	30
4.3.1 In vitro βιολογικά συστήματα μελέτης της δραστηριότητας GnSAF	30
4.3.2 Μελέτες απομόνωσης του παράγοντα GnSAF	30
4.4 Διαφοροποίηση του παράγοντα GnSAF από τις πρωτεΐνες της ομάδας της ανασταλτίνης	33
4.5 Θέση παραγωγής του GnSAF	34
4.6 Μηχανισμός δράσης	35
4.7 Φυσιολογική σημασία του GnSAF	35
4.8 Η λευκωματίνη ορού του ανθρώπου και ο παράγοντας GnSAF	38
5. Σκοπός	40
B. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	41
6. Κύτταρα	42
6.1.1 Κοκκώδη κύτταρα	42
6.1.2 Κύτταρα από ηπατικό ιστό ανθρώπου	43
6.1.3 Μονοπύρηνια κύτταρα από περιφερικό αίμα	43
6.1.4 Κυτταρικές σειρές	44
6.2. Καλλιέργεια κυττάρων	44
6.2.1 Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων	44
6.2.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών	45
Α. Απόψυξη κυττάρων	45
Β. Καλλιέργεια προσκολλημένων κυττάρων (HepG2 και HeLa) με θρυψινοποίηση	45
Γ. Καλλιέργεια μη προσκολλημένων κυττάρων (K562)	46

7. Απομόνωση DNA	46
7.1 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα	47
7.2 Απομόνωση DNA από κυτταρικές σειρές ή κοκκώδη κύτταρα	47
7.3 Απομόνωση DNA από ηπατικό ιστό	47
8. Απομόνωση RNA	48
8.1 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινα κύτταρα	48
8.2 Απομόνωση κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA	49
8.2.1 Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA	49
8.2.2 Απομόνωση πυρηνικού RNA	50
9. Απομόνωση πρωτεϊνών	52
10. Σύνθεση cDNA	52
11. Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση PCR του γονιδίου ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA, Human Serum Albumin)	53
12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης	57
Φωτογράφιση του πηκτώματος	58
Μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους	58
13. Φωτομετρικός Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων	58
14. Καθαρισμός προϊόντων PCR	58
15. Ταυτοποίηση των προϊόντων της PCR με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και άμεση ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)	59
15.1 Ανάλυση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με ένζυμα περιορισμού (RFLP - Restriction fragment Length Polymorphism)	59
15.2 Άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (Sequencing)	60
16. Ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων PCR	60
17. Ανάλυση κατά Northern (Northern Blot)	61
17.1.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA	61
17.1.2 Μεταφορά πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	61
17.2 Υβριδισμός μεμβράνης με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια	62
17.2.1 Σήμανση ανιχνευτών	62
17.2.2 Ραδιενεργός υβριδισμός	63
18. In situ υβριδισμός	67
18.1 Μη ραδιενεργός in situ υβριδισμός	67
18.1.1 Καλλιέργεια, σταθεροποίηση και μονιμοποίηση κυττάρων.	68
18.1.2 Σήμανση ανιχνευτή	69
18.1.3 Υβριδισμός	69
18.2 Ανίχνευση	71
19. Ανάλυση κατά Western (Western Blot Analysis)	63
19.1 Ανάλυση Πρωτεϊνών	65
19.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου.	65

19.1.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης	66
19.1.3 Χρώση της πηκτής και αποχρωμάτωση	66
19.2 Υβριδισμός	66
19.2.1 Επώαση φίλτρου νιτροκυτταρίνης	66
19.2.2 Ανίχνευση	67
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	73
20. Έκφραση του γονιδίου της λευκωματίνης του ορού του ανθρώπου στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα	74
21. Μελέτη του μηχανισμού έκτοπης έκφρασης του HSA γονιδίου στα κοκκώδη κύτταρα	80
22. Μελέτη έναρξης του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα	81
23. Ταυτοποίηση της ειδικότητας και της αλληλουχίας των προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων περιορισμού και άμεσο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)	82
23. 1 Ένζυμα περιορισμού	82
23. 2 Άμεσος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας	83
24. Ημιποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των διαφόρων εξονίων του γονιδίου της λευκωματίνης σε διάφορους κυτταρικούς τύπους	86
25. Ανάλυση κατά Northern	86
26. In situ υβριδισμός	88
27. Ανάλυση κατά Western	87
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	92
4.1 Συζήτηση	93
4.2. Συμπεράσματα:	99
Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	100
ΣΤ. SUMMARY	103
Ζ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	105

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ταυτοποίηση του ωοθηκικού παράγοντα GnSAF και ο ρόλος του στη φυσιολογία της αναπαραγωγής αποτελεί αντικείμενο επισταμένων μελετών διεθνώς. Με την παρούσα εργασία επιχειρείται η διερεύνηση του γονιδίου υπεύθυνου για την κωδικοποίηση του GnSAF.

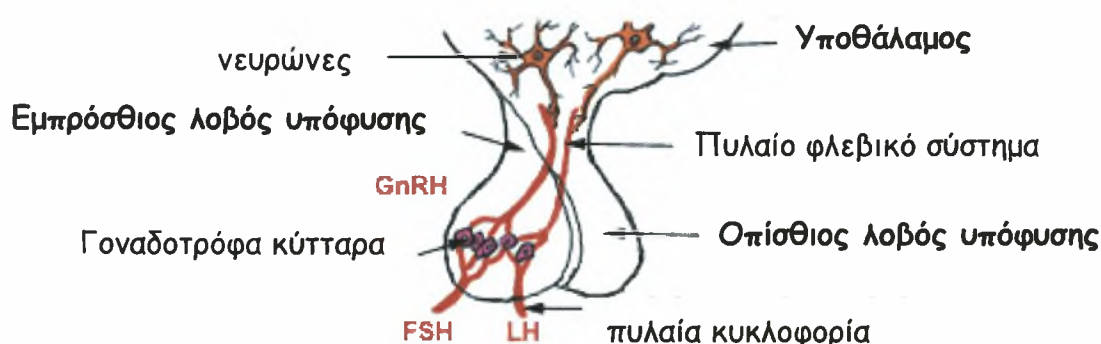
Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την εποπτεία του Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Ιωάννη .Ε. Μεσσήνη. Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως τον Καθηγητή κ. Μεσσήνη. Χάρis τη σωστή καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη και τη στήριξη που μου έδειξε κατέστη εφικτή η πραγματοποίηση του συγκεκριμένου ερευνητικού πρωτοκόλλου. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή Βιολογίας κ Ν. Βαμβακόπουλο για τη συμμετοχή του στην Τριμελή Επιτροπή της διδακτορικής διατριβής μου και για τις εύστοχες παρατηρήσεις του κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογίας κ. Παναγούλα Κόλλια, η οποία στήριξε τη διενέργεια και εξέλιξη της παρούσης εργασίας, τόσο με την άρτια επιστημονική της γνώση όσο και με την καθημερινή της βοήθεια στην πραγματοποίηση των πειραματικών διαδικασιών. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τα μέλη της επταμελούς Επιτροπής, μέλη ΔΕΠ του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας: κ. Δ. Αρβανίτη, Καθηγητή Ανατομίας, κ. Ν. Σακελλαρίδη, Καθηγητή Φαρμακολογίας, κ. Γ. Κουκούλη, Επίκουρο Καθηγητή Ενδοκρινολογίας και τον κ. Α. Καλλιτσάρη, Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας. Επιπλέον, ευχαριστώ το προσωπικό του Εργαστηρίου Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και ιδιαίτερα τη Βιολόγο Δρ. Πιπίνα Παππαγγελή για τη διαρκή της υποστήριξη και την ουσιαστική της συμβολή κατά την συλλογή των κοκκωδών κυττάρων καθώς και το προσωπικό του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη συνεργασία τους και ιδιαίτερα τη Βιολόγο κ. Μαρία Σάτρα, για τη χορήγηση των ηπατικών κυττάρων, τη Βιολόγο κ. Μαρία Σαμαρά για τη βοήθεια της στην ανάπτυξη του υβριδισμού κατά Northern, τη Βιολόγο κ. Ιωάννα Χιώτογλου για τη βοήθεια της στην ανάπτυξη του υβριδισμού κατά Western και τη Μοριακή Βιολόγο κ. Ανδρομάχη Βαγενά για την πολύτιμη και ουσιαστική βοήθεια της στην απεικόνιση των αποτελεσμάτων από τον *in situ* υβριδισμό. Επίσης, τον Καθηγητή Ενδοκρινολογίας της Αναπαραγωγής του Πανεπιστημίου Edinburgh, UK, Stephen G Hillier για την βοήθεια που μου προσέφερε στην εκμάθηση της μεθόδου καλλιέργειας των κοκκωδών κυττάρων. Τέλος, ευχαριστώ τους γονείς μου και την αδελφή μου για την αγάπη και την αμέριστη ηθική και υλική υποστήριξη τους. Η παρούσα εργασία κατά το πρώτο μέρος της υποστηρίχτηκε από το ΠΕΝΕΔ 1999 (προς τον Καθηγητή Ιωάννη Ε. Μεσσήνη) κωδικός έργου 1438.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Γενικά

Η λειτουργία του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος στον άνθρωπο όπως και σε άλλα θηλαστικά, διαφέρει από αυτό του ανδρικού σε πολλά σημεία. Κύρια διαφορά αυτών είναι ότι στις γυναίκες οι κύριοι αδένες της αναπαραγωγής, δηλαδή οι ωothήκες, έχουν ορισμένο χρόνο λειτουργίας. Μία σημαντική ιδιομορφία είναι ότι μόνο ένα ωοκύτταρο φθάνει στην ωρίμανση κάθε φορά. Η κυκλικά περιοδική παραγωγή ώριμων ωοκυττάρων από την ωοθήκη σχετίζεται με τις κυκλικές αλλαγές στην παραγωγή των ορμονών, που συμμετέχουν στο γεννητικό κύκλο. Οι ορμόνες αυτές παράγονται από το υποθαλαμο-υποφυσιακό σύστημα και τις ωοthήκες και προκαλούν κυκλικές αλλαγές στη μήτρα και στον κόλπο (Messinis and Templeton 1988a).

Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος στις γυναίκες καθορίζεται από μία σειρά πολύπλοκων μηχανισμών θετικής και αρνητικής παλινδρόμησης αλληλορρύθμισης μεταξύ του υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος (Σχήμα 1) και των ωοθηκών. Αναλυτικότερα, η λειτουργία της υπόφυσης ρυθμίζεται από διεγερτικούς και ανασταλτικούς παράγοντες, που εκκρίνονται από συγκεκριμένους νευρώνες του υποθάλαμου (Williams, 1981, pp 3-8).

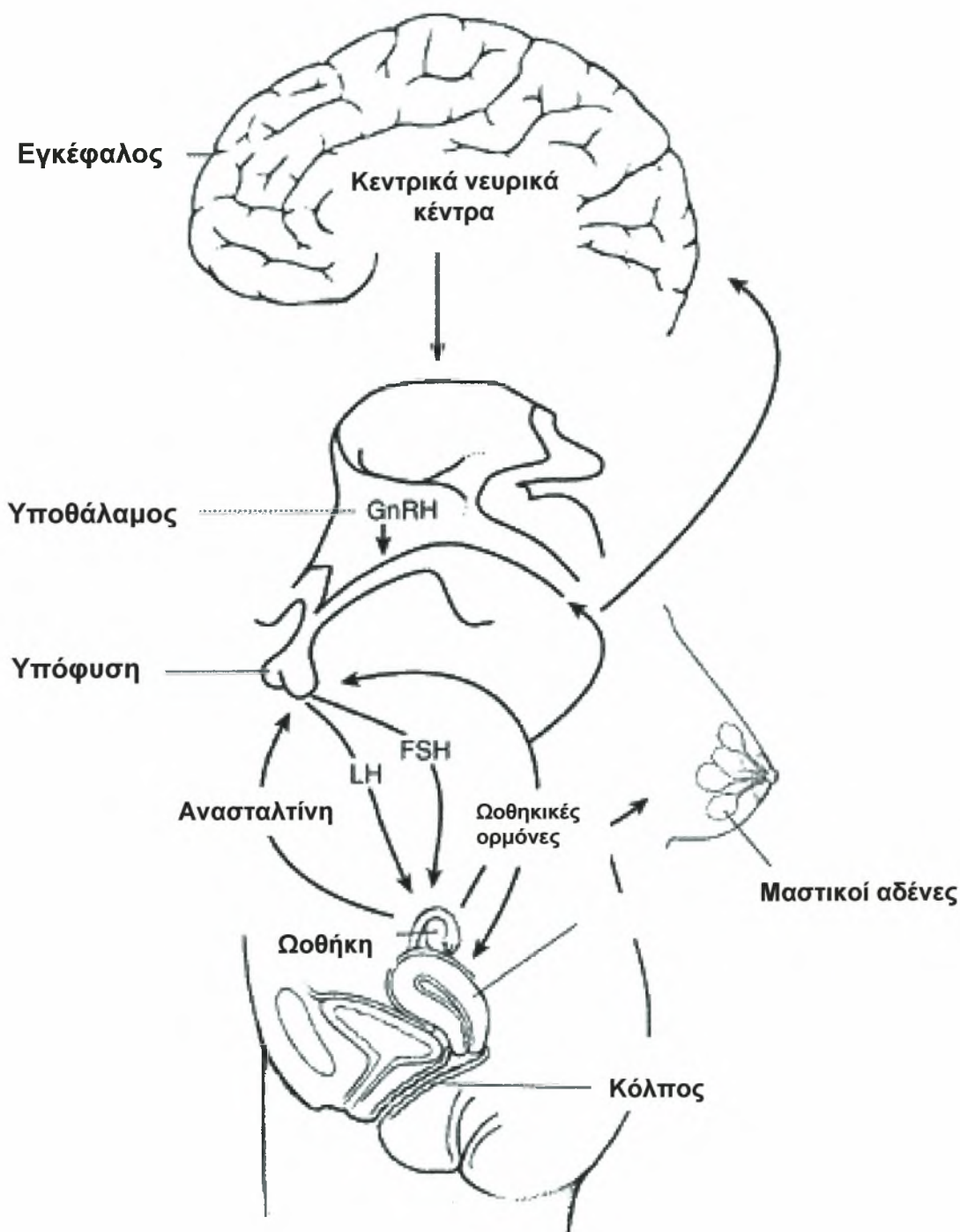


Σχήμα 1. Σχηματική αναπαράσταση υποθαλαμο-υποφυσιακού συστήματος. Προσαρμοσμένο από Williams (1981)

1981, pp 3-8). Κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο είναι γνωστή η δράση των στεροειδών ορμονών, ενώ τα τελευταία χρόνια είναι πλέον αναγνωρισμένη και η ρυθμιστική δράση που έχουν οι μη στεροειδείς ορμόνες, που όπως αναφέρθηκε εκκρίνονται από τις ωοθήκες. Η πιο γνωστή από αυτές είναι η ανασταλτίνη (inhibin), ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας δεν έχει απολύτως διευκρινισθεί. Τα τελευταία χρόνια ερευνάται η ύπαρξη ενός μη στεροειδούς πεπτιδικού παράγοντα διάφορου της ανασταλτίνης που πιθανώς δρα ελαττώνοντας την ευαισθησία της υπόφυσης στην ορμόνη έκκρισης των γοναδοτροφινών GnRH (Gonadotrophin Releasing hormone) με θεωρούμενη έδρα παραγωγής του τη στοιβάδα των ωοθηκικών κοκκωδών κυττάρων (Messinis and Templeton, 1989).

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των μεθόδων IVF (*In vitro* fertilisation-εξωσωματική γονιμοποίηση), έγινε αντιληπτός ο ρόλος της FSH (Follicle stimulating hormone) για την παραγωγή αυτής της μη χαρακτηρισμένης ορμόνης, η οποία παράγεται από τις διεγερμένες ωοθήκες των γυναικών και έχει ονομασθεί «παράγοντας αμβλύνσεως του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor - GnSAF)» (Messinis and Templeton, 1989). Ο παράγοντας GnSAF θεωρείται ότι είναι υπεύθυνος για την ελάττωση του μεγέθους του μεσοκύκλιου κύματος της LH (Luteinising Hormone) στις γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση, μέσω της ελάττωσης της υποφυσιακής απάντησης στην υποθαλαμική ορμόνη GnRH (Messinis and Templeton, 1989, Fowler et al., 2003).

Για την καλύτερη κατανόηση της ταυτοποίησης, του μηχανισμού δράσης και της φυσιολογικής σημασίας του GnSAF, παρατίθενται περιληπτικά τα στάδια του γεννητικού κύκλου καθώς και οι μηχανισμοί, που συμβάλλουν στη ρύθμισή του.



Σχήμα 2. Αρνητικός και θετικός μηχανισμός παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (feedback). Προσαρμοσμένο από Stanier and Forsling (1990).

2. Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος και η ρύθμιση του

Στην ενήλικη γυναίκα, η ρύθμιση του γεννητικού της κύκλου γίνεται από τον υποθάλαμο, την υπόφυση και τις ωοθήκες. Ο ωοθηκικός ή γεννητικός κύκλος αναφέρεται στα γεγονότα, που λαμβάνουν χώρα από την μια εμμηνορρυσία έως την επόμενη. Η διάρκεια του κύκλου είναι μεταξύ 22 και 35 ημέρες και

διακρίνονται δύο κύριες φάσεις: i) Η ωοθυλακική φάση ή φάση ωρίμανσης του ωοθυλακίου και ii) Η φάση του σχηματισμού του ωχρού σωματίου ή ωχρινική φάση. Η ύπαρξη μιας δυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των ορμονών, που εκκρίνονται από τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα και αυτών από τα ωοθυλάκια, καθορίζουν τη σειρά των γεγονότων, που συμβαίνουν στη διάρκεια ενός φυσιολογικού γεννητικού κύκλου. Αυτά συμπίπτουν χρονικά με ανάλογες αλλαγές, που παρατηρούνται στη μορφολογία του ενδομητρίου, οι οποίες προκαλούνται από τις ορμονικές μεταβολές (Marshall and Odell, 1992 pp 1493-1497).

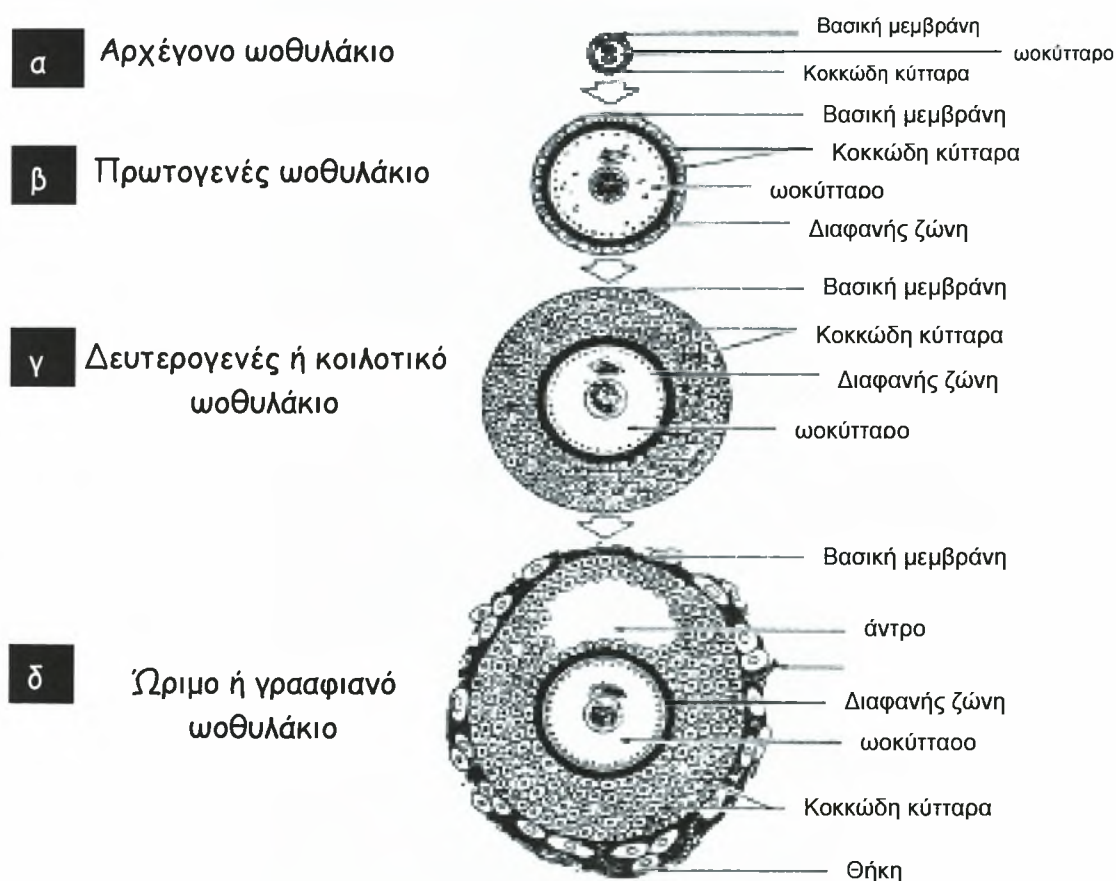
2.1 Η ωοθυλακική φάση ή φάση ωρίμανσης του ωοθυλακίου

Κατά τη διάρκεια της πρώιμης ωοθυλακικής φάσης (3^η με 4^η ημέρα), οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα των γοναδοτροφινών, που εκκρίνονται από την υπόφυση, δηλαδή της ωχρινοποιητικής ορμόνης LH και της ορμόνης διέγερσης των ωοθυλακίων FSH, είναι παρόμοιες. Επίσης, οι ώσεις της LH είναι σταθερές στο εύρος και συμβαίνουν κάθε 60 με 90 λεπτά.

Το «αρχέγονο ωοθυλάκιο» (Σχήμα 3^α), με διάμετρο 30-60 μm , αποτελείται από το ωκύτταρο, που πρόκειται να διαφοροποιηθεί σε ώριμο ωάριο. Το ωκύτταρο παραμένει στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και περιβάλλεται από τη βασική μεμβράνη και από ένα στοίχο επίπεδων κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα) (Σχήμα 3^β) (Μεσσήνης 2005 σελ 27-30, Kenigsberg et al 1992, pp 1916-1921).

Η ανάπτυξη του αρχέγονου ωοθυλακίου σε «πρωτογενές ωοθυλάκιο» γίνεται με την αύξηση της διαμέτρου του από 15 σε 100 μm και την παρουσίαση μιας ζώνης κυττάρων της έσω θήκης και την ανάπτυξη περισσότερων στοιχών κυβοειδών κυττάρων (κοκκώδη κύτταρα). Τα κοκκώδη κύτταρα με τις κυτταροπλασματικές τους προεκβολές διατρέχουν τη διαφανή ζώνη δημιουργώντας ένα δίαυλο επικοινωνίας με τη μεμβράνη του ωοκυττάρου, ώστε να μπορούν να μεταφέρονται στο ωάριο πληροφορίες ή τροφικά στοιχεία. Εξέχον χαρακτηριστικό του ωοθυλακίου είναι η δημιουργία μιας κοιλότητας, που ονομάζεται ωοθυλακική κοιλότητα ή άντρο και περιέχει το ωοθυλακικό υγρό το οποίο παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα. Στα κύτταρα αυτά εμφανίζονται υποδοχείς της FSH οι οποίοι είναι σημαντικοί για την έναρξη της ορμονο-εξαρτώμενης ανάπτυξης του ωοθυλακίου. Έτσι, το πρωτογενές ωοθυλάκιο αναπτύσσεται σε δευτερογενές ή προκοιλοτικό ωοθυλάκιο (χωρίς άντρο) και τα κοκκώδη κύτταρα αυξάνουν στην περιφέρεια (Σχήμα 3^γ). Στο στάδιο αυτό, το ωοθυλάκιο έχει διάμετρο 400 μm και με τη συσσώρευση ωοθυλακικού υγρού μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων σχηματίζεται στον έναν πόλο του ωοθυλακίου το άντρο. Τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνουν βλενοπολυσακχαρίτες σχηματίζοντας τη διαφανή ζώνη. Υπό την επίδραση των γοναδοτροφινών, τα κοιλοτικά ωοθυλάκια ωριμάζουν και από τα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας, σχηματίζεται γύρω από το ωάριο ο ωοφόρος δίσκος και ο ακτινωτός στέφανος και κάτω από αυτόν η διαφανής ζώνη (Σχήμα 3^δ) (Μεσσήνης 2005 σελ 27-30, Kenigsberg et al, 1992, pp 1916-1921).

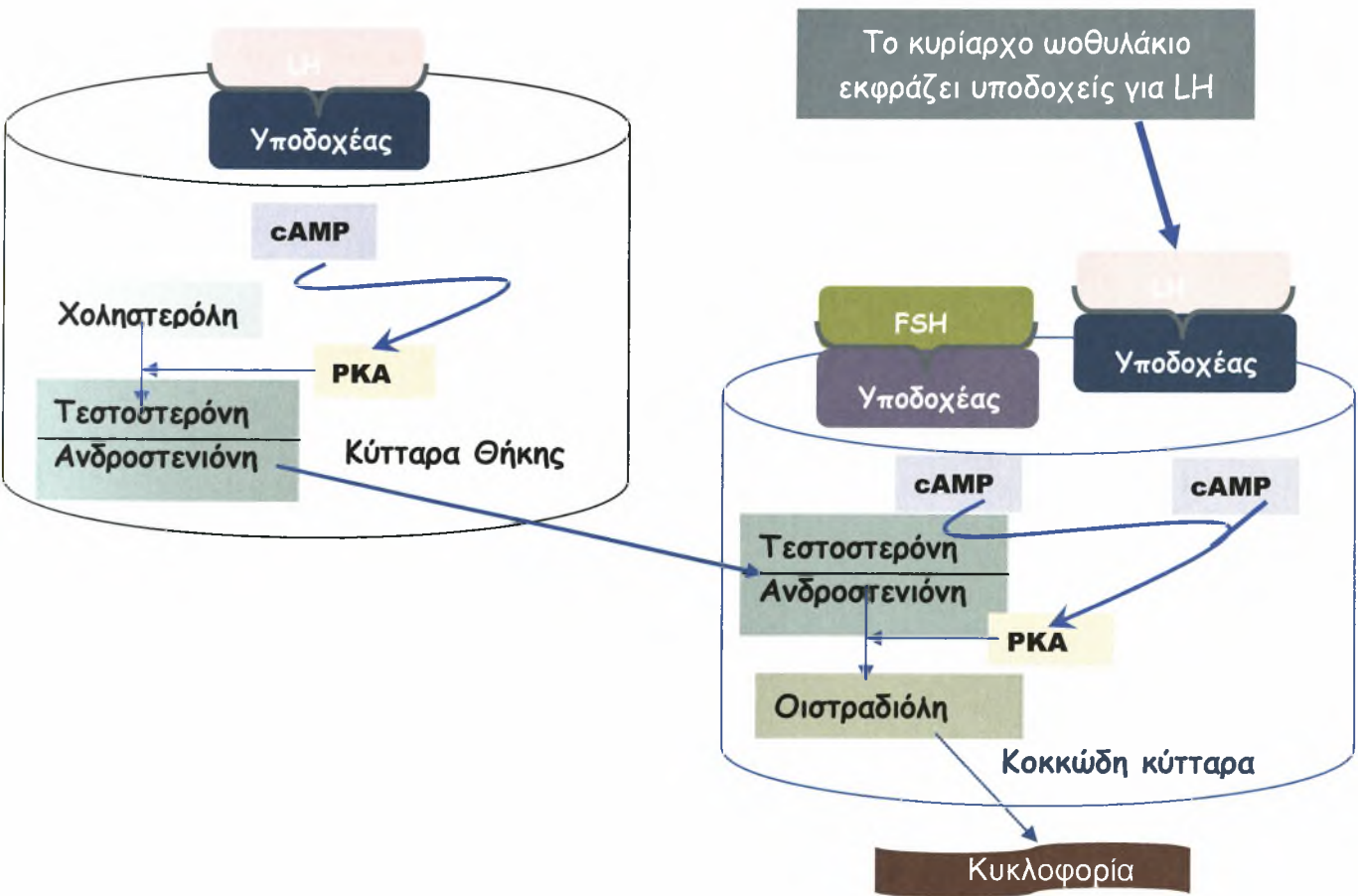
Δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός μέσω του οποίου το αρχέγονο ωοθυλάκιο ωριμάζει και γίνεται πρωτογενές και δευτερογενές. Για να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη ενός προκοιλοτικού δευτερογενούς ωοθυλακίου σε πρωθυλακιόρρηκτικό ή γραφιανό χρειάζονται περίπου 85 ημέρες στον άνθρωπο (Gougeon, 1986). Τα εξελισσόμενα σε ώριμα ή γραφιανά ωοθυλάκια (Σχήμα 3^ε, 3^{στ}) έχουν διάμετρο που ξεκινά από 5-8 και αυξάνεται μέχρι περίπου τα 20 mm οπότε και ακολουθεί η ρήξη τους. Η ανάπτυξή τους γίνεται μέσα σε 15 ημέρες περίπου. Κατά την ωρίμανση σταδιακά παρατηρείται συσσώρευση ωοθυλακικού υγρού καθώς και αύξηση του αριθμού των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων της θήκης. Παράλληλα, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη κύτταρα και επάγεται ο σχηματισμός υποδοχέων της LH στα κοκκώδη κύτταρα, που αρχικά υπήρχαν μόνο στα κύτταρα θήκης (Μεσσίνη, 2005, σελ 30-31).



Σχήμα 3. Ωοθυλάκια σε διάφορες εξελικτικές μορφές. Προσαρμοσμένο από τους Stanier and Forsling (1990).

Κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι στεροειδείς ορμόνες, που παράγονται από τα κύτταρα της θήκης και τα κοκκώδη κύτταρα μέσα από μια αλληλεπίδραση με τις γοναδοτροφίνες ορμόνες της υπόφυσης. Έτσι, διατυπώθηκε η θεωρία γνωστή ως η «θεωρία δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροφινών» σύμφωνα με την οποία αναπτύσσεται η συνεργασία των κοκκωδών κυττάρων με τα κύτταρα της

θήκης για τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών. Αναλυτικότερα, τα κοκκώδη κύτταρα με την επίδραση της FSH εκφράζουν στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, την αρωματάση, ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση των οιστρογόνων. Τα ανδρογόνα αποτελούν το υπόστρωμα για τη δράση της αρωματάσης, δεν παράγονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Αντίθετα, τα ένζυμα αυτά παράγονται στα κύτταρα της θήκης υπό την επίδραση της LH. Τα μεταφερόμενα ανδρογόνα τεστοστερόνη και ανδροστενιόνη από τα κύτταρα της θήκης στα κοκκώδη κύτταρα αρωματοποιούνται σε οιστρογόνα. Φαίνεται καθαρά πόσο σημαντική είναι η συνεργασία των γοναδοτροφινών με τις στεροειδείς και μη στεροειδείς ορμόνες, όπως είναι η ανασταλίνη και οι ακτιβίνες για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και η δημιουργία οιστρογονικού μικροπεριβάλλοντος στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων (Σχήμα 4) (McNatty et al., 1979a,b, Scheneyer, 2000, Fortune et al., 2004).



Σχήμα 4. Θεωρία των δύο κυττάρων – δύο γοναδοτροφινών

2.2 Διακυκλική περίοδος

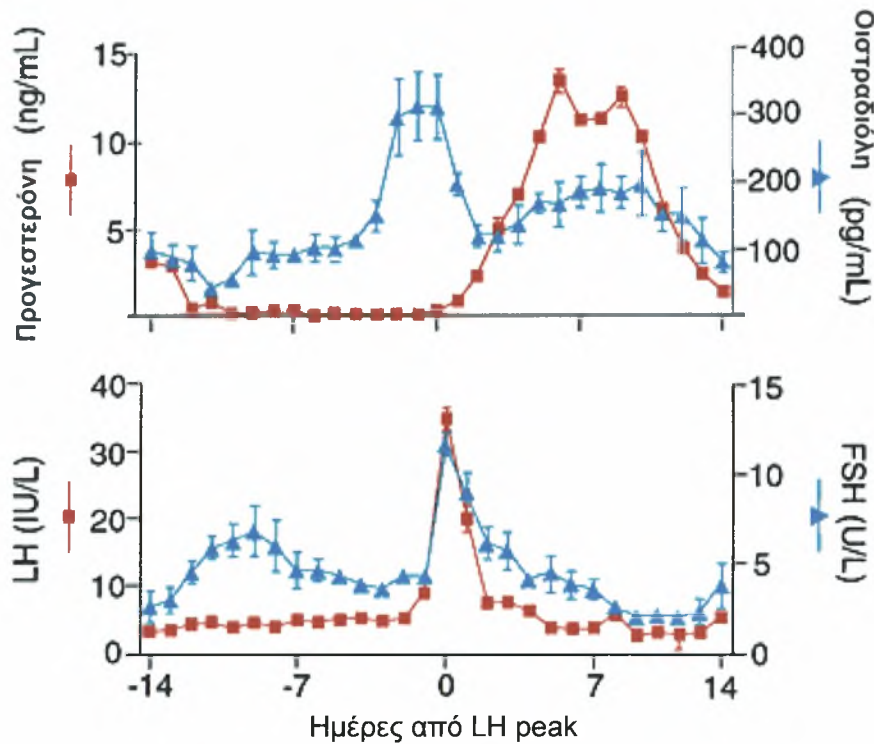
Στο φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, οι συγκεντρώσεις της FSH στον ορό αρχίζουν να αυξάνονται 2 με 3 ημέρες πριν την έναρξη της εμμήνου ρύσεως. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η αύξηση αυτή αρχίζει 4 μέρες πριν την έναρξη της έμμηνου ρήσης (Miro and Aspinall, 2005). Η FSH παραμένει αυξημένη μέχρι το μέσο της ωοθυλακικής φάσης, οπότε επιστρέφει στα βασικά της επίπεδα (Mais et al., 1987, Messinis et al., 1993a). Κατά τη φάση αυτή η οποία ονομάζεται «διακυκλική αύξηση» ή «παράθυρο» της FSH, γίνεται η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Η επιλογή αυτή γίνεται ανάμεσα σε αρκετά ωοθυλάκια μεγέθους 2-5 mm, που υπάρχουν στις ωοθήκες και στρατολογούνται. Από αυτά ένα μόνο επιλέγεται τελικά, με μια διαδικασία που ελέγχεται αποκλειστικά από την FSH. Τα ωοθυλάκια, που δεν επιλέγονται, μετατρέπονται σε άτρητα και σταδιακά εξαφανίζονται στο στρώμα της ωοθήκης (Hsueh, et al, 1994, Μεσσήνης 2005, pp 37-39, Messinis 2006).

Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου γίνεται μέσα από μια πολύπλοκη και συνεχή διαδικασία. Η διακυκλική αύξηση της FSH ελέγχεται από παράγοντες της ωοθήκης πιθανώς από την ανασταλτίνη A, την προγεστερόνη και την οιστραδιόλη, στις οποίες παρατηρείται μια σταδιακή αλλά σημαντική μείωση των επιπέδων τους δημιουργώντας μια ραγδαία ανάπτυξη των κοκκωδών κυττάρων στο κυρίαρχο ωοθυλάκιο, ενώ τα μειωμένα επίπεδα της FSH στα υπόλοιπα γρααφινά ωοθυλάκια προκαλούν την παύση της ανάπτυξής τους. Τα υψηλά αυτά ενδοκυτταρικά επίπεδα της FSH προκαλούν και την αύξηση στα επίπεδα της οιστραδιόλης.

Η διακυκλική αύξηση της FSH διαρκεί μέχρι και την 5^η με 6^η ημέρα της ωοθυλακικής φάσης (Roseff et al., 1989, Messinis et al., 1993b, Groome et al., 1996). Η αύξηση της οιστραδιόλης φαίνεται να προκαλεί τη σταδιακή μείωση της έκκρισης της FSH από την υπόφυση, δηλαδή το τέλος της διακυκλικής αύξησης (Σχήμα 5). Η ανασταλτίνη B, από τη στιγμή που τα επίπεδα της FSH φτάνουν στη μέγιστη τιμή, αρχίζει να αυξάνει σταδιακά και αμέσως δρα περιοριστικά στην ανάπτυξη περισσότερων του ενός ωοθυλακίων. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της πιθανής κατασταλτικής δράσης της ανασταλτίνης B στα επίπεδα της FSH, στενεύοντας έτσι το παράθυρο της FSH (Burger and Igarashi, 1988, Groome et al., 1996, Welt et al., 1997). Κάποιο ρόλο στη ρύθμιση της διακυκλικής αύξησης της FSH πιθανώς να διαδραματίζει και η ακτιβίνη A (Muttukrishna et al., 1996).

Βάσει των παραπάνω δεδομένων, είναι πιθανό ότι η ανασταλτίνη A συμμετέχει στη διαδικασία που «ανοίγει» το παράθυρο της FSH, ενώ η ανασταλτίνη B εμπλέκεται στο μηχανισμό που «κλείνει» το παράθυρο αυτό. Η έκκριση της οιστραδιόλης φαίνεται να είναι η βασική υπεύθυνη για την αρνητική παλινδρομη αλληλορύθμιση της FSH κατά την ωοθυλακική φάση. Η οιστραδιόλη, που παράγεται από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, πιθανώς να παίζει κάποιο ρόλο στην περαιτέρω ωρίμανση του επικρατούντος ωοθυλακίου (Zelevnik et al., 1981), το οποίο συνεχίζει να αυξάνει παρά τη μείωση των επιπέδων της FSH. Αυτό σχετίζεται αφ' ενός με τη δράση ενδοωοθυλακικών παραγόντων και αφ'ετέρου με την απόκτηση υποδοχέων της LH από τα

κοκκώδη κύτταρα. Έτσι, το ωοθυλάκιο στο δεύτερο ήμισυ της ωοθυλακικής φάσης εξαρτάται τόσο από την FSH όσο και από την LH.



Σχήμα 5. Μεταβολές των υποφυσιακών και των ωοθηκικών ορμονών στην κυκλοφορία της γυναίκας στη διάρκεια του φυσικού γεννητικού κύκλου. Ως σημείο αναφοράς έχει ληφθεί η ημέρα της εκκριτικής αιχμής (peak) της LH (ημέρα 0). Προσαρμοσμένο από τους Marshall and Odell (1992)

2.3 Περιοωοθυλακιορρηκτική φάση

Με την αύξηση της οιστραδιόλης ευαισθητοποιείται η υπόφυση στη GnRH. Κατά το μεσοκύκλιο κύμα της LH, δεν αυξάνεται η συχνότητα των ώσεων της LH, αλλά μόνο το εύρος της κάθε ώσης, που οφείλεται σε αύξηση τους εύρους των ώσεων της GnRH ή στην αυξημένη ανταπόκριση της LH στην έκκριση της GnRH. Η οιστραδιόλη και η προγεστερόνη αυξάνουν την ανταπόκριση της LH στη GnRH. Έτσι, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης αυξάνεται σταδιακά αρχικά και απότομα στη συνέχεια φθάνοντας στη μέγιστη τιμή κατά την έναρξη του προωοθυλακιορρηκτικού κύματος της LH μέσω μηχανισμού θετικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (Hoff, 1983, Fritz and Speroff, 1983, Marshall and Odell, 1992, pp 1910-1912). Στη διάρκεια του κύματος της LH, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης ελαττώνεται σημαντικά. Το μεσοκύκλιο κύμα της LH οδηγεί στην ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων μέσα από αλλαγή στη στερεοειδογένεση, έτσι ώστε η παραγωγή της προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα να αυξάνεται. Κατά πόσον η προγεστερόνη στο αίμα αυξάνει πριν την έναρξη του μεσοκύκλιου κύματος της LH έχει αποτελέσει κατά καιρούς αντικείμενο συζητήσεων (Caro and Tarin, 1988, Messinis and Templeton, 1990a, Mason et al., 1993, Dafopoulos et al., 2005). Παρ’ όλα αυτά, η προγεστερόνη αυξάνει την ευαισθησία της υπόφυσης στην

Παρ' όλα αυτά, η προγεστερόνη αυξάνει την ευαισθησία της υπόφυσης στην GnRH και αυξάνει το εύρος του κύματος που προκαλείται από την οιστραδιόλη, δηλαδή ενισχύει το θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (Richards and Midgley, 1976).

Η ωοθυλακιορρηξία συνήθως συμβαίνει 10-12 ώρες μετά την αιχμή του κύματος της LH και περίπου 36-40 ώρες μετά την έναρξή του. Μέχρι την έναρξη του κύματος της LH, το ωοκύτταρο βρίσκεται στο στάδιο της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Με την εμφάνιση του εκκριτικού κύματος της LH συνεχίζεται η διαδικασία της μείωσης του ωοκυττάρου με τη δημιουργία του πρώτου πολικού σωματίου και την ωρίμανση του ωοκυττάρου μέχρι τη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Επιπλέον, ενεργοποιείται η σύνθεση των προσταγλανδινών, απαραίτητων για την ρήξη του ωοθυλακίου (Tsafiriri et al., 1972, Mattheij et al., 1993, 1994, Jamnongjit and Hammos, 2005). Το ωάριο που βρίσκεται πλέον στη μετάφαση II, θα ολοκληρώσει τη μειωτική του διαίρεση τη στιγμή της γονιμοποίησης από το σπερματοζώαριο.

2.4 Η ωχρινική φάση

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, τα κοκκώδη κύτταρα του ραγέντος ωοθυλακίου ωχρινοποιούνται υπό την επίδραση της LH και μαζί με τα κύτταρα της θήκης, τα αιμοφόρα αγγεία και το συνδετικό ιστό που τα παρεμβάλλουν σχηματίζουν το ωχρό σωμάτιο. Τα λευκά αιμοσφαίρια παράγουν διάφορες ουσίες, όπως οι κυτοκίνες, που ρυθμίζουν τη λειτουργία του ωχρού σωματίου. Κατά την ωχρινοποίηση, τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα έχουν την τυπική μορφολογία των διαφοροποιημένων κυττάρων παραγωγής στεροειδών, με πλούσιο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, ραβδοειδή μιτοχόνδρια και λιπώδη έγκλειστα με εστέρες χοληστερόλης. Εάν δεν γίνει γονιμοποίηση και εμφύτευση ακολουθεί η ωχρινόλυση, δηλαδή ο εκφυλισμός του ωχρού σωματίου. Μετά την 23^η ημέρα του κύκλου αναπτύσσεται μια ζώνη από πυκνοτικά κύτταρα. Κατά την ωχρινοποίηση, υπό την επίδραση της LH το ωχρό σωμάτιο παράγει προγεστερόνη. Μετά το κύμα της LH τα επίπεδα της LH στο αίμα είναι χαμηλά και οι ώσεις της LH αραιώνουν με συχνότητα περίπου μία ώση ανά τέσσερις ώσεις, ενώ σταδιακά ελαττώνεται η ανταπόκριση της LH στη GnRH. Οι συγκεντρώσεις των υποδοχέων της LH στην ωοθήκη είναι χαμηλές στην αρχή με μια απότομη αύξηση προς το μέσο της ωχρινικής φάσης και ελάττωση προς το τέλος. Τα υψηλά επίπεδα της προγεστερόνης φαίνεται να είναι η αιτία της μείωσης της συχνότητας των ώσεων της GnRH και της LH (Soules et al., 1984, Filicori et al., 1986, Nippoldt et al., 1989). Επίσης, τα επίπεδα της FSH παραμένουν χαμηλά στη φάση αυτή, γεγονός που αντανάκλα την επίδραση του αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Το ωχρό σωμάτιο εκτός από την προγεστερόνη παράγει και οιστραδιόλη μέσω του μηχανισμού των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροφινών με την FSH να παίζει σημαντικό ρόλο. Τόσο η προγεστερόνη όσο και η οιστραδιόλη συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροφινών. Πειράματα, που έγιναν σε γυναίκες, έδειξαν ότι μετά από ωοθυκεκτομή κατά τη μέση ωχρινική φάση αυξήθηκαν σταδιακά τα επίπεδα της FSH και της LH, ενώ οι συγκεντρώσεις της οιστραδιόλης και

της προγεστερόνης μειώθηκαν σημαντικά σε διάστημα 24 ωρών (Alexandris et al., 1997). Με την έναρξη της ωχρινόλυσης μειώνεται δραματικά η παραγωγή της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης και αυξάνονται η συχνότητα των ώσεων της LH και η συγκέντρωση στο πλάσμα της FSH με σκοπό την έναρξη του επόμενου γεννητικού κύκλου (Kenigsberg et al. 1992, pp 1915-1918, Marshall JC and Odell WD. 1992, pp 1903-1907, Messinis, 1997).

3. Το μεσοκύκλιο εκκριτικό κύμα των γοναδοτροφινών και η ρύθμισή του

Οι γοναδοτροφίνες ορμόνες, LH και FSH, είναι γλυκοπρωτεϊνικές ουσίες υπεύθυνες για τη σπερματογένεση, την ωοθυλακιογένεση και την ωοθυλακιορρηξία στον άνθρωπο και παράγονται από τα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης (Daughaday, 1985, pp 568-613, Marshall and Barkan 1992, pp 1931, Kaiser et al., 1997, Sosnowski et al., 2000 Shacham et al., 2001). Το κύμα των γοναδοτροφινών προκαλείται υπό την επίδραση του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης με τη συμμετοχή τριών κυρίως ρυθμιστικών παραγόντων. Τους παράγοντες αυτούς απαρτίζουν η υποθαλαμική ορμόνη GnRH, οι ωθητικές στεροειδείς ορμόνες (η οιστραδιόλη και πιθανώς η προγεστερόνη) και οι πεπτιδικές ορμόνες των ωθηκών (Pierce and Parsons, 1981, Gharib et al., 1990, Shoham et al., 1995). Η έκκριση τους διακρίνεται σε α) τονική ή βασική έκκριση, η οποία επηρεάζεται από την αρνητική επίδραση των στεροειδών β) κυκλική έκκριση, που αφορά στο μεσοκυκλικό κύμα έκκρισης των γοναδοτροφινών, όπου εμφανίζεται η εκκριτική τους αιχμή λόγω της θετικής επίδρασης των οιστρογόνων και γ) κατά ώσεις ή επεισοδιακή έκκριση, η οποία εμφανίζεται ανά 1-2 ώρες, ανεξάρτητα της κυκλικής ή της τονικής έκκρισης, και θεωρείται ότι ακολουθεί τις αντίστοιχες ώσεις της GnRH (Μεσσήνης, 2005, pp 32-33).

3.1 Η υποθαλαμική ορμόνη GnRH

Η GnRH είναι μια δεκαπεπτιδική ορμόνη του υποθαλάμου, η οποία διεγείρει τα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης, ενεργοποιώντας έτσι την έκκριση και της LH και της FSH μέσω του μηχανισμού ενεργοποίησης της κινάσης C (Shoham et al., 1995, Ortmann et al., 1999). Η GnRH, η κύρια ρυθμιστική ορμόνη της αναπαραγωγικής λειτουργίας των θηλαστικών, είναι παρούσα σε πολλές περιοχές του υποθαλάμου, με τη μέγιστη συγκέντρωση στον τοξοειδή πυρήνα και από τη βάση του υποθαλάμου ελευθερώνεται στην πυλαία κυκλοφορία της υπόφυσης (Sosnowski et al., 2000). Έτσι, τα μόρια της ορμόνης ενώνονται με ειδικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των γοναδοτρόφων κυττάρων. Το ερέθισμα αυτό μεταδίδεται μέσω της σύνδεσης των υποδοχέων των γοναδοτρόφων κυττάρων με την πρωτεΐνη πρόσδεσης στην τριφωσφορική γουανοσίνη - GTP ή αλλιώς πρωτεΐνη G (Gq/G11). Η πρωτεΐνη G ενεργοποιεί τη φωσφολιπάση C (Andrews et al, 1990, Hausdorff et al., 1992, Hawes et al., 1992a,b, Sealfon et al., 1997, Stanislaus et al., 1997, Lin et al., 1998, Naor et al., 1998, Ortmann et al., 1999. Cheng and Leung 2000) Η φωσφολιπάση C, καταλύει την υδρόλυση της 4,5-

διφωσφορικής-φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης (phosphatidyl-inositol 4,5 – biphosphate, PIP₂) σε διασυλγλυκερόλη (diacylglycerol – DAG) και 1,4,5 τριφωσφορική-ινοσιτόλη (inositol 1,4,5 triphosphate, IP₃). Η διασυλγλυκερόλη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C – PKC, η οποία και φωσφορυλιώνει συγκεκριμένες πρωτεΐνες, που συμμετέχουν στην εκκριτική διαδικασία των γοναδοτροφινών. Η τριφωσφορική-ινοσιτόλη (IP₃) συνδέεται με έναν υποδοχέα μεμβράνης του σωματιδίου αποθήκευσης ασβεστίου, που βρίσκεται κοντά στην κυτταρική μεμβράνη και έτσι απελευθερώνονται ιόντα ασβεστίου από τις ενδοκυττάρειες αποθήκες ασβεστίου. Παράλληλα, ασβέστιο εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ειδικών διαύλων. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα, γίνεται μεγαλύτερη ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, η οποία και τελικά συμμετέχει στην εξωκύτωση των γοναδοτροφινών, LH και FSH (Ortman et al, 1999). Η έκκριση της LH απαιτεί την παρουσία ιόντων ασβεστίου στον εξωκυττάριο χώρο. Η πρόσδεση της GnRH στον υποδοχέα σηματοδοτεί το άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου της κυτταρικής μεμβράνης και την είσοδο ασβεστίου που ακολουθείται από άμεση έκκριση των αποθεμάτων LH και FSH. Η 1,4,5 τριφωσφορο-ινοσιτόλη δρα συνεργικά στην έκκριση των γοναδοτροφινών καθώς απελευθερώνει ενδοκυτταρικές εφεδρείες ιόντων ασβεστίου (Ortmann et al., 1999).

Η έκκριση της GnRH ρυθμίζεται από την παραγωγή στεροειδών ορμονών αλλά και πεπτιδικών παραγόντων από τις ωοθήκες, που δημιουργούν τους θετικούς και αρνητικούς μηχανισμούς παλίνδρομης αλληλορρύθμισης (Schacham et al., 2001). Η GnRH επιτρέπει την έκκριση των απαραίτητων ποσοτήτων γοναδοτροφινών για την εμφάνιση του μεσοκύκλιου γοναδοτροφικού κύματος (Wang, et al., 1976, Fowler et al., 1994a). Η έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο είναι παλμική (κατά ώσεις) και είναι καθοριστικής σημασίας για την έκκριση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση (Belchetz, et al., 1978, Knobil et al., 1980, Marshall and Kelch 1986, Filicori et al., 1989, Sollenberger et al., 1990; Marshall and Griffin, 1993). Η αυξημένη συχνότητα των ώσεων της GnRH έχει συσχετιστεί με την υπερέκκριση της LH σε ασθενείς με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (Yen, 1980, Kaltsas et al., 1999, Franks et al., 2000). Μελέτες για τον τρόπο έκκρισης της LH έδειξαν ότι στους ανθρώπους η LH ελευθερώνεται στην κυκλοφορία κατά ώσεις. Τα δεδομένα αυτά απέδειξαν ότι η παλμική αυτή έκκριση της LH οφείλεται στην αντίστοιχη παλμική έκκριση της GnRH από τον υποθάλαμο. Η FSH εμφανίζει επίσης παλμική έκκριση, αλλά είναι λιγότερο εμφανής από εκείνη της LH.

Η GnRH ελευθερώνεται στην πυλαία κυκλοφορία προκαλώντας την έκκριση των γοναδοτροφινών. Στην αυτο-επαγωγική επίδραση της GnRH (self – priming effect), τα ιόντα ασβεστίου είναι ο κύριος ρυθμιστής. Πειράματα, που έγιναν σε γυναίκες, στις οποίες χορηγήθηκε εξωγενώς GnRH σε διαδοχικές ώσεις έδειξαν την ύπαρξη δύο λειτουργικών δεξαμενών (pools) για την έκκριση των γοναδοτροφινών. Η πρώτη που ονομάζεται «πρώτη δεξαμενή ή άμεσα ελευθερώσιμη» εκκρίνει γοναδοτροφίνες αμέσως μετά την επίδραση της GnRH, ενώ η «δεύτερη δεξαμενή» χρειάζεται περισσότερο χρόνο διέγερσης από τη GnRH. Αυτό συμβαίνει καθώς η δεύτερη δεξαμενή απαιτεί την *de novo* σύνθεση των νέων ορμονών μέσω μηχανισμού που συμμετέχει η

κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) (Wang et al., 1976). Κατά τη χορήγηση δύο δόσεων GnRH των 10 µg, με διαφορά 2 ωρών, η μία από την άλλη, παρατηρήθηκε μέγιστη απάντηση στην πρώτη δόση στα 30 λεπτά, η οποία αντιπροσωπεύει την «ευαισθησία της υπόφυσης» στη GnRH. Η συνολική έκταση κάτω από την καμπύλη, που διαρκεί 240 λεπτά, αφορά στις εφεδρείες των γοναδοτρόφων κυττάρων σε γοναδοτροφίνες (Lasley et al., 1975, Messinis, 2006). Η απάντηση στη δεύτερη δόση GnRH είναι μεγαλύτερη από την απάντηση στην πρώτη δόση και αποτελεί το αυτοεπαγωγικό φαινόμενο της GnRH (self-priming effect). Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές παρουσία αυξημένης στάθμης οιστρογόνων και αντανakλά την αύξηση του αριθμού των υποδοχέων της GnRH στα γοναδοτρόφα κύτταρα αλλά πιθανά και να σχετίζεται με την αυξημένη βιοδιαθεσιμότητα της GnRH στην υπόφυση, καθώς η οιστραδιόλη αναστέλλει το μεταβολισμό της GnRH σε κύτταρα επιμύων και πιθήκων (Danforth et al., 1990).

Απευαισθητοποίηση είναι το φαινόμενο, κατά την οποία η συνεχής διέγερση της υπόφυσης από τη GnRH την καθιστά σταδιακά ανερέθιστη στην ορμόνη αυτή. Αυτό είναι το αποτέλεσμα της απόκρυψης των υποδοχέων της GnRH (down regulation) (Belchetz et al., 1978, Marshall, 1992, pp 1903-1907, Ortmann et al., 1999, Weiss et al., 2004).

Η παλμική έκκριση της GnRH είναι το αποτέλεσμα της έμφυτης ικανότητας των νευρώνων της να την εκκρίνουν σε διαδοχικές ώσεις (Estes et al., 1982, Marshall, 1992, pp 1903-1907). Ο τρόπος αυτός της έκκρισης της επηρεάζεται από τις στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης καθώς και το ΚΝΣ. Οι πιο σημαντικοί νευροδιαβιβαστές, που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία, είναι η νορ-επινεφρίνη, η επινεφρίνη και η ντοπαμίνη. Τα μέχρι τώρα δεδομένα δείχνουν τις κατεχολαμίνες να ρυθμίζουν την απελευθέρωση της GnRH αλλά ο τρόπος δράσης τους δεν είναι απόλυτα σαφής. Η νορ-επινεφρίνη και η επινεφρίνη φαίνεται να διεγείρουν την έκκριση της GnRH που σχετίζεται με την παρουσία των στεροειδών κατά το διάστημα του μεσοκύκλιου κύματος έκκρισης της LH. Ο ρόλος της ντοπαμίνης είναι ασαφής, αφού ενώ της έχει αποδοθεί ρόλος αναστολέα της έκκρισης της LH, κάτω από ορισμένες συνθήκες έχει βρεθεί να έχει διεγερτική δράση. Διπλός ρόλος αναστολέα και καταστολέα στην έκκριση της LH από την υπόφυση έχει αποδοθεί και στη σεροτονίνη (Kalra and Kalra, 1983). Το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (gamma-aminobutyric acid, GABA) έχει αναφερθεί ότι αυξάνει την έκκριση της LH, όπως και η ακετυλοχολίνη και η ισταμίνη (Μεσσίνης, 2005).

3.2 Ωοθηκικές στεροειδείς ορμόνες

Οι στεροειδείς ορμόνες των ωοθηκών παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκκρισης της GnRH αλλά και στην υποφυσιακή ανταπόκριση στη GnRH με μηχανισμούς θετικής αλλά και αρνητικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης. Η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη εκκρίνονται από τα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και δρουν συνεργικά για να αυξήσουν την ανταπόκριση των γοναδοτρόφων κυττάρων της υπόφυσης στη GnRH. Το συνδυαστικό αποτέλεσμα των δύο ορμονών είναι κρίσιμης σημασίας για την παραγωγή του

μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών. Η θετική δράση της οιστραδιόλης ευαισθητοποιεί την υπόφυση στη GnRH για την έκκριση της LH (Ferlin et al., 1974) και ενισχύει το επαγωγικό φαινόμενο της GnRH στις γοναδοτροφίνες (Lasley et al., 1975). Η αλληλεπίδραση της οιστραδιόλης με τη GnRH, επηρεάζει την έκφραση του μεσοκύκλιου κύματος της LH (Hoff et al., 1977). Τόσο η FSH όσο και η LH επηρεάζονται από την αρνητική επίδραση της οιστραδιόλης στην ωοθυλακική φάση (Messinis and Templeton, 1990a). Με την αρνητική επίδραση της οιστραδιόλης στην υπόφυση αναστέλλεται η έκκριση της FSH και της LH κατά την ωοθυλακική και την ωχρινική φάση του κύκλου (Dafopoulos et al., 2005). Η προγεστερόνη παράγεται κυρίως κατά την ωχρινική φάση και ανιχνεύεται σε μικρότερες ποσότητες στο αίμα και κατά την ωοθυλακική φάση (Judd et al., 1992, Alexandris et al., 1997).

3.3 Μη στεροειδείς ορμόνες της ωοθήκης

3.3.1 Ανασταλίνη

Η ανασταλίνη (inhibin) είναι μια μη στεροειδής ορμόνη, που παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης και δρα ανασταλτικά στην έκκριση της FSH από τα κύτταρα της υπόφυσης *in vitro*. Δυο ισομορφές της ανασταλτίνης έχουν περιγραφεί, η ανασταλτίνη Α και η ανασταλτίνη Β. Μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση της ανασταλτίνης στο πλάσμα είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της FSH (Messinis, 2006). Η ανασταλτίνη Β θεωρείται ότι παράγεται κυρίως από το ωοθυλάκιο κατά την επιλογή του ως κυρίαρχο (de Kretser et al., 2002) και τα επίπεδα της είναι υψηλά στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης, ενώ μειώνονται πολύ κατά το τέλος της ωοθυλακικής φάσης και κατά την ωχρινική φάση, εμφανίζοντας αιχμή κατά το μέσον του κύκλου. Τα επίπεδα της ανασταλτίνης Α ακολουθούν αντίστροφη διακύμανση και εμφανίζονται χαμηλά στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης και υψηλά στο τέλος της και στη διάρκεια της ωχρινικής φάσης (Groome et al., 1996). Η ανασταλτίνη απομονώθηκε από το ωοθυλακικό υγρό διαφόρων ζώων αλλά και του ανθρώπου, η δράση της δε είναι ανασταλτική και ασκείται εκλεκτικά στην έκκριση της FSH (McLachlan et al., 1988).

3.3.2 Ακτιβίνη και φολιστατίνη

Η ακτιβίνη (activin) αποτελείται από τρεις ισομορφές την ακτιβίνη Α, την ακτιβίνη Β και την ακτιβίνη ΑΒ. Η ακτιβίνη διεγείρει την έκκριση της FSH στους πιθήκους (Muttukrishna and Knight, 1991) αλλά όχι στους επίμους (Stouffer et al., 1993). Η ακτιβίνη διεγείρει τη βασική έκκριση της FSH (Rivier et al., 1986, Schwall et al., 1988, Katayama et al., 1990) και καταστέλλει την από τη GnRH προκαλούμενη σύνθεση και έκκριση της LH από τα γοναδοτρόφα κύτταρα στους χοίρους αλλά όχι στους επίμους *in vitro* (Gregg et al., 1991, Braden and Conn, 1992). Υπάρχουν μελέτες μόνο όσον αφορά στην ακτιβίνη Α και από μετρήσεις που έγιναν στο αίμα γυναικών βρέθηκε να έχει διακυμάνσεις στις συγκεντρώσεις της, οι οποίες είναι υψηλές στην αρχή της ωοθυλακικής

φάσης, κατά τη διάρκεια του μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών και κατά το τέλος της ωχρινικής φάσης (Muttukrishna et al., 1996).

Η φολιστατίνη (follistatin) είναι πρωτεΐνη δέσμευσης για την ακτιβίνη στην ανενεργή της μορφή στην ωοθήκη, στο ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό, στην περιφερική κυκλοφορία και στην υπόφυση (Kogawa et al., 1991, Nakamura et al., 1990, Sadatsuki et al., 1993, Sugino et al., 1993). Η παρουσία και η έκφραση της φολιστατίνης στην υπόφυση (Kaiser et al., 1992, DePaolo et al., 1993) ρυθμίζεται από τη συχνότητα των ώσεων έκκρισης της GnRH (Kirk et al., 1994) και μπορεί να διαδραματίζει έναν ρόλο στην ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροφινών. Η φολιστατίνη φαίνεται να μειώνει την έκκριση των γοναδοτροφινών, *in vitro*, καταστέλλοντας τις οδούς της πρωτεϊνικής κινάσης C και μειώνοντας τους τόπους δέσμευσης της GnRH (Wang et al., 1990).

4. GnSAF

Στο τέλος της δεκαετίας του 1970 έγιναν οι πρώτες παρατηρήσεις για την ύπαρξη ενός μη στεροειδούς παράγοντα, που μείωνε την έκκριση της LH ως απάντηση στην επίδραση της GnRH. Οι de Jong et al. (Jong et al., 1979) έδειξαν την ύπαρξη ενός πρωτεϊνικού τμήματος μικρότερου των 10 kDa που απομονώθηκε από το ωοθυλακικό υγρό βοός (bFF), το οποίο ελάττωσε την έκκριση της LH από την υπόφυση *in vitro*. Ακολούθως η χορήγηση FSH σε επίμυες, με στόχο την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, επέφερε μείωση της ανταπόκρισης της LH στη GnRH (Geiger et al., 1980). Έκτοτε πολλά στοιχεία έχουν συγκεντρωθεί από εργασίες *in vivo* και *in vitro* σε θηλαστικά και σε ανθρώπους για την ύπαρξη ενός τέτοιου παράγοντα.

4.1.1 *In vivo* μελέτες

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός πρωτεϊνικού παράγοντα που επηρεάζει την έκκριση της LH μέσω της διέγερσης της υπόφυσης από τη GnRH προήλθαν από εργασίες, στις οποίες μελετήθηκε η μεσοκύκλια έκκριση των γοναδοτροφινών σε πιθήκους. Η υπερδιέγερση των ωοθηκών έγινε με human menopausal gonadotropin - εμμηνοπαυσιακή γοναδοτροφίνη (hMG) ή με FSH και παρατηρήθηκε αναστολή της θετικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της οιστραδιόλης, αποκλεισμός του ενδογενούς κύματος της LH και μείωση της απάντησης της LH στη διέγερση με GnRH (Hodgen 1982, Schenken and Hodgen GD, 1983).

Επίσης, σε πιθήκους έγινε χορήγηση FSH όπου με την ανάπτυξη πολλαπλών ωοθυλακίων και παρά την αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης δεν εμφανίστηκε κύμα της LH. Με την υπερδιέγερση των ωοθηκών με FSH, μειώθηκε και η επαγωγική δράση της GnRH στην έκκριση της LH. Παρόμοια θεραπεία με FSH, που ακολουθήθηκε σε πιθήκους μετά τη χειρουργική αφαίρεση των ωοθηκών δεν είχε επίδραση στο προκαλούμενο από την οιστραδιόλη κύμα της LH. Θεωρήθηκε τότε ότι η παρουσία της FSH σε συγκεντρώσεις, που ξεπερνούν τις κανονικές για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθηλακίου στο φυσιολογικό κύκλο, προκαλεί την έκκριση ωοθηκικών παραγόντων, που εμποδίζουν την εμφάνιση του επαγόμενου από την οιστραδιόλη κύματος της LH (Schenken and Hodgen, 1983).

Μελέτες, που έγιναν σε πιθήκους, έδειξαν ότι η εμφάνιση του κύματος της LH μετά από τη χορήγηση FSH εμποδίζεται, λόγω της ύπαρξης ενός πρωτεϊνικού ωοθηκικού παράγοντα, (Schenken and Hodgen, 1983, 1986). Σε ανάλογες μελέτες, όπου χορηγήθηκε hMG παρατηρήθηκε επίσης αναστολή της επίδρασης της GnRH στην υπόφυση, με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της έκκρισης της LH, η οποία προκαλείται ως αποτέλεσμα του θετικού μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης της οιστραδιόλης (Littman and Hodgen GD, 1984).

Ο ωοθηκικός αυτός παράγοντας ονομάστηκε βάσει των μελετών είτε «παράγοντας αναστολής του μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Inhibiting Factor-GnSIF)» στα θηλαστικά (Sopelak and

Hodgen, 1984) ή «παράγοντας άμβλυνσης του μεσοκύκλιου κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor-GnSAF)» στους ανθρώπους (Messinis and Templeton, 1989).

Οι Sopelak and Hodgen (1984) χορήγησαν χοίρειο ωοθυλακικό υγρό σε πιθήκους και παρατήρησαν την αναστολή του ενδογενούς κύματος της LH, ενώ δεν σημειώθηκε αντίστοιχη δράση για την LH, που εκκρίνεται υπό την επίδραση της εξωγενούς χορήγησης GnRH. Οι εν λόγω ερευνητές υπέθεσαν την ύπαρξη του GnSIF, ως ο παράγοντας, που εμποδίζει το ενδογενές κύμα της LH στους πιθήκους.

Μία σειρά μελετών που έγιναν σε επίμυες και αφορούσαν στη διέγερση τους με FSH, έδειξαν την ανασταλτική δράση του GnSIF στην έκκριση της LH ως απάντηση σε ερέθισμα με GnRH (de Koning et al, 1994, van Dieten and de Koning, 1995, Tio et al., 1998) καθώς και σε βοειδή (Fowler and Price, 1997).

Πλήθος μελετών έχουν γίνει σε γυναίκες. Οι πρώτες παρατηρήσεις αφορούσαν γυναίκες που υποβάλλονταν σε θεραπεία για IVF μετά την εξωγενή χορήγηση εμμηνοπαυσιακής γοναδοτροφίνης (hMG). Στις γυναίκες αυτές, παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην εμφάνιση του κύματος της LH (Ferraretti et al., 1983). Για πρώτη φορά σε γυναίκες παρατηρήθηκε άμβλυνση του ενδογενούς κύματος της LH κατά τη διάρκεια ωοθηκικής διέγερσης με συνδυασμό κατά ώσεις χορήγησης hMG ή FSH και κλομιφένης ή μόνο με χορήγηση FSH. Η σύγκριση έγινε με την εμφάνιση του κύματος της LH στις ίδιες γυναίκες, σε φυσιολογικούς κύκλους, πριν την έναρξη της θεραπείας για IVF (Messinis et al., 1985, Messinis and Templeton, 1986, Messinis, et al., 1986a, Messinis and Templeton, 1988b).

Από τις πρώτες μελέτες παρατηρήθηκε ότι η υπερδιέγερση των ωοθηκών γυναικών με FSH μπορεί να αποκλείσει την εμφάνιση του ενδογενούς κύματος της LH. Ένας μεγάλος αριθμός μικρού – μεσαίου μεγέθους ωοθυλακίων μπορεί να έχει κατασταλτική επίδραση τόσο στην τονική όσο και στη μεσοκύκλια έκκριση των γοναδοτροφινών. Ο μηχανισμός καταστολής της LH φαίνεται να είναι διαφορετικός από αυτόν για την FSH. Είναι πιθανόν το κύμα που εμφανίζεται να είναι πρόωρο, όταν υπάρχουν λίγα μικρού μεγέθους αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια. Η εμφάνιση του ενδογενούς κύματος της LH σε γυναίκες με υπερδιέγερση των ωοθηκών είναι αποτέλεσμα μιας ισορροπίας μεταξύ της οιστραδιόλης και άλλων ωοθηκικών παραγόντων, οι οποίοι παράγονται κυρίως από τα μικρά ωοθυλάκια (Messinis and Templeton, 1986, Messinis and Templeton, 1987a).

Ρόλο όμως παίζουν και άλλοι φαρμακευτικοί παράγοντες οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τη ωοθηκική διέγερση. Όταν στο φαρμακευτικό σχήμα υπάρχει η κλομιφαίνη, το κύμα της LH εμφανίζεται σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ όπου χορηγούνται μόνο γοναδοτροφίνες, το ενδογενές κύμα της LH μπορεί να είναι πρόωρο (Messinis and Templeton, 1986, Templeton et al., 1986).

Με την ανάπτυξη της τεχνικής IVF, όπου χρησιμοποιήθηκε ευρέως η τεχνική πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, δόθηκαν πολλές

πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς που ελέγχουν τη σύνδεση των ωοθηκών με τον υποθαλαμο-υποφυσιακό άξονα (Messinis and Templeton 1988a). Κατά την πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση παρατηρείται σημαντική ελάττωση στη βασική έκκριση της LH. Παράλληλα, η απάντηση της υπόφυσης στη GnRH μειώνεται σημαντικά και αυτός είναι πιθανώς ο μηχανισμός μέσω του οποίου ο GnSAF αμβλύνει το ενδογενές κύμα της LH (Messinis and Templeton, 1989).

Όσον αφορά στην πρωτεϊνική φύση του παράγοντα GnSAF, οι *in vivo* μελέτες δείχνουν τη διαφοροποίηση του από τις στεροειδείς ορμόνες μέσα από τη διαφορετική δράση που παρουσιάζουν στο γεννητικό κύκλο. Μελέτες, που πραγματοποιήθηκαν σε γυναίκες με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης για θεραπεία με IVF, το ενδογενές κύμα της LH αμβλύνθηκε ανάλογα με το βαθμό της υπερδιέγερσης των ωοθηκών. Η διάρκεια του κύματος της LH και οι τιμές της αιχμής (peak) του κύματος έδειξαν να έχουν αρνητικό συσχετισμό με τα επίπεδα της οιστραδιόλης στο πλάσμα (Messinis et al., 1986a). Ακόμη, παρατηρήθηκε άμβλυνση της υποφυσιακής ανταπόκρισης στη GnRH 12 ώρες πριν από τη σημαντική αύξηση στα επίπεδα της οιστραδιόλης στο πλάσμα γυναικών όπου χορηγήθηκε FSH για πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση (Messinis et al., 1991, Messinis et al., 1993b). Επιπλέον, σε άλλη μελέτη που αφορούσε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, ενισχύθηκε η υπόθεση του GnSAF, όπου σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς κύκλους αυτών των γυναικών οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης και της τεστοστερόνης δεν άλλαξαν αλλά το μεσοκύκλιο κύμα της LH αμβλύνθηκε (Messinis and Templeton, 1989).

Επιπρόσθετα, το ενδογενές κύμα της LH αμβλύνεται σε γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση ακόμη και με την παρουσία φυσιολογικών τιμών προγεστερόνης (Messinis and Templeton, 1986). Παρ' όλα αυτά, συγκεντρώσεις της προγεστερόνης στο αίμα άνω του φυσιολογικού, μείωσαν σημαντικά τη διάρκεια του κύματος των γοναδοτροφινών που προκλήθηκε από την εξωγενή χορήγηση οιστραδιόλης και αυτό είναι προφανώς μέρος του μηχανισμού που αμβλύνει το ενδογενές κύμα της LH σε γυναίκες με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης (Messinis and Templeton, 1990a). Σε φυσιολογικούς γεννητικούς κύκλους γυναικών, το ενδογενές κύμα της LH ούτε μειώνεται ούτε αυξάνεται με τη χορήγηση υψηλών δόσεων οιστραδιόλης, ώστε τα επίπεδα της στο πλάσμα να είναι πολύ άνω των φυσιολογικών κατά την άμεση προ-ωοθυλακιωρρηκτική περίοδο (Messinis and Templeton, 1987b). Συνεπώς, η ελάττωση του κύματος έχει σχέση με μη στεροειδείς ουσίες, που παράγονται από τις υπερδιεγερμένες ωοθήκες (Messinis et al., 1986b, Messinis and Templeton, 1987b).

Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε γυναίκες καταδείχτηκε ότι ο GnSAF ελαττώνει την απόκριση της υπόφυσης στη GnRH (Messinis and Templeton, 1990c) καθώς και σε επίμυες, στους οποίους χορηγήθηκε FSH (Koppelaar et al., 1991, Koppelaar et al., 1993).

Τα πειραματικά δεδομένα από μελέτες σε γυναίκες, πιθήκους και επίμυες έδειξαν ότι η FSH διεγείρει την παραγωγή του GnSAF (Scheken et al., 1984,

Messinis and Templeton, 1986, Busbridge et al., 1988, Messinis et al., 1991, Messinis et al., 1993c, Messinis et al., 1994a) κατά την ωοθυλακική φάση (Messinis et al., 1991) αλλά και κατά την ωχρινική φάση υπερδιεγερμένων κύκλων γυναικών (Messinis et al., 1993b). Καθώς η χορήγηση FSH σε εμμηνοπαυσιακές γυναίκες δεν ελάττωσε την ανταπόκριση της υπόφυσης στη GnRH (Messinis et al., 1994b), η χαμηλή βιοδραστικότητα του GnSAF δεν οφείλεται στα αυξημένα επίπεδα της FSH στην κυκλοφορία (Fowler and Templeton, 1996).

Η χορήγηση γοναδοτροφινών με σκοπό την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας σε γυναίκες δημιουργεί αύξηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης και της ανασταλίνης. Η χρήση γυναικών με πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία ως μοντέλο για τη μελέτη της αύξησης της βιοδραστικότητας του GnSAF/IF να δημιούργησε αρχικά ερωτηματικά ως προς το ρόλο της οιστραδιόλης στη μειωμένη ανταπόκριση της υπόφυσης στη GnRH (Messinis and Templeton, 1988b, Muttukrishna et al., 1994).

Βιοδραστικότητα GnSAF έχει διαπιστωθεί τόσο στην ωοθυλακική όσο και στην ωχρινική φάση. Συγκεκριμένα, η χορήγηση της FSH κατά την αρχή και το μέσον της ωχρινικής φάσης σε γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση, κατέστειλε την ευαισθησία της υπόφυσης στην έκκριση της LH ως απάντηση στη GnRH. Έτσι, η δραστηριότητα του GnSAF δεν μπορούσε να αποδοθεί σε μηχανισμό αρνητικής παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των στεροειδών, καθώς η χορήγηση της FSH δεν αύξησε σημαντικά την οιστραδιόλη ή την προγεστερόνη (Messinis et al., 1993a). Η προγεστερόνη μπορεί να μειώσει τη διάρκεια του μεσοκύκλιου κύματος της LH, που προκαλείται από την οιστραδιόλη, αλλά χρειάζεται να χορηγηθεί σε υψηλές δόσεις (Messinis and Templeton, 1990a). Σε φυσιολογικούς κύκλους γυναικών, παρατηρήθηκε ότι το ενδογενές κύμα της LH δεν επηρεάζεται από τα επίπεδα της οιστραδιόλης στον ορό αλλά από την παρουσία ανασταλτικών ωοθηκικών παραγόντων (Messinis et al., 1992).

Διάφορες πειραματικές διαδικασίες έχουν γίνει με στόχο να δείξουν ότι η βιοδραστικότητα του GnSAF οφείλεται στην FSH και όχι στην αρνητική παλίνδρομη αλληλορρύθμιση της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης σε επίπεδο υπόφυσης (Messinis et al., 1991, Messinis et al., 1993c). Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η χορήγηση μιας δόσης FSH προκαλεί δοσο-εξαρτώμενα κατασταλτικά αποτελέσματα στην ανταπόκριση της υπόφυσης στην εξωγενή χορήγηση GnRH. Παρόμοια μελέτη έγινε και από τους Fowler and Price (Fowler and Price 1997) σε βοειδή, όπου διαπιστώθηκε ότι η FSH επηρεάζει τα επίπεδα του GnSIF/GnSAF στο πλάσμα. Ανάλογα αποτελέσματα είχε και η μελέτη που έγινε σε γυναίκες με φυσιολογικό κύκλο, όπου μετά από χορήγηση FSH ή hCG, κατά την ωχρινική φάση, διαπιστώθηκε ότι η FSH φέρεται να είναι υπεύθυνη για την παραγωγή του GnSAF και όχι η LH (Messinis et al., 1996). Σε μια πειραματική διαδικασία που έγινε σύγκριση του φυσιολογικού κύκλου γυναικών με ένα κύκλο όπου έγινε εξωγενής χορήγηση FSH, διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ανταγωνιστική δράση μεταξύ της οιστραδιόλης και του GnSAF σχετικά με τη διέγερση της υπόφυσης από τη GnRH (Messinis et al., 1998). Πρόσφατα έγινε μία μελέτη, που αφορούσε σε δύο ομάδες γυναικών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε θεραπεία

με FSH με στόχο την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Ο GnSAF μετρήθηκε σε δείγματα αίματος με τη χρήση *in vitro* βιολογικής δοκιμασίας σε επιφύσεις επιμύων (Martinez et al., 2002). Σε αυτή την έρευνα, η ομάδα από τις γυναίκες που είχαν καλή ανταπόκριση στη θεραπεία είχαν περισσότερη παραγωγή GnSAF από αυτές που δεν είχαν καλή ανταπόκριση. Έγινε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μη διεγερμένους κύκλους αυτών των γυναικών, όπου παρατηρήθηκε ότι στις γυναίκες με την καλή ανταπόκριση ανιχνεύθηκε GnSAF, σε αντίθεση με τις γυναίκες που δεν είχαν καλή ανταπόκριση όπου και δεν ανιχνεύθηκε καθόλου GnSAF. Η εργασία αυτή οδήγησε στο συμπέρασμα ότι όταν υπάρχει προβληματική ανταπόκριση της ωοθήκης στην FSH, υπάρχει και μειωμένη παραγωγή του GnSAF (Martinez et al., 2002). Η πρόσφατη πειραματική μελέτη που έγινε σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (Daforoulou et al., 2004a), παρέχει ενδείξεις ότι ο παράγοντας GnSAF παίζει φυσιολογικό ρόλο στη διάρκεια του γεννητικού κύκλου. Η παραγωγή του λαμβάνει χώρο κατά την αρχική προς μέση ωοθυλακική φάση και μειώνεται δραστικά κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο (Messinis, 2006).

Μια σειρά μελετών, που πραγματοποιήθηκαν *in vivo*, επικεντρώθηκαν στην επίδραση του GnSAF/IF στις εφεδρείες της LH που εκκρίνεται υπό την επίδραση της GnRH και της αυτο-πριμοδοτικής δράσης της GnRH. Σε γυναίκες, η χορήγηση FSH μείωσε και τις δυο κορυφές της LH, που εκκρίνονται σε απάντηση δυο διαδοχικών δόσεων GnRH (Messinis et al., 1994c). Επιπλέον, το φαινόμενο της αυτο-πριμοδότησης, που είναι εμφανές με τις δύο δώσεις GnRH ήταν επίσης μειωμένο (Messinis and Templeton, 1991). Παρόμοια δεδομένα προκύπτουν από μια *in vivo* μελέτη σε επίμους, όπου παρατηρήθηκε ότι η βιοδραστικότητα του GnSAF προκαλούμενη από την FSH, μείωσε την αυτοπριμοδότηση της GnRH (van Dielen et al., 1989, Korppenaal et al., 1991). Τόσο σε γυναίκες όσο και σε επίμους, ο GnSAF διεγερόμενος από την FSH διατηρεί την υπόφυση σε μια κατάσταση χαμηλής ανταπόκρισης στη GnRH, επίδραση την οποία υπερβαίνει η επαναλαμβανόμενη χορήγηση GnRH σε ώσεις (Korppenaal et al., 1993, Messinis et al., 1994c). Ένα μεγαλύτερο μεσοδιάστημα ανάμεσα στις ώσεις επιτρέπει στον GnSAF να επαναφέρει την υπόφυση στη μη διεγερμένη κατάσταση (Korppenaal et al., 1993). Φαίνεται ότι η FSH, μέσω του GnSAF, μπορεί να καθυστερεί την ανταπόκριση της LH στη GnRH (de Koning et al., 1994). Γενικότερα, παρατηρήθηκε βιοδραστικότητα του παράγοντα στον ορό γυναικών με φυσιολογικό κύκλο αλλά και σε αυτές που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για IVF (Fowler et al., 1994a, 1995, 2002)

Ο παράγοντας GnSAF θεωρείται ότι είναι υπεύθυνος για την πιο πάνω αναφερθείσα ελάττωση του μεγέθους του μεσοκύκλιου κύματος της LH, μέσω της ελάττωσης της υποφυσιακής απάντησης στην υποθαλαμική ορμόνη GnRH (Messinis and Templeton, 1989, 1990c, 1990d, 1990e).

Από τις μελέτες που έγιναν για τη μη στεροειδή φύση του GnSAF (Fowler et al., 1990), διατυπώθηκε η υπόθεση ότι για την παραγωγή του GnSAF υπεύθυνα είναι κυρίως τα μικρά ωοθυλάκια (Messinis and Templeton 1990d, 1991a). Πολλές μελέτες που έγιναν σε γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία με FSH ή και σε φυσιολογικούς κύκλους (Messinis et al., 1996,

Martinez et al., 2002) έδειξαν ότι κατά την ωχρινική φάση μια ομάδα αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων είναι η πηγή του GnSAF, παρά το ωχρό σωματίο.

4.1.2 *In vitro* μελέτες

Αρκετές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα είδη θηλαστικών, ώστε να διευκρινιστεί η επίδραση του ωοθυλακικού υγρού, απαλλαγμένου από τα στεροειδή τόσο στη βασική όσο και στην προκαλούμενη από τη GnRH έκκριση των γοναδοτροφινών από υποφυσιακά κύτταρα *in vitro*. Τα αποτελέσματα όμως είναι αντικρουόμενα. Με τη χρήση μιας *in vitro* βιολογικής μεθόδου, που βασίζεται στην καλλιέργεια υποφυσιακών κυττάρων προβάτων, διαπιστώθηκε δραστηριότητα GnSAF στο ωοθυλακικό υγρό γυναικών, που υποβλήθηκαν σε πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση (Fowler et al., 1990). Τα ευρήματα αυτά ενισχύουν τις κλινικές παρατηρήσεις, ότι δηλαδή ο GnSAF είναι μη στεροειδής ουσία, διαφορετική από την inhibin (ανασταλτίνη), που έχει την ικανότητα να ελαττώνει την απόκριση της LH στη GnRH, χωρίς να επηρεάζει τη βασική έκκριση των γοναδοτροφινών (Fowler et al., 1990). Συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες *in vitro* έδειξαν την ελάττωση της απάντησης της LH στη GnRH από ωοθυλακικό υγρό γυναικών με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης (Fowler et al., 1992) ή χοίρειο ωοθυλακικό υγρό σε συστήματα καλλιέργειών υποφυσιακών κυττάρων επιμύων (Lagace et al., 1979, Huag and Miller 1984, Danforth et al., 1987).

Επίσης, έχει αναφερθεί ότι, η αύξηση του μεγέθους του ωοθυλακίου είναι αντιστρόφως ανάλογη με την παραγωγή του GnSAF από αυτά καθώς, όταν το ωοθυλάκιο υπερβαίνει σε διάμετρο τα 10 mm σε φυσιολογικούς κύκλους και τα 13 mm σε διεγερμένους κύκλους μειώνεται και η παραγωγή του GnSAF (Fowler et al., 1994b).

4.2 Ρόλος του GnSAF

Όπως αναφέρθηκε, η παραγωγή του GnSAF από τις ωοθήκες διεγείρεται από την FSH, όχι όμως και από τη χοριακή γοναδοτροφίνη (Messinis et al., 1991, 1993c; 1994a; 1996; 1998). Πιθανολογείται, ότι ο ρόλος του GnSAF στην έκκριση των γοναδοτροφινών εκδηλώνεται κυρίως στην ωοθυλακική φάση του κύκλου. Επιπλέον, ο παράγοντας αυτός φαίνεται να έχει μικρό χρόνο ημιζωής (και επομένως μικρό χρόνο δράσης) στην κυκλοφορία (Messinis et al., 1996).

Ανάλογη ουσία με δράση GnSAF έχει απομονωθεί τα τελευταία χρόνια από κύτταρα Sertoli ποντικών (Tio et al., 1994) και από ωοθυλακικό υγρό χοίρων (Danforth and Cheng, 1995). Ωστόσο είναι άγνωστο αν η ουσία αυτή είναι παρόμοια ή ανάλογη με τον GnSAF στον άνθρωπο. Είναι πιθανόν να υπάρχουν διαφορές μεταξύ διαφόρων ειδών ζώων, αφού η ουσία που απομονώθηκε από τα ποντίκια διέφερε από εκείνη των χοίρων τόσο ως προς το μοριακό της βάρος, όσο και ως προς την αλληλουχία των αμινοξέων στο αμινοτελικό της άκρο.

Ο πιθανός ρόλος του GnSAF στη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου είναι να ρυθμίζει το εύρος της υποφυσιακής απάντησης της LH στη GnRH κατά την ωοθυλακική φάση (Messinis et al., 1994c, 1998). Συγκεκριμένα, στη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, ο GnSAF ρυθμίζει το εύρος της απόκρισης της LH στην υποθαλαμική ορμόνη GnRH, ασκώντας αρνητική επίδραση. Ειδικότερα, η υπόθεση που έχει αναπτυχθεί είναι ότι η δραστηριότητα του GnSAF ελαττώνεται βαθμιαία από την αρχή μέχρι το τέλος της ωοθυλακικής φάσης του κύκλου, διευκολύνοντας έτσι κατά την προωοθυλακιορρηκτική περίοδο την αυξημένη γοναδοτροφική απάντηση στη θετική επίδραση της οιστραδιόλης (Messinis and Templeton 1990a, Messinis 2006). Συνεπώς, ο GnSAF δεν καταργεί αλλά περιορίζει το εύρος της απόκρισης της υπόφυσης στη θετική επίδραση της οιστραδιόλης και έτσι ρυθμίζει το μέγεθος του μεσοκύκλιου κύματος της LH. Το κύμα αυτό ελαττώνεται στις γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακική ωρίμανση, στις οποίες παρατηρείται σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του GnSAF. Σύμφωνα με την υπόθεση αυτή, το μεσοκύκλιο κύμα της LH δεν ρυθμίζεται μόνο από την οιστραδιόλη, όπως μέχρι σήμερα γνωρίζαμε, αλλά και από τον GnSAF και είναι το αποτέλεσμα της εξισορροπημένης δράσης των δύο αυτών ουσιών στην ευαισθησία της υπόφυσης στην υποθαλαμική ορμόνη GnRH (Messinis and Templeton, 1991b, Messinis et al., 2002). Από κλινικής πλευράς, η ελαττωμένη παραγωγή ενός τέτοιου παράγοντα πιθανόν να μπορεί να εξηγήσει την παθοφυσιολογία καταστάσεων, όπως το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, στο οποίο ως γνωστό παρατηρείται αυξημένη απάντηση της LH στην υποθαλαμική ορμόνη GnRH (Yen, 1980).

Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι η επίδραση του GnSAF στην LH είναι ανάλογη της επίδρασης της ανασταλτίνης στην FSH, χωρίς όμως να επηρεάζει τη βασική έκκριση της LH. Η δράση του GnSAF πιθανολογείται ότι ασκείται στην υπόφυση, όπου ελαττώνει και τις δύο δεξαμενές της γοναδοτροφικής έκκρισης (άμεσα ελευθερώσιμη-releasable και εφεδρική-reserve) (Messinis and Templeton, 1990c, 1991b) και ότι η δράση αυτή είναι ανταγωνιστική εκείνης της οιστραδιόλης (Messinis et al., 1994c, 1998, Dafopoulos et al., 2004a), αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμα γνωστός. Πάντως, επειδή ο παράγοντας αυτός ελαττώνει αλλά δεν αναστέλλει τη διεγερτική επίδραση της οιστραδιόλης στην υπόφυση, δεν φαίνεται να δρα ως πραγματική αντιοιστρογόνο ουσία (Messinis and Templeton, 1990b, 1991b).

Η φυσιολογική σημασία του GnSAF δεν είναι απόλυτα σαφής. Με βάση τα υπάρχοντα δεδομένα έχει αναπτυχθεί η υπόθεση, ότι κατά τον γεννητικό κύκλο, ο παράγοντας αυτός συμμετέχει στη φυσιολογική διαδικασία της έκκρισης της LH (Messinis and Templeton, 1991a, Messinis et al., 1994c; 1998, 2002).

4.3 Απομόνωση του παράγοντα GnSAF

4.3.1 In vitro βιολογικά συστήματα μελέτης της δραστηριότητας GnSAF

Έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφορα *in vitro* βιολογικά συστήματα για τη μελέτη της βιοδραστηριότητας GnSAF. Τα συστήματα αυτά βασίζονται στην έμμεση μέτρηση της δραστηριότητας του GnSAF, μέσω της μείωσης ή όχι της έκκρισης της LH από τα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης. Περιληπτικά, το υπό εξέταση βιολογικό υγρό, για παράδειγμα το ωοθυλακικό υγρό ή και εμπλουτισμένα υπερκείμενα καλλιέργειών κοκκωδών κυττάρων, προστίθενται στην καλλιέργεια υποφυσιακών κυττάρων. Έπειτα γίνεται μέτρηση της LH στα υπερκείμενα αυτών των καλλιεργειών. Κατά διαστήματα, έχουν χρησιμοποιηθεί πρωτογενείς καλλιέργειες υπόφυσης προβάτων (Fowler et al., 1990; 1992, 1993), συστήματα διαπότισης βασισμένα σε ιστό υπόφυσης θηλυκών επιμύων ή προβάτων (Busbridge et al., 1990, Knight et al., 1990, Fowler et al., 1994a), καθώς και σύστημα επώασης ιστού υπόφυσης επιμύων (de Koning et al., 1989). Το σύστημα όμως που χρησιμοποιείται ευρύτερα μέχρι και σήμερα είναι οι πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης επιμύων (Danforth et al., 1987, Fowler et al., 1994b, Kita et al., 1994, Balen et al., 1995, Byrne et al., 1995, Pappa et al., 1999a,b, Fowler et al., 2001, Fowler et al., 2002, Tavoulari et al., 2004).

4.3.2 Μελέτες απομόνωσης του παράγοντα GnSAF

Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει προσπάθειες απομόνωσης του GnSAF από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες. Η πρώτη παρατήρηση, που έγινε για την ύπαρξη του *in vitro* (de Jong et al., 1979), αφορούσε ωοθυλακικό υγρό βοός, το οποίο κλασματώθηκε κατόπιν εκχυλίσσεως με αιθανόλη και μελετήθηκε η επίδραση των διαφόρων κλασμάτων στην έκκριση των γοναδοτροφινών από την υπόφυση, χρησιμοποιώντας πρωτογενείς καλλιέργειες υπόφυσης επιμύων ως *in vitro* σύστημα. Ανιχνεύθηκε δραστηριότητα της ανασταλτίνης σε κλάσμα με μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 10 kDa, ενώ το κλάσμα που περιείχε μικρότερα από 10 kDa μοριακά βάρη προκάλεσε σημαντική ελάττωση της έκκρισης της LH μετά από διέγερση με GnRH και δεν είχε καμία επίδραση στη βασική έκκριση της FSH.

Η ομάδα του Danforth (Danforth et al., 1987) πέτυχε το μερικό καθαρισμό του παράγοντα GnSAF από ωοθυλακικό υγρό βοός με τη μέθοδο του ενεργού άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας heparin-Sepharose προκειμένου να γίνει διαχωρισμός των δραστηριοτήτων της ανασταλτίνης και του GnSAF. Με τον τρόπο αυτό, ανιχνεύθηκε η δραστηριότητα της ανασταλτίνης στα κλάσματα που δεσμεύτηκαν από τη στήλη, ενώ η δραστηριότητα του GnSAF παρατηρήθηκε στα κλάσματα που δεν δεσμεύτηκαν από τη στήλη. Οι πρωτογενείς καλλιέργειες κυττάρων υπόφυσης χρησιμοποιήθηκαν ως το βιολογικό *in vitro* σύστημα, όπου και ανιχνεύθηκαν οι δραστηριότητες της ανασταλτίνης και του παράγοντα GnSAF. Η ανασταλτίνη και ο GnSAF βρέθηκαν να έχουν διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες γεγονός που υποδηλώνει διαφορετική βιολογική συμπεριφορά. Ο GnSAF ήταν ανθεκτικός στη θέρμανση στους 60°C για 60 λεπτά καθώς και μετά από

καθίζηση των πρωτεϊνών με ακετόνη, ενώ το κλάσμα που εμφάνισε βιοδραστικότητα ανασταλτίνης δεν έδειξε καμία επίδραση στην ελάττωση της έκκρισης της LH από την υπόφυση μετά από διέγερση με GnRH.

Με τη μέθοδο της υπερδιήθησης ανιχνεύθηκε δραστικότητα GnSAF σε κλάσμα ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού, που αντιστοιχούσε σε μοριακό βάρος μικρότερο των 12 kDa (Knight et al., 1990), επιβεβαιώνοντας έτσι τα αρχικά αποτελέσματα του de Jong. Επίσης στην ίδια μελέτη βρέθηκε ότι ο παράγοντας είναι ανθεκτικός σε θέρμανση στους 70°C για 30 λεπτά. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν την παρατήρηση των Danforth (Danforth et al., 1987), που αφορά στη δραστικότητα της ανασταλτίνης, η οποία διαχωρίστηκε από τη δραστικότητα GnSAF με χρωματογραφία στήλης, έχοντας προσδεμένο πάνω στη στήλη αντίσωμα έναντι της α υποομάδας της ανθρώπινης ανασταλτίνης. Το βιολογικό σύστημα, όπου έγιναν οι μετρήσεις για τη βιοδραστικότητα του παράγοντα, ήταν σύστημα διαπότισης υποφυσιακού ιστού θηλακών επιμύων.

Τα έτη 1992 και 1993, δημοσιεύτηκαν από τους Fowler et al. (Fowler et al., 1992, 1993) εργασίες, που αφορούσαν στη χρήση ωοθυλακικού υγρού από γυναίκες με πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης και με τη μέθοδο της υπερδιήθησης ανιχνεύθηκε βιοδραστικότητα του παράγοντα σε κλάσματα ωοθυλακικού υγρού, που αντιστοιχούσαν σε μοριακά βάρη από 10 – 69 kDa. Το *in vitro* σύστημα, που χρησιμοποιήθηκε για την παρακολούθηση του GnSAF, ήταν πρωτογενείς καλλιέργειες υποφυσιακών κυττάρων αλλά και συστήματα διαπότισης ιστού υπόφυσης προβάτων.

Ακολούθησε η μερική απομόνωση του παράγοντα (Danforth and Cheng, 1993) από ωοθυλακικό υγρό χοίρου. Χρησιμοποιήθηκαν 5 λίτρα ωοθυλακικού υγρού, που υποβλήθηκε σε μια σειρά από τεχνικές χρωματογραφίας, όπως είναι η χρωματογραφία heparin-Sepharose, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής Q-Sepharose και Mono-Sepharose, χρωματογραφία υψηλής πίεσης σε στήλη υδροξυλαπατίτη και στήλη μοριακής διήθησης. Η διαδικασία αυτή κατέληξε στη μερική απομόνωση του GnSAF, δίδοντας δύο πρωτεϊνικές κορυφές η μία >100 kDa και η άλλη 10-70 kDa. Τα κλάσματα που απομονώθηκαν και εμφάνισαν δραστικότητα GnSAF, προκάλεσαν αναστολή της έκκρισης της LH από την υπόφυση μετά από διέγερση με GnRH, χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά τη βασική έκκριση της FSH. Η ίδια διαδικασία καθαρισμού εφαρμόστηκε για την απομόνωση του παράγοντα GnSAF από ωοθυλακικό υγρό βοειδούς, αυτή τη φορά δίνοντας ένα κλάσμα με δραστικότητα GnSAF το οποίο αντιστοιχούν σε μοριακό βάρος 28-44 kDa (Danforth and Cheng 1993).

Τέσσερις συνολικά αναφορές υπάρχουν μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία για πλήρη απομόνωση του παράγοντα GnSAF από βιολογικά υγρά. Η πρώτη αναφορά περιγράφει την απομόνωση ενός παράγοντα με βιοδραστικότητα GnSAF από 32 λίτρα υπερκείμενου καλλιιεργειών κυττάρων Sertoli (Tio et al., 1994). Η απομόνωση έγινε ακολουθώντας διάφορα στάδια υγρής χρωματογραφίας, όπως Mono-Q, C4, C8, C2/C18, ενώ το τελικό καθοριστικό στάδιο ήταν η χρωματογραφία ηλεκτροφόρησης υψηλής απόδοσης (high performance electrophoresis chromatography). Η μονομερής πρωτεΐνη στην

οποία κατέληξαν ήταν μοριακού βάρους 37 kDa, με αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου: NH₂-SDXXPQL. Στην εργασία αυτή αναφέρεται ότι ο παράγοντας GnSAF σε μικρότερο βαθμό εμφάνισε και δραστικότητα ανασταλτίνης, δημιουργώντας την εντύπωση ότι το μόριο αυτό μοιράζεται κοινές βιολογικές ιδιότητες με την ανασταλτίνη.

Η δεύτερη προσπάθεια απομόνωσης του παράγοντα GnSAF έγινε από τους Danforth and Cheng (Danforth and Cheng, 1995), όπου χρησιμοποιήθηκαν 5 λίτρα χοίρειου ωοθυλακικού υγρού. Βρέθηκε ότι ο παράγοντας έχει μοριακό βάρος 69 kDa, με αλληλουχία του αμινοτελικού άκρου, NH₂-SKPLAE. Σε αντίθεση με την προηγούμενη αναφορά, δεν αποδόθηκε βιοδραστικότητα ανασταλτίνης στον παράγοντα αυτόν.

Οι δύο άλλες εργασίες, που αφορούν την απομόνωση του παράγοντα GnSAF, έγιναν με τη χρήση ανθρώπινου βιολογικού υλικού.

Οι Pappa et al. (Pappa et al., 1999a) χρησιμοποίησαν 250 ml ανθρώπινου ωοθυλακικού υγρού από γυναίκες με υπερδιεγερμένες ωοθήκες, το οποίο θερμάνθηκε στους 80°C για 5 λεπτά και μετά από μια σειρά χρωματογραφικών διεργασιών, όπως χρωματογραφία heparin-Sepharose, χρωματογραφία Con-A Sepharose και υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία ανάστροφης φάσης (HPLC), ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε γέλη για την κλασμάτωση του παράγοντα GnSAF. Η πρωτεΐνη που απομονώθηκε ταυτοποιήθηκε ως το καρβοξυτελικό τμήμα της λευκωματίνης ορού του ανθρώπου με μοριακό βάρος 12.5 kDa. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες που προέκυψαν είναι ALEVDETYVPK, XXALVELK και AVMDDDFAAFEVEK. Το βιολογικό σύστημα παρακολούθησης που χρησιμοποιήθηκε ήταν πρωτογενείς καλλιέργειες υποφυσιακών κυττάρων επιμύων, επί των οποίων το απομονωθέν κλάσμα μείωσε την έκκριση LH από τα κύτταρα μετά από διέγερσή τους με GnRH, δείχνοντας δραστικότητα GnSAF.

Μια διαφορετική προσέγγιση για την απομόνωση του παράγοντα χρησιμοποίησαν οι Fowler et al. (Fowler et al., 2002) με υπερκείμενα πρωτογενούς καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων, τα οποία είχαν απομονώσει από γυναίκες, που υποβάλλονταν σε θεραπεία πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης. Οι πρωτογενείς καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων έγιναν παρουσία FSH και τα συμπυκνωμένα υπερκείμενα αυτών ελέγχθηκαν για δραστικότητα GnSAF σε σύστημα παρακολούθησης με πρωτογενείς καλλιέργειες υποφυσιακών κυττάρων επιμύων. Η προσθήκη των υπερκειμένων έδειξε μείωση στην έκκριση της LH από τα κύτταρα της υπόφυσης μετά από διέγερσή τους με GnRH, δηλαδή δραστικότητα GnSAF. Τα στάδια απομόνωσης περιλάμβαναν Dyematrex Blue χρωματογραφία, ψευδοχρωματοεστιακή χρωματογραφία (PCF) και κατόπιν ηλεκτροφόρηση σε γέλη δύο διαστάσεων (2D gel electrophoresis). Τα προϊόντα των χρωματογραφικών διαδικασιών ελέγχονταν με τη χρήση αντισώματος «ειδικού» προς τον παράγοντα GnSAF, που αναπτύχθηκε από τους συγγραφείς. Το κλάσμα που απομονώθηκε είχε μοριακό βάρος περίπου 64 kDa, pI 5.7 και pH 5.8. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι κλάσματα με μοριακό βάρος 17 kDa αλλά και 83 kDa έδειξαν, σε μικρότερο συγκριτικά βαθμό,

μείωση της παραγόμενης LH από τα υποφυσιακά κύτταρα στο σύστημα παρακολούθησης δραστηριότητας του GnSAF. Δύο αλληλουχίες προέκυψαν από αυτή τη μελέτη και προτάθηκαν ως πιθανές αλληλουχίες για τον παράγοντα GnSAF, μια εσωτερική αλληλουχία: EPQVYVHAP και μια αμινοτελική NH₂-xVPQGNAGN, χωρίς καμία από αυτές να εμφανίζει κάποια ομολογία με άλλη ήδη γνωστή πρωτεΐνη.

Επιπλέον, έχουν γίνει προσπάθειες για την παρασκευή ενός αντισώματος ειδικού ως προς τον παράγοντα GnSAF, ώστε να γίνει πιο εύκολη η διαδικασία απομόνωσης και χαρακτηρισμού του. Οι διαδικασίες για την παραγωγή αντισώματος έναντι του παράγοντα GnSAF περιλάμβαναν τη μερική απομόνωση του παράγοντα GnSAF από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό με τεχνικές, όπως η αφαλάτωση και η διήθηση μέσω φίλτρων για την απομάκρυνση ενώσεων με μικρό μοριακό βάρος καθώς και μέρους των στεροειδών και μετά χρησιμοποιήθηκαν χρωματογραφικές κολώνες, όπως η υδρόφοβη αλληλεπίδραση LC και γέλη διαπήδησης HPLC (Bates et al., 1996) καθώς και με την τεχνολογία phage display (Sorsa-Leslie et al., 2005) χωρίς όμως επιτυχία. Η απομόνωση του GnSAF, όπως αυτή περιγράφηκε από τους Fowler et al. (Fowler et al., 2002), προτείνει την παρασκευή αντισωμάτων έναντι του GnSAF από επίμυες (Fowler et al., 2002). Το αντίσωμα αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παραπάνω εργασία, καθώς όμως αφορά μόνο στην απομόνωση του παράγοντα από το συγκεκριμένο εργαστήριο και με χρήση ως αντιγόνου του μορίου ή των μορίων, που η ερευνητική ομάδα θεώρησε ως παράγοντα GnSAF, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως.

4.4 Διαφοροποίηση του παράγοντα GnSAF από τις πρωτεΐνες της ομάδας της ανασταλτίνης

Ένα από τα βασικά ερωτήματα σχετικά με τη φύση του GnSAF αφορά την πιθανότητα να έχει κάποια συγγένεια ή να είναι ταυτόσημος με τις πρωτεΐνες της ομάδας της ανασταλτίνης. Ειδικά, τα πρώτα χρόνια, μετά τις μελέτες που κατέδειξαν την ύπαρξη ενός τέτοιου πρωτεϊνικού παράγοντα, υπήρξαν μελέτες που συνδέουν την ελάττωση της έκκρισης της LH, μετά από διέγερση με GnRH *in vitro*, με τη δράση της ανασταλτίνης (Campen and Vale, 1988, Fowler et al., 1994a). Αυτή η ελάττωση στην έκκριση της LH μπορεί να οφείλεται και στη δράση της ακτιβίνης (Mutukrishna and Knight, 1991, Miyake et al., 1993). Η περίπτωση να συνδέεται η δράση του παράγοντα αυτού με τη δράση της ακτιβίνης θεωρείται λιγότερο πιθανή καθώς, όπως είναι ήδη γνωστό, η μεγαλύτερη ποσότητα αυτής της πρωτεΐνης είναι δεσμευμένη στην ανενεργή της μορφή με τη φολλιστατίνη (Nakamura et al., 1990, Schneyer et al., 1992).

Λίγες μελέτες αναφέρουν την πιθανότητα ο παράγοντας GnSAF να αποτελεί μέλος της ομάδας της ανασταλτίνης ή ακόμα να πρόκειται για την ίδια την ανασταλτίνη. Μελέτες, στις οποίες χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα έναντι της ανασταλτίνης, ώστε να εξουδετερωθεί η δράση της, έδωσαν αντιφατικά αποτελέσματα. Υπάρχουν ερευνητικές διαδικασίες, όπου έγινε απενεργοποίηση της δραστηριότητας της ανασταλτίνης σε ωοθυλακικό υγρό ή ορό αίματος γυναικών και η δραστηριότητα του GnSAF συνέχισε να υφίσταται

(Fowler et al., 1995, Byrne et al., 1995). Αντίθετα, η ανοσοποίηση θηλυκών επιμύων έναντι της ανασταλτίνης προκάλεσε εξαφάνιση της παρατηρούμενης δραστηριότητας GnSAF (Culler and Negro-Villar, 1989, Culler, 1992a,b). Οι διαφορές αυτές μπορούν να αποδοθούν είτε στη χρήση διαφορετικών πειραματικών μοντέλων είτε στα διαφορετικά είδη ζώων. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ανασταλτίνη έχει κοινές βιολογικές δραστηριότητες με τον παράγοντα GnSAF (Campen and Vale, 1988, Farnworth et al., 1988a,b, Tio et al., 1994).

Παρ' όλ' αυτά, ειδικά στις μελέτες απομόνωσης του GnSAF, επανειλημμένα έχειδειχθεί η δυνατότητα διαχωρισμού της ανασταλτίνης από τον παράγοντα αυτού με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων, με heparin –Sepharese, καθώς η ανασταλτίνη δεσμεύεται στην ηπαρίνη (Danforth et al., 1987, Fowler et al., 1990), με χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (Danforth and Cheng, 1993), υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (Fowler et al., 1994a, Danforth and Cheng, 1995) και αγκιστείας χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι της ανασταλτίνης (Knight et al., 1990). Η δραστηριότητα του GnSAF, που μειώνεται με την αύξηση της διαμέτρου των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, δεν συσχετίζεται ή σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα, με τη βιολογική δραστηριότητα ή την ανοσολογική δραστηριότητα της ανασταλτίνης (Fowler et al., 1994b, Kita et al., 1994).

Με τη χρήση των παραπάνω επιστημονικών δεδομένων, διαφαίνεται η διαφορετική βιολογική οντότητα του παράγοντα GnSAF και της ανασταλτίνης καθώς και το γεγονός ότι οι δύο πρωτεϊνικής φύσης ωοθηκικοί παράγοντες συμμετέχουν στη ρύθμιση της έκκρισης των γοναδοτροφινών από την υπόφυση, ακολουθώντας διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης.

4.5 Θέση παραγωγής του GnSAF

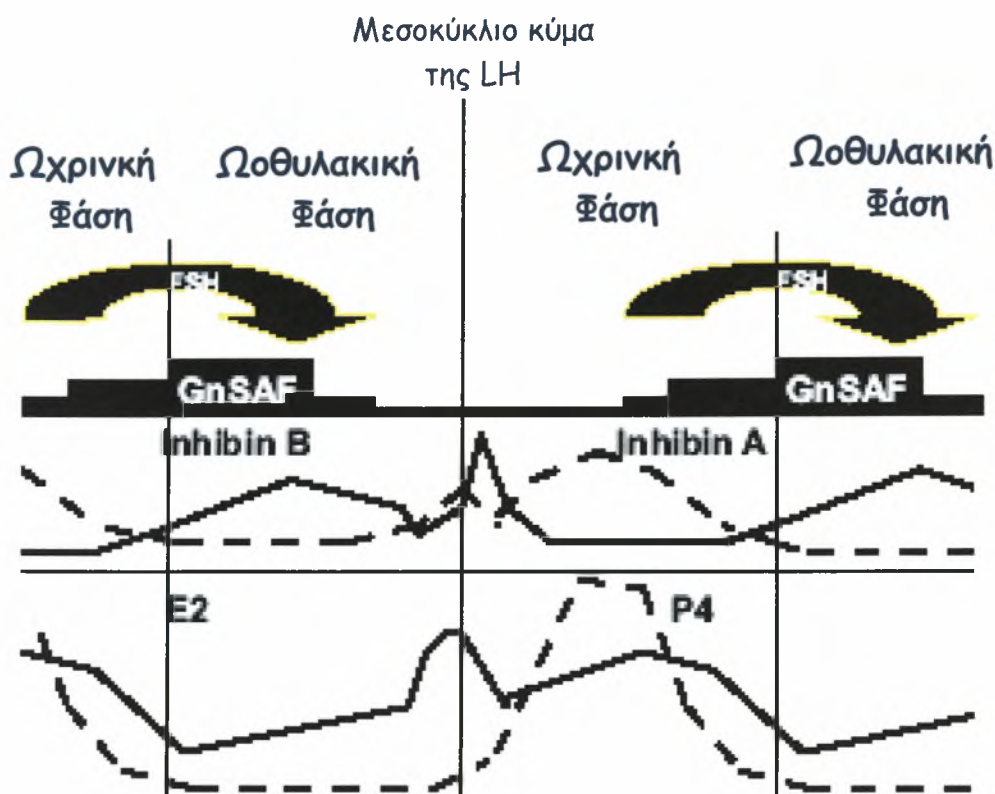
Τα τελευταία χρόνια έγιναν διάφορες μελέτες για τον προσδιορισμό της θέσης παραγωγής του GnSAF. Οι πρώτες ενδείξεις για την ωοθηκική προέλευση του παράγοντα αυτού παρουσιάστηκαν μέσα από μια σειρά μελετών με ωοθηκομηθένες επίμους, κατά τις οποίες παρατηρήθηκε αύξηση της ορμονικής απάντησης της υπόφυσης στη GnRH. Η αύξηση αυτή αποδόθηκε σε πιθανό παράγοντα ή παράγοντες που εκκρίνει η ωοθήκη και συντελούν στη διατήρηση της υπόφυσης σε κατάσταση χαμηλής διεγερσιμότητας τη GnRH (de Koning et al., 1979; 1987; 1989).

Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση hMG σε θηλυκούς πιθήκους με φυσιολογικό αναπαραγωγικό κύκλο προκάλεσε ελάττωση της ευαισθησίας της υπόφυσης στη GnRH *in vivo*. Η επίδραση αυτή διατηρήθηκε για 90 λεπτά μετά την αφαίρεση των ωοθηκών (Littman & Hodgen, 1984). Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν σε ωοθηκεκτομηθείσες γυναίκες, στις οποίες είχε προηγουμένως χορηγηθεί FSH (Messinis et al., 1996).

Μια πρόσφατη μελέτη από τους Fowler et al. (Fowler et al., 2002), έδειξε τα κοκκώδη κύτταρα ως τη θέση παραγωγής του GnSAF. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα υπερκείμενα υγρά καλλιεργείων κοκκωδών κυττάρων, τα οποία είχαν απομονωθεί από γυναίκες, οι οποίες υποβλήθηκαν σε

μείωση της παραγωγής του GnSAF κατά την προωρρηκτική φάση, δηλαδή τότε που η συγκέντρωση της οιστραδιόλης υπερβεί τον ουδό για τον θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, επιτρέπει την πλήρη έκφραση του μηχανισμού αυτού με τις μέγιστες διαστάσεις του κύματος της LH σε εύρος και σε διάρκεια. Ο ρόλος του GnFAF λοιπόν κατά την ωοθυλακιορρηξία είναι καθοριστικός καθώς δεν παρεμποδίζει το θετικό μηχανισμό παλίνδρομης αλληλορρύθμισης των στεροειδών, αλλά ρυθμίζει το μέγεθος της ανταπόκρισης της υπόφυσης στη διέγερση με GnRH. Μπορεί λοιπόν ο GnSAF να έχει ρόλο στη ρύθμιση του εύρους των ώσεων της LH, συντονίζοντας την έκκριση της LH με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και τη στεροειδογένεση στις γυναίκες και σε άλλα θηλαστικά. Υπάρχουν μελέτες, που υποστηρίζουν αυτήν την υπόθεση, καθώς υποστηρίζουν ότι η αλλαγή του μηχανισμού παλίνδρομης αλληλορρύθμισης, που ασκούν οι στεροειδείς ορμόνες στον υποθάλαμο-υπόφυσιικό άξονα από αρνητικό σε θετικό, είναι ανεπαρκής για να εξηγήσει πλήρως το μηχανισμό εμφάνισης του μεσοκύκλιου κύματος της LH (Taylor et al., 1995, Clarke, 1995).

Εξ' αιτίας λοιπόν του μεγαλύτερου αριθμού των μικρών ωοθυλακίων σε γυναίκες με υπερδιεγερμένες ωοθήκες, αυξάνεται η παραγωγή του παράγοντα GnSAF, αυξάνοντας έτσι και την αρνητική του επίδραση. Στο Σχήμα 6, δίνεται περιληπτικά μια σχηματική απεικόνιση των ορμονών που μετέχουν σε αυτή τη διαδικασία στις διάφορες φάσεις του γεννητικού κύκλου. Είναι πιθανόν, καταστάσεις, όπως η αυξημένη απάντηση της υπόφυσης στη GnRH στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες ή το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών, να μπορούν να εξηγηθούν από την έλλειψη σε αυτές τις γυναίκες μικρών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, που θα μπορούσαν να παράγουν GnSAF. Με τον πλήρη χαρακτηρισμό του GnSAF και τη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης του, μπορούν να βρεθούν νέα δεδομένα για τη ρύθμιση του γεννητικού κύκλου καθώς και νέο τρόπο αντιμετώπισης της στειρότητας και εναλλακτικοί τρόποι αντισύλληψης.



Ο GnSAF περιορίζει το εύρος των ώσεων της LH

Ο GnSAF περιορίζει το εύρος των ώσεων της LH κατά τη μετάβαση από την ωχρινική στην ωοθυλακική φάση

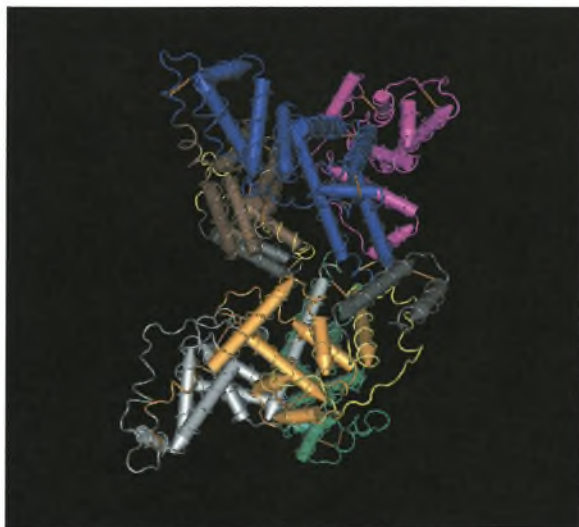
Σχήμα 6. Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης του γεννητικού κύκλου. Προσαρμοσμένο από τον Messinis (2006)

4.8 Η Λευκωματίνη ορού του ανθρώπου και ο παράγοντας GnSAF

Η μελέτη για την απομόνωση και το μερικό χαρακτηρισμό του GnSAF από τους Parra et al. (Parra et al., 1999a) είναι η μόνη, κατά την οποία η προτεινόμενη αλληλουχία για τον GnSAF έδειξε να έχει ομολογία με γνωστή πρωτεΐνη και συγκεκριμένα με το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης λευκωματίνης του ορού του ανθρώπου. Τα δεδομένα αυτά στηρίζονται και από μια πρόσφατη μελέτη, που έγινε με τη σύνθεση του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης σε ευκαρυωτικό σύστημα έκφρασης, που χρησιμοποιεί τον μεθυλοτροφικό ζυμομύκητα *Pichia pastoris* (Tavoulari et al., 2004). Σύμφωνα με τη μελέτη αυτή, τα υπερκείμενα από την καλλιέργεια του μύκητα, όπου εκφράστηκε το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης μεταξύ των καταλοίπων 490 και 585 αλλά οι άλλες δύο δομικές περιοχές της,

υποβλήθηκαν σε *in vitro* σύστημα ελέγχου της δραστηριότητας GnSAF καλλιιεργειών υποφυσιικών κυττάρων επίμυων. Έτσι, παρατηρήθηκε ότι σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τμήματα της λευκωματίνης του ορού, μόνο το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης προκάλεσε δραστική μείωση της έκφρασης της LH από τα υποφυσιικά κύτταρα μετά από επίδραση GnRH.

Η λευκωματίνη του ορού ανθρώπου είναι μια υδατοδιαλυτή, μονομερής, σφαιρική, μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη 585 αμινοξέων, με κύριο τόπο παραγωγής στον άνθρωπο τον ηπατικό ιστό. Επίσης, έχει βρεθεί ότι παράγεται σε μικρότερη ποσότητα από το πάγκρεας και το μεσολόβιο και ο φυσιολογικός της ρόλος αφορά κυρίως στην πρόσδεση και τη μεταφορά πρωτεϊνών του πλάσματος. Επιπρόσθετα, εμπλέκεται και σε μια σειρά άλλων μηχανισμών, όπως η διατήρηση της οσμωτικής πίεσης, η δέσμευση των ελεύθερων ριζών, η αναστολή της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και η αντιθρομβωτική δράση καθώς και η διαπερατότητα των αγγείων (Peters, 1970, Zahring et al., 1976). Η πρωτεΐνη αυτή αποτελείται από τρία δομικά μέρη και θεωρείται ότι το κάθε ένα από αυτά προέκυψε από τον τριπλασιασμό του πρώτου αρχικού δομικού μέρους. (Εικόνα 1) Το μοριακό της βάρος είναι 65 kDa. Το γονίδιο της λευκωματίνης αποτελείται από 15 εξώνια και αντίστοιχα από 14 εσώνια, τα οποία βρίσκονται συμμετρικά τοποθετημένα μέσα στα τρία δομικά μέρη. Αποτελείται από 16961 νουκλεοτίδια και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 4 στη θέση q11-q22 του ανθρώπινου γονιδιώματος. Αρχικά, το μόριο της λευκωματίνης συντίθεται ως προ-λευκωματίνη, από όπου αποκόπτεται το αμινοτελικό άκρο, πριν η νέα παραγόμενη πρωτεΐνη ελευθερωθεί από το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Η προ-λευκωματίνη, με τη σειρά της αποκόπτεται στο σύστημα Golgi, ώστε τελικά να παραχθεί η λευκωματίνη (Minghetti et al., 1986).



Εικόνα 1: Τριδιάσταση αναπαράσταση της δομής της λευκωματίνης του ορού του ανθρώπου (Carter and Ho, 1994)

5. Σκοπός

Η παρούσα εργασία βασίστηκε στα ερευνητικά δεδομένα που αναλύθηκαν παραπάνω (Pappa et al., 1999a) και κύριος στόχος της είναι να ερευνήσει την πιθανότητα να είναι ο GnSAF ταυτόσημος με το καρβοξυτελικό τμήμα της λευκωματίνης. Αρχικά, ερευνήθηκε εάν τα κοκκώδη κύτταρα, που θεωρούνται ο τύπος παραγωγής του GnSAF μπορούν να εκφράσουν μετάγραφα ολόκληρου ή μέρους του γονιδίου της λευκωματίνης. Μετέπειτα, οι έρευνες είχαν στόχο να μελετήσουν και την πιθανή έκφραση σε πρωτεϊνικό επίπεδο της μεταγραφής που εμφανίζεται από τα κοκκώδη κύτταρα. Τέλος, η καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν ως μέσο ανίχνευσης της έκφρασης του γονιδίου GnSAF και ως μέσο μελέτης του μηχανισμού παραγωγής του GnSAF με την επίδραση διαφόρων ορμονών.

Β. ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στην ενότητα αυτή παρατίθενται το υλικό και η ανάπτυξη των διαφόρων μεθόδων, που χρησιμοποιήθηκαν, με στόχο την ανίχνευση της έκφρασης του υπεύθυνου γονιδίου του GnSAF ως τμήμα του γονιδίου της ανθρώπινης λευκωματίνης από τα κοκκώδη κύτταρα. Στις πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τύποι ανθρώπινων κυττάρων, για τη χρήση των οποίων δόθηκε η πλήρης συναίνεση από τους δότες. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν είναι πλήρως χαρακτηρισμένες.

6. Κύτταρα

6.1.1 Κοκκώδη κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκαν κοκκώδη κύτταρα που λήφθηκαν από ωχρινοποιημένα ωοθυλάκια 134 γυναικών ηλικίας μεταξύ 20 και 40 ετών, οι οποίες υποβλήθηκαν σε ωοθηκική διέγερση με FSH με σκοπό την εξωσωματική γονιμοποίηση. Η συλλογή των κοκκωδών κυττάρων γινόταν με τη μέθοδο της καθίζησης και πριν χρησιμοποιηθούν, υποβάλλονταν σε κατεργασία απομάκρυνσης του αίματος και λοιπών στοιχείων του ωοθυλακικού υγρού (Hillier et al., 1991).

Διαδικασία:

1. Το ωοθυλακικό υγρό μοιράζονταν ανά 6 ml σε πλαστικά σωληνάρια (Falcon) των 15 ml
2. Ακολουθούν, διαδοχικές εκπλύσεις με διάλυμα άλατος PBS (Dullbeco's Phosphate Buffered Saline – Biochrom, UK) σε στείρες συνθήκες και θερμοκρασία δωματίου. Μεταξύ των εκπλύσεων μεσολαβούσαν διαστήματα των 2 - 3 λεπτών για την καθίζηση των κυττάρων. Το άλας συμπαρασύρει και απομακρύνει προσμίξεις και ερυθρά αιμοσφαίρια και επιτρέπει την καθίζηση των κοκκωδών κυττάρων στον πυθμένα του σωληναρίου
3. Απομακρύνονταν τα μικρά πηγμάτα αίματος που τυχόν υπήρχαν και τα ελάχιστα λευκά αιμοσφαίρια που μπορεί να υπήρχαν όταν η πρόσμιξη του αίματος ήταν μεγάλη
4. Ακολούθησε μέτρηση των κυττάρων για τον καθορισμό του συνολικού τους αριθμού καθώς και για την εκτίμηση του ποσοστού βιωσιμότητάς τους. Συνήθως η βιωσιμότητα κυμαίνεται περίπου στο 50%. Η μέτρηση έγινε με τη χρήση της πλάκας Newbauer και της χρωστικής αποκλεισμού των νεκρών κυττάρων, trypan blue (Sambrook et al., 1989, pp 10.1-10.2). Η χρωστική αυτή χρωματίζει μπλε τα κύτταρα, που είναι νεκρά, καθώς μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη και να εισέλθει στο εσωτερικό τους λόγω της διάχυσης. Στο ζων κύτταρο όμως δεν μπορεί να εισέλθει και έτσι τα ζώντα κύτταρα παραμένουν άχρωμα. Για να μελετηθούν τα κύτταρα, προσθέτονται ίσος όγκος χρωστικής και κυττάρων. Ο υπολογισμός του αριθμού των κυττάρων φαίνεται στον Πίνακα 1
5. Κάτω από το μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, τα κοκκώδη κύτταρα φαίνονται ως πιο φωτεινά, πιο μεγάλα από τα ερυθρά αιμοσφαίρια και έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα. Η αλλαγή θερμοκρασίας κάτω από τους 37°C δεν είναι επιβλαβής για την βιωσιμότητα των κυττάρων, ενώ εκτενείς διακυμάνσεις στο pH θα πρέπει να αποφεύγονται καθώς αυτό μπορεί να μειώσει την

- βιωσιμότητά τους. Για το λόγο αυτό, ένας δείκτης pH (Phenol Red) εμπεριέχονταν στο καλλιεργητικό υλικό
6. Τα κύτταρα συλλέγονταν και χρησιμοποιούνταν είτε για καλλιέργεια σε πλάκες καλλιέργειας 92 θέσεων (*in vitro* culture) είτε για απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών

Πεδίο	1	2	3	4	Μέσος όρος
Αριθμός ζώντων κυττάρων	α	β	γ	δ	$\frac{\alpha+\beta+\gamma+\delta}{4}$
Αριθμός νεκρών κυττάρων	ε	ζ	η	θ	$\frac{\epsilon+\zeta+\eta+\theta}{4}$
Σύνολο	α+ε	β + ζ	γ + η	δ+θ	

α, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ : ο αριθμός των κυττάρων που μετρήθηκαν στα πεδία της πλάκας Newbauer.

Αριθμός κυττάρων:
Μέσος όρος ζώντων κυττάρων x συνολικό όγκο (ml) των κυττάρων στο σωλήνα x 2 x 10⁴

Βιωσιμότητα κυττάρων (%):
Μέσος όρος ζώντων κυττάρων / συνολικό αριθμό κυττάρων x 100

Πίνακας 1: Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη μέθοδο trypan blue.

6.1.2 Κύτταρα από ηπατικό ιστό ανθρώπου

Τα κύτταρα αυτά απομονώθηκαν από ηπατικό ιστό ατόμων που προσήλθαν στην Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας για βιοψία για διάφορους λόγους και στη συνέχεια αποδείχθηκαν υγιείς. Το γενετικό υλικό (DNA και RNA) αυτών των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ως θετικός μάρτυρας.

6.1.3 Μονοπύρηννα κύτταρα από περιφερικό αίμα

Τα μονοπύρηννα κύτταρα από περιφερικό αίμα υγιών δοτών συλλέχθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική διαχωρισμού με φυγοκέντρηση σε βαθμίδωση φικόλλης (Ficoll – Histopaque, Sigma).

Διαδικασία:

1. Επιστοίβαση 5-7 ml ολικού αίματος σε 3 ml φικόλλης
2. Φυγοκέντρηση σε 2000 rpm επί 15 λεπτά
3. Συλλογή της στοιβάδας των μονοπύρηννων και μεταφορά σε νέο σωληνάριο
4. Προσθήκη 8 ml διαλύματος PBS και καλή ανάδευση

5. Φυγοκέντρωση του δείγματος μετά από ήπια ανακίνηση σε 1800 rpm επί 5 λεπτά
6. Απώρριψη υπερκειμένου και επανάληψη της φυγοκέντρωσης
7. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 1 ml διαλύματος PBS
8. Μέτρηση του αριθμού των κυττάρων με τη μέθοδο Trypan Blue

6.1.4 Κυτταρικές σειρές

Χρησιμοποιήθηκε η κυτταρική σειρά HepG2, δηλαδή ανθρώπινα ηπατικά κύτταρα που παράγουν λευκωματίνη. Τα κύτταρα ελήφθησαν μετά την αποκόλληση τους από τη φιάλη καλλιέργειας με τρυψίνη (Trypsin / EDTA, Biocrom, UK), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.2. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν οι ανθρώπινες κυτταρικές σειρές HeLa, ανθρώπινα επιθηλιακά καρκινικά κύτταρα τραχήλου και K562, ανθρώπινα ερυθρολευχαιμικά κύτταρα από χρόνια μυελογενή λευχαιμία, ως αρνητικοί μάρτυρες, καθώς καμία από τις κυτταρικές σειρές δεν εκφράζει την λευκωματίνη.

6.2. Καλλιέργεια κυττάρων

6.2.1 Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων

Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hillier et al. (1991). Ακολούθησε η συλλογή του θρεπτικού υλικού ανά 24 ώρες για την ανίχνευση του παράγοντα GnSAF. Συνολικά, η καλλιέργεια διαρκούσε 92 ώρες, όπου έγινε έλεγχος παραγωγής του παράγοντα από τα κύτταρα μετά από διέγερσή τους με γοναδοτροφίνες, με σκοπό τη διερεύνηση των συνθηκών παραγωγής του παράγοντα.

Η καλλιέργεια γινόταν σε καλλιεργητικό υλικό 199 με Hepes (Invitrogen, UK). Σε αυτό προσθέτονταν 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Invitrogen, UK), 5% L-Glutamine, 1% Penicillin/Streptomycin 5000/500 units και 0.1% Bovine Serum Albumin – BSA (1 mg/ml BSA, Sigma USA). Η προσθήκη του BSA βοηθά στην επικόλληση των κυττάρων στην πλάκα καλλιέργειας. Για τον ίδιο λόγο στο διάλυμα PBS προσθέτονταν BSA σε ίδια αναλογία, όταν τα κύτταρα επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια.

Διαδικασία:

1. Μία ημέρα πριν την καλλιέργεια η πλάκα με τις 24 θέσεις (οπές) επιστρώνονταν με 500 μl/θέση Donor calf serum (Invitrogen, UK) και επωάζονταν επί 16 ώρες (overnight, O/N) στους 37°C. Ο ορός βοηθά στην επικόλληση των κυττάρων στην πλάκα αλλά δεν προστίθετο άμεσα στο καλλιεργητικό υλικό για να αποφευχθεί η ανάμιξη άλλων μη επιθυμητών στοιχείων, που εμπεριέχονται σε αυτό
2. Την επόμενη ημέρα, η πλάκα ξεπλένονταν 2 φορές με PBS και τα κύτταρα επαναδιαλύονταν σε πλήρες θρεπτικό υλικό με συγκέντρωση 50000 κυττάρων/500 μl/θέση
3. Στα συγκεκριμένα πειράματα προστέθηκε η ορμόνη FSH (NIHR, USA) σε διάφορες συγκεντρώσεις (10-100 ng/μl) στο καλλιεργητικό υλικό
4. Τα κύτταρα καλλιεργούνταν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37°C, με 5% CO₂ και 100% υγρασία

Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό συλλέχθηκε ανά 24 ώρες και διατηρήθηκε στους -70°C μέχρι την εξέτασή του για την ύπαρξη ή όχι του παράγοντα. Για να εξεταστεί η φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων, μέρος του υπερκείμενου καλλιεργητικού υλικού εξετάστηκε για παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα με ELISA. Τα κοκκώδη κύτταρα είναι θέση παραγωγής της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης (Karamouti et al., 2004).

6.2.2 Καλλιέργεια κυτταρικών σειρών

Η καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών έγινε σύμφωνα με τις οδηγίες των προμηθευτών.

HepG2: Καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό DMEM (Sigma, UK) με 10% Fetal Bovine Serum, 5% L-Glutamine και 1% Penicillin/Streptomycin 10000/1000 units.

K562 και HeLa: Καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό RPMI (Invitrogen, UK) με 10% FBS, 5% L-Glutamine και 1% Penicillin/Streptomycin 10000/1000 units.

A. Απόψυξη κυττάρων

Τα κύτταρα φυλάσσονταν στους -160°C . Η απόψυξη των κυττάρων έγινε όπως περιγράφεται παρακάτω.

Διαδικασία:

1. Γρήγορη απόψυξη του φιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37°C
2. Άμεση μετάγγιση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο 15 ml που περιέχει πλήρες θρεπτικό υλικό μέχρι τα 5 ml
3. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 8 λεπτά
4. Απόρριψη του υπερκείμενου και έκπλυση με 5 ml PBS με Ca^{+2} και Mg^{+2}
5. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 8 λεπτά
6. Απόρριψη του υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 5 ml πλήρες θρεπτικό υλικό
7. Καλλιέργεια των κυττάρων σε κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 και 100% υγρασία

B. Καλλιέργεια προσκολλημένων κυττάρων (HepG2 και HeLa) με θρυψινοποίηση

Η αποκόλληση των κυττάρων και η επανακαλλιέργεια τους γίνεται ως εξής:

1. Απόρριψη του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα
2. Προσθήκη 5 ml διαλύματος PBS χωρίς Ca^{+2} και Mg^{+2} και ελαφρά ανακίνηση. Η φλάσκα παράμενε για 3 λεπτά με περιστασιακή ανακίνηση και απομάκρυνση του PBS
3. Επανάληψη βήματος 2
4. Προσθήκη 1 ml θρυψίνης (θρυψινοποίηση) στη φλάσκα των 25 cm^2 . Ανακίνηση και επώαση στους 37°C επί 5 λεπτά μέχρι να αποκολληθούν τα κύτταρα. Ο μέγιστος χρόνος θρυψινοποίησης ήταν 10 λεπτά
5. Άμεση προσθήκη πλήρους θρεπτικού υλικού σε δεκαπλάσια ποσότητα αυτής της θρυψίνης
6. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 10 λεπτά

7. Απόρριψη του υπερκειμένου
8. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 10 ml PBS με Ca^{+2} και Mg^{+2} και ανάδευση ιζήματος
9. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 10 λεπτά
10. Απόρριψη του υπερκειμένου. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και μέτρηση των κυττάρων στην πλάκα Newbauer
11. Ακολουθούσε είτε η αραίωση των κυττάρων (1:4) σε καινούργιες φλάσκες και επώαση στον κλίβανο στους 37°C ή η συλλογή κυττάρων για απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών ή εναλλακτικά, κατάψυξη των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% DMSO (Merk, USA) και 30% FBS, σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού. Η κατάψυξη έγινε σταδιακά τοποθετώντας τα κύτταρα αρχικά στους -20°C για 4 ώρες, στη συνέχεια στους -70°C για 24 h τουλάχιστον και τελικά στους -160°C για φύλαξη

Γ. Καλλιέργεια μη προσκολλημένων κυττάρων (K562)

1. Απόχυση του καλλιεργητικού υλικού από τη φλάσκα σε σωληνάριο 15 ml
2. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 10 λεπτά
3. Απόρριψη του υπερκειμένου
4. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 10 ml PBS με Ca^{+2} και Mg^{+2} και ανάδευση ιζήματος
5. Φυγοκέντρηση στις 800 rpm επί 10 λεπτά
6. Απόρριψη του υπερκειμένου. Επανεναιώρηση των κυττάρων σε 10 ml πλήρους θρεπτικού υλικού και μέτρηση του αριθμού των κυττάρων
7. Ανάλογα με τον αριθμό των κυττάρων, τα κύτταρα αραιώνονταν (συνήθως 1:4) σε καινούργιες φλάσκες και επανακαλλιεργούνταν σε κλίβανο στους 37°C , 5% CO_2 και 100% υγρασία
8. Εναλλακτικά, συλλογή κυττάρων για απομόνωση RNA, DNA και πρωτεϊνών ή κατάψυξη των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό με 10% DMSO και 30% FBS σε συγκέντρωση $4-5 \times 10^6$ κύτταρα/ml θρεπτικού υλικού. Διαδικασία κατάψυξης ίδια με αυτή που αναφέρθηκε προηγουμένως

7. Απομόνωση DNA

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος φυσιολογικών ατόμων. Το ίδιο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε και για την εκχύλιση DNA από τις κυτταρικές σειρές, τα κοκκώδη κύτταρα και τον ηπατικό ιστό. Η εκχύλιση του DNA έγινε με τη μέθοδο, που περιγράφεται παρακάτω, όπου χρησιμοποιήθηκε kit ειδικό για την απομόνωση DNA από αίμα, κύτταρα και ιστούς, το QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, UK). Στο kit χρησιμοποιούνται στήλες (QIAamp Spin Columns) με στόχο την απομόνωση των νουκλεϊκών οξέων. Η χρήση μεμβρανών από πηκτή σιλικόνης, που βρίσκεται στις στήλες, δεσμεύει εκλεκτικά τα νουκλεϊκά οξέα, ενώ είναι διαπερατή στις πρωτεΐνες και τα δισθενή κατιόντα, που μπορούν να αναστείλουν την πολυμεράση κατά την αντίδραση PCR. Στο kit περιέχονται οι κατάλληλες στήλες, πρωτεϊνάση K, διαλύματα AL και ATL (διαλύματα λύσης), τα διαλύματα AW1 και AW2 (διαλύματα για τις εκπλύσεις,

όπου απαιτείται η προσθήκη αιθανόλης) και το διάλυμα ΑΕ (διάλυμα έκλουσης και επανασύστασης του DNA).

7.1 Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Διαδικασία:

1. Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K και 200 μl AL buffer (ρυθμιστικό διάλυμα λύσης) σε 200 μl δείγματος (περίπου 5×10^6 λεμφοκύτταρα / 200 μl PBS) σε σωληνάριο errendorf (1.5 ml)
2. Καλή ανακίνηση
3. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C για 10 λεπτά
4. Προσθήκη 200 μl αιθανόλης (96%-100%) στο σωληνάριο errendorf και ανάδευση
5. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη QIAamp και φυγοκέντρηση σε 8000 rpm επί 1 λεπτό
6. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1 στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επί 1 λεπτό
7. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη και προσθήκη 500 μl διαλύματος AW2 στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm επί 3 λεπτά
8. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάριο errendorf και προσθήκη 100 μl διαλύματος AE στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επί 1 λεπτό
9. Η στήλη απομακρύνονταν και στο σωληνάριο περιέχονταν το DNA, το οποίο φυλάσσεται για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% και φωτομέτρηση

7.2 Απομόνωση DNA από κυτταρικές σειρές ή κοκκώδη κύτταρα

Μετά τη συλλογή των κυττάρων, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 7.2, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε σωληνάριο errendorf διαλυμένα σε όγκο 200 μl PBS.

Διαδικασία:

1. Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K
2. Στη συνέχεια ακολουθούσαν τα στάδια 3-9 του πρωτοκόλλου για την απομόνωση DNA από κύτταρα από περιφερικού αίματος.

7.3 Απομόνωση DNA από ηπατικό ιστό

Διαδικασία:

1. 25 mg ιστού τεμαχίζονταν σε μικρά τμήματα και τοποθετούνταν σε σωληνάριο errendorf με 180 μl διάλυμα ATL. Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K και καλή ανάμιξη του δείγματος με vortex.
2. Επώαση του δείγματος σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι να επιτευχθεί η πλήρης λύση του ιστού. Κατά διαστήματα γινόταν ανάδευση του δείγματος με vortex για να επιτευχθεί η διάλυση
3. Προσθήκη RNase A (100 mg/ml), ανάδευση του δείγματος με vortex επί 15 sec και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Προσθήκη 200 μl διαλύματος AL στο δείγμα. Ανάμιξη του

δείγματος με vortex επί 15 sec και επώαση για 10 λεπτά στους 70°C

4. Μεταφορά του δείγματος σε στήλη QIAamp και φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επί 1 λεπτό
5. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW1 στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επί 1 λεπτό
6. Αντικατάσταση σωληναρίου συλλογής κάτω από τη στήλη. Προσθήκη 500 μl διαλύματος AW2 στη στήλη. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm επί 3 λεπτά
7. Τοποθέτηση της στήλης σε σωληνάριο erpendorf και προσθήκη στη στήλη 200 μl διαλύματος AE. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό. Φυγοκέντρηση στις 8000 rpm επί 1 λεπτό
8. Επανάληψη σταδίου 7
9. Η στήλη απομακρύνονταν και το σωληνάριο που περιείχε το DNA φυλάσσονταν για ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση του DNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% και φωτομέτρηση

8. Απομόνωση RNA

Όλες οι διαδικασίες απομόνωσης RNA πραγματοποιούνταν σε πάγο και όλα τα υλικά και πλαστικά εργαλεία, που χρησιμοποιούνταν, είχαν επεξεργαστεί με διάλυμα DEPC για την αναστολή των ενζύμων που διασπούν το RNA και υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με DNase I (Promega, UK), για να αποφευχθεί η επιμόλυνση των δειγμάτων με DNA.

8.1 Απομόνωση ολικού RNA από ανθρώπινα κύτταρα

Για την εκχύλιση ολικού RNA από όλους τους τύπους κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται παρακάτω. Ακολουθήθηκε η μέθοδος του ισοθειοκυανικού γουανιδινίου, όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Chomczynski and Sachi (Chomczynski and Sachi, 1987).

Υλικά:

Αγαρόζη (Invitrogen, UK)
70% αιθανόλη (Merk, USA)
Βρωμιούχο αιθίδιο (Merk, USA)
Ισοπροπυλική αλκοόλη (Merk, USA)

Χλωροφόρμιο (Merk, USA)

ddH₂O

Διάλυμα PBS (Biochrom, UK)

Διάλυμα Trizol® (Invitrogen, UK)

Διαδικασία:

1. Προσθήκη Trizol® σε αναλογία 200 μl Trizol® / 10⁶ κύτταρα
2. Καλή διάλυση των κυττάρων με στόχο την πολύ καλή διάσπαση των κυττάρων και την εκχύλιση του RNA
3. Προσθήκη του ενός δεκάτου του όγκου του Trizol® χλωροφορμίου

4. Το μίγμα τοποθετούνταν στον πάγο για 15 λεπτά με ενδιάμεση ανάδευση με μηχανικό αναδευτήρα (vortex), ώστε να επιτευχθεί πολύ καλή ομογενοποίηση του μίγματος
5. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 15 λεπτών στους 4°C
6. Συλλογή της υδατινής φάσης, στην οποία περιέχονταν το RNA, σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης
7. Φύλαξη του δείγματος στους -20°C επί 16 ώρες (O/N) ή εναλλακτικά στους -70°C για 3 ώρες
8. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 30 λεπτών στους 4°C
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος. Προσθήκη στο ίζημα 1 ml 70% αιθανόλη
10. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C.
11. Απομάκρυνση υπερκείμενου διαλύματος. Επανάληψη σταδίου 10 με στόχο την απομάκρυνση υπολειμμάτων πιθανών προσμίξεων
12. Επαναδιάλυση ιζήματος σε ddH₂O
13. Φωτομέτρηση δείγματος για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο στα 260 και 280 nm
14. Έλεγχος ποιότητας του δείγματος σε πηκτική αгарόζης 1%.

Για την απομόνωση ολικού RNA χρησιμοποιήθηκαν 52 δείγματα από κοκκώδη κύτταρα και το RNA διατηρήθηκε στους -70°C.

8.2 Απομόνωση κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA

Η απομόνωση κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA έγινε με τη μέθοδο του συμπλόκου ριβονουκλεοσιδίου της βαναδύλης (VRC - vanadyl ribonucleoside complex method) (Davis et al., 1986, pp 136-138).

8.2.1 Απομόνωση κυτταροπλασματικού RNA

Για 1-10 x 10⁶ κύτταρα

Υλικά:

Απόλυτη αιθανόλη (Merk, USA)

Φαινόλη υψηλής καθαρότητας (Sigma, USA)

Χλωροφόρμιο (Merk, USA)

EDTA 0.5M (Invitrogen, UK)

ddH₂O

1M NaCl (Invitrogen, UK)

1M MgCl₂ (Invitrogen, UK)

10% SDS (Invitrogen, UK)

1M Tris pH 7.5 (Invitrogen, UK)

VRC στους -20°C για την αναστολή των RNAσών (Invitrogen, UK)

3 M CH₃COONa pH 5.2 (Invitrogen, UK)

10% NP40 (Invitrogen, UK)

10x RSB

RSB/VRC

Διάλυμα 2 x Lysis

Διαλύματα:

1. **Διάλυμα 10x RSB:** 100 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂
2. **Διάλυμα 1 x RSB/VRC:**

Για 2ml	
10xRSB	200μl
VRC	100μl
ddH ₂ O	1700μl
3. **Διάλυμα 2 x Lysis:** 1% SDS
0.6 N NaCl
10mM EDTA
20mM Tris pH 7.5
ddH₂O
4. **Διάλυμα TE** 10mM EDTA
20mM Tris pH 7.5

Διαδικασία:

Όλες οι διαδικασίες γίνονται στον πάγο.

1. Διάλυση κυττάρων σε 200 μl παγωμένο 1x RSB/VRC
2. Προσθήκη 20 μl NP40 10% για το σπάσιμο των μεμβρανών των κυττάρων. Καλή ανάδευση έως ότου να διαλυθεί τελείως το ίζημα
3. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
4. Συλλογή υπερκλειμένου και προσθήκη 200 μl 2x lysis. Στη συνέχεια προσθήκη 400 μl φαινόλη υψηλής καθαρότητας. Καλή ανάδευση
5. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
6. Συλλογή υπερκλειμένου και προσθήκη ίσου όγκου παγωμένης φαινόλης υψηλής καθαρότητας και παγωμένου χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1. Καλή ανάδευση
7. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
8. Συλλογή υπερκλειμένου και προσθήκη ίσου όγκου παγωμένου μίγματος χλωροφόρμιου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1. Καλή ανάδευση
9. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
10. Συλλογή υπερκλειμένου και προσθήκη του ενός δεκάτου του όγκου 3 M CH₃COONa pH 5.2 και 1 ml απόλυτης αιθανόλης
11. Καταβύθιση στους -20°C O/N ή για 2 - 3 ώρες στους -70°C
12. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 30 λεπτά στους 4°C
13. Απόρριψη υπερκλειμένου. Το ίζημα επανεναιωρούνταν σε 70% αιθανόλη με καλή ανάδευση
14. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 20 λεπτά στους 4°C
15. Απόρριψη υπερκλειμένου. Το ίζημα επανεναιωρούνταν σε 70% αιθανόλη με καλή ανάδευση
16. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 20 λεπτά στους 4°C
17. Επαναδιάλυση ιζήματος σε ddH₂O. Φωτομέτρηση δείγματος για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο στα 260 και 280 nm και έλεγχος ποιότητας του δείγματος σε πηκτή αгарόζης 1%

8.2.2 Απομόνωση πυρηνικού RNA

Διαδικασία:

Για την απομόνωση πυρηνικού RNA ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και για την απομόνωση του κυτταροπλασματικού RNA μέχρι του σταδίου 3. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία.

1. Επανεναιώρηση ιζήματος σε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος TE, προσθήκη 200 μl 2x lysis και 400 μl φαινόλη υψηλής καθαρότητας
2. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 12 λεπτά στους 4°C
3. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης υψηλής καθαρότητας και χλωροφορμίου σε αναλογία 1:1 παγωμένα
4. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
5. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1
6. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
7. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη του ενός δέκατου του όγκου 3 M CH₃COONa pH 5.2 και 1 ml απόλυτης αιθανόλης. Κατακρήμνιση στους -20°C (O/N) ή για 2 - 3 ώρες στους -70°C
8. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 30 λεπτά στους 4°C
9. Διάλυση ιζήματος σε 100 μl ddH₂O και προσθήκη ενζύμου DNase I σε τελική συγκέντρωση 2 μg/ml και επώαση για 1 ώρα στους 37°C
10. Προσθήκη 10 mM EDTA και 0.2% SDS. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης υψηλής καθαρότητας και χλωροφόρμιου σε αναλογία 1:1
11. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 12 λεπτά στους 4°C
12. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 24:1
13. Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 12 λεπτά στους 4°C
14. Συλλογή του υπερκείμενου διαλύματος σε καινούργιο σωληνάριο και προσθήκη ενός δέκατου του όγκου 3 M CH₃COONa pH 5.2 και 1 ml απόλυτης αιθανόλης
15. Κατακρήμνιση O/N στους -20°C ή για 2 - 3 ώρες στους -70°C.
16. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 30 λεπτά στους 4°C
17. Απόρριψη υπερκείμενου διαλύματος
18. Προσθήκη στο ίζημα 1 ml 70% αιθανόλη
19. Καλή ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C
20. Απόρριψη υπερκείμενου διαλύματος
21. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 1 ml 70% αιθανόλης.
22. Ύστερα από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 20 λεπτά στους 4°C
23. Επαναδιάλυση ιζήματος σε ddH₂O
24. Φωτομέτρηση δείγματος για ποιοτικό και ποσοτικό έλεγχο στα 260 και 280 nm
25. Έλεγχος ποιότητας του δείγματος σε πηκτή αγαρόζης 1%

9. Απομόνωση πρωτεϊνών

Η απομόνωση των πρωτεϊνών για όλους του τύπους κυττάρων έγινε με τη χρήση αποδιατακτικού διαλύματος απομόνωσης πρωτεϊνών και ενζύμων, που διασπούν τις πρωτεάσες (Sambrook, 1989 pp 13.2).

Υλικά:

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν της Εταιρείας Invitrogen, UK.

Αποδιατακτικό διάλυμα απομόνωσης πρωτεϊνών:

0.15 M NaCl

5 mM EDTA, pH 8

1% Triton X100

10 mM Tris-Cl, pH 7.4

Λίγο πριν τη χρήση προστίθεται: 1:1000 5 mM DTT

1:1000 100 mM PMSF σε ισοπροπανόλη

1:1000 5M aminocaproic acid

Διαδικασία:

1. Πλύση κυττάρων με διάλυμα PBS χωρίς Ca^{+2} και Mg^{+2}
2. Φυγοκέντρηση σε 2000 rpm επί 10 λεπτά στους 4°C
3. Απόρριψη υπερκειμένου και επαναδιάλυση ιζήματος σε 100 μl αποδιατακτικού διαλύματος απομόνωσης πρωτεϊνών
4. Μεταφορά μίγματος σε παγωμένο σωληνάριο τύπου eppendorf και επώαση στον πάγο για 20 λεπτά
5. Καλή ομογενοποίηση μίγματος
6. Φυγοκέντρηση στις 1200 rpm επί 2 λεπτά στους 4°C
7. Μεταφορά υπερκειμένου σε παγωμένο σωληνάριο τύπου eppendorf
8. Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford (Biorad, USA)

10. Σύνθεση cDNA

Η σύνθεση cDNA έγινε, όπως έχει ήδη περιγραφεί από τους Kwok and Higuchi (Kwok and Higuchi (1989) με την αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random hexamers, 500 μg/ml). Το ένζυμο, που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση, είναι η αντίστροφη μεταγραφάση M-MLV-RT (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200 U/μl, Invitrogen, UK). Στην αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκαν επίσης ρυθμιστικό διάλυμα της αντίστροφης μεταγραφάσης, 5x RT buffer και νουκλεοτίδια dNTPs 10 mM (Invitrogen, UK) (Πίνακας 2). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε 1 μg ολικό, κυτταροπλασματικό και πυρηνικό RNA σε 20 μl τελικό όγκο αντίδρασης. Στη συνέχεια, προσθέτονταν ddH₂O και εξαμερείς εκκινητές. Ακολουθούσε επώαση στους 65°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών. Κατόπιν, το διάλυμα διατηρούνταν στον πάγο για 5 λεπτά.

Υπόστρωμα	Όγκοι (μl)
RNA	1μg = x μl
ddH ₂ O	20-(8 + x)
Αντιδραστήρια	
RT buffer 5 x*	4
εξανουκλεοτίδια τυχαίας ακολουθίας (500 μg/ml)	1
dNTPs (10 mM)	2
M-MLV RT (200 U/μl)	1
Συνολικός όγκος	20

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια για τη σύνθεση cDNA

* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RT buffer 5x: 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂.

Μετά την προσθήκη και των λοιπών αντιδραστηρίων, ακολουθούσε η αντίδραση σύνθεσης cDNA.

1. 37°C, 60 λεπτά
2. 94°C, 2 λεπτά
3. Φύλαξη 4°C

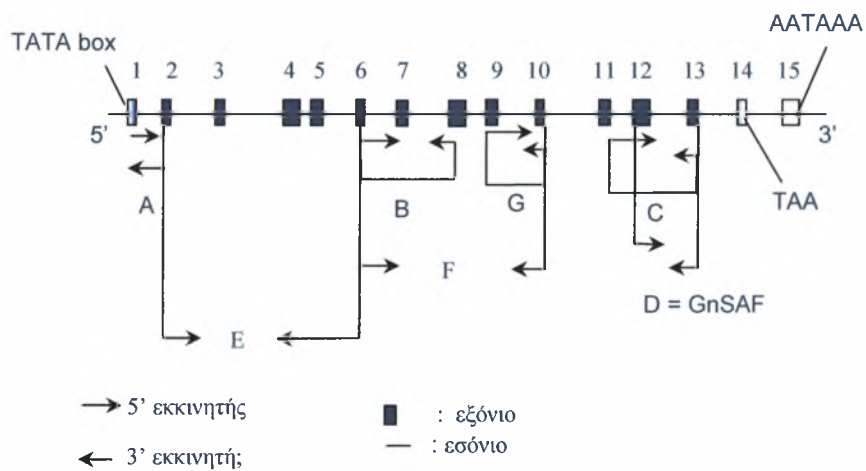
11. Σχεδιασμός εκκινητών για την αντίδραση PCR του γονιδίου ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA, Human Serum Albumin)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction – PCR) χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση τμημάτων του γονιδίου της ανθρώπινης λευκωματίνης. Με τη χρήση κατάλληλων εκκινητών (primers), έγινε τμηματικά η ενίσχυση όλου του γονιδίου της λευκωματίνης από το αμινοτελικό έως το καρβοξυτελικό άκρο. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε βάση του γονιδιώματος της λευκωματίνης ορού του ανθρώπου, όπως αυτή αναλύθηκε από τους Minghetti et al. (Minghetti et al., 1986) (GeneBank M12523). Η μεταγραφή του κάθε τμήματος του γονιδίου HSA εξετάστηκε με παράλληλη μελέτη ολικού, κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA. Επιπρόσθετα, ως θετικός μάρτυρας της έκφρασης του γονιδίου HSA χρησιμοποιήθηκε cDNA από την κυτταρική σειρά HepG2 και cDNA, που προήλθε από ολικό RNA κυττάρων ηπατικού ιστού. Η έκφραση του mRNA του HSA γονιδίου μελετήθηκε αφενός στο cDNA λεμφοκυττάρων περιφερικού αίματος, ως τη μόνη πιθανή πρόσμιξη κυττάρων στο ωοθυλακικό υγρό κατά τη λήψη του δείγματος και αφετέρου στο cDNA των κυττάρων HeLa και K562, που χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες. Επιπλέον, ως αρνητικοί μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα DNA από κοκκώδη κύτταρα,

κύτταρα ηπατικού ιστού, κύτταρα HepG2 και κύτταρα περιφερικού αίματος. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν βάση του γονιδίου της λευκωματίνης του ανθρώπου (HSA) (Σχήμα 7). Στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ζεύγη εκκινητών, τα οποία φαίνονται στον Πίνακα 3, όπου και δίδεται το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων PCR. Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με στόχο:

1. Την ενίσχυση της περιοχής, όπου θεωρείται ότι υπάρχει ομολογία του παράγοντα GnSAF με το καρβοξυτελικό τμήμα του γονιδίου HSA (εξόνιο 12 έως εξόνιο 13)
2. Την ενίσχυση της περιοχής 5' του καρβοξυτελικού άκρου μέχρι και το 3' άκρο του γονιδίου HSA (εξόνιο 11 έως εξόνιο 13)
3. Την ενίσχυση τμημάτων στο μέσο του γονιδίου HSA μεταξύ των εξονίων 2, 3, 4, 6, 8, 9 και 10, με σκοπό τον έλεγχο παραγωγής mRNA μεταγράφων του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα, που αντιστοιχούν σε περιοχές οι οποίες δεν θεωρούνται ότι έχουν ομολογία με τον παράγοντα GnSAF
4. Την ενίσχυση της περιοχής έναρξης εγγραφής του γονιδίου που εκτείνεται από το εξόνιο 1 του γονιδίου HSA μέχρι την αρχή του εξονίου 2 καθώς και την περιοχή από το πρώιμο TATA box μέχρι του σημείου έναρξης μεταγραφής του γονιδίου της λευκωματίνης με σκοπό τη μελέτη έναρξης μεταγραφής του γονιδίου που πιθανά να είναι υπεύθυνο για τον GnSAF

Η επιλογή των αντίστοιχων ζευγών εκκινητών έγινε με τέτοιο τρόπο, ώστε να ενισχύονται μόνο mRNA μετάγραφα και όχι αντίστοιχα τμήματα DNA.



Σχήμα 7. Σχηματική απεικόνιση της θέσης των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου HSA

Όνομα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Ενισχυόμενο τμήμα	Αναμενόμενο μέγεθος (bp)
1613 1790r	f: 5' tcagctctggaagtcgatg 3' r :5'aagctgcgaaatcatccataa 3'	D (εξόνια 12-13)	196
ALex11 1790r	f :5' ccaagtgtcaactccaactct 3' r :5' aagctgcgaaatcatccataa 3'	C (εξόνια 11-13)	413
ALex6 ALex8r	f :5'ctcgatgaacttcgggatgaa 3' r :5' ctcatcattttccacttcggca 3'	B (εξόνια 6-8)	348
ALex1 ALex2r	f :5' gtaatcggttggcagccaatg 3' r: 5' cactctgtgtgcatctcg 3'	A (εξόνια 1-2)	230
ALex2 ALex6r	f:5' tctcagatgcacacaagagtg 3' r:5' catcgagcttggcaacag 3'	E (εξόνια 2-6)	543
ALex6 ALex10r	f:5'ctcgatgaacttcgggatgaa 3' r:5'gcattctggaattgtactc 3'	F (εξόνια 6-10)	674
ALex9 ALex10r	f:5' gaatatgcaagaaggcatcc 3' r:5'gcattctggaattgtactc 3'	G (εξόνια 9-10)	221
ALT ALex1r	f :5' gtcagcctgtcctattgtatat 3' r: 5' cattggctgccaaaccgattac 3'	-793 – εξόνιο 1	777
ALA ALex1r	f :5' agttgcatctgaggcaacatc 3' r: 5' cattggctgccaaaccgattac 3'	-660 – εξόνιο 1	557
actinF actinR	f:5' tgctatccaggctgtgtcat 3' r:5'gatggagtgaaggtagttt 3'	β-ακτίνη	464

f: 5' εκκινητής
r: 3' εκκινητής

Πίνακας 3: Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των mRNA μεταγράφων του γονιδίου HSA και των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς ακτίνης

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης PCR ήταν 100 µl. Στην αντίδραση επίσης χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικό διάλυμα 10x, MgCl₂ (50mM), dNTPs (40mM) και Taq πολυμεράση (5 Units/µl). Οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις και ποσότητες των αντιδραστήριων, που χρησιμοποιήθηκαν, φαίνονται στους Πίνακες 4 και 5. Όλα τα αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, είναι από την Εταιρία Invitrogen, UK.

Αντιδραστήρια	Όγκοι / συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα	cDNA: 10 µl, DNA 1 µg
RB 10 x*	10 µl
MgCl ₂ (50mM)	3 µl (1.5 mM)
dNTPs (40mM)	800 µM
1613 Alex 1 (50 pmol /µl)	1 µl
1790r, Alex2r (50 pmol /µl)	1 µl
Taq polymerase (5 U/µl)	0.4 µl (2 units)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 100 µl

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την ενίσχυση του γονιδίου HSA με τα ζεύγη εκκινητών 1613/1790r, ALex 1 /ALex2r

Αντιδραστήρια	Όγκοι / συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα	cDNA: 10 µl, DNA 1 µg
RB 10 x*	10 µl
MgCl ₂ (50mM)	4 µl (2 mM)
dNTPs (40mM)	800 µM
ALex 11, ALex 9, ALex 6, ALex 2, ALT, ALA (50 pmol /µl)	1 µl
1790r, ALex10r, Alex8r, ALex6r, ALex1r (50 pmol /µl)	1 µl
Taq polymerase (5 U/µl)	0.4 µl (2 units)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την ενίσχυση του γονιδίου HSA με τα υπόλοιπα ζεύγη εκκινητών

* Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος 10x (reaction buffer): 200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl.

Για τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβάνονταν ένα σωληνάριο, που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός του υποστρώματος (negative control). Οι συνθήκες PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών, για κάθε αντίδραση ενίσχυσης ήταν κοινές εκτός από τη θερμοκρασία στο στάδιο σύνδεσης των εκκινητών (annealing), η οποία διέφερε για κάθε ζεύγος εκκινητών. Τα στάδια της αντίδρασης PCR και οι αντίστοιχες θερμοκρασίες αναλύονται παρακάτω:

Συνθήκες αντίδρασης:

- Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά
- Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 35 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 53-64°C (ανάλογα με το ζεύγος εκκινητή, 1 λεπτό)
 - φάση σύνθεσης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό
- Τελική σύνθεση μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά.

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών, που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων, τα οποία εκφράζονται σταθερά στον υπό ανάλυση ιστό (γονίδιο αναφοράς) (Kwok and Higuchi, 1989) . Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς το γονίδιο ακτίνης, το οποίο κωδικοποιεί μια από τις πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού όλων των κυττάρων. Ως θετικός μάρτυρας για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 5 µl του προϊόντος cDNA ενισχύθηκαν με PCR (Πίνακας 6), χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες της ακτίνης (actinF/actinR, Πίνακας 3).

Συνθήκες αντίδρασης:

- Αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά
- Κυρίως αντίδραση: επαναλαμβάνεται επί 35 φορές. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό
 - φάση σύνδεσης εκκινητών: 57°C, 1 λεπτό
 - φάση σύνθεση μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό
- Τελική σύνθεση μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά.

Αντιδραστήρια	Όγκοι / συγκεντρώσεις
Υπόστρωμα cDNA	5 µl
RB 10 x*	5 µl
MgCl ₂ (50mM)	2.5 (2.5 mM)
dNTPs (10mM)	1µl (200 µM για κάθε ένα)
actinF (30 pmol /µl)	2 µl
actinR (30 pmol /µl)	2 µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.3 µl (2 units)
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 µl

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια για την ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης

12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί τη συνήθη απλή μέθοδο διαχωρισμού ταυτοποίησης και καθαρισμού τμημάτων DNA μεγέθους 0.1-60 Kb (Sambrook, et al., 1989, pp 6.3-6.20).

Στο πήκτωμα αγαρόζης οι ζώνες του DNA, RNA καθώς και των προϊόντων PCR ανιχνεύονται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε χαμηλή συγκέντρωση. Το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) είναι μια φθορίζουσα ουσία, που έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA και του RNA και έτσι επιτρέπει την ανίχνευση ποσοτήτων DNA και RNA (μέχρι και 1 ng), όταν το πήκτωμα εκτεθεί σε υπεριώδες φως.

Το βρωμιούχο αιθίδιο χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δίκλωνων και μονόκλωνων μορίων νουκλεϊκών οξέων, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει σχετικά μικρότερη συγγένεια, κατά 15%, για τα μονόκλωνα μόρια DNA σε σχέση με τα δίκλωνα μόρια DNA. Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί είτε να υπάρχει στο πήκτωμα αγαρόζης σε συγκέντρωση 0.5 mg/ml είτε να προστεθεί ως χρωστική μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης.

Υλικά:

Αγαρόζη (Invitrogen, UK): η ποσότητα που προστίθεται εξαρτάται από την περιεκτικότητα που θέλουμε να έχει το πήκτωμα

Βρωμιούχο αιθίδιο 5 mg/ml (Merk, USA)

10x TBE : 106 g/l Tris (Merk, USA)
55 g/l Βορικό οξύ (Merk, USA)
9.3 g/l EDTA (Invitrogen, UK)

Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται διάλυμα 1x TBE.

Διάλυμα φόρτωσης 2x (loading buffer) : 2.25g EDTA (Invitrogen, UK)
10% γλυκερίνη (Merk, USA)
0.1% bromophenol blue
(Invitrogen, UK)
10mM Tris (Invitrogen, UK)

Φωτογράφιση του πηκτώματος

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα φωτογραφίζονταν με τη φωτογραφική μηχανή τύπου Polaroid DS-34 και φιλμ τύπου Polaroid 667.

Μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους

Προκειμένου να εκτιμηθεί το μοριακό βάρος των τμημάτων DNA στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους, οι οποίοι ηλεκτροφορήθηκαν μαζί με τα προς εξέταση δείγματα. Οι μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους προέρχονται από πέψη DNA φάγου ή πλασμιδίου με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού οπότε τα τμήματα που προκύπτουν έχουν γνωστό μοριακό βάρος.

13. Φωτομετρικός Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων

Για να προσδιοριστεί η ακριβής συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική (φασματοσκοπική) μέθοδος απορρόφησης του υπεριώδους φωτός. Τα νουκλεϊκά οξέα, λόγω των αζωτούχων βάσεων που περιέχουν, απορροφούν το υπεριώδες φως δίνοντας χαρακτηριστικά φάσματα απορρόφησης με μέγιστη απορρόφηση σε μήκος κύματος 260 και 280 nm (Sambrook, et al., 1989, pp 6.3-6.20). Έχει υπολογιστεί ότι 1 μονάδα απορρόφησης στα 260 nm αντιστοιχεί σε:

50 µg/ml δίκλωνου DNA
40 µg/ml RNA
33 µg/ml μονόκλωνου DNA

Το κλάσμα των τιμών απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm (μέγιστο απορρόφησης πρωτεϊνών) (A_{260}/A_{280}) παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του διαλύματος του νουκλεϊκού οξέος. Για το λόγο αυτό, ο λόγος A_{260}/A_{280} πρέπει να κυμαίνεται 1.7-1.9.

14. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και συγκέντρωσης 2% και 3%, ανάλογα με το μέγεθος του τμήματος,

που ενισχύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα TBE. Κάθε προϊόν PCR απομονώνονταν κόπτοντας την πηκτή αγαρόζης, που περιέχει το προϊόν PCR. Το τμήμα πηκτής, που περιείχε τη ζώνη, τοποθετούνταν σε σωληνάριο errendorf. Για τον καθαρισμό του προϊόντος από την πηκτή της αγαρόζης, χρησιμοποιήθηκαν το QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN, USA). Χρησιμοποιήθηκαν στήλες με ικανότητα δέσμευσης του προϊόντος PCR σε μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης. Τα διαλύματα του kit βοηθούν στη συλλογή του DNA, το οποίο προσροφάται στη μεμβράνη παρουσία υψηλής αλατότητας, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά διέρχονται από τη στήλη. Το προϊόν PCR τελικά εκλύονταν με διάλυμα EB.

Διαλύματα που περιέχονται στο kit:

- Διάλυμα QG: περιέχει θειοκυανικό γουανιδίνιο
- Διάλυμα PE: διάλυμα έκπλυσης στο οποίο προστίθεται απόλυτη αιθανόλη
- Διάλυμα EB: (10 mM Tris-Cl, pH 8.5)

Διαδικασία:

1. Ζύγισμα του τμήματος της πηκτής και προσθήκη 3 όγκων διαλύματος QG για κάθε 1 όγκο πηκτής 2% και 6 όγκους διαλύματος QG για κάθε 1 όγκο πηκτής 3% (100mg ~100 µl)
2. Επώαση στους 50°C για 10 λεπτά. Vortex κάθε 2-3 λεπτά. Πλήρης διαλυτοποίηση της αγαρόζης
3. Προσθήκη ενός όγκου ισοπροπανόλης στο δείγμα και ανάδευση
4. Μεταφορά του μίγματος στη στήλη, που ήταν τοποθετημένη σε σωληνάριο errendorf 2 ml
5. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 2 λεπτά
6. Απόρριψη του διηθήματος και προσθήκη 0.5 ml διαλύματος QG
7. Φυγοκέντρηση στις 12000 rpm επί 2 λεπτά
8. Απόρριψη του διηθήματος και προσθήκη 0.75 ml διαλύματος PE
9. Αναμονή 2-5 λεπτά και φυγοκέντρηση επί 1 λεπτό στις 13000 rpm
10. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο errendorf
11. Προσθήκη 50 µl διαλύματος EB στη στήλη και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm επί 1 λεπτό για την έκλυση του DNA

15. Ταυτοποίηση των προϊόντων της PCR με τη χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών και άμεση ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

15.1 Ανάλυση των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) με ένζυμα περιορισμού (RFLP - Restriction fragment Length Polymorfism)

Για τη μελέτη της ειδικότητας των προϊόντων PCR:

- 1) χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο Dde I (New England Biolabs, UK), το οποίο τέμνει το τμήμα του γονιδίου, που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης, με αναμενόμενα μεγέθη μήκους 110bp και 86bp.
- 2) χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα Ava II και Dde I (New England Biolabs, UK). Τα ένζυμα αυτά έχουν θέση αναγνώρισης στο τμήμα του HSA γονιδίου,

που αντιστοιχεί στην περιοχή η οποία εκτείνεται από το εξόνιο 11 μέχρι και το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης (μέγεθος ζωνών 196bp/117 bp και 303bp/110 bp, αντίστοιχα).

Διαδικασία:

Στις αντιδράσεις πέψης προϊόντων PCR με ένζυμα περιορισμού χρησιμοποιούνταν

1. 30μl προϊόν PCR, το οποίο επωάζεται με 20 - 50 units ενζύμου περιορισμού και 1/10 του τελικού όγκου ρυθμιστικού διαλύματος του αντίστοιχου ενζύμου (10x buffer)
2. DNA, όπου το τελικό διάλυμα αντίδρασης πρέπει να έχει τελική συγκέντρωση περίπου 150 μg/ml (Sambrook, et. al., 1989)
3. Ακολουθούσε επώαση O/N στους 37°C
4. Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος πέψης σε πηκτή αγαρόζης 2% με παράλληλη ηλεκτροφόρηση μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (φχ/HaeIII).

15.2 Άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (Sequencing)

Η ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων (Sequencing) των καθαρισμένων προϊόντων PCR με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυντιθεμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger et al., 1977) έγινε σε αυτόματο αναλυτή [Applied Biosystems ABI 3730 sequencer, version 1 "Big Dye" dye-terminator chemistry (ABI)]. Για την ανάλυση και του κωδικοποιητικού και του αντισυνθετικού κλώνου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές συμπληρωματικοί για κάθε τμήμα του γονιδίου της λευκωματίνης, όπως αυτοί είχαν σχεδιαστεί για την αντίδραση της PCR (Πίνακας 3). Κάθε αντίδραση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε προϊόντα PCR τριών ανεξαρτήτων αντιδράσεων ενίσχυσης, που είχαν πραγματοποιηθεί σε ξεχωριστά δείγματα.

16. Ημιποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων PCR

Ο ημιποσοτικός προσδιορισμός των τμημάτων A,B,C,D (Σχήμα 5) του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα έγινε με παράλληλη ενίσχυση των mRNA μεταγράφων της β-ακτίνης στα κοκκώδη κύτταρα καθώς και στα κύτταρα HepG2 (θετικός μάρτυρας). Το κάθε προϊόν PCR των τμημάτων του γονιδίου HSA και β-ακτίνης ηλεκτροφορούνταν παράλληλα σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Ακολουθούσε αποτύπωση με τη χρήση φωτογραφικής μηχανής Polaroid. Η ανάλυση και ο υπολογισμός της οπτικής πυκνότητας κάθε ζώνης έγινε με το σύστημα αναλυτικής σάρωσης Hewlett Packard ScanJet 3300C (Image Analysis System). Το κάθε δείγμα ελέγχθηκε τουλάχιστον δύο φορές. Η ποσότητα DNA, που υπήρχε σε κάθε δείγμα και που αντιπροσωπεύει τις διαφορετικές περιοχές του γονιδίου της λευκωματίνης, υπολογίστηκε βάσει του λόγου της έντασης της ζώνης, που αντιστοιχεί στην HSA ως προς αυτή της β-ακτίνης (Dotzlaw et al., 1999).

17. Ανάλυση κατά Northern (Northern Blot)

17.1.1 Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων RNA

Υλικά:

Τα χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν της Εταιρείας Invitrogen, UK.

Διάλυμα 20xMOPs

MOPs 0.4 M	83.7 g
CH ₃ COONa 0.1 M	8.2 g
EDTA 0.02 M	7.4 g
ddH ₂ O	μέχρι τελικό όγκο 1000 ml
pH 7.1	

Πηκτή αгарόξης για αποτύπωση κατά Northern 1%

Για 100 ml	
αγαρόξη	0.94 g
20 x MOPs	4.7 ml
ddH ₂ O	72.2 ml
φορμαλδεΰδη 37% (Merk, USA)	17 ml
βρωμιούχο αιθίδιο	3 μl

Προετοιμασία δείγματος

RNA	15 μg
Φορμαμίδη	16 μl
φορμαλδεΰδη 37%	7 μl
20xMOPs	4 μl

Διαδικασία (Sambrook, et al., 1989, pp 9.16-10.6):

1. Ανάμειξη του RNA με τα υπόλοιπα υλικά του μίγματος (φορμαμίδη, φορμαλδεΰδη, MOPs) και επώαση για 15 λεπτά στους 55°C
2. Τοποθέτηση στον πάγο και προσθήκη 3 μl παγωμένης χρωστικής βρωμοφαινόλης
3. Ανάμειξη με νοrtex και στη συνέχεια για 5 λεπτά στον πάγο
4. Στιγμιαία φυγοκέντρωση (spin) και φόρτωση των δειγμάτων στην πηκτή αγαρόξης
5. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων O/N σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x MOPs στα 18 V και 100 mA.

17.1.2 Μεταφορά πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Υλικά:

Μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (nitrocellulose – Biorad, USA)

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 20x SSC pH 7.0: 3 M NaCl
0.3 M Κιτρικό Νάτριο
ddH₂O

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 2x SSC pH 7.0: αραίωση διαλύματος 20x με προσθήκη 4 όγκων ddH₂O σε 1 όγκο διαλύματος 20x.

Διαδικασία:

1. Η μεταφορά πηκτής σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης γίνονταν με τη βοήθεια του ρυθμιστικού διαλύματος 20x SSC και έτσι επιτυγχάνονταν η αποτύπωση των δειγμάτων στη μεμβράνη. Χρησιμοποιείται ένα γυάλινο σκεύος που φέρει βοηθητικό γυάλινο στήριγμα. Μέσα στο γυάλινο σκεύος τοποθετούνταν το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς.
2. Τοποθέτηση 3 χαρτιών Whatman 3MM πάνω στο βοηθητικό γυάλινο στήριγμα. Οι δύο άκρες του χαρτιού εξέχουν από τις δύο απέναντι πλευρές, ώστε να βυθίζονται στο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς λειτουργώντας ως αγωγός για τη μεταφορά του διαλύματος στην πηκτή και τη μεμβράνη
3. Τοποθέτηση της πηκτής και περίφραξη αυτής με διαφανή μεμβράνη
4. Προσθήκη του φίλτρου νιτροκυτταρίνης που έχει ήδη εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 20x SSC επί 5 λεπτά
5. Τοποθέτηση 3 χαρτιών Whatman 3MM, που έχουν ήδη εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 2x SSC
6. Τοποθέτηση πάκου χαρτιών πάχους 8 cm
7. Τοποθέτηση βάρους 500 g. Χρειάζονταν 18 ώρες για να γίνει πλήρης η μεταφορά.

17.2 Υβριδισμός μεμβράνης με σημασμένα ολιγονουκλεοτίδια

17.2.1 Σήμανση ανιχνευτών

Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκε το kit "Random Primers DNA Labeling system» της Εταιρείας Invitrogen, UK.

Υλικά:

Μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Random Primers: 0.67 M Hepes, 0.17 M Tris-HCl, 17 mM MgCl₂, 33 mM 2-μερκαπτοαιθανόλη, 1.33 μg/ml BSA, 18 OD₂₆₀ units/ml ολιγοδεσοξυριβονουκλεοτιδικούς εκκινητές (εξαμερή), pH 6.8

Διάλυμα dATP: 0.5 μM dATP σε 1 μM Tris-HCl (pH 7.5)

Διάλυμα dCTP: 0.5 μM dCTP σε 1 μM Tris-HCl (pH 7.5)

Διάλυμα dGTP: 0.5 μM dGTP σε 1 μM Tris-HCl (pH 7.5)

Διάλυμα dTTP: 0.5 μM dTTP σε 1 μM Tris-HCl (pH 7.5)

Ένζυμο Klenow fragment σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικού καλίου (pH 7.0)

Ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής της αντίδρασης: 0.5 M EDTA, pH 8.0
ddH₂O

Διαδικασία:

1. Αποδιάταξη 25 ng προϊόντος PCR (που έχει προηγουμένως καθαριστεί με τη μέθοδο, που αναφέρεται αναλυτικά την παράγραφο 9) διαλυμένου σε 20 μl ddH₂O με βρασμό επί 5 λεπτά σε υδατόλουτρο και άμεση μεταφορά στον πάγο
2. Οι παρακάτω προσθήκες γίνονταν στον πάγο:
 - 2 μl διάλυμα dATP
 - 2 μl διάλυμα dGTP
 - 2 μl διάλυμα dTTP
 - 15 μl μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Random Primers

5 μl (περίπου 50 μCi) [α - 32 P]dCTP, 3000 Ci/mmol, 10 μCi/μl
ddH₂O σε τελικό όγκο 49 μl
Σύντομη ανάμειξη

3. Προσθήκη 1 μl Klenow fragment, ήπια ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση
4. Προσθήκη 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα διακοπής της αντίδρασης

17.2.2 Ραδιενεργός υβριδισμός

Υλικά:

Διάλυμα υβριδισμού	6 x SSC (αραίωση διαλύματος 20x) 2 x αντιδραστήριο Denhardt αραίωση διαλύματος 100x (Sigma, USA) 0.1% SDS
Διάλυμα έκπλυσης 1	1 x SSC (αραίωση διαλύματος 20x) 0.1% SDS
Διάλυμα έκπλυσης 2	0.2 x SSC (αραίωση διαλύματος 20x) 0.1% SDS

Διαδικασία:

A. Προϋβριδισμός

Επώαση νιτροκυταρίνης στο διάλυμα υβριδισμού επί 1 ώρα στους 68°C

B. Υβριδισμός

1. Προσθήκη του ραδιενεργά σηματομένου ανιχνευτή στο διάλυμα υβριδισμού
2. O/N επώαση στους 68°C

Γ. Εκπλύσεις

1. Απόχυση του υγρού υβριδισμού και έκπλυση της μεμβράνης με το διάλυμα έκπλυσης 1 επί 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
2. Απόχυση διαλύματος έκπλυσης 1 και έκπλυση της μεμβράνης με το διάλυμα έκπλυσης 2 επί 20 λεπτά στους 68°C. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε αλλές 2 φορές
3. Φωτογράφιση μεμβράνης με φιλμ ευαισθησίας KODAK XAR μετά από 24-48 ώρες. Η μεμβράνη φυλάσσονταν στους -70°C

18. Ανάλυση κατά Western (Western Blot Analysis)

Υλικά:

Μεθανόλη (Merk, USA)
Αιθανόλη (Merk, USA)
Ισοπροπανόλη (Merk, USA)
Οξικό οξύ (Merk, USA)
Tween-20 (Biorad, UK)
Στρεπταβιδίνη (Biorad, UK)

Βιοτυλιωμένη αλκαλική φωσφατάση (Biorad, UK)

Coomassie Brilliant Blue (Biorad, UK)

Ξηρό γάλα χωρίς λιπαρά (Biorad, UK)

SDS Gel-Loading Buffer (Biorad, UK)

Bovine Serum Albumin (BSA) (Sigma, USA)

Τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια, που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν της Εταιρείας Invitrogen, UK

Παρασκευή πηκτής διαχωρισμού (Resolving gel) 14%

για τελικό όγκο 20 ml

30% ακρυλαμίδη/δισ ακρυλαμίδη	9.3 ml
1.5 M Tris –HCl (pH 8.8)	5.0 ml
10% SDS	200 μ l
APS (10%)	200 μ l
TEMED	20 μ l
ddH ₂ O	5.3 ml

Παρασκευή πηκτής επιστοίβασης (Stacking gel) 5%

για τελικό όγκο 10 ml

30% ακρυλαμίδη/δισ ακρυλαμίδη	1.7 ml
1.0 M Tris –HCl (pH 6.8)	1.25 ml
10% SDS	100 μ l
APS (10%)	100 μ l
TEMED	10 μ l
ddH ₂ O	6.8 ml

Διαλύματα:

2X SDS Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πηκτώματος (Gel-Loading Buffer) (για τελικό όγκο 10 ml)

100 mM Tris-HCl (pH 6.8)	1 ml
100 mM DTT (dithiothreitol)	1 ml
4% SDS	4 ml
0.2% bromophenol blue	2 ml
20% Γλυκερόλη	2 ml

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης Tris-Glycine (για 1 lt 5X stock διαλύματος)

25 mM Tris Base	3.0 g
250 mM Γλυκίνη (για ηλεκτροφόρηση)	18.8 g
0.1% SDS (από 10% stock διάλυμα)	10.0 ml
ddH ₂ O	990 ml

Ρύθμιση pH στο 8.3 με πυκνό διάλυμα HCl.

Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer)

(Για 1 lt 5x stock διαλύματος)

39 mM Γλυκίνη (κατάλληλη για ηλεκτροφόρηση)	2.9 g
48 mM Tris Base	5.8 g
0.037% SDS	0.037 g
20% Μεθανόλη	200 ml
ddH ₂ O	800 ml

Ρύθμιση pH στο 8.3 με πυκνό διάλυμα HCl.

Tris-Buffered Saline (TBS)

(Για 1 lt 10x stock διαλύματος)

200 mM Tris Base	24.22 g
5 M NaCl	292.2 g
ddH ₂ O	1000 ml

Ρύθμιση pH στο 7.5 με πυκνό διάλυμα HCl.

Διάλυμα TBS 1X

Προσθήκη 100 ml 10x TBS σε 900 ml ddH₂O.

Διάλυμα έκπλυσης (TTBS)

Προσθήκη 450 μl Tween>20 σε 900 ml 1xTBS.

Διάλυμα Blocking

Προσθήκη 5.0 g ξηρού γάλακτος χωρίς λιπαρά σε 100 ml TBS.

Σύμπλοκο στρεπταβιδίνης-βιοτυνυλιωμένης αλκαλικής φωσφατάσης

(1:3000 αραιώση για κάθε συστατικό του συμπλόκου).

Προσθήκη 33 μl στρεπταβιδίνης και 33 μl βιοτυλιωμένης αλκαλικής φωσφατάσης σε 100 ml TTBS. Επώαση συμπλόκου για 1 - 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση του.

Διάλυμα χρώσης πηκτής

Coomassie Brilliant Blue	0.25 g
Μεθανόλη:H ₂ O (1:1 v/v)	90 ml
Οξικό οξύ	10 ml

18.1 Ανάλυση Πρωτεϊνών

18.1.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήγμα SDS-Πολυακρυλαμιδίου

1. Ετοιμασία της συσκευής «Minigel Apparatus» της Hoefer Scientific Instruments, Germany, για την παρασκευή της πηκτής. Καλός καθαρισμός των τμημάτων της συσκευής [(τζάμια, spacers, χτενάκια (1.5 mm) και πλάκα αλουμινίου] με 70% αιθανόλη
2. Τοποθέτηση της πηκτής διάκρισης (Resolving Gel) στη συσκευή (Sambrook et al. 1989, pp 18.52). Επίστρωση λεπτής στοιβάδας ισοπροπανόλης (500 μl). Αυτό εξασφαλίζει την ευθύτητα της επιφάνειας της πηκτής, την αποφυγή εξάτμισης του πολυακρυλαμιδίου και την παρουσία φυσαλίδων. Η στερεοποίηση της πηκτής εκπληρώνεται σε 20 λεπτά
3. Η συγκέντρωση της πηκτής πολυακρυλαμίδης κυμαίνεται ανάλογα με το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών, που θα αναλυθούν, πχ η πρωτεΐνη HSA, με μοριακό βάρος 65 kDa, ηλεκτροφορείται σε πηκτή 10%, ενώ η πρωτεΐνη GnSAF, με μοριακό βάρος 12.5 kDa, ηλεκτροφορείται σε πηκτή διάκρισης 14%
4. Μετά τη σταθεροποίηση της πηκτής διάκρισης, ετοιμάζονται η πηκτή επιστοίβασης (stacking gel), η οποία τοποθετούνταν πάνω από την πηκτή διάκρισης ταυτόχρονα με τα χτενάκια. Οι δύο πηκτές (resolving και stacking) είχαν διαφορετικό pH (8.8 και 6.8, αντίστοιχα). Το pH της πηκτής επιστοίβασης είναι ίδιο με αυτό του SDS-gel loading buffer και αυτό εξασφαλίζει τη σωστή διαχώριση των πρωτεϊνών μεταξύ τους
5. Τοποθέτηση δειγμάτων (20 μg) στον πάγο

6. Προσθήκη ίσης ποσότητας 2x SDS Gel-Loading Buffer
7. Θέρμανση των δειγμάτων στους 100°C για 3 λεπτά
8. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε διάλυμα 1x Tris-Glycine Electrophoresis Buffer (1x)
9. Μετά την είσοδο των δειγμάτων στην πηκτική διάκρισης, η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 200 Volt για 1 ½ - 2 ώρες

18.1.2 Μεταφορά πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης

1. Μετά την ηλεκτροφόρηση, οι πρωτεΐνες μεταφέρονταν σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης PVDF (Immobilon-P, Pharmacia, UK) με τη βοήθεια ειδικής συσκευής της Εταιρείας Biorad, UK και κατάλληλου διαλύματος (Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς - Transfer Buffer 1x)
2. Καθορίζονταν η πλευρά της συσκευής, που θα ήταν η άνοδος και η πλευρά που θα ήταν η κάθοδος
3. Τοποθέτηση 3 χαρτιών Whatman 3MM στη συσκευή μεταφοράς, τα οποία είχαν εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (1x)
4. Τοποθέτηση της πηκτής με τις πρωτεΐνες και προσθήκη του φίλτρου νιτροκυτταρίνης εμβαπτισμένου σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (1x)
5. Τοποθέτηση 3 χαρτιών Whatman 3MM χαρτί στη συσκευή μεταφοράς, τα οποία έχουν εμβαπτιστεί σε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (1x)
6. Η μεταφορά γίνεται στα 300 mA, 100 Volt και 300 Watt. Χρειάζονταν 1 ½ - 2 ώρες για να γίνει πλήρης η μεταφορά

18.1.3 Χρώση της πηκτής και αποχρωμάτωση

Μετά τη μεταφορά, το φίλτρο επώαζονταν σε διάλυμα Blocking, ενώ η πηκτική χρωματίζονταν με Coomassie Brilliant Blue. Με αυτό τον τρόπο, επιβεβαιώνεται η μεταφορά των πρωτεϊνών στο φίλτρο και ο διαχωρισμός των ζωνών με γυμνό μάτι.

1. Ετοιμασία του διαλύματος χρώσης Coomassie Brilliant Blue
2. Εμβάπτιση της πηκτής στη χρώση και ανακίνηση επί 1 ώρα
3. Συλλογή της χρώσης και αποχρωμάτωση με το διάλυμα:
90 ml μεθανόλη:H₂O (1:1 v/v), και
10 ml οξικό οξύ
4. Φύλαξη της μεμβράνης μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

18.2 Υβριδισμός

18.2.1 Επώαση φίλτρου νιτροκυτταρίνης

1. Επώαση του φίλτρου νιτροκυτταρίνης σε διάλυμα Blocking για 1 ώρα
2. Απόρριψη του διαλύματος Blocking και εμβάπτιση του φίλτρου σε 20 ml διάλυμα Tris-Buffered Saline (TBS) 1x με 2% Bovine Serum Albumin (BSA)
3. Προσθήκη του πολυκλωνικού αντισώματος κουνελιού, anti-HSA (ab1217 abcam, UK) (1:2500 αραίωση του αντισώματος)
4. Ακολουθεί O/N επώαση στους 4°C

5. Την επόμενη ημέρα, απόχυση του πρώτου αντισώματος και ξέπλυμα του φίλτρου με διάλυμα TBS 1x, που περιέχει 0.05% Tween >20 (TTBS). Έκπλυση επί 3 φορές για 10 λεπτά κάθε φορά
6. Μετά την τελευταία έκπλυση, επώαση του φίλτρου σε διάλυμα Blocking για 1 ώρα
7. Απόχυση του διαλύματος Blocking και επώαση του φίλτρου σε 20 ml TTBS με το δεύτερο μη ειδικό (non-specific) αντίσωμα Anti-IgG Rabbit-Ep. Human Peroxidase Conjugated High and Low (Donkey polyclonal - ab6802, Abcam, UK) (αραίωση 1:5000). Η επώαση γίνονταν επί 1 – 2 ώρες
8. Έκχυση του διαλύματος και έκπλυση του φίλτρου (2 φορές) με TTBS για 5 – 10 λεπτά
9. Επώαση του φίλτρου σε διάλυμα στρεπταβιδίνης-βιοτυνυλιωμένης αλκαλικής φωσφατάσης επί 3 ώρες
10. Απόχυση του διαλύματος και έκπλυση με TTBS για 5 – 10 λεπτά επί 3 φορές

18.2.2 Ανίχνευση

Η διαδικασία αυτή έγινε με τη χρήση του Pharmacia kit για ECL σύμφωνα με τις οδηγίες της Εταιρείας Pharmacia, UK. Η μέθοδος αυτή γίνεται με τη χρήση δυο ουσιών (Colour Reagent A και Colour Reagent B), που αναμιγνύονται σε ίση αναλογία (1:1). Παρουσία του υπεροξειδίου του οξυγόνου (H_2O_2) και της λουμινόλης, η ραφαιανιδική υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) οξειδώνει τη λουμινόλη με αποτέλεσμα την εκπομπή φωτός, η ένταση του οποίου αυξάνεται κατά 1000 φορές παρουσία ενός χημικού ενισχυτή. Η εκπομπή φωτός αποτυπώνεται από το φίλτρο νιτροκυτταρίνης σε φωτογραφικό φιλμ. Η όλη διαδικασία γίνονταν σε σκοτεινό θάλαμο και αναλυτικά ακολουθούνταν η παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθήκη ίσης ποσότητας διαλύματος χρώσης A (Colour Reagent A) που περιέχει: 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)
2.5 mM λουμινόλη (υπόστρωμα χημειοφωταύγειας)
0.4 p-κουμαρικό οξύ
2. Προσθήκη ίσης ποσότητας διαλύματος χρώσης B (Colour Reagent B) που περιέχει: 100 mM Tris-HCl (pH 8.5)
5.4 mM H_2O_2
3. Εμβάπτιση του φίλτρου στο διάλυμα εμφάνισης (colour development solution) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου με απλή ανακίνηση μέχρι να εμφανισθούν οι επιθυμητές ζώνες
4. Έκπλυση του φίλτρου με ddH₂O, ώστε να διακοπεί η αντίδραση
5. Φωτογράφιση μεμβράνης με φιλμ ευαισθησίας KODAK XAR μετά από 0.5-30 min.

19. *In situ* υβριδισμός

19.1 Μη ραδιενεργός *in situ* υβριδισμός

ddH₂O

Διάλυμα υβριδισμού

60% απιονισμένη φορμαμίδη
300 mM NaCl
30 mM Κιτρικό Νάτριο
10 mM EDTA
25 mM NaH₂PO₄ pH 7.4
5% Dextran Sulphate
ddH₂O σε τελικό όγκο 100 ml

Διάλυμα έκπλυσης

60% απιονισμένη φορμαμίδη
300 mM NaCl
30 mM Κιτρικό Νάτριο

Διαδικασία:

A. Υβριδισμός

1. Αφυδάτωση κυττάρων με διαδοχικές επωάσεις σε:
70% αιθανόλη για 10 λεπτά
90% αιθανόλη για 10 λεπτά
100% αιθανόλη για 10 λεπτά
2. Ενυδάτωση κυττάρων με διαδοχικές επωάσεις σε
100% αιθανόλη για 10 λεπτά
90% αιθανόλη για 10 λεπτά
70% αιθανόλη για 10 λεπτά
3. Επώαση κυττάρων σε PBS για 10 λεπτά
4. Επώαση κυττάρων με διάλυμα πεπσίνης στους 37°C για 30 λεπτά
5. Έκπλυση κυττάρων με PBS για 5 λεπτά
6. Μετα – μονιμοποίηση με επώαση σε διάλυμα 1% φορμαλδεϋδη για 10 λεπτά
7. Έκπλυση με PBS για 5 λεπτά
8. Αποδιάταξη σημασμένου ανιχνευτή DNA πριν την χρήση με θέρμανση στους 80°C για 5 λεπτά. Ο ανιχνευτής χρησιμοποιούνταν σε συγκέντρωση 5 ng/μl σε διάλυμα υβριδισμού
9. Αποδιάταξη κυττάρων στην αντικειμενοφόρο πλάκα με θέρμανση στους 80°C για 2 λεπτά
10. Τοποθέτηση 20 μl από τον σημασμένο ανιχνευτή πάνω στην αντικειμενοφόρο πλάκα
11. Κάλυψη της αντικειμενοφόρου πλάκας με καλυπτρίδα, ώστε να εμποδιστεί η εξάτμιση του διαλύματος υβριδισμού
12. Υβριδισμός στους 37°C για 16 h

B. Εκπλύσεις:

1. Απόρριψη καλυπτρίδας με χρήση διαλύματος έκπλυσης με ανάδευση επί 5 λεπτά
2. Έκπλυση με διάλυμα έκπλυσης με συνεχή ανάδευση επί 5 λεπτά στους 37°C
3. Έκπλυση με PBS επί 5 λεπτά

19.2 Ανίχνευση

Υλικά:

Anti –Diogoxenin-AP Conjugate (Roche, Germany)
Tween>20 (Sigma, USA)
Μαλεϊκό οξύ (Roche, Germany)
Διάλυμα blocking (Roche, Germany)
Tris–HCl (Invitrogen, UK)
NaCl (Invitrogen, UK)
MgCl₂ (Invitrogen, UK)
DAPI [δι-υδροχλωρική 4',6-διαμιδίνη-2'-φαινυλινδόλη (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride)] χρωστική (Roche, Germany)
PBS (Biochrom, UK)
1,4-διαζο-δικυκλο-[2,2,22]-οκτάνιο (1,4-diaza-bicyclo-[2,2,22]-octane - DABCO, Sigma, USA)
Γλυκερόλη (Merk, UK)

Διάλυμα Blocking (10x): Αραίωση σε διάλυμα 1x με προσθήκη 9 όγκων μαλεϊκού οξέος σε 1 όγκο διαλύματος blocking

Διαλύματα ανίχνευσης:

A. Ρυθμιστικό διάλυμα 1

100 mM Tris – HCl pH 7.5

150 mM NaCl pH 7.5

B. Ρυθμιστικό διάλυμα Blocking

Ανάμιξη διαλύματος Blocking στο ρυθμιστικό διάλυμα 1 σε αναλογία 0.5 % (v/v)

Γ. Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Ανάμιξη Tween>20 στο ρυθμιστικό διάλυμα 1 σε αναλογία 0.05 % (v/v)

Δ. Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης

100 mM Tris – HCl pH 8.0

150 mM NaCl pH 8.0

10 mM MgCl₂ pH 8.0

HNPP: 2-υδροξυ-3-ναπτοϊκό οξύ-2'-φαινυλανιλική φωσφατάση (2-hydroxy-3-naptoic acid-2'-phenylanilide phosphate) σε διμεθυλφορμαμίδη (dimethylformamide-DMF)

Fast Red TR: 4-χλωρο-2-μεθυλβενζοδιαζονικό άλας ημι-χλωριούχου ψευδάργυρου (4-chloro-2-methylbenzenediazonium hemi-zinc chloride salt)

Προετοιμασία μίγματος HNPP/Fast Red TR:

10 μl έτοιμου διαλύματος HNPP

10 μl έτοιμου διαλύματος Fast Red TR

1 ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης

Ακολουθεί διήθηση του μίγματος με φίλτρο 0.2 μm αμέσως πριν την χρήση.

Διάλυμα DAPI χρωστικής: 1 μl DAPI χρωστικής (stock διάλυμα 5 mg/ml) σε 50 ml PBS

Διάλυμα διατήρησης φθορισμού:

2g DABCO

25 ml γλυκερόλη

25 ml PBS

Διαδικασία:

Για την διαδικασία της ανίχνευσης, χρησιμοποιήθηκε το Kit HNPP Fluorescent Detection Set (Roche, Germany).

A. Ανοσολογική ανίχνευση και χρώση (*Immunological detection and staining*)

1. Διάλυση συμπλόκου Anti-AP στο ρυθμιστικό διάλυμα 2 σε αναλογία 1:500 (v/v)
2. Προσθήκη 100 μl διαλύματος συμπλόκου στην αντικειμενοφόρο πλάκα με τα μονιμοποιημένα κύτταρα και εφαρμογή καλυπτρίδας
3. Επώαση για 1 ώρα στους 37°C σε υγρό θάλαμο
4. Έκπλυση για 10 λεπτά με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης
5. Επανάληψη του σταδίου 4 δύο φορές
6. Έκπλυση αντικειμενοφόρου πλάκας με το ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης για 10 λεπτά
7. Επανάληψη σταδίου 6
8. Απόθεση 100 μl μίγματος HNPP/Fast Red στην αντικειμενοφόρο πλάκα και κάλυψη της με καλυπτρίδα
9. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά
10. Έκπλυση αντικειμενοφόρου πλάκας με απεσταγμένο νερό για 10 λεπτά.

Αντι-Χρώση και μονιμοποίηση (*Counterstaining and mounting*)

Οι διαδικασίες γίνονται σε σκοτεινό θάλαμο

1. Επώαση αντικειμενοφόρου πλάκας επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε διάλυμα DAPI χρωστικής σε PBS με συγκέντρωση (5 mg/ml)
2. Έκπλυση με νερό επί 3 λεπτά
3. Στέγνωμα πλάκας στο σκοτάδι
4. Προσθήκη 20 μl διαλύματος διατήρησης φθορισμού και επίθεση καλυπτρίδας
5. Σφράγιση με βερνίκι
6. Φύλαξη στο σκοτάδι

Ανίχνευση

Η ανίχνευση έγινε με αυτόματο μικροσκόπιο Axionplan, της Εταιρείας Zeiss, USA σε μήκος κύματος 540-590 nm με ταυτόχρονη χρήση των συστημάτων φίλτρων TRIC, όπου εμπεριέχεται το φίλτρο Rhodamine, και DAPI. Η ανάλυση των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα ISIS.

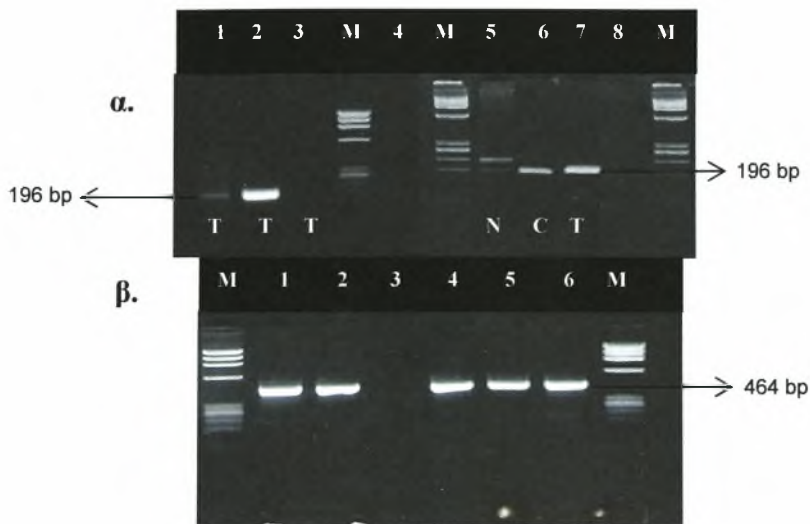
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

20. Έκφραση του γονιδίου της λευκωματίνης του ορού του ανθρώπου στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα

Η ανίχνευση πιθανής έκτοπης έκφρασης του γονιδίου της λευκωματίνης (HSA) μελετήθηκε σε RNA κοκκωδών κυττάρων από 52 γυναίκες. Επίσης, διαχωρισμός κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA έγινε σε 32 δείγματα. Τα τμήματα του γονιδίου, που ενισχύθηκαν με RT-PCR, έχουν αναφερθεί αναλυτικά στην ενότητα «Υλικό και Μέθοδοι» (Πίνακας 3 και Σχήμα 7). Στα δείγματα ολικού, κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA ανιχνεύθηκαν HSA mRNA μετάγραφα, που αντιστοιχούν στο καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου (τμήμα D) (Εικόνα 2^α). Τα ίδια αποτελέσματα βρέθηκαν και από την ενίσχυση της περιοχής, που καλύπτει την αρχή του γονιδίου έως την αρχή του εξονίου 2 (τμήμα A) (Εικόνα 3^α).

Στη συνέχεια έγινε ενίσχυση των τμημάτων B και C, του HSA γονιδίου, όπου ανιχνεύθηκαν mRNA μετάγραφα λευκωματίνης σε πυρηνικό και ολικό RNA αλλά όχι στο κυτταροπλασματικό RNA (Εικόνες 4^α και 5^{αβ}). Ακολούθως η ενίσχυση των τμημάτων E, F, και G του HSA γονιδίου, ανέδειξε mRNA μετάγραφα λευκωματίνης σε ολικό RNA αλλά όχι στο κυτταροπλασματικό RNA (Εικόνες 6^α, 7^α και 8^α αντίστοιχα). Η σύγκριση όλων των παραγόμενων προϊόντων PCR από τα κοκκώδη κύτταρα, που προέκυψαν από την ενίσχυση με τους προαναφερθέντες εκκινητές για το γονίδιο HSA, έγινε με την παράλληλη ενίσχυση των αντίστοιχων τμημάτων στην ηπατική κυτταρική σειρά HepG2 και τον ηπατικό ιστό (θετικοί μάρτυρες). Η ακρίβεια και η ευαισθησία της RT-PCR με τους αντίστοιχους εκκινητές επιβεβαιώθηκε α) από την παράλληλη ενίσχυση των αντίστοιχων HSA μεταγράφων στα κύτταρα HepG2 και στα κύτταρα από ηπατικό ιστό και β) από την απουσία ανίχνευσης HSA mRNA μεταγράφων σε λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος και σε K562 κύτταρα (Εικόνες 2^α, 3^α, 4^α, 5^{αβ}, 6^α, 7^α, 8^α). Η έκφραση του γονιδίου της ακτίνης, ως γονιδίου αναφοράς, ήταν σταθερή σε όλα τα εξεταζόμενα δείγματα (Εικόνες 2^β, 3^β, 4^β, 6^β, 7^β, 8^β).

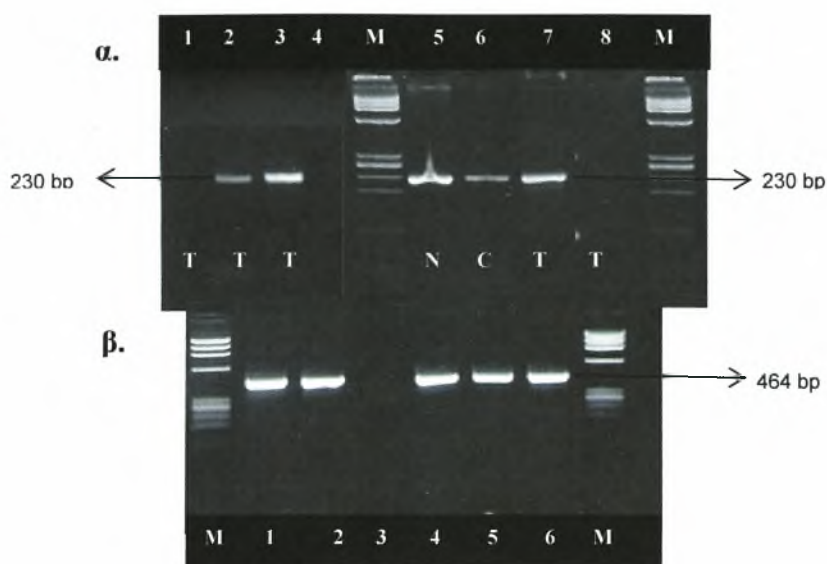
Messenger RNA μετάγραφα των τμημάτων A και D του γονιδίου HSA ανιχνεύθηκαν σε ολικό, πυρηνικό και κυτταροπλασματικό RNA κοκκωδών κυττάρων σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τμήματα. Η παρουσία mRNA μεταγράφων στα κοκκώδη κύτταρα τμημάτων του γονιδίου HSA, που αντιστοιχούν στην αρχή του γονιδίου και στο καρβοξυτελικό του άκρου, υποδηλώνει ότι μόνο ένα τμήμα του γονιδίου HSA εκφράζεται στα κοκκώδη κύτταρα.



Εικόνα 2:

α. Ενίσχυση του τμήματος D (εξόνια 12 – 13, καρβοξυτελικό άκρο) του γονιδίου HSA από ολικό (T), κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό (N) RNA. Ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), ολικό RNA από ηπατικό ιστό (2), ολικό RNA από K562 κύτταρα (3), αρνητικός μάρτυρας (4), πυρηνικό και κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (5, 6) ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (7), λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (8).

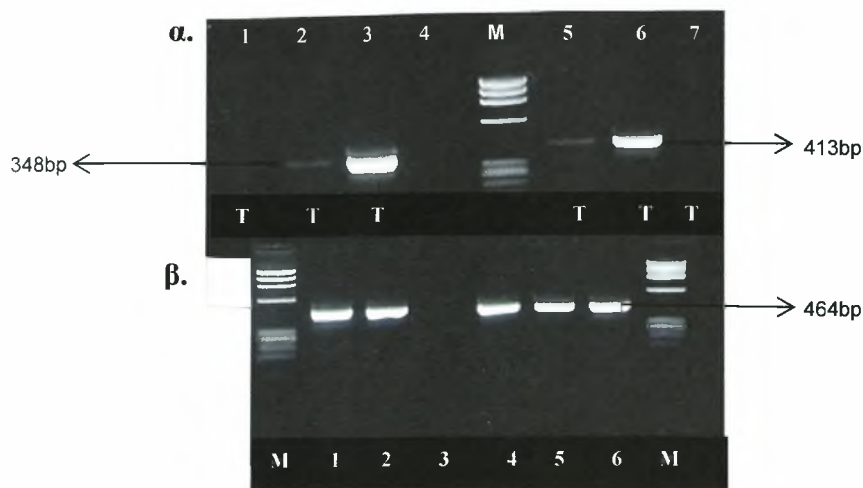
β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), κύτταρα HepG2 (2), ηπατικό ιστό (4), λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (5), K562 κύτταρα (6), αρνητικός μάρτυρας (3). **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.



Εικόνα 3:

α. Ενίσχυση του τμήματος A (εξόνια 1 έως 2) του γονιδίου HSA από ολικό (T), κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό (N) RNA. Ολικό RNA από K562 κύτταρα (1), ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (2), ολικό RNA από ηπατικό ιστό (3), αρνητικός μάρτυρας (4), πυρηνικό και κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (5, 6) ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (7), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (8).

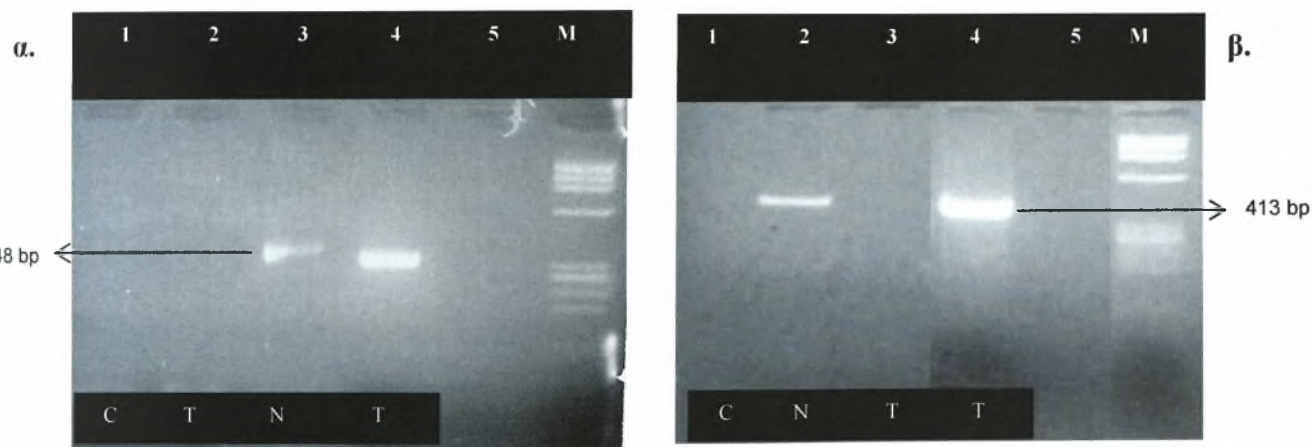
β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), κύτταρα HepG2 (2), ηπατικό ιστό (4), λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (5), K562 κύτταρα (6), αρνητικός μάρτυρας (3). **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.



Εικόνα 4:

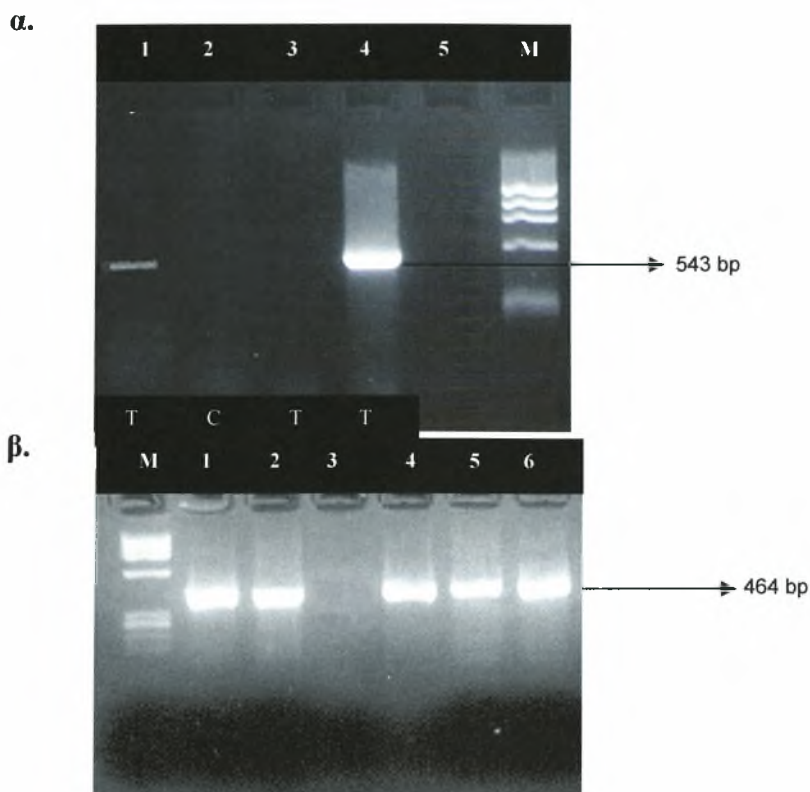
α. Ενίσχυση του τμήματος Β (εξόνια 6 – 8) του γονιδίου HSA από ολικό (T) RNA από K562 κύτταρα (1), κοκκώδη κύτταρα (2), ηπατικό ιστό (3), αρνητικός μάρτυρας (4), και του τμήματος C (εξόνια 11 έως 13) του γονιδίου HSA από ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (5) ολικό RNA από ηπατικό ιστό (6) ολικό RNA από K562 κύτταρα (7).

β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), κύτταρα HepG2 (2), ηπατικό ιστό, (4) λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (5), K562 κύτταρα (6), αρνητικός μάρτυρας (3). **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.



Εικόνα 5:

α. Ενίσχυση του τμήματος Β (εξόνια 6 – 8) του γονιδίου HSA από ολικό (T), κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό RNA (N). Κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (2), πυρηνικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (3) ολικό RNA από HepG2 κύτταρα (4), αρνητικός μάρτυρας (5) **και β.** Ενίσχυση του τμήματος C (εξόνια 11 – 13) του γονιδίου HSA από ολικό (T), κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό RNA (N). Κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), πυρηνικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (2), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (3) ολικό RNA από HepG2 κύτταρα (4), αρνητικός μάρτυρας (5). **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

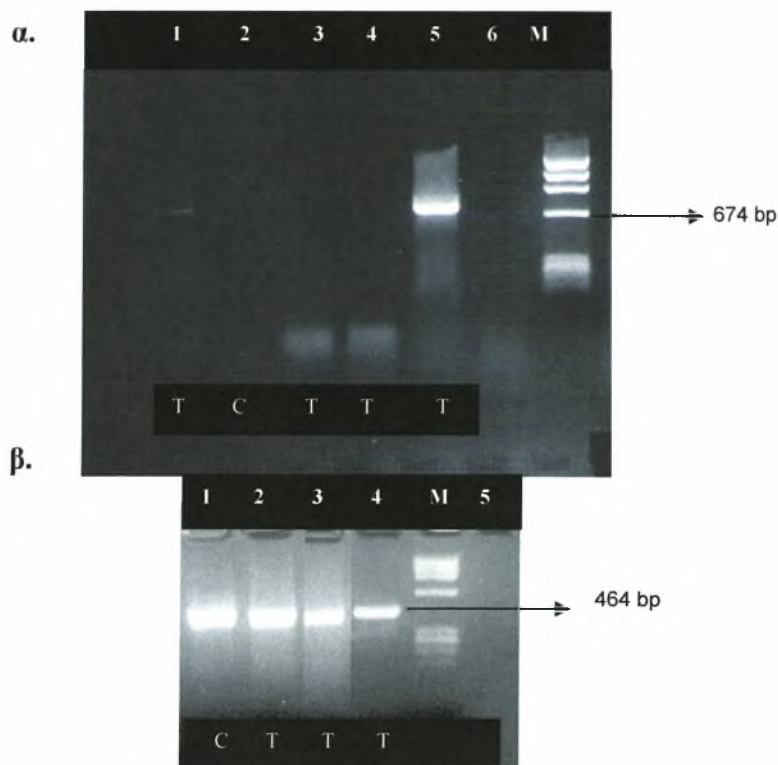


Εικόνα 6:

α. Ενίσχυση του τμήματος E (εξόνια 2 – 6) του γονιδίου HSA από ολικό (T) και κυτταροπλασματικό (C) RNA. Ολικό και κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1,2), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (3), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (4), αρνητικός μάρτυρας (5).

β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από ολικό (T) RNA από ηπατικό ιστό (1), κύτταρα HepG2 (2), αρνητικός μάρτυρας (3), λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (4), κυτταροπλασματικό RNA (C) από κοκκώδη κύτταρα (5), ολικό RNA (T) από κοκκώδη κύτταρα (6).

M: Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

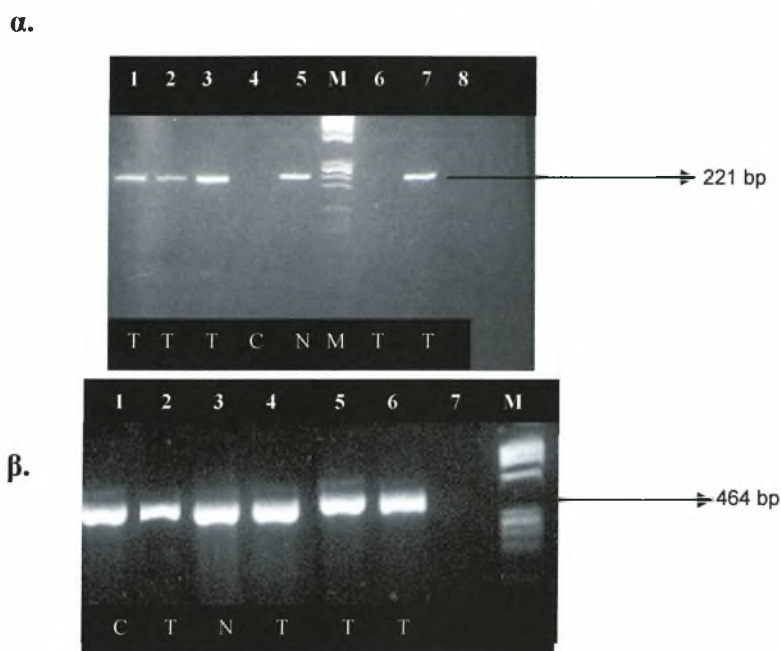


Εικόνα 7:

α. Ενίσχυση του τμήματος F (εξόνια 6 – 10) του γονιδίου HSA από ολικό (T) και κυτταροπλασματικό (C). Κυτταροπλασματικό και ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1, 2), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (3), ολικό RNA από κύτταρα K562 (4), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (5), αρνητικός μάρτυρας (6).

β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από κυτταροπλασματικό (C) RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (2), ολικό (T) RNA από κύτταρα HepG2 (3), ολικό (T) RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (4), αρνητικός μάρτυρας (5).

M: Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.



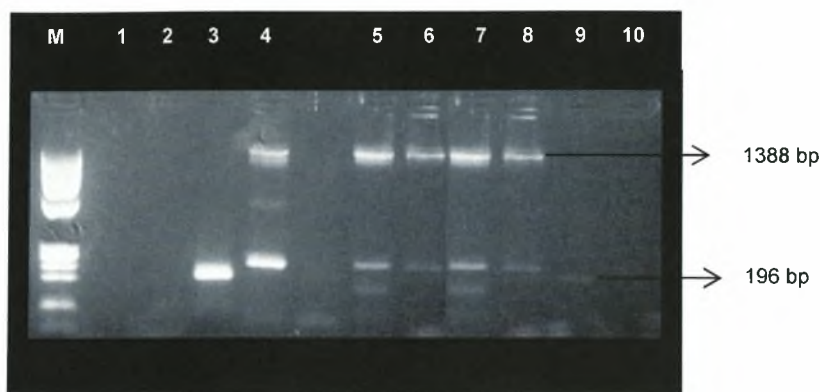
Εικόνα 8:

α. Ενίσχυση του τμήματος G (εξόνια 9 – 10) του γονιδίου HSA από ολικό (T), κυτταροπλασματικό (C) και πυρηνικό RNA (N). Ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1,2), ολικό RNA από ηπατικό ιστό (3), κυτταροπλασματικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (4), πυρηνικό RNA (N) από κοκκώδη κύτταρα (5), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (6), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (7) αρνητικός μάρτυρας (8).

β. Ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο ακτίνης από ολικό (T) RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), κυτταροπλασματικό (C) RNA από κοκκώδη κύτταρα (2), πυρηνικό (N) RNA από κοκκώδη κύτταρα (3), ολικό (T) RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (4), ολικό (T) RNA από κύτταρα HepG2 (5), ολικό (T) RNA από ηπατικό ιστό, (6), αρνητικός μάρτυρας (7). **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

21. Μελέτη του μηχανισμού έκτοπης έκφρασης του HSA γονιδίου στα κοκκώδη κύτταρα

Η μελέτη του μηχανισμού της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα έγινε με τον έλεγχο απομάκρυνσης των ενδιάμεσων αλληλουχιών (IVS) του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε κυτταροπλασματικό και πυρηνικό RNA κοκκωδών κυττάρων με εκκινητές, που εκτείνονται από το τέλος του εξονίου 12 έως το τέλος του εξονίου 13 (τμήμα D), με στόχο την ανίχνευση μεταγράφων, που πιθανά περιέχουν την IVS 12. Γενομικό DNA από κοκκώδη κύτταρα, κύτταρα HepG2, ηπατικό ιστό καθώς και από περιφερικό αίμα και κύτταρα K562 χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες για την ανάδειξη προϊόντων PCR, που περιέχουν την IVS 12 (Εικόνα 9). Η ενίσχυση κυτταροπλασματικού και πυρηνικού RNA από κοκκώδη κύτταρα με τους αντίστοιχους εκκινητές για την IVS-12 ανέδειξε μια ζώνη, που αντιστοιχεί σε μετάγραφο mRNA, όπου διαφαίνεται ότι έγινε σωστά η διαδικασία διασύνδεσης (Εικόνα 9).

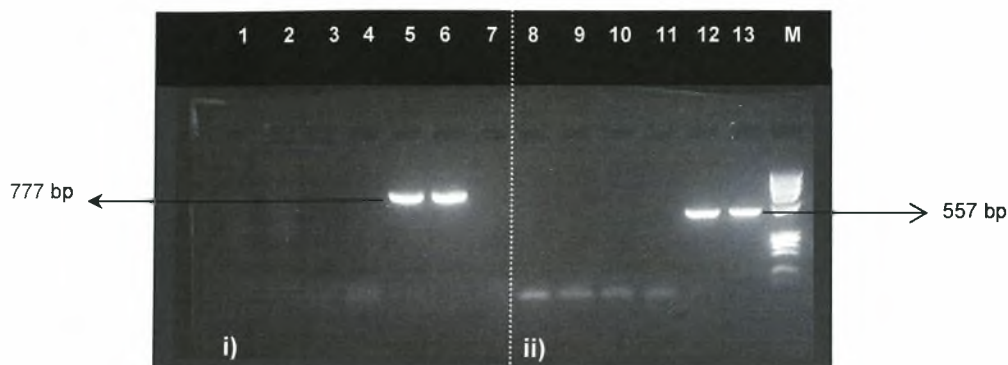


Εικόνα 9:

Ενίσχυση του τμήματος D (εξόνια 12 – 13) του γονιδίου HSA από ολικό (T), RNA και DNA. Τα δείγματα DNA περιέχουν την περιοχή IVS 12, σε αντίθεση με τα RNA δείγματα. Αρνητικός μάρτυρας (1), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (2), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (3), DNA από κύτταρα HepG2 (4) DNA από κοκκώδη κύτταρα (5), DNA από κύτταρα K562 (6), DNA από ηπατικό ιστό (7) DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος (8), ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (9), ολικό RNA από K562 κύτταρα. **M:** Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

22. Μελέτη έναρξης του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα

Η μελέτη του σημείου έναρξης μεταγραφής του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα έγινε σε 5 δείγματα από ολικό RNA και σε 5 δείγματα από κυτταροπλασματικό RNA. Τα προϊόντα PCR από ολικό RNA και κυτταροπλασματικό RNA κοκκωδών κυττάρων αντιστοιχούν σε μετάγραφα, που προέρχονται από το ευρέως χρησιμοποιούμενο σημείο έναρξης μεταγραφής. Αντίστοιχα HSA mRNA μετάγραφα ανιχνεύθηκαν από RNA HepG2 κυττάρων και ηπατικού ιστού. Επιπρόσθετα, κατά τη μελέτη αυτή έγινε χρήση δειγμάτων από DNA κοκκωδών, HepG2, ηπατικών, K562 κυττάρων καθώς και λεμφοκυττάρων από περιφερικό αίμα ανθρώπου, με σκοπό τη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων από τα αντίστοιχα του RNA (Εικόνα 10).



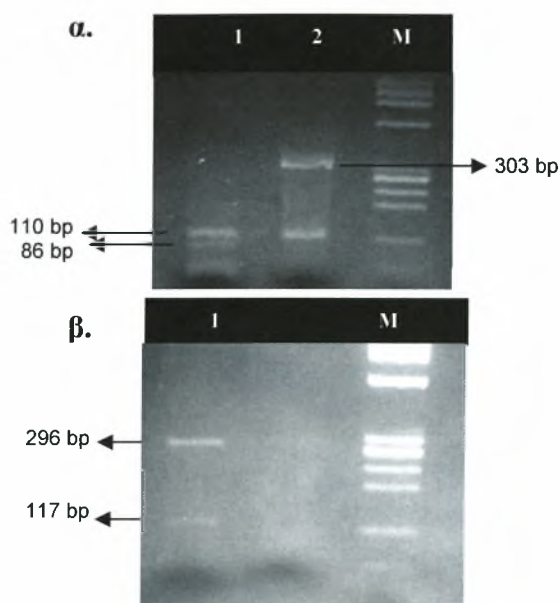
Εικόνα 10:

Μελέτη του σημείου έναρξης μεταγραφής του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα, από ολικό (T) RNA και DNA. **i)** με εκκινητές ALT και ALEX1r. Ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (1), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (2), ολικό RNA από ηπατικό ιστό (3), ολικό RNA από λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (4), DNA από κοκκώδη κύτταρα (5), DNA από HepG2 κύτταρα (6), αρνητικός μάρτυρας (7) και **ii)** με εκκινητές ALA και ALEX1r. Ολικό RNA από κοκκώδη κύτταρα (8), ολικό RNA από κύτταρα HepG2 (9), ολικό RNA από ηπατικό ιστό (10), αρνητικός μάρτυρας (11), DNA από κοκκώδη κύτταρα (12), DNA από HepG2 (13) **M**: Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

23. Ταυτοποίηση της ειδικότητας και της αλληλουχίας των προϊόντων PCR με χρήση ενζύμων περιορισμού και άμεσο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing)

23. 1 Ένζυμα περιορισμού

Η ειδικότητα των προϊόντων PCR επιβεβαιώθηκε και με την πέψη αυτών με κατάλληλες περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Για το λόγο αυτό, η ανάλυση των προϊόντων PCR για το τμήμα C έγινε με τη χρήση των ενζύμων περιορισμού DdeI και AvaII και για το τμήμα D με DdeI (Εικόνα 11). Τα μοριακά βάρη των ζωνών μετά την πέψη των προϊόντων PCR των αντίστοιχων τμημάτων από δείγματα κοκκωδών κυττάρων ήταν τα αναμενόμενα για κάθε ένζυμο βάσει της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου (Minghetti et al., 1986).



Εικόνα 11:

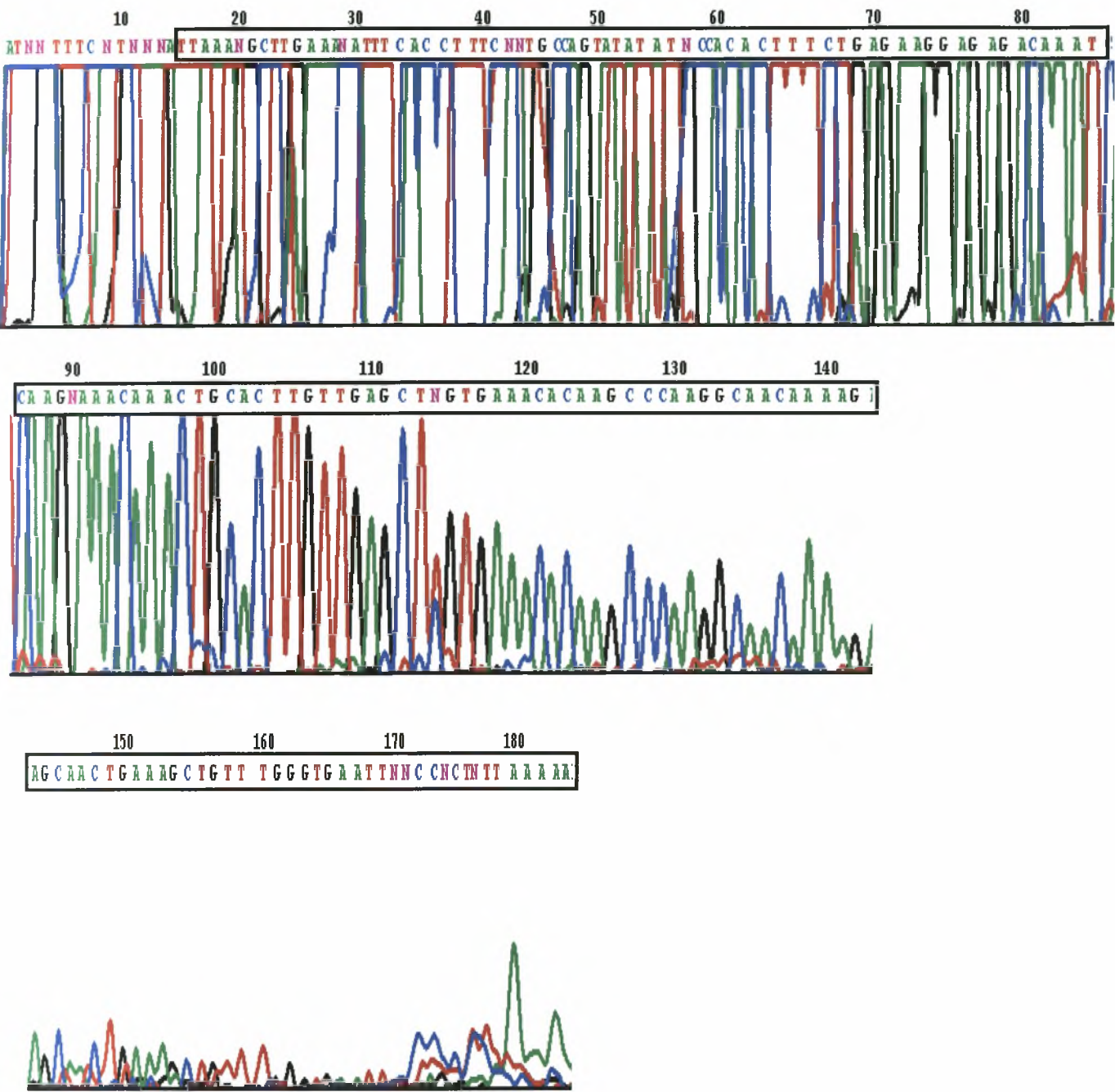
Ανάλυση των τμημάτων C (413 bp) και D (196 bp) με ένζυμα περιορισμού
 α: *Ddel*, 1: τμήμα D (110 bp/86 bp), 2: τμήμα C (303 bp / 110 bp).
 β: *Avall*, 1: τμήμα C (296 bp/117bp). **M**: Μάρτυρας φX 174 DNA/HaeIII.

23.2 Άμεσος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε στα προϊόντα PCR, που προέρχονται από όλα τα τμήματα του γονιδίου HSA. Παράλληλη μελέτη έγινε και σε αντίστοιχα PCR προϊόντα από HepG2 κύτταρα. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων του άμεσου προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του HSA γονιδίου σε κοκκώδη και HepG2 κύτταρα έγινε με τη βάση δεδομένων BLAST. Η πιστότητα των αποτελεσμάτων ήταν 70-80%, ανάλογα με την ποιότητα και την ποσότητα του δείγματος. Η ανάλυση των τμημάτων A και D του HSA γονιδίου από RNA κοκκωδών, HepG2 και ηπατικών κυττάρων αποτυπώνεται στην Εικόνα 12. Για κάθε διαφορετικό προϊόν PCR η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας έγινε τουλάχιστον 3 φορές.

Η παρουσία HSA mRNA μεταγράφων στα κοκκώδη κύτταρα, που αντιστοιχούν στα τμήματα A και D (αρχή γονιδίου και καρβοξυτελικού άκρου), επιβεβαιώθηκε αφ' ενός με τη χρήση ενζύμων περιορισμού, που πέπτουν ειδικά αυτή την περιοχή του γονιδίου και αφ' ετέρου με τον άμεσο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του αντίστοιχου τμήματος PCR (Εικόνες 11β και 12).

α. Sample 1 1613



Εικόνα 12:

α. Χρωματογραφική απεικόνιση του άμεσου προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Μέσα σε πλαίσιο βρίσκονται οι βάσεις που βρέθηκαν κατά την ανάλυση δείγματος προϊόντος PCR που έγινε σε ολικό RNA κοκκωδών κυττάρων με εκκινητές που ενισχύουν το καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου της HSA (τμήμα D). Τα αποτελέσματα αυτής δίνονται αναλυτικά στο μέρος β.

Αποτέλεσμα άμεσου προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing):

ATNNTTTCNTNNNA**T**TAAANGCTTGAAANATTT**C**ACCTTT**C**NNTGCCAGTATATAT**N**CCACACTTTCTGAGAAGGAGAGACA
AATCAAGNAAACAA**A**ACTGC**A**CTTGT**T**GAGCTNGTGAACACAAGCCCAAGGCAACAAGAGCAACTGAAAGCTGTTTGGGTGA
ATTNNCCNCTNT**T**TAAAAA

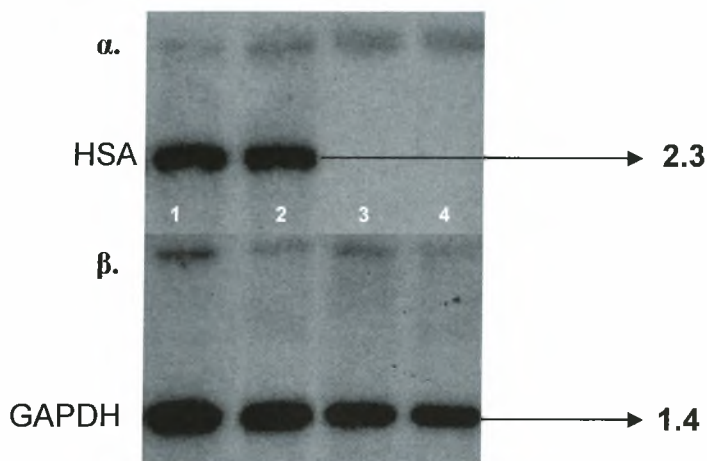
Αντιστοιχία με γονίδιο HSA - καρβοξυτελικό άκρο (εξόνιο 12 έως εξόνιο 13)

exon	15534..15757	/gene="ALB"
	/number=12	
intron	15758..16940	/gene="ALB"
	/number=12	
exon	16941..17073	/gene="ALB"
	/number=13	
intron	17074..18525	/gene="ALB"
	/note="alloalbumin Venezia"	
	/number=13	
intron	17074..17687	/gene="ALB"
	/number=13	
.....15481	aaaattttca gcttcacctc ttttgaat	tt ctgctctcct gcctgttctt tagtatccg
15541	tggtcctgaa ccagttatgt gtgttgcatg	agaaaacgcc agtaagtgac agagtcacca
15601	aatgctgcac agaatccttg gtgaacaggc	gaccatgott ttcagctctg gaagtcgatg
....15661	aaacatacgt tcccaaagag tttaatgctg	aaacattcac cttccatgca gatatatgca
15721	cactttctga gaaggagaga caaatcaaga	aacaaa gtg aggagtattt cttactgca
15781	tgtgtttgta gtcttgatag caagaactgt	caattcaagc tagcaacttt ttcctgaagt
15841	agtgattata tttcttagag gaaagtattg	gagtgttgcc cttattatgc tgataagagt
15901	accagaata aaatgaataa ctttttaaag	acaaaatcct ctgttataat attgctaaaa
15961	ttattcagag taatattgtg gattaaagcc	acaatagaat aacatgttag accatattca
16021	gtagaaaaag atgaacaatt aactgataaa	tttgtgcaca tggcaaatta gttaatggga
16081	accataggag aatttatttc tagatgtaa	taattatttt aagtttgccc tatggtggcc
16141	ccacacatga gacaaacccc caagatgtga	cttttgagaa tgagacttgg ataaaaaca
16201	tgtagaaatg caagccctga agctcaactc	cctattgcta tcacaggggt tataattgca
16261	taaaatttag ctatagaaag ttgctgtcat	ctcttggtgg ctgtaatcat cgtctaggct
16321	taagagtaat attgcaaaac ctgtcatgcc	cacacaaatc tctccctggc attggtgtct
16381	ttgcagatgt cagtgaagaa gaaccagcag	ctcccatgag tttggatagc cttattttct
16441	atagcctccc cactgaaggg agcaaagttt	aagaacccaaa tataaagttt ctcactttta
16501	tagatgagaa aaatttttaa taaagtccaa	gataattaaa tttttaagga tcatttttag
16561	ctctttaata gcaataaaac tcaatatgac	ataatatggc acttccaaaa tctgaataat
16621	atataattgc aatgacatac ttcttttcag	agatttactg aaaagaaatt tgttgacact
16681	acataacgtg atgagtgggt tatactgatt	gtttcagttg gtcttccac caactccatg
16741	aaagtggatt ttattatcct catctgcag	atgagaatat tgagacttat agcggatgc
16801	ctggcccaag tactcagagt tgccctggctc	caagatttat aatcttaaat gatgggacta
16861	ccatccttac tctctccatt tttctatacg	tgagtaatgt tttttctgtt tttttttttt
16921	ctttttccattcaaaactcag tgcacttggt	gagctcgtga aacacaagcc caaggcaaca
16981	aaagagcaac tgaaagctgt tatggatgat	ttcgcagctt ttgtagagaa gtgctgcaag....

Εικόνα 12:

β. Άμεσος προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) προϊόντος PCR του τμήματος D από ολικό RNA κοκκωδών κυτάρων. Η αντιστοιχία των βάσεων που βρέθηκαν με το γονίδιο της HSA ως προς το καρβοξυτελικό άκρο (τμήμα D) σημειώνεται με έντονη γραμματοσειρά. Με κίτρινο σημειώνονται οι εκκινήτες (1613 και 1790r) που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος D. Με γκρι σημειώνεται η περιοχή του εσονίου του γονιδίου, με λευκό η περιοχή του εξονίου, ενώ με ροζ σημειώνεται η αρχή των εξονίων 12 και 13 και με πράσινο το τέλος του εξονίου 12.

αναμενόμενο. Η απουσία HSA mRNA μεταγράφων στα κοκκώδη κύτταρα μπορεί να δικαιολογηθεί από την περιορισμένη δυνατότητα της μεθόδου για ανίχνευση μεταγράφων σε χαμηλή συγκέντρωση. Ο αποκλεισμός ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων έγινε με την παράλληλη ενίσχυση των μεταγράφων για το γονίδιο αναφοράς GAPDH (Εικόνα 13).

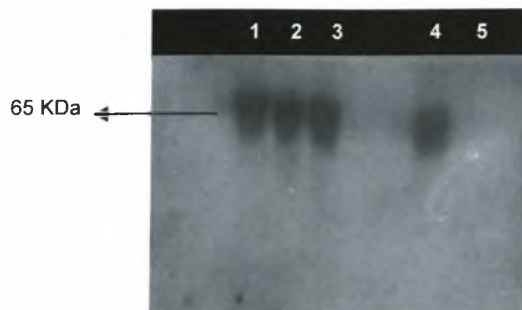


Εικόνα 13:

Έκφραση των μεταγράφων του γονιδίου HSA (α) και του γονιδίου GAPDH – γονίδιο αναφοράς (β) με ανάλυση κατά Northern. Χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA (20μg) από ηπατικό ιστό (1), HepG2 κύτταρα (2), κοκκώδη (3) και λεμφοκύτταρα περιφερικού αίματος (4).

26. Ανάλυση κατά Western

Η ανάλυση κατά Western (Western blot analysis) έγινε σε 30 πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κοκκωδών κυττάρων γυναικών καθώς και κυττάρων HepG2 με τη χρήση πολυκλωνικού αντισώματος ειδικού για την ανθρώπινη λευκωματίνη του ορού. Οι ζώνες του αναμενόμενου μεγέθους για τη λευκωματίνη, 65 kDa, ανιχνεύθηκαν στα HepG2 κύτταρα. Στα κοκκώδη κύτταρα ανιχνεύθηκε μία ζώνη 65 kDa και καμία άλλη. Τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από τα K562 κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικός μάρτυρας, όπου ουδεμία ζώνη ανιχνεύθηκε (Εικόνα 15).



Εικόνα 15:

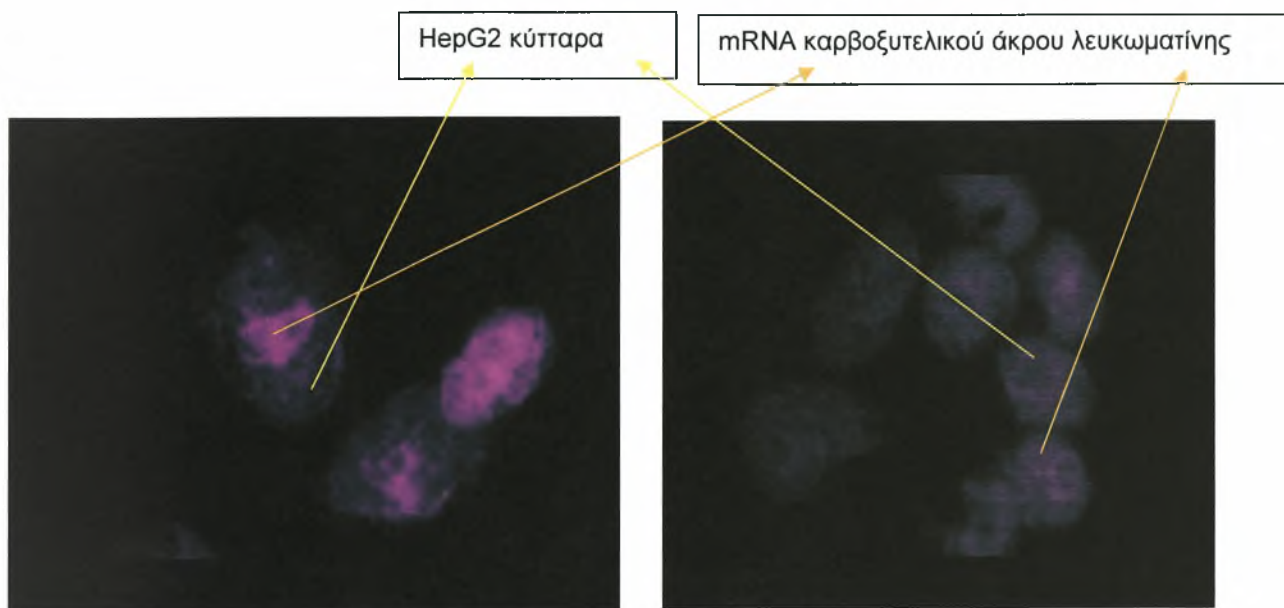
Μελέτη της πρωτεΐνης HSA με ανάλυση κατά Western. Εκχυλίσματα πρωτεϊνών από κοκκώδη (1, 2 & 3), HepG2 (4) και K562 κύτταρα (5).

27. *In situ* υβριδισμός

Η μελέτη με τη μέθοδο του *in situ* υβριδισμού έγινε με σημασμένο ανιχνευτή-προϊόν PCR, που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου της λευκωματίνης (τμήμα D).

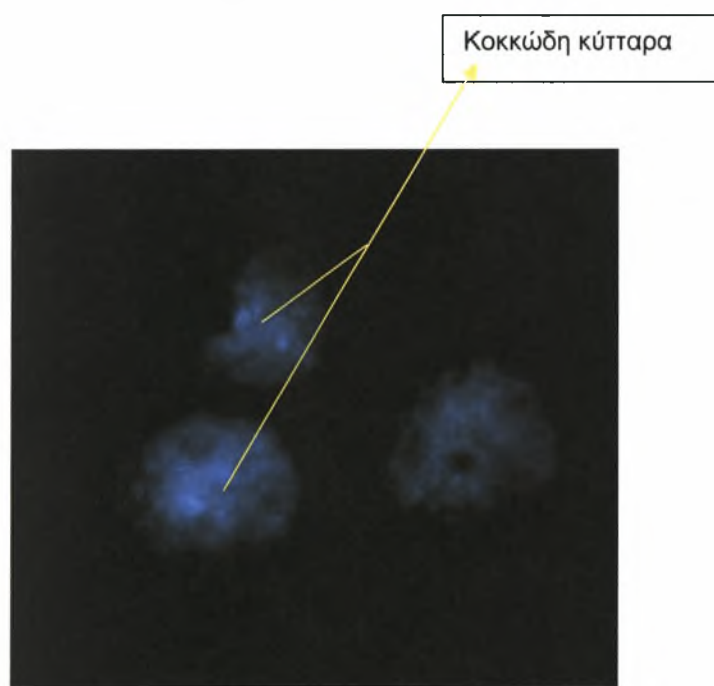
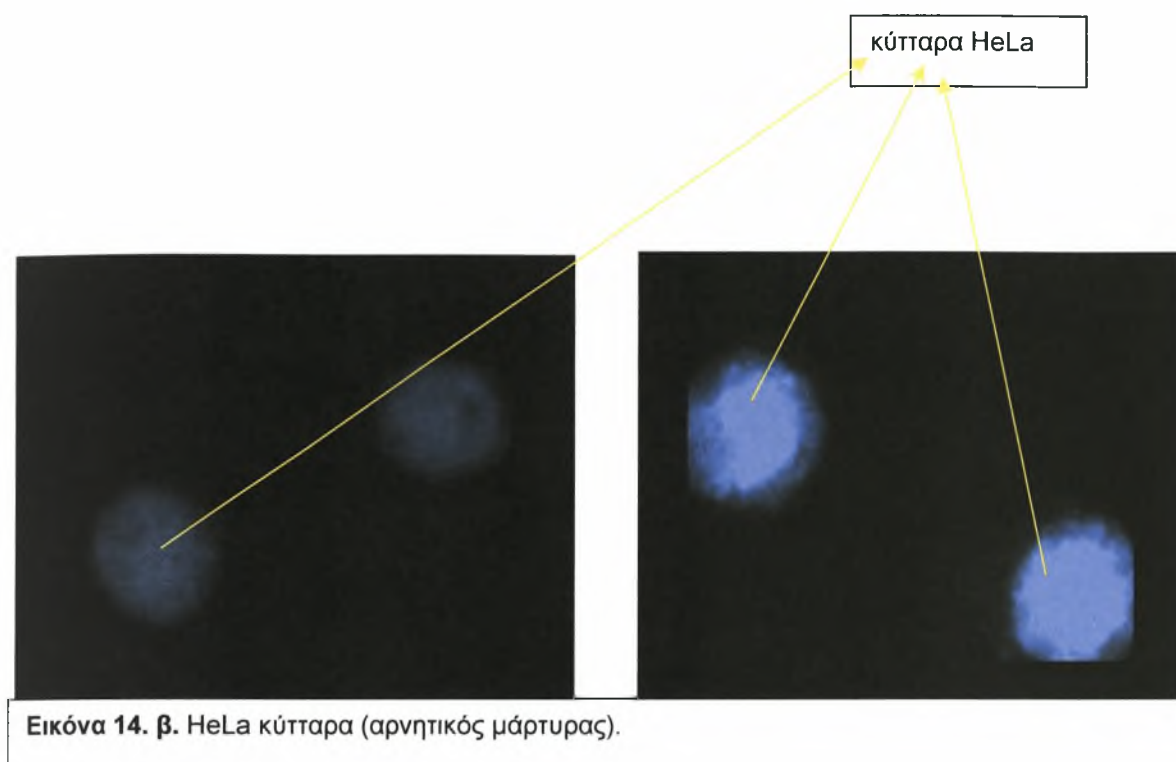
Έγινε ταυτόχρονη καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων, HepG2 κυττάρων (θετικός μάρτυρας) και της κυτταρικής σειράς HeLa (αρνητικός μάρτυρας). Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων (5 δείγματα) έγινε παρουσία ή απουσία της ορμόνης FSH στη μέγιστη συγκέντρωση (100 ng/μl) καθώς η FSH θεωρείται ότι επάγει την παραγωγή του GnSAF. Τα κύτταρα κατά την εξέτασή τους με το μικροσκόπιο, εμφανίζουν κυανό χρωματισμό λόγω της DAPI χρωστικής, ενώ ο ερυθρός χρωματισμός εμφανίζεται λόγω της χρώσης με Fast Red, δείχνοντας την ύπαρξη υβριδισμού του ανιχνευτή με το αντίστοιχο mRNA του κυττάρου. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε, όπως ήταν αναμενόμενο, ύπαρξη HSA mRNA μεταγράφων στα HepG2 κύτταρα (Εικόνα 14α). Αντίθετα, δεν ανιχνεύτηκε ύπαρξη mRNA στα κύτταρα HeLa (Εικόνα 14β) και στα κοκκώδη κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν χωρίς παρουσία FSH (Εικόνα 14γ). Στα κοκκώδη κύτταρα όμως, που καλλιεργήθηκαν παρουσία FSH, ανιχνεύθηκαν mRNA μεταγράφα του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης (Εικόνα 14δ). Από τα αρχικά αυτά αποτελέσματα φαίνεται ότι, παρουσία της FSH, παράγεται τουλάχιστον το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης από τα κοκκώδη κύτταρα, όπως γίνεται και στα κύτταρα HepG2, που είναι ο φυσικός τόπος παραγωγής της λευκωματίνης (Εικόνες 14^α, 14^β). Η απουσία HSA mRNA μεταγράφων στα κύτταρα, που καλλιεργήθηκαν χωρίς FSH, πιθανώς να οφείλεται στα όρια ευαισθησίας της τεχνικής και έτσι δεν μπορούν να ανιχνευθούν τα HSA mRNA μεταγράφα, όταν απαντώνται σε χαμηλή συγκέντρωση στα υπό εξέταση κύτταρα και στο ότι πιθανώς η FSH επάγει την παραγωγή των HSA mRNA μεταγράφων στα κοκκώδη κύτταρα.

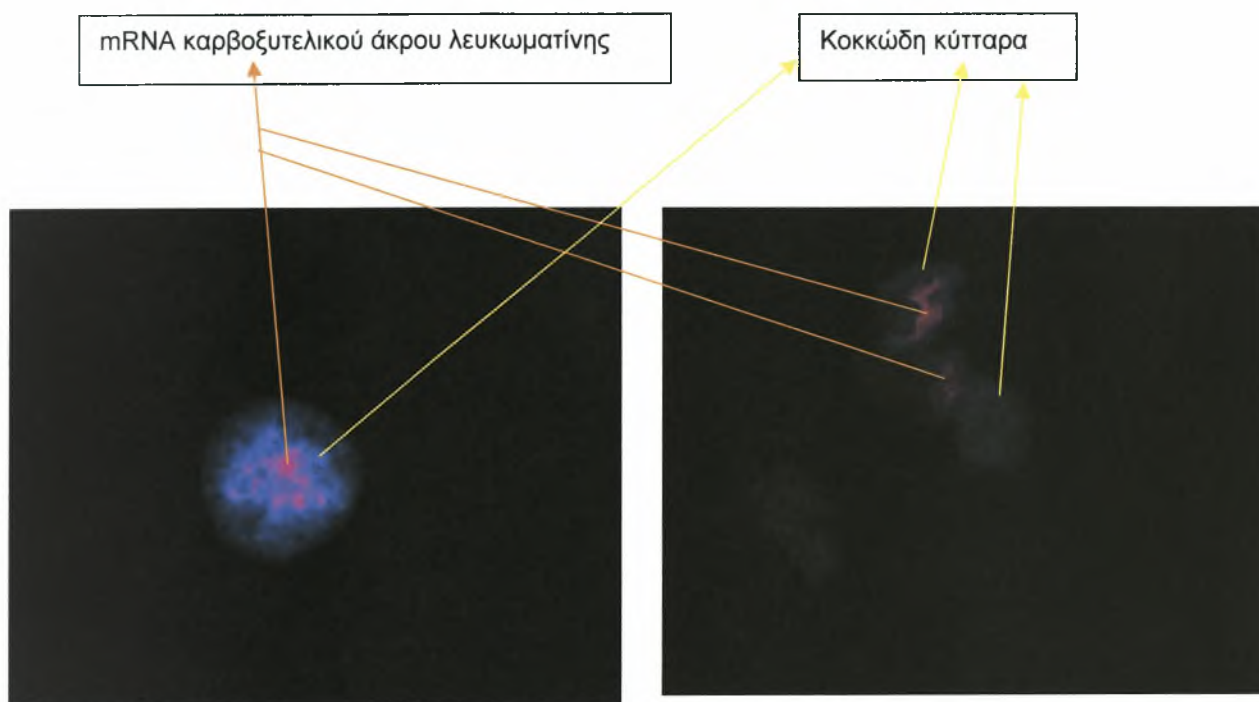
Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να θεωρήσουμε ότι τα κοκκώδη κύτταρα παράγουν δύο μόνο τμήματα (από το σημείο έναρξης μεταγραφής του HSA γονιδίου έως την αρχή του εξονίου 2 και από το εξόνιο 12 έως το εξόνιο 13) του γονιδίου της HSA, που πιθανώς αντιστοιχούν στο γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα GnSAF.



Εικόνα 14. *In situ* υβριδισμός, με ανιχνευτή για το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης (τμήμα D) σημειασμένο με χρωστική Fast Red. Τα κύτταρα έχουν χρωματιστεί με κυανή χρώση DAPI (μεγέθυνση x100).

α. HepG2 κύτταρα (θετικός μάρτυρας).





Εικόνα 14. δ. Κοκκώδη κύτταρα παρουσία FSH.

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Συζήτηση

Η λευκωματίνη ορού του ανθρώπου αποτελείται από 585 αμινοξέα, με μοριακό βάρος 65 KDa. Είναι μια σφαιρική μη γλυκοζυλιωμένη πρωτεΐνη, που συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ. Αποτελείται από τρεις όμοιες δομικά περιοχές, που θεωρείται ότι προέκυψαν από τον τριπλασιασμό μιας αρχικής δομής (Urano et al., 1984). Το γονίδιο υπεύθυνο για την κωδικοποίησή της ανήκει σε μια ευρύτερη πολυγονιδιακή οικογένεια πρωτεϊνών, όπου υπάγονται η α-εμβρυϊκή πρωτεΐνη και η πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (Jagodzinski et al., 1981, Gorin et al., 1981, Law and Dugaiczky, 1981, Yang et al., 1985). Η ακριβής του θέση έχει χαρτογραφηθεί στο σημείο q11-22 του χρωμοσώματος 4 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Mikkelsen et al., 1977, Harper and Dugaiczky, 1983). Αποτελείται συνολικά από 16961 νουκλεοτίδια, που καταμερίζονται σε 15 εξόνια και 14 εσόνια (Minghetti et al., 1986). Έχει ένα συγκεκριμένο ρόλο στο ανθρώπινο σώμα, κυρίως αυτόν της δέσμευσης των πρωτεϊνών μεταφοράς, ενώ έχει αναμιχθεί σε γνωστούς μηχανισμούς, όπως η οσμωτική πίεση των κολλοειδών, η δέσμευση των ελεύθερων ριζών, η αναστολή της λειτουργίας των αιμοπεταλίων και σε αντιθρομβωτικούς μηχανισμούς (Peters, 1970, Zahringer et al., 1976, Carter and Ho, 1994).

Προηγούμενα ερευνητικά αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι ο παράγοντας GnSAF είναι το καρβοξυτελικό άκρο της HSA (Pappa et al., 1999a). Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό ως πηγή απομόνωσης του GnSAF. Η βιοδραστικότητα GnSAF ελέγχθηκε σε *in vitro* βιολογικό σύστημα μελέτης κυττάρων υπόφυσης επιμύων (Pappa et al., 1999b). Η χρήση ανάλυσης της αλληλουχίας των αμινοξέων με φασματοσκοπία μάζας ταυτοποίησε το απομονωθέν τμήμα των 12.5 KDa, ως ομόλογο με το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης. Επιπλέον, σε νεότερη έρευνα που αφορούσε σε ανασυνδυασμένα πολυπεπτίδια της HSA πρωτεΐνης, αναφέρθηκε ότι το αντίστοιχο πεπτίδιο του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης 95 aa, που εκφράστηκε από το σύστημα έκφρασης του *P. pastoris*, μείωσε τη διεγερόμενη από την GnRH έκφραση της LH σε καλλιέργεια κυττάρων επιμύων κατά 50-82%, δείχνοντας έτσι βιοδραστικότητα GnSAF (Tavoulari et al., 2004). Αντιθέτως, όταν στην ίδια αυτή δοκιμασία ελέγχθηκε το παράγωγο ολόκληρης της HSA, βρέθηκε να μην είναι δραστικό (Tavoulari et al., 2004). Σε συνέχεια των παραπάνω, προέκυψε η υπόθεση ότι η λευκωματίνη ή ένα τροποποιημένο μόριο αυτής της πρωτεΐνης μπορεί να εμπλέκεται στη φυσιολογία του γεννητικού κύκλου της γυναίκας ως ένας διάφορος παράγοντας, όπως ο GnSAF.

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια διερεύνησης της μοριακής βάσης του GnSAF, με σκοπό την καλύτερη κατανόηση αυτού του παράγοντα και του φυσιολογικού του ρόλου στο γεννητικό κύκλο της γυναίκας. Η πειραματική διαδικασία εστιάστηκε στην ανίχνευση του γονιδίου, που πιθανώς είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση του GnSAF.

Τα αποτελέσματα έδειξαν μια έκτοπη έκφραση του mRNA της ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA) σε ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Ειδικότερα, ανιχνεύθηκαν μετάγραφα HSA – mRNA, που εκτείνονται από το

σημείο έναρξης της μεταγραφής έως την αρχή του εξονίου 2 και από το εξόνιο 12 έως το εξόνιο 13. Τα παραπάνω mRNA μετάγραφα ανιχνεύθηκαν τόσο στον πυρήνα όσο και στο κυτταρόπλασμα των κοκκωδών κυττάρων. Επιπρόσθετα, δεν ανιχνεύθηκε κανένα μετάγραφο mRNA, που να κωδικοποιεί τα υπόλοιπα εξόνια του γονιδίου HSA στο κυτταρόπλασμα των κοκκωδών κυττάρων. Η απουσία των μεταγραφόμενων περιοχών του HSA γονιδίου, που εκτείνονται από το εξόνιο 2 έως το εξόνιο 11, σε αντίθεση με τις περιοχές που κωδικοποιούν το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου, καταδεικνύει μια διαφορική έκφραση του HSA γονιδίου στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα. Η απουσία εμφάνισης εσόνιων στα δείγματα RNA δείχνει κατ' αρχήν την επιτυχή απομόνωση RNA από τα κοκκώδη κύτταρα και μετά τη ορθή ενίσχυση των τμημάτων με τους κατάλληλους εκκινητές, χωρίς την παρουσία DNA στα δείγματα, που εξετάστηκαν. Με τη χρήση των περιοριστικών ενζύμων και με τον άμεσο προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας,δείχθηκε ότι τα αποτελέσματα της PCR είναι αληθή και όχι προϊόντα ατελούς ενίσχυσης του γενετικού υλικού (Lewin, 1994, pp 137, 645).

Τα αποτελέσματα από τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR ενίσχυσαν τα προηγούμενα ευρήματα. Το καρβοξυτελικό και το αμινοτελικό άκρο της λευκωματίνης, βρέθηκαν ότι εκφράζονται από τα κοκκώδη κύτταρα σε συγκρίσιμες αναλογικά ποσότητες με την έκφραση τους στα κύτταρα HepG2. Η έκφραση ωστόσο των υπόλοιπων τμημάτων του γονιδίου της λευκωματίνης από τα κοκκώδη κύτταρα εμφανίζεται πολύ πιο ασθενής. Πιθανώς λοιπόν, η έκφρασή τους στα κοκκώδη κύτταρα να γίνεται σε μικρές ποσότητες. Αυτός μπορεί να είναι και ο λόγος, που τα τμήματα αυτά δεν ανιχνεύθηκαν σε κυτταροπλασματικό δείγμα κοκκωδών κυττάρων.

Η χρήση του υβριδισμού κατά Northern δεν μπόρεσε να δώσει αποτελέσματα λόγω έλλειψης ευαισθησίας της μεθόδου, σύμφωνα με τη θεώρηση ότι η έκφραση του γονιδίου υφίσταται σε μικρές ποσότητες (Fowler et al., 2003), γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευσή του με αυτή τη μέθοδο. Έτσι, χρησιμοποιήθηκε μια εναλλακτική μέθοδος, ο *in situ* υβριδισμός, που επιτρέπει την άμεση ανίχνευση mRNA μεταγράφων ενός γονιδίου από κύτταρα, που καλλιεργούνται *in vitro*. Η μέθοδος αυτή είναι λιγότερο παρεμβατική, καθώς τα mRNA μετάγραφα ανιχνεύονται άμεσα στα κύτταρα, που πιθανά τα εκφράζουν, χωρίς τη μεσολάβηση άλλων μεθόδων, που απαιτούν τη λύση των κυττάρων για την απομόνωση του γενετικού τους υλικού.

Ο *in situ* υβριδισμός έγινε, ώστε να μπορέσει να διευκρινιστεί η *in vitro* έκφραση του τμήματος D (καρβοξυτελικό άκρο) του γονιδίου της λευκωματίνης. Τα κοκκώδη κύτταρα έδειξαν την έκφραση του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης σε συγκρίσιμη ποσότητα με αυτή που εμφανίστηκε στα κύτταρα HepG2. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή, η έκφραση παρουσιάστηκε μόνο σε κοκκώδη κύτταρα, που είχαν καλλιεργηθεί παρουσία FSH. Έκφραση του τμήματος D δεν παρατηρήθηκε σε κοκκώδη κύτταρα, στα οποία δεν προστέθηκε FSH κατά την καλλιέργειά τους, όπως και στα κύτταρα HeLa. Η απουσία ανίχνευσης HSA μεταγράφων στην καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων, όταν δεν υπάρχει FSH, είναι ένα γεγονός, που μπορεί να οφείλεται

στην μικρή ποσότητα, που παράγεται από τα κοκκώδη κύτταρα, οπότε καθίσταται αδύνατη η ανίχνευση HSA μεταγράφων.

Τα αποτελέσματα από τον *in situ* υβριδισμό ενισχύουν την άποψη ότι τα κοκκώδη κύτταρα μπορούν να εκφράσουν τουλάχιστον το καρβοξυτελικό άκρο του γονιδίου της λευκωματίνης σε συγκρινόμενες ποσότητες με αυτές, που παράγονται από τα HepG2 κύτταρα, τον φυσικό τόπο παραγωγής της λευκωματίνης. Η μέθοδος αυτή, με τη χρήση σημασμένου ανιχνευτή ειδικού ως προς το καρβοξυτελικό άκρο, παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μόνο των μεταγράφων του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης με την επιλογή κατάλληλων συνθηκών υβριδισμού. Επιπλέον, επιτρέπει το διαχωρισμό εάν το σήμα προέρχεται από DNA ή από RNA, καθώς η εικόνα που παρουσιάζεται είναι διαφορετική. Η ύπαρξη DNA εντοπίζεται στα χρωμοσώματα δίνοντας ευκρινή στίγματα που αντιστοιχούν στα γονίδια που βρίσκονται στα χρωμοσώματα (σε δύο αντίγραφα). Αντίθετα, η ύπαρξη RNA μεταγράφων δίνει μια εικόνα πολλαπλών στιγμάτων που αντιστοιχούν στην ύπαρξη πολλών mRNA μεταγράφων του γονιδίου. Ακόμη, ο δεσμός μεταξύ DNA ανιχνευτή και RNA στόχου είναι ισχυρότερος από το δεσμό μεταξύ DNA ανιχνευτή και DNA στόχου, δίνοντας έτσι προβάδισμα στον υβριδισμό του ανιχνευτή με τα RNA μετάγραφα (Wetmur et al., 1981). Η απουσία εμφάνισης υβριδισμού στα κύτταρα HeLa (αρνητικός μάρτυρας) διασφαλίζει τον ορθό υβριδισμό, απομακρύνοντας την πιθανότητα η παρουσία φθοριζόντων σημάτων στους άλλους τύπους κυττάρων να προέρχεται από τον υβριδισμό του ανιχνευτή στο DNA. Ένα επιπλέον στοιχείο, που προκύπτει από την ανάλυση αυτή, είναι ότι η παραγωγή αυτή φαίνεται να επάγεται από την παρουσία της FSH στην καλλιέργεια των κυττάρων. Όπως αναφέρθηκε στο εισαγωγικό μέρος αυτής της εργασίας, η παραγωγή του GnSAF από τα κοκκώδη κύτταρα είναι εφικτή υπό την επίδραση της FSH (Messinis et al., 1991, Messinis et al., 1993c, Messinis et al., 1994a) και επομένως μπορεί αυτή η έκφραση του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης να ταυτίζεται με την έκφραση του GnSAF γονιδίου. Η έλλειψη εμφάνισης έκφρασης του καρβοξυτελικού άκρου της HSA, απουσία FSH κατά την καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων, υποστηρίζει την παραπάνω θεωρία. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν και με άλλες μελέτες, που αφορούν έκφραση mRNA μεταγράφων της λευκωματίνης σε ηπατικό ιστό (Theise et al., 2000, Jochheim, 2004, Luk, 2005). Η μέθοδος αυτή όμως έχει ορισμένους περιορισμούς ως προς την επιλογή των σημασμένων ανιχνευτών, κυρίως όσον αφορά στο μήκος τους. Αν οι σημασμένοι ανιχνευτές έχουν μήκος άνω των 500 bp γίνεται πιο δύσκολη η διείσδυση τους στο κύτταρο. Αυτό σημαίνει ότι δεν θα γίνει ορθά ο υβριδισμός και ειδικά σε γονίδια, που δεν έχουν υψηλή έκφραση δεν θα είναι εφικτή η ανίχνευσή τους. Το βέλτιστο μήκος του ανιχνευτή θα πρέπει να είναι περίπου στις 200 bp, ώστε να εξασφαλίζεται η επιτυχής διείσδυση στο κύτταρο αλλά και η ορθή ανίχνευση των μεταγράφων. Αυτός είναι ο λόγος που δεν εξετάσθηκε η έκφραση ολόκληρου γονιδίου της λευκωματίνης και των μεγαλύτερων τμημάτων της στην παρούσα εργασία.

Τα ευρήματα σε επίπεδο έκφρασης mRNA μεταγράφων μπορούν να εξηγηθούν είτε με την εναλλακτική διαδικασία διασύνδεσης, καθώς τα πρόδρομα mRNA μόρια εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα είτε με την εναλλακτική έκφραση του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα, μέσω ενός

διαφορετικού υποκινητή. Ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει διερευνηθεί ακόμη. Πρόσφατα δεδομένα από την έρευνα για το Ανθρώπινο Γονιδίωμα (Human Genome project), έδειξαν ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα απαρτίζεται από ένα σχετικά μικρό αριθμό γονιδίων (περίπου 30000 γονίδια) υποδηλώνοντας μια συντηρητική χρήση των γονιδίων. Έτσι, έχει παρατηρηθεί το ίδιο γονίδιο να μπορεί να λειτουργεί διαφορετικά σε διαφορετικούς ιστούς. Σε πολλές περιπτώσεις, η έκφραση και η μετάφραση αρκετών γονιδίων γίνεται με διαφορετικό τρόπο, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο πραγματοποιείται η έκφραση των γονιδίων αυτών (Boissel, et al., 1998; Strausberg et al., 2002). Έχει επίσης υπολογιστεί ότι τουλάχιστον το 59% των γονιδίων του ανθρώπου χρησιμοποιούν εναλλακτική επεξεργασία του RNA, ώστε να παραχθούν πολλαπλά μετάγραφα mRNA, τα οποία και παρουσιάζουν διαφορές στη σύνθεση των εξονίων τους (Venter, et al., 2001). Η χρήση διαφορετικών εξονίων ενός γονιδίου ενισχύει την παραγωγή επιπλέον πρωτεϊνικών ισομορφών, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν στις δομικές και τις λειτουργικές τους ιδιότητες (Lewin 1994, pp 911, Venter, et al., 2001).

Είναι γνωστό ότι το γονίδιο της λευκωματίνης του ορού του ανθρώπου έχει ένα εναλλακτικό TATA box σε πρότερη θέση (θέση -793), σε σχέση με το κυρίως χρησιμοποιούμενο (θέση -88) (Minghetti et al., 1986; Urano et al., 1986), το οποίο μπορεί να γίνει λειτουργικό σε έναν άλλο ιστό παρουσία διαφορετικών σημάτων έναρξης μεταγραφής, όπως στην περίπτωση των κοκκωδών κυττάρων παρουσία της ορμόνης FSH. Έχει ήδη αναφερθεί ότι ορμόνες, όπως η δεξαμεθαζόνη (Belanger et al., 1981, Guertin et al., 1983, Huang et al., 1984) και η ινσουλίνη (Plant et al., 1983) μπορούν να αλλάξουν την έκφραση του γονιδίου της α-εμβρυϊκής πρωτεΐνης, πρωτεΐνη της ίδιας γονιδιακής οικογένειας με τη λευκωματίνη, στον ηπατικό ιστό.

Η εναλλακτική διαδικασία διασύνδεσης είναι ο πιθανότερος μηχανισμός μέσω του οποίου προκύπτει η έκφραση του καρβοξυτελικού άκρου της λευκωματίνης και όχι ολόκληρου του γονιδίου της. Πρόκειται για ένα σημαντικό μοριακό μηχανισμό που δημιουργεί την πολυπλοκότητα, η οποία παρατηρείται στις ανθρώπινες πρωτεΐνες (Lamba et al., 2004). Τα μοναδικά mRNA μετάγραφα γονιδίων, που παράγονται μέσω της εναλλακτικής διαδικασίας διασύνδεσης, μπορεί να έχουν μια διαφορετική (Chandrasekharan et al., 2002) ή και αντίθετη λειτουργία (Foulkes and Sassone Corsi, 1992) από αυτή των αντίστοιχων πρωτεϊνών, που προκύπτουν με κανονική διαδικασία διασύνδεσης. Η επιλογή των χρησιμοποιούμενων κωδικοποιητικών αλληλουχιών κατά την εναλλακτική διαδικασία διασύνδεσης συχνά ρυθμίζεται από ένα ειδικό τρόπο ως προς τον ιστό παραγωγής, πιθανά μέσω διαφορετικής ρύθμισης του υποκινητή. Η αυξανόμενη πολυμορφία των πρωτεϊνών έχει δείχθει ότι παράγει εναλλακτικές μορφές των μεταγραφικών παραγόντων (hDMP1, ANL-1, HIF-1α, C/EBPε), των υποδοχέων των παραγόντων ανάπτυξης (υποδοχέας pregnane X), των ενζύμων (CYP4F3), των παραγόντων ανάπτυξης και των ορμονών (πρόσφατα έχουν περιγραφεί ορμονικοί υποδοχείς σε κακοήγεις νεοπλασίες) (Christmas et al., 2001, Kuehl et al., 2001, Ding and Miller, 2002., Tschan et al., 2003, Lamba et al., 2004).

Όπως αναφέρθηκε, η έκτοπη αυτή έκφραση του HSA γονιδίου σχετίζεται με το γονίδιο του GnSAF, το τελευταίο μπορεί να είναι είτε ένα παράγωγο της εναλλακτικής διαδικασίας διασύνδεσης του γονιδίου της λευκωματίνης ή ένα διαφορετικό γονίδιο, του οποίου η έκφραση γίνεται μέσω ενός διαφορετικού υποκινητή. Καθώς όμως κατά τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου της λευκωματίνης στα κοκκώδη κύτταρα δεν παρατηρήθηκε η λειτουργία διαφορετικού υποκινητή, η θεωρία που φαίνεται πιο πιθανή είναι αυτή της εναλλακτικής διασύνδεσης. Επιπρόσθετα, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα από τον *in situ* υβριδισμό, προκύπτει η υπόθεση ότι η FSH έχει σημαντικό ρόλο σε αυτή τη διαδικασία ως παράγοντας, που επηρεάζει τη διαφορετική ρύθμιση του υποκινητή, σε αντίστοιχο ρόλο με αυτό της ινσουλίνης και της δεξαμεθαζόνης, που όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μπορούν να αλλάξουν τον τρόπο έκφρασης της α-εμβρυϊκής πρωτεΐνης.

Σήμερα, υπάρχουν βάσεις δεδομένων με προφίλ της έκφρασης των γονιδίων σε ανθρώπινους ιστούς και μια έρευνα σε μία από αυτές (<http://expression.gnf.org/cgi-bin/index.cgi>) για έκφραση HSA σε ανθρώπινους ιστούς ανέφερε την υψηλότερη έκφραση της λευκωματίνης στο ήπαρ ενηλίκων και εμβρύων και σε μικρότερο ποσοστό στο πάγκρεας και στο μεσολόβιο, ενώ δεν αναφέρεται έκφραση λευκωματίνης στην ωοθήκη θηλαστικών (Shamay et al., 2005). Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσης έρευνας είναι πιθανό μόνο μια διαφοροποιημένη μορφή της λευκωματίνης να εκφράζεται στον ωοθηκικό ιστό. Επιπλέον, υπάρχει μια πρόσφατη αναφορά για μία πρωτεΐνη όμοια με τη λευκωματίνη, που εκφράζεται στην ωοθήκη νυχτερίδας, ποικιλίας *Scotophilus heathi* (Chanda et al., 2004). Η πρωτεΐνη αυτή βρέθηκε ότι παράγεται κυρίως από τα κοκκώδη κύτταρα κατά τη στρατολόγηση και την προωρρηκτική περίοδο, που συγχρονίζεται με δύο κορυφώσεις, της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και της στερεοδογένεσης. Έχει μοριακό βάρος 66 KDa και 70% ομολογία με την λευκωματίνη του ορού του ανθρώπου (Chanda, et al., 2004). Η παραπάνω έρευνα είναι σε συμφωνία με τα δεδομένα της παρούσης έρευνας, καθώς δείχνει τη δυνατότητα και άλλων θηλαστικών να παράγουν στις ωοθήκες τους πρωτεΐνες ομόλογες με τη λευκωματίνη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες το ήπαρ παράγει ολόκληρη την πρωτεΐνη της λευκωματίνης και όχι τμήμα αυτής (Minghetti et al., 1986), επομένως δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε αυτή η παρουσία του GnSAF στην κυκλοφορία.

Τα δεδομένα από τις αναλύσεις, που έγιναν σε πρωτεϊνικό επίπεδο, πιθανολογούν ότι ο GnSAF συντίθεται αρχικά ως ένα πρόδρομο μόριο HSA, το οποίο τελικά μέσω της εναλλακτικής διαδικασίας διασύνδεσης παράγεται το ώριμο μόριο. Η ανάλυση κατά Western έδειξε την έκφραση ολόκληρης της HSA πρωτεΐνης από τα κοκκώδη κύτταρα σε συγκρίσιμες ποσότητες με αυτή, που παράγεται από τα κύτταρα HepG2, ενώ δεν ανιχνεύθηκε σήμα που να αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο της HSA (12.5 KDa). Αυτή η έλλειψη σήματος είναι δύσκολο να εξηγηθεί, αλλά μπορεί να αποδοθεί στη μεθοδολογία λόγω έλλειψης ειδικού αντισώματος ως προς το καρβοξυτελικό άκρο της HSA, αλλά και στο γεγονός ότι θεωρείται περιορισμένη η ποσότητα GnSAF, που υπάρχει κατά την προωοθυλακιορρηκτική φάση του γεννητικού κύκλου (Fowler et al., 2001). Ο GnSAF θεωρείται ότι παράγεται κυρίως στην πρώιμη και τη μέση ωοθυλακική φάση σε σύγκριση με την τελική ωοθυλακική

φάση του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου (Messinis and Templeton, 1991). Αυτό σχετίζεται με την υπόθεση ότι η πηγή παραγωγής του GnSAF είναι από μια ομάδα μικρών ωοθυλακίων (Fowler et al., 1994b, 2001). Μια δεύτερη πιθανότητα είναι ότι το κυτταρικό σύστημα, κοκκώδη κύτταρα, που χρησιμοποιήθηκε να μην είναι αξιόπιστο. Κάτι τέτοιο όμως δεν είναι πιθανό αφού τα κοκκώδη κύτταρα θεωρούνται ο κύριος τόπος παραγωγής του GnSAF.

Κατά το φυσιολογικό γεννητικό κύκλο, ο ρόλος του GnSAF φαίνεται να περιορίζεται στην ωοθυλακική φάση, δηλαδή πριν από το μεσοκύκλιο κύμα της LH (Messinis et al., 1988), αφού μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του παράγοντα έχουν ανιχνευθεί σε μικρότερα παρά σε προωθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια (Fowler et al., 1994b, 2001). Επομένως, η χρήση των κοκκωδών κυττάρων από μικρά αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια θα ήταν καταλληλότερη. Ωστόσο, σε γυναίκες με πολλαπλή ωοθυλακιορρηξία, λόγω της ασύγχρονης ωοθυλακικής ωρίμανσης κατά τη συνεχή διέγερση με FSH διατηρούνται υψηλές ποσότητες GnSAF καθ' όλη τη διαδικασία της ωοθυλακικής πρόκλησης (Messinis et al., 1998). Τα παραπάνω, ταυτόχρονα με τον περιορισμένο αριθμό φυσιολογικών κύκλων στις διαδικασίες IVF καθώς και το γεγονός ότι κατά τη συλλογή των κοκκωδών κυττάρων ένας αριθμός αυτών χάνεται μας οδήγησε στη χρήση όλων των ωοθυλακίων ανεξαρτήτως μεγέθους στην προσπάθεια να συλλεγεί ικανοποιητικό υλικό για περαιτέρω ανάλυση. Εάν τα μικρά ωοθυλάκια θα μπορούσαν να εκφράσουν μετάγραφα του καρβοξυτελικού τμήματος του HSA γονιδίου, χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Επιπλέον, υπάρχει η πιθανότητα η ανίχνευση ολόκληρης της λευκωματίνης από τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα κοκκωδών κυττάρων να οφείλεται σε επιμόλυνση των δειγμάτων από τη λευκωματίνη του ορού. Είναι γνωστό ότι η λευκωματίνη έχει μεγάλο βαθμό δέσμευσης σε άλλες πρωτεΐνες, αφού ένας από τους κύριους ρόλους της είναι η μεταφορά πρωτεϊνών. Η πιθανότητα η φυσική αυτή ιδιότητα της λευκωματίνης να δημιουργήσει προβλήματα στην πειραματική αυτή διαδικασία δεν είναι μεγάλη, αφού οι μοριακές τεχνικές έδειξαν την έκφραση του mRNA της. Η παρασκευή και η χρήση ειδικού ως προς το καρβοξυτελικό άκρο αντισώματος, θα βοηθήσει στη διερεύνηση του προβλήματος.

Επομένως, τα παρόντα αποτελέσματα μπορούν να εξηγηθούν: α) από το μικρό μοριακό βάρος και τη μικρή συγκέντρωση του παράγοντα GnSAF ώστε να μπορεί να είναι αδύνατη η ανίχνευση του. Επιπρόσθετα, στην ανάλυση των πρωτεϊνών με τη μέθοδο ανάλυσης κατά Western χρειάζεται πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακρυλαμίδα (14%) η οποία δυσχεραίνει την κάθοδο και το σωστό διαχωρισμό των πρωτεϊνών β) στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα για την ανθρώπινη λευκωματίνη και όχι ειδικό για το καρβοξυτελικό της άκρο που πιθανά να αποτελεί τον παράγοντα GnSAF. Επίσης, στα πειράματα αυτά είναι πολύ εύκολη η επιμόλυνση των δειγμάτων από την ανθρώπινη λευκωματίνη, που βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στον ορό του αίματος. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν κυτταροσειρές ως αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες (K562 και HepG2 αντίστοιχα), στις καλλιέργειες των οποίων δεν χρησιμοποιήθηκε λευκωματίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin), η οποία είναι πρωτεΐνη συγγενής με την HSA. Κατά την απομόνωση των πρωτεϊνών από τα κοκκώδη κύτταρα όμως, συχνά υπήρξαν προσμίξεις

αίματος και παρά την προσεκτική απομάκρυνση του αίματος από τα δείγματα δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα πρόσμιξης της HSA από το αίμα, καθώς είναι γνωστό ότι αυτή η πρωτεΐνη είναι ένα μόριο, που προσκολλάται εύκολα κάνοντας την απομάκρυνση της εξαιρετικά δύσκολη. Έτσι, μπορεί να εξηγηθεί η ανίχνευση ζώνης 65 kDa στα κοκκώδη κύτταρα, που αντιστοιχεί στη λευκωματίνη και μπορεί να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα πρόσμιξης του αίματος στα κοκκώδη κύτταρα κατά την απομόνωσή τους από το ωοθυλακικό υγρό.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι ο GnSAF βασίζεται στην έκτοπη έκφραση του γονιδίου HSA στα κοκκώδη κύτταρα μέσω του μηχανισμού της εναλλακτικής διασύνδεσης. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την προσπάθεια που κάνει ο οργανισμός για να ελέγξει την παραγωγή μιας πρωτεΐνης - ορμόνης μέσω ενός ήδη υπάρχοντος γονιδίου και η παραγωγή της μπορεί να ρυθμιστεί από έναν αριθμό στεροειδών και μη ορμονών οι οποίες ασκούν τη δράση τους είτε τοπικά στις ωοθήκες είτε στο επίπεδο της υπόφυσης. Επομένως, η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί μια νέα οδό συνεργασίας με τις άλλες πρωτεΐνες και παράγοντες που συμμετέχουν στη ρύθμιση του γεννητικού κύκλου. Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται ώστε να διευκρινιστεί πλήρως αυτή η υπόθεση.

4.2. Συμπεράσματα:

1. Παρέχονται ενδείξεις ότι το γονίδιο, που κωδικοποιεί τον GnSAF, μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας εναλλακτικής έκτοπης έκφρασης του HSA γονιδίου στα κοκκώδη κύτταρα.
2. Η έκτοπη αυτή έκφραση θεωρείται, με τα δεδομένα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα εργασία, ότι οφείλεται στην εναλλακτική διαδικασία διασύνδεσης στο πρόδρομο μόριο HSA μέσω διαφορετικής ρύθμισης του υποκινητή.
3. Η χρήση του υβριδισμού κατά Western για την ανίχνευση έκφρασης της εναλλακτικής αυτής πρωτεΐνης από τα κοκκώδη κύτταρα, πιθανά να μην είναι εφαρμόσιμη, λόγω των τεχνικών δυσκολιών που παρουσιάζει η μεθοδολογία και τα αποτελέσματά της να μην είναι αποδεκτά, λόγω της αναπόφευκτης πρόσμιξης της HSA πρωτεΐνης, που βρίσκεται πάντα στον ορό. Η χρήση ειδικού προς το καρβοξυτελικό άκρο της λευκωματίνης αντισώματος μπορεί να αποτελέσει τη λύση στο πρόβλημα αυτό.
4. Τα δεδομένα από τον *in situ* υβριδισμό επιτρέπουν την ανάπτυξη της υπόθεσης ότι στη ρύθμιση του υποκινητή για τη διαφορετική έκφραση του HSA γονιδίου σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η FSH. Φαίνεται ότι η έκφραση του γονιδίου, τουλάχιστον *in vitro*, επάγεται από την παρουσία FSH κατά την καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων.
5. Τα πρώιμα αποτελέσματα σε επίπεδο RNA, σε συνδυασμό με τα δεδομένα από τον *in situ* υβριδισμό, συνηγορούν στο ότι η έκτοπη αυτή έκφραση του καρβοξυτελικού άκρου του γονιδίου της λευκωματίνης στα κοκκώδη κύτταρα μπορεί να ταυτίζεται με την έκφραση του γονιδίου του GnSAF.

Ε. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο παράγοντας άμβλυνσης του κύματος των γοναδοτροφινών (Gonadotrophin Surge Attenuating Factor -GnSAF) είναι μια μη στεροειδής ωθητική ουσία, που μέσω μια σημαντικής μείωσης της ανταπόκρισης της υπόφυσης στη GnRH αμβλύνει το ενδογενές κύμα της LH σε γυναίκες, οι οποίες υποβάλλονται σε θεραπεία πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, ο GnSAF, του οποίου τόπος παραγωγής θεωρούνται τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα και η παραγωγή του επάγεται κυρίως από την FSH, έχει ομολογία με το καρβοξυτελικό άκρο της ανθρώπινης λευκωματίνης (HSA). Με βάση τα παραπάνω η εργασία αυτή έχει σκοπό τη μελέτη του υπεύθυνου γονιδίου για τον παράγοντα GnSAF, έκφραση ολόκληρου ή μέρους του HSA γονιδίου από τα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που υποβλήθηκαν σε θεραπεία για εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).

Υλικό και Μέθοδοι: Η ανάλυση των HSA mRNA μεταγράφων με RT-PCR έγινε σε ωχρινποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Η ταυτοποίηση των προϊόντων PCR έγινε με περιοριστικές ενδονουκλεάσες και ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing). Για την κατανόηση του υποκείμενου μηχανισμού της έκτοπης αυτής έκφρασης του HSA γονιδίου στα κοκκώδη κύτταρα, μελετήθηκε η διαδικασία διασύνδεσης (απομάκρυνση εσονίων) σε δείγματα ολικού και κυτταροπλασματικού RNA. Ο ημι-ποσοτικός προσδιορισμός των τμημάτων του HSA γονιδίου έγινε σε σύγκριση με την έκφραση του γονιδίου της β-ακτίνης. Η ανάλυση κατά Northern και ο *in situ* υβριδισμός έγιναν με στόχο την επιπλέον διερεύνηση της έκφρασης του HSA γονιδίου από τα κοκκώδη κύτταρα. Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων κατά τον *in situ* υβριδισμό έγινε παρουσία ή απουσία FSH και σημειώθηκε ανιχνευτής ήταν το προϊόν PCR, που αντιστοιχεί στο καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου. Η ανάλυση κατά Western χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της πιθανής έκφρασης της πρωτεΐνης από τα κοκκώδη κύτταρα.

Αποτελέσματα: Η ανάλυση των αποτελεσμάτων RT-PCR και την ταυτοποίηση των προϊόντων PCR στα κοκκώδη κύτταρα έδειξαν ίδιες ζώνες έδειξαν ότι στο κυτταρόπλασμα των κοκκωδών κυττάρων εκφράζεται το αμινοτελικό και καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου. Η ημι-ποσοτική ανάλυση έδειξε ότι τόσο το αμινοτελικό όσο και το καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου, αντίθετα με την έκφραση των υπόλοιπων τμημάτων που είναι ελάχιστη, εκφράζονται από τα κοκκώδη κύτταρα σε συγκρινόμενες αναλογικά ποσότητες με αυτές από τα HepG2 κύτταρα (θετικός μάρτυρας). Η ορθή διαδικασία της διασύνδεσης επιβεβαιώθηκε από την ύπαρξη σωστά μεταγραφόμενων HSA mRNA μεταγράφων (χωρίς εσόνια) στα κοκκώδη κύτταρα που αφορούν την περιοχή από το εξόνιο 12 έως το εξόνιο 13 του HSA γονιδίου. Στην ανάλυση κατά Northern, ανιχνεύθηκαν HSA mRNA μετάγραφα μόνο στα HepG2 κύτταρα. Η απουσία εμφάνισης σήματος HSA στα κοκκώδη κύτταρα υποδηλώνει ότι η λευκωματίνη πιθανά εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, μη ανιχνεύσιμα με αυτή τη μέθοδο. Ο *in situ* υβριδισμός παρουσία FSH έδειξε συγκρίσιμα επίπεδα έκφρασης του καρβοξυτελικού άκρου του HSA γονιδίου στα κοκκώδη κύτταρα με αυτά που εκφράζονται στα HepG2 κύτταρα. Στην ανάλυση κατά Western, τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα των ανθρώπινων ωχρινποιημένων κοκκωδών κυττάρων και της κυτταρικής σειράς HepG2 έδωσαν ζώνες μεγέθους 65 kDa, που αντιστοιχούν στο ορθό μέγεθος για την πρωτεΐνη HSA, χωρίς όμως την ανίχνευση περαιτέρω ζωνών.

ΣΤ. SUMMARY

Συζήτηση: Τα κοκκώδη κύτταρα έδειξαν ότι εκφράζουν το αμινοτελικό και το καρβοξυτελικό άκρο του HSA γονιδίου σε συγκρινόμενα επίπεδα με αυτά που ανιχνεύονται στα ανθρώπινα ηπατοκύτταρα. Επιπλέον, τα αποτελέσματα του *in situ* υβριδισμού δείχνουν ότι η έκφραση mRNA μεταγράφων του καρβοξυτελικού άκρου του HSA γονιδίου, πιθανά επάγεται από την παρουσία της FSH. Τελικά, προτείνεται ότι το γονίδιο υπεύθυνο για τον GnSAF, είναι πιθανά αποτέλεσμα μια εναλλακτικής διαδικασίας διασύνδεσης του HSA γονιδίου.

Z. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Introduction: Gonadotrophin Surge Attenuating Factor (GnSAF) is a non-steroidal ovarian substance that in superovulated women attenuates the endogenous LH surge via a significant reduction of LH response to GnRH. According to previous studies, GnSAF, which is assumed to be produced by human granulosa cells under the influence of FSH, has a homology with the carboxyl terminal of the human serum albumin (HSA) protein. In an attempt to validate these findings, the whole or partial expression of HSA-gene was studied by RT-PCR analysis in human granulosa cells from women undergoing *in vitro* fertilization treatment.

Materials & Methods: RT-PCR analysis of HSA RNA transcripts was employed in luteinized granulosa cells in order to investigate the possible expression of the HSA gene. To ensure the specificity of PCR products, restriction enzyme and sequence analysis were performed. To further understand the underlying mechanism of the differential expression of HSA gene in granulosa cells, cytoplasmic and nuclear RNA were studied for HSA RNA processing (removal of introns). Semi-quantification was used for comparison of the expression of the HSA gene fragments to that of β -actin. Northern Blot analysis and *in situ* hybridization were performed as well, to further investigate the expression of the HSA gene by granulosa cells. Granulosa cells for *in situ* hybridization were cultured with or without the addition of FSH and the PCR product corresponding to the carboxyl terminal of HSA was used as probe. Western blot analysis was carried out to detect the possible expression of the albumin gene in granulosa cells.

Results: RT-PCR and sequencing analysis of cDNA from granulosa cells revealed identical bands with those from the positive control for the amino as well as the carboxyl terminal corresponding to HSA gene at the cytoplasmic level. Semi-quantification analysis revealed expression of the amino as well as the carboxyl terminal of HSA gene from granulosa cells in comparative amounts to those from the HepG2 cells. The expression of the rest of the fragments was almost undetectable in the granulosa cells. PCR analysis for fragment from exon 12 to exon 13, cytoplasmic and total RNA from granulosa and HepG2 cells showed correctly spliced (containing no HSA IVS-12) transcripts, while DNA samples from these cells gave the unspliced fragments as expected. In Northern Blot analysis, correctly sized HSA mRNA transcripts, corresponding to the full transcript of HSA gene, were detected in HepG2 cells. The lack of detection of HSA message in granulosa cells suggest that HSA is possibly expressed in limited amounts by granulosa cells, not detectable by this method. However, *in situ* hybridization showed expression of the carboxyl terminal of the HSA gene, in relative amounts to that showed in HepG2 cells. This expression was detected in granulosa cells that were cultured with the addition of FSH. In Western blot analysis, the protein extracts of human luteinized granulosa cells and the HepG2 cell line gave detectable bands of the HSA at the expected size of 65kDa but no other bands were determined.

Conclusion: We have demonstrated that human granulosa cells express the carboxyl and amino terminal parts of the HSA gene in levels comparable to those found in human hepatocytes. *In situ* hybridization results implicit that this expression is probably induced in presence of FSH. It is suggested that the coding gene for GnSAF may be a result of an alternative splicing of HSA-gene.

Alexandris E, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K, Lolis D and Messinis IE. (1997) Changes in gonadotrophin response to gonadotrophin releasing hormone in normal women following bilateral ovariectomy. Clin Endocrinol. 47, 721-726.

Andrews WV, Hansen JR, Janovick JA and Conn PM. (1990) Gonadotropin-releasing hormone modulation of protein kinase-C activity in perfused anterior pituitary cell cultures. Endocrinology. 127, 2393-2399.

Balen AH, Er J, Rafferty B, and Rose M. (1995) Characterization of a rat anterior pituitary cell bioassay. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 31, 316-322.

Bates RL, Fowler PA and Melvin WT. (1996) Purification of GnSAF from human follicular fluid for production of a monoclonal antibody. Biochem Soc Trans. 24:269S.

Belanger L, Frain M, Baril P, Gingras M-C, Bartkowiak J and Sala-Trepat JM. (1981) Glucocorticosteroid suppression of alpha1-fetoprotein synthesis in developing rat liver. Evidence for selective gene repression at the transcriptional level. Biochemistry. 20, 6665-6672.

Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ and Knobil E. (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. Science. 202, 631-633.

Boissel JP, Schwarz PM and Forstermann U. (1998) Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. Nitric Oxide. 2, 337-49.

Braden TD and Conn PM. (1992) Activin-A stimulates the synthesis of gonadotropin-releasing hormone receptors. Endocrinology. 130, 2101-2105.

Burger HG and Igarashi M. (1988) Inhibin: definition and nomenclature, including related substances. Endocrinology. 122, 1701-1702.

Busbridge NJ, Buckley DM, Cornish M and Whitehead SA. (1988) Effects of ovarian hyperstimulation and isolated preovulatory follicles on LH responses to GnRH in rats. J Reprod Fertil. 82, 329-336.

Busbridge NJ, Chamberlain GV, Griffiths A and Whitehead SA. (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 PA, Fraser M, Culler MD 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.

- Campen CA and Vale W. (1988) Interaction between purified ovine inhibin and steroids on the release of gonadotropins from cultured rat pituitary cells. *Endocrinology*. 123, 1320-1328.
- Cano A and Tarin JJ. (1998) Two distinct two step ranks of progesterone stimulation after three different levels of oestrogen priming. Effect on induction of luteinizing hormone surges in young and climacteric women. *Hum Reprod*. 13, 852-858.
- Carter DC and Ho JX. (1994) Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*. 45, 153-203.
- Chanda D, Yonekura M and Krishna A. (2004) Pattern of ovarian protein synthesis and secretion during the reproductive cycle of *Scotophilus heathi*: synthesis of an albumin-like protein. *Biotech Histochem*. 79, 129-138.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, and Simmons DL. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 13926-13931.
- Cheng KW and Leung PC. (2000) The expression, regulation and signal transduction pathways of the mammalian gonadotropin-releasing hormone receptor. *Can J Physiol Pharmacol*. 78, 1029-1052.
- Chomczynski P and Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162, 156-159.
- Christmas P, Jones JP, Patten CJ, Rock DA, Zheng Y, Cheng SM, Weber BM, Carlesso N, Scadden DT, Rettie AE and Soberman RJ. (2001) Alternative splicing determines the function of CYP4F3 by switching substrate specificity. *J Biol Chem*. 276, 38166-38172.
- Clarke, IJ. (1995) Evidence that the switch from negative to positive feedback at the level of the pituitary gland is an important timing event for the onset of the preovulatory surge in LH in the ewe. *J Endocrinol*. 145, 271-282.
- Culler MD and Negro-Vilar A. (1988) Passive immunoneutralization of endogenous inhibin: sex-related differences in the role of inhibin during development. *Mol Cell Endocrinol*. 58, 263-273.
- Culler MD. (1992a) Inhibin suppresses luteinizing hormone (LH)-releasing hormone self-priming: direct action on follicle-stimulating hormone secretion and opposition of estradiol-enhanced LH secretion. *Endocrinology*. 130, 1605-1614.
- Culler MD. (1992b) In vivo evidence that inhibin is a gonadotropin surge-inhibiting/attenuating factor. *Endocrinology*. 131, 1556-1558.

Dafopoulos K, Kotsovassilis CG, Milingos S, Kallitsaris A, Galazios G, Zintzaras E, Sotiros P and Messinis IE. (2004) Changes in pituitary sensitivity to GnRH in estrogen-treated post-menopausal women: evidence that gonadotrophin surge attenuating factor plays a physiological role. *Hum Reprod.* 19, 1985-1992.

Dafopoulos K, Mademtzis I, Vanakara P, Kallitsaris A, Stamatiou G, Kotsovassilis C and Messinis IE. (2005) Evidence that termination of the estradiol-induced luteinizing hormone surge in women is regulated by ovarian factors. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 641-645.

Danforth DR, Sinosich MJ, Anderson TL, Cheng CY, Bardin CW and Hodgen GD. (1987) Identification of gonadotropin surge-inhibiting factor (GnSIF) in follicular fluid and its differentiation from inhibin. *Biol Reprod.* 37, 1075-1082.

Danforth DR, Elkind-Hirsch K and Hodgen GD. (1990) In vivo and in vitro modulation of gonadotropin-releasing hormone metabolism by estradiol and progesterone. *Endocrinology* 127, 319-324.

Danforth DR and Cheng CY. (1993) The identification of gonadotrophin surge inhibiting factor and its role in the regulation of pituitary gonadotrophin secretion. *Hum Reprod.* 8, Suppl 2:117-122.

Danforth DR and Cheng CY. (1995) Purification of a candidate gonadotropin surge inhibiting factor from porcine follicular fluid. *Endocrinology.* 136, 1658-1665.

Davis LG, Dibner MD and Battey JF. (1986) Basic methods in molecular biology. Elsevier New York, pp 136-138.

Daughaday WH. (1985) The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW (Eds) *Textbook of Endocrinology.* W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp 568-613.

de Jong FH, Welschen R, Hermans WP, Smith SD and van der Molen HJ. (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.* 47-59.

de Koning J, van Dieten JA, Tijssen AM and van Rees GP. (1979) Studies on a protein synthesis dependent step in LH release by LH-RH. *Acta Endocrinol (Copenh).* 92, 648-657.

de Koning J, Tijssen AM and van Rees GP. (1987) The involvement of ovarian factors in maintaining the pituitary glands of female rats in a state of low LH responsiveness to LHRH. *J Endocrinol.* 112, 265-273.

- de Koning J, Tijssen AM, van Rees GP. (1989) The self-priming action of LHRH increases the low pituitary LH and FSH response caused by ovarian factors: observations in vitro. *J Endocrinol.* 120, 439-447.
- de Koning J, Westhoff WE, Koppelaar DW and van Dieën JA. (1994) On the dynamics between gonadotrophin surge-inhibiting factor and gonadotrophin releasing hormone (GnRH): role of self-priming and desensitization in the luteinizing hormone response to GnRH after follicle stimulating hormone treatment. *Hum Reprod.* 9, 1600-1606.
- de Kretser DM, Hedger MP, Loveland KL and Phillips DJ. (2002) Inhibins, activins and follistatin in reproduction. *Hum Reprod Update.* 8, 529-541.
- DePaolo LV, Mercado M, Guo Y and Ling N. (1993) Increased follistatin (activin-binding protein) gene expression in rat anterior pituitary tissue after ovariectomy may be mediated by pituitary activin. *Endocrinology.* 132, 2221-2228.
- Ding, W-Q and Miller, LJ. (2002) Signaling from novel splice variants of hormone receptors in cancer. *Int. J. Gastro. Cancer* 31, 31-39.
- Dotzlaw H, Leygue E, Watson P and Murphy LC (1999) The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue. *Clin Cancer Res.* 5, 2103-2107.
- Estes KS, Simpkins JW and Kalra SP. (1982) Normal LHRH neuronal function and hyperprolactinemia in old pseudopregnant Fischer 344 rats. *Neurobiol Aging.* 3, 247-252.
- Farnworth PG, Robertson DM, de Kretser DM and Burger HG. (1988a) 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, 233-241.
- Farnworth PG, Robertson DM, de Kretser DM and Burger HG. (1988b) Effects of 31 kilodalton bovine inhibin on follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in rat pituitary cells in vitro: actions under basal conditions. *Endocrinology.* 122, 207-213.
- Ferin M, Dyrenfurth I, Cowchock S, Warren M and Wiele RL. (1974) Active immunization to 17 beta-estradiol and its effects upon the reproductive cycle of the rhesus monkey. *Endocrinology.* 94, 765-776.
- Ferraretti AP, Garcia JE, Acosta AA and Jones GS. (1983) Serum luteinizing hormone during ovulation induction with human menopausal gonadotropin for in vitro fertilization in normally menstruating women. *Fertil Steril.* 40, 742-747.
- Filicori M, Flamigni C, Campaniello E, Ferrari P, Meriggiola MC, Michelacci L, Pareschi A and Valdiserri A. (1989) Evidence for a specific role of GnRH

- pulse frequency in the control of the human menstrual cycle. *Am J Physiol.* 257(6 Pt 1):E930-936.
- Filicori M, Santoro N, Merriam GR and Crowley WF Jr (1986) Characterization of the physiological pattern of episodic gonadotropin secretion throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 62, 1136-1144.
- Fortune JE, Rivera JM and Yang MY (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in the selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci.* 83, 109-126.
- Foulkes NS and Sassone-Corsi P. (1992) More is better: activators and repressors from the same gene. *Cell.* 68,411-414.
- Fowler PA and Price CA. (1997) Follicle-stimulating hormone stimulates circulating gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor bioactivity in cows. *Biol Reprod.* 57, 278-85.
- Fowler PA and Spears N. (2004) The cultured rodent follicle as a model for investigations of gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) production. *Reproduction.* 127, 679-688.
- Fowler PA and Templeton A. (1996) The nature and function of putative gonadotropin surge-attenuating/inhibiting factor (GnSAF/IF). *Endocr Rev.* 17, 103-120.
- Fowler PA, Messinis IE and Templeton AA. (1990) Inhibition of LHRH-induced LH and FSH release by gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) from human follicular fluid. *J. Reprod. Fert.* 90, 587-594.
- Fowler PA, Townsend C, Messinis IE, 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.
- Fowler PA, Templeton A and Messinis IE. (1993) The ovarian modulation of gonadotrophin releasing hormone-induced luteinizing hormone secretion in women. *Hum Reprod.* 8 Suppl 2:112-116.
- Fowler PA, Cunningham P, Fraser M, MacGregor F, Byrne B, Pappas A, Messinis IE and Templeton A. (1994a) Circulating gonadotrophin surge-attenuating factor from superovulated women suppresses in vitro gonadotrophin-releasing hormone self-priming. *J Endocrinol.* 143, 45-54.
- Fowler PA, Fraser M, Cunningham P, Knight PG, Byrne B, McLaughlin EA, Wardle PG, Hull MG and Templeton A. (1994b) Higher gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is found in small follicles from superovulated women. *J Endocrinol.* 143, 33-44.

Fowler PA, Fahy U, Culler MD, Knight PG, Wardle PG, McLaughlin EA, Cunningham P, Fraser M, Hull MG and Templeton A. (1995) Gonadotrophin surge-attenuating factor bioactivity is present in follicular fluid from naturally cycling women. *Hum Reprod.* 10, 68-74.

Fowler PA, Sorsa T, Harris WJ, Knight PG and Mason HD. (2001) Relationship between follicle size and gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous cycles in women. *Hum Reprod.* 16, 1353-1358.

Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Cash P, Dunbar B, Melvin W, Wilson Y, Mason HD 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.

Fowler PA, Sorsa-Leslie T, Harris W and Mason HD (2003) Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research? *Reproduction.* 126, 689-99.

Franks S, Mason H and Willis D. (2000) Follicular dynamics in the polycystic ovary syndrome. *Mol Cel Endocrinol.* 163, 49-52.

Fritz MA, and Speroff L. (1983) Current concepts of the endocrine characteristics of normal menstrual function: the key to diagnosis and management of menstrual disorders. *Clin Obstet Gynecol.* 26, 647-689.

Geiger JM, Plas-Roser S and Aron C. (1980) Mechanisms of ovulation in female rats treated with FSH at the beginning of the estrous cycle: changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone (LHRH). *Biol Reprod.* 22, 837-845.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA and Chin WW. (1990) Molecular biology of the pituitary gonadotropins. *Endocr Rev.* 11, 177-99.

Goodman RL and Knobil E. (1981) The sites of action of ovarian steroids in the regulation of LH secretion. *Neuroendocrinology.* 32, 57-63.

Gorin MB, Cooper DL, Eiferman F, van de Rijn P and ilghman SM. (1981) The evolution of α -Fetoprotein and Albumin. *J. Biol. Chem.* 256, 1954-1959.

Gougeon A. (1986) Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1, 81-87.

Gregg DW, Schwall RH and Nett TM. (1991) Regulation of gonadotropin secretion and number of gonadotropin-releasing hormone receptors by inhibin, activin-A and estradiol. *Biol Reprod.* 44, 725-732.

Groome NP, Illingworth PJ, O'Brien M, Pai R, Rodger FE, Mather JP and McNeilly AS. (1996) Measurement of dimeric inhibin B throughout the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 1401-1405.

- Guertin M, Baril P, Bartkowiak J, Anderson A and Belanger L. (1983) Rapid suppression of alpha 1-fetoprotein gene transcription by dexamethasone in developing rat liver. *Biochemistry*. 22, 4296-42302.
- Harper ME and Dugaiczky A. (1983) Linkage of the evolutionarily-related serum albumin and alpha-fetoprotein genes within q11-22 of human chromosome 4. *Am J Hum Genet*. 35, 565-572.
- Hausdorff WP, Pitcher JA, Luttrell DK, Linder ME, Kurose H, Parsons SJ, Caron MG and Lefkowitz RJ. (1992) Tyrosine phosphorylation of G protein alpha subunits by pp60c-src. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 5720-5724.
- Hawes BE, Marzen JE, Waters SB and Conn PM. (1992a) Sodium fluoride provokes gonadotrope desensitization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and gonadotrope sensitization to A23187: evidence for multiple G proteins in GnRH action. *Endocrinology*. 130, 2465-2475.
- Hawes BE, Waters SB, Janovick JA, Bleasdale JE and Conn PM. (1992b) Gonadotropin-releasing hormone-stimulated intracellular Ca^{2+} fluctuations and luteinizing hormone release can be uncoupled from inositol phosphate production. *Endocrinology*. 130, 3475-3483.
- Hillier SG, Wickings EJ, Illingworth PI, Yong EL, Reichert LE Jr, Baird DT and McNeilly AS. (1991). Control of immunoactive inhibin production by human granulosa cells. *Clin Endocrinol*. 35, 71-78.
- Hodgen GD. (1982) The dominant ovarian follicle. *Fertil Steril*. 38, 281-300.
- Hoff JD, Lasley BL, Wang CF and Yen SS. (1977) The two pools of pituitary gonadotropin: regulation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 44, 302-312.
- Hoff JD, Quigley ME and Yen SS. (1983) Hormonal dynamics at midcycle: a reevaluation. *J Clin Endocrinol Metab*. 57, 792-796.
- Hsueh AJ, Billing H, and Tsafiriri A. (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonal controlled apoptotic process. *Endocr. Rev*. 15, 707-724.
- genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet*. 27, 383-391.
- Huang ES and Miller WL. (1980) Effects of estradiol-17S on basal and luteinising hormone releasing hormone-induced secretion of luteinising hormone and follicle stimulating hormone by ovine pituitary cell culture. *Biol Reprod*. 23,124-134.
- Huang DP, Schwartz CE, Chiu JF and Cook JR. (1984) Dexamethasone inhibition of rat hepatoma growth and alpha-fetoprotein synthesis. *Cancer Res*. 44, 2976-2980.

- Jagodzinski LL, Sargent TD, Yang M, Glackin C and Bonner J (1981) Sequence homology between RNAs encoding rat alpha-fetoprotein and rat serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3521-3525.
- Jamnongjit M and Hammes SR. (2005) Oocyte maturation: The coming age of a germ cell. *Semin Reprod Med.* 23, 234-241.
- Jochheim A, Hilleman T., Kania G, Scharf J, Attaran M, Manns MP, Wobus AM and Ott M. (2004) *Int. J. Dev. Biol.* 48, 23-29.
- Judd S, Terry A, Petrucco M and White G. (1992) The source of pulsatile secretion of progesterone during the human follicular phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 74, 299-305.
- Kaiser UB, Lee BL, Carroll RS, Unabia G, Chin WW and Childs GV. (1992) Follistatin gene expression in the pituitary: localization in gonadotropes and folliculostellate cells in diestrous rats. *Endocrinology.* 130, 3048-3056.
- Kaiser UB, Jakubowiak A, Steinberger A and Chin WW. (1997) Differential effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulse frequency on gonadotropin subunit and GnRH receptor messenger ribonucleic acid levels in vitro. *Endocrinology.* 138, 1224-1231.
- Kalra SP and Kalra PS. (1983) Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. *Endocr Rev.* 4, 311-351.
- Kaltsas T, Pontikides N, Krassas GE, Seferiadis K, Lolis D and Messinis IE. (1999) Growth hormone response to thyrotrophin releasing hormone in women with polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod.* 14, 2704-2708.
- Karamouti M, Kollia P, Karligiotou E, Kallitsaris A, Prapas N, Kollios G, Seferiadis K, Vamvakopoulos N and Messinis IE. (2003) Absence of leptin expression and secretion by human luteinized granulosa cells. *J Mol Endocrinol.* 31, 233-239.
- Katayama T, Shiota K and Takahashi M. (1990) Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. *Mol Cell Endocrinol.* 69, 179-185.
- Kenigsberg D, Rosenwaks Z and Hodgen D. (1992) The ovary: Development and control of follicular maturation and ovulation. In: Kelly WN (ed) *Textbook of internal Medicine.* JB Lippincott Company. Philadelphia. vol 2:1915-1921.
- Kirk SE, Dalkin AC, Yasin M, Haisenleder DJ and Marshall JC. (1994) Gonadotropin-releasing hormone pulse frequency regulates expression of pituitary follistatin messenger ribonucleic acid: a mechanism for differential gonadotrope function. *Endocrinology.* 135, 876-80.

Kita M, Taii S, Kataoka N, Shimatsu A, Nakao K and Mori T. (1994) Changes of gonadotrophin surge inhibiting/attenuating factor activity in pig follicular fluid in relation to follicle size. *J Reprod Fertil.* 101, 59-66.

Knight PG, Castillo RJ, Glencross RG, Beard AJ and Wrathall JH. (1990) Isolation of bovine ovarian inhibin, its immunoneutralization in vitro and immunolocalization in bovine ovary. *Domest Anim Endocrinol.* 7, 299-313.

Knobil E, Plant TM, Wildt L, Belchetz PE and Marshall G. (1980) Control of the rhesus monkey menstrual cycle: permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science.* 207, 1371-1373.

Kogawa K, Nakamura T, Sugino K, Takio K, Titani K and Sugino H. (1991) Activin-binding protein is present in pituitary. *Endocrinology.* 128, 1434-1440.

Koppenaar DW, Tijssen AM, van Dieten JA and de Koning J. (1991) The self-priming action of LHRH is under negative FSH control through a factor released by the ovary: observations in female rats in vivo. *J Endocrinol.* 129, 205-211.

Koppenaar DW, van Dieten JA, Tijssen AM and de Koning J. (1993) Induction of the gonadotrophin surge-inhibiting factor by FSH and its elimination: a sex difference in the efficacy of the priming effect of gonadotrophin-releasing hormone on the rat pituitary gland. *Endocrinol.* 138, 191-201.

Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS and Schuetz E. (2001) Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 27, 383-391.

Kwok S and Higuchi R. (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature.* 339, 237-238.

Lagace L, Labrie F, Lorenzen J, Schwartz NB and Channing CP. (1979) Selective inhibitory effect of porcine follicular fluid on follicle stimulating hormone secretion in anterior pituitary cells in culture. *Clin Endocrinol.* 10, 401-405.

Lamba V, Yasuda K, Lamba JK, Assem M, Davila J, Strom S, and Schuetz EG. (2004) PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators. *Toxicol Appl Pharmacol.* 199, 251-265.

Lasley BL, Wang CF and Yen SS. (1975) The effects of estrogen and progesterone on the functional capacity of the gonadotrophs. *J Clin Endocrinol Metab.* 41, 820-826.

Law SW and Dugaiczky A. (1981) Homology between the primary structure of alpha-fetoprotein, deduced from a complete cDNA sequence, and serum albumin. *Nature*. 291, 201-205.

Lewin B. (1994) *Genes V*. Oxford University Press, London. Pp 137, 645, 911.

Lin X, Janovick JA and Conn PM. (1988) Mutations at the consensus phosphorylation sites in the third intracellular loop of the rat gonadotropin-releasing hormone receptor: effects on receptor ligand binding and signal transduction. *Biol Reprod*. 59, 1470-1476.

Littman BA and Hodgen GD. (1984) Human menopausal gonadotropin stimulation in monkeys: blockade of the luteinizing hormone surge by a highly transient ovarian factor. *Fertil Steril*. 41, 440-447.

Luk JM, Wang PP, Lee CK, Wang, JH and Fan ST (2005) Hepatic potential of bone marrow stromal cells: Development of in vitro culture and intra-portal transplantation models. *J. Immunol. Methods*. 305, 39-47.

Mais V, Cetel NS, Muse KN, Quigley ME, Reid RL and Yen SS (1987) Hormonal dynamics during luteal-follicular transition. *J Clin Endocrinol Metab*. 64, 1109-1114.

Marshall JC and Griffin ML. (1993) The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod. Suppl* 2:57-61.

Marshall JC and Kelch RP. (1986) Gonadotropin-releasing hormone: role of pulsatile secretion in the regulation of reproduction. *N Engl J Med*. 315,1459-1468.

Marshall JC. (1992) Regulation of gonadotropin secretion. In: Kelly WN (ed) *Textbook of internal Medicine*. JB Lippincott Company. Philadelphia. vol 2:1903-1912.

Marshall JC and Barkan AL. (1992) Hypothalamic pituitary end organ interactions. In: Kelly WN (ed) *Textbook of internal Medicine*. JB Lippincott Company. Philadelphia. vol 2:1931.

Marshall JC and Odell WD. (1992) The menstrual cycle – hormonal regulation, mechanisms of anovulation and responses of the reproductive tract to steroid hormones. In: Kelly WN (ed) *Textbook of internal Medicine*. JB Lippincott Company. Philadelphia. vol 2:1941-1948.

Martinez F, Barri PN, Coroleu B, Tur R, Sorsa-Leslie T, Harris WJ, Groome NP, Knight PG and Fowler PA. (2002) Women with poor response to IVF have lowered circulating gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF) bioactivity during spontaneous and stimulated cycles *Hum Reprod*. 17, 634-640.

Mason HD, Mannaerts B, de Leeuw R, Willis DS and Franks S. (1993) Effects of recombinant human follicle stimulating hormone on cultured human granulosa cells: comparison with urinary gonadotrophins and actions in preovulatory follicles. *Hum Reprod.* 8, 1823-1827.

Mattheij JA, Swarts JJ, van der Heijden AJ, van Helvoort AL and Kusters IC. (1993) Advancement of meiotic resumption in graafian follicles reduces fertility in the rat. *Gynecol Obstet Invest.* 36, 129-135.

Mattheij JA, Swarts JJ, Hurks HM and Mulder K. (1994) Advancement of meiotic resumption in graafian follicles by LH in relation to preovulatory ageing of rat oocytes. *J Reprod Fertil.* 100, 65-70.

McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H and Hsueh AJ. (2001) Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod.* 64, 293-298.

McLachlan RI, Robertson DM, De Kretser DM and Burger HG. (1988) Advances in the physiology of inhibin and inhibin-related peptides. *Clin Endocrinol.* 29, 77-112.

McNatty KP, Makris A, DeGrazia C, Osathanondh R and Ryan KJ. (1979a) The production of progesterone, androgens, and estrogens by granulosa cells, thecal tissue, and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 49, 687-699.

McNatty KP, Smith DM, Makris A, Osathanondh R and Ryan KJ. (1979b) The microenvironment of the human antral follicle: interrelationships among the steroid levels in antral fluid, the population of granulosa cells, and the status of the oocyte in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 49, 851-860.

Messinis IE. (1997) Luteal function–luteolysis. *Ann N Y Acad Sci.* 816, 151-157.

Μεσσίνης ΙΕ. (2005). Επιστομή: Μαιευτική και Γυναικολογία. MD Communications. Αθήνα. Σελ 5-44.

Messinis IE. (2006) Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Update.* In press.

Messinis IE and Templeton A. (1986) The effect of pulsatile follicle stimulating hormone on the endogenous luteinizing hormone surge in women. *Clin Endocrinol.* 25, 633-640.

Messinis IE and Templeton AA. (1987a) Endocrine and follicle characteristics of cycles with and without endogenous luteinizing hormone surges during superovulation induction with pulsatile follicle-stimulating hormone. *Hum Reprod.* 2, 11-16.

Messinis IE and Templeton AA. (1987b) Effect of high dose exogenous oestrogen on midcycle luteinizing hormone surge in human spontaneous cycles. *Clin Endocrinol.* 27, 453-459.

Messinis IE and Templeton AA. (1988a) The endocrine consequences of multiple folliculogenesis. *J Reprod Fert (Suppl)* 36, 27-37.

Messinis IE and Templeton A. (1988b) Blockage of the positive feedback effect of oestradiol during prolonged administration of clomiphene citrate to normal women. *Clin Endocrinol.* 29, 509-516.

Messinis IE and Templeton AA. (1989) Pituitary response to exogenous LHRH in superovulated women. *J Reprod Fert* 87, 633-639.

Messinis IE and Templeton AA. (1990a) Prolactin secretion in women during the oestradiol induced luteinizing hormone surge with or without progesterone. *Clin Endocrinol.* 32, 755-761.

Messinis IE and Templeton AA. (1990b) Effects of supraphysiological concentrations of progesterone on the characteristics of the oestradiol-induced gonadotrophin surge in women. *J Reprod Fert.* 88, 513-519.

Messinis IE and Templeton A. (1990c) Superovulation induction in women suppresses luteinizing hormone secretion at the pituitary level. *Clin Endocrinol.* 32, 107-114.

Messinis IE and Templeton A. (1990d) In-vivo bioactivity of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol.* 33, 213-218.

Messinis IE and Templeton AA. (1990e) Anti-oestrogenic effect of clomiphene citrate in oestrogen-treated, hypogonadal women. *Hum Reprod.* 5, 150-152.

Messinis IE and Templeton AA. (1991a) Evidence that gonadotrophin surge-attenuating factor exists in man. *J. Reprod. Fert.* 92, 217-233.

Messinis IE and Templeton A. (1991b) Attenuation of gonadotrophin release and reserve in superovulated women by gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF). *Clin Endocrinol* 34, 259-263

Messinis IE, Templeton A and Baird DT. (1985) Endogenous luteinizing hormone surge during superovulation induction with sequential use of clomiphene citrate and pulsatile human menopausal gonadotropin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61, 1076-1080.

Messinis IE, Templeton A and Baird DT. (1986a) Endogenous luteinizing hormone surge in women during induction of multiple follicular development with pulsatile follicle stimulating hormone. *Clin Endocrinol.* 24,193-201.

Messinis IE, Templeton A and Baird DT. (1986b) 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.

Messinis IE, Milingos S, Zikopoulos K, Hasiotis G, Seferiadis K and Lolis D. (1988) Luteinizing hormone response to gonadotrophin-releasing hormone in normal women undergoing ovulation induction with urinary or recombinant follicle stimulating hormone. Hum Reprod. 13, 2415-2420.

Messinis IE, Hirsch P and Templeton AA. (1991) Follicle stimulating hormone stimulates the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in vivo. Clin Endocrinol. 35, 403-407.

Messinis IE, Mademtzis I, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K, Tsolas O and Templeton AA. (1992) Positive feedback effect of oestradiol in superovulated women. Hum Reprod, 7469-474.

Messinis IE, Koutsoyiannis D, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K, Lolis D and Templeton AA. (1993a) Changes in pituitary response to GnRH during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle. Clin Endocrinol. 38, 159-163.

Messinis IE, MacTavish A and Templeton AA. (1993b) Activity of gonadotrophin surge-attenuating factor during the luteal phase in superovulated women. J Reprod Fert. 97, 271-275.

Messinis IE, Lolis D, Papadopoulos L, Tsahalina Th, Papanikolaou N, Seferiadis K & Templeton AA (1993c) Effect of varying concentrations of follicle stimulating hormone on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) in women. Clin. Endocrinol. 39, 45-50.

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K and Templeton AA. (1994a) Effect of an increase in FSH on the production of gonadotrophin-surge-attenuating factor in women. J. Reprod. Fert. 101, 689-695.

Messinis IE, Lolis D, Papastergiopoulou L, Milingos S, Tsahalina E, Seferiadis K and Templeton AA. (1994b) Effect of follicle stimulating hormone treatment on the pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in post-menopausal women. Hum Reprod. 9,241-244

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Tsahalina E, Seferiadis K and Templeton AA. (1994c) Modulation of the action of gonadotrophin surge-attenuating factor by gonadotrophin-releasing hormone. Hum Reprod. 9, 1437-1441.

Messinis IE, Lolis D, Zikopoulos K, Milingos S, Kollios G, Seferiadis K and Templeton AA. (1996) Effect of follicle stimulating hormone or human chorionic gonadotrophin treatment on the production of gonadotrophin surge attenuating factor (GnSAF) during the luteal phase of the human menstrual cycle. Clin Endocrinol. 44, 169-75.

Messinis IE, Milingos S, Alexandris E, Mademtzis I, Kollios G and Seferiadis K. (2002) Evidence of differential control of FSH and LH responses to GnRH by ovarian steroids in the luteal phase of the cycle. *Hum Reprod* 17 299-303.

Mikkelsen M, Jacobsen P and Henningsen K. (1977) Possible localization of Gc-System on chromosome 4. Loss of long arm 4 material associated with father-child incompatibility within the Gc-System. *Hum Hered.* 2,105-107.

Minghetti PP, Ruffner DE, Kuang WJ, Dennison OE, Hawkins JW, Beattie WG and Dugaiczky A. (1986) Molecular structure of the human albumin gene is revealed by nucleotide sequence within q11-22 of chromosome 4. *J Biol Chem.* 261, 6747-6757.

Miro F and Aspinall LJ. (2005) The onset of the initial rise in follicle-stimulating hormone during the human menstrual cycle. *Hum Reprod.* 20, 96-100.

Miyake A, Tasaka K, Sakumoto T, Kawamura Y and Aono T. (1983) Estrogen induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in normal cyclic women. *J Clin Endocrinol Metab.* 56, 1100-1102.

Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG and Spears N. (2001) Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles in vitro. *Reproduction.* 121, 89-96.

Muttukrishna S and Knight PG. (1991) Inverse effects of activin and inhibin on the synthesis and secretion of FSH and LH by ovine pituitary cells in vitro. *J Mol Endocrinol.* 6, 171-178.

Muttukrishna S, Fowler PA, Groome N, Robertson WR and Knight PG. (1994) Serum concentrations of dimeric inhibin during the spontaneous human menstrual cycle and after treatment with exogenous gonadotrophin. *Hum Reprod.* 9,1634-1642.

Muttukrishna S, Fowler PA, George L, Groome NP and Knight PG. (1996) Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 3328-3334.

Nakamura T, Takio K, Eto Y, Shibai H, Titani K and Sugino H. (1990) Activin-binding protein from rat ovary is follistatin. *Science.* 247, 836-838.

Naor Z, Harris D and Shacham S. (1998) Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol.* 19,1-19.

Nippoldt TB, Reame NE, Kelch RP and Marshall JC. (1989) The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 69, 67-76.

Ortmann O, Asmus W, Diedrich K, Schulz KD and Emons G. (1999) Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating

polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *Eur J Endocrinol.* 140, 207-214.

Pappa A, Seferiadis K, Fotsis Th, Shevchenko of A, Marselos M, Tsolas O and Messinis IE. (1999a) Purification of α candidate gonadotrophin surge attenuating factor from human follicular fluid. *Hum. Reprod.* 14, 1449-1456.

Pappa A, Seferiadis K, Marselos M, Tsolas O and Messinis IE. (1999b) Development and application competitive ELISA assays for rat LH and FSH. *Theriogenology.* 51, 911-926.

Peters T Jr. (1970) Serum albumin. *Adv Clin Chem.* 13, 37-111.

Pierce JG and Parsons TF. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem.* 50, 465-495.

Plant PW, Deeley RG and Grieninger G (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 15355-15360.

Richards JS and Midgley AR Jr. (1976) Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol Reprod.* F14, 82-94.

Rivier C, Rivier J and Vale W. (1986) Inhibin-mediated feedback control of follicle-stimulating hormone secretion in the female rat. *Science.* 234, 205-208.

Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, Vale W, Rivier J, Burger HG and Yen SS. (1989) Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal-follicular transition of the human menstrual cycle *J Clin Endocrinol Metab.* 69, 1033-1039.

Sadatsuki M, Tsutsumi O, Sakai R, Eto Y, Hayashi N and Taketani Y. (1993) Presence and possible function of activin-like substance in human follicular fluid. *Hum Reprod.* 8, 1392-1395.

Shamay A, Homans R, Fuerman Y, Levin I, Barash H, Silanikove N and Mabeesh SJ. (2005) Expression of albumin in nonhepatic tissues and its synthesis by the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 88, 569-576.

Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning; a laboratory manual.* 2nd edn, The cold spring harbor laboratory press, USA. pp 6.3-6.20, 9.16-10.6, 10.1-10.2, 13.2, 18.52-18.60.

Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74, 5463-5467.

Schenken RS and Hodgen GD. (1983) Follicle-stimulating hormone induced ovarian hyperstimulation in monkeys: blockade of the luteinizing hormone surge. *J Clin Endocrinol Metab.* 57, 50-55.

Schenken RS and Hodgen GD. (1986) Follicle-Stimulating hormone blocks estrogen-positive feedback during the early follicular phase in monkeys. *Fertil Steril.* 45, 556-560.

Schenken RS, Anderson WH and Hodgen GD. (1984) Follicle-stimulating hormone increases ovarian vein nonsteroidal factors with gonadotropin-inhibiting activity. *Fertil Steril.* 42, 785-790.

Schneyer AL, O'Neil DA, and Crowley WF Jr. (1992) Activin-binding proteins in human serum and follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab.* 74, 1320-1324.

Schneyer AL, Fujiwara T, Fox J, Welt CK, Adams J, Messerlian M and Taylor AE. (2000) Dynamic changes in the intrafollicular inhibin/activin/Follistatin Axis during human follicular development: Relationship to circulating hormone concentrations *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3319-3330.

Schwall RH, Szonyi E, Mason AJ, and Nikolics K. (1988) Activin stimulates secretion of follicle-stimulating hormone from pituitary cells desensitized to gonadotropin-releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun.* 151, 1099-1104.

Sealfon SC, Weinstein H and Millar RP. (1997) Molecular mechanisms of ligand interaction with the gonadotropin-releasing hormone receptor. *Endocr Rev.* 18,180-205.

Shacham S, Harris D, Ben-Shlomo H, Cohen I, Bonfil D, Przedecki F, Lewy H, Ashkenazi IE, Seger R and Naor Z. (2001) Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. *Vitam Horm.* 63, 63-90.

Shoham Z, Schacter M, Loumaye E, Weissman A, MacNamee M and Insler V. (1995) The luteinizing hormone surge--the final stage in ovulation induction: modern aspects of ovulation triggering. *Fertil Steril.* 64, 237-251.

Sollenberger MJ, Carlsen EC, Booth RA Jr, Johnson ML, Veldhuis JD and Evans WS. (1990) Nature of gonadotropin-releasing hormone self-priming of luteinizing hormone secretion during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol.* 163, 1529-1534.

Sopelak VM and Hodgen GD. (1984) Blockade of the estrogen-induced luteinizing hormone surge in monkeys: a nonsteroidal, antigenic factor in porcine follicular fluid. *Fertil Steril.* 41, 108-113.

Sorsa-Leslie T, Mason HD, Harris WJ and Fowler PA. (2005) Selection of gonadotrophin surge attenuating factor phage antibodies by bioassay. *Reprod Biol Endocrinol.* 26, 3:49.