

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ –**  
**ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ**  
**ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ**

***ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ***

**Συμβουλευτική επιτροπή:**  
**Ρογδάκης, Ε. Καθηγητής**  
**Μπιζέλης, Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής**  
**Πολίτης, Ι. Καθηγητής**

**Αθήνα, Νοέμβριος 2009**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ**  
**ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΕΙΔΙΚΗΣ ΖΩΟΤΕΧΝΙΑΣ**

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ – ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ**  
**ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ: Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ**  
***ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ***

Εξεταστική επιτροπή:  
Δεληγεώργης, Σ. Καθηγητής  
Ζέρβας, Γ. Καθηγητής  
Κανδαράκης, Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής  
Μπιζέλης, Ι. Αναπληρωτής Καθηγητής  
Οικονομόπουλος, Ι. Επίκουρος Καθηγητής  
Πολίτης, Ι. Καθηγητής  
Ρογδάκης, Ε. Καθηγητής

Αθήνα, Νοέμβριος 2009

Η εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε την πιο επίπονη αλλά συγχρόνως την πλουσιότερη σε εμπειρίες περίοδο της ζωής μου. Η επιστημονική μου κατάρτιση ως βιοχημικός εμπλουτίστηκε, καθώς ήρθα σε επαφή με ένα διαφορετικό χώρο, αυτόν της ζωικής παραγωγής. Οι πολύτιμες γνώσεις και εμπειρίες, τις οποίες αποκόμισα, με έκαναν να αγαπήσω και να αφοσιωθώ στην επιστήμη της ζωικής παραγωγής. Καθοριστικό ρόλο σε αυτό συνετέλεσε η συνεργασία μου με ανθρώπους καταξιωμένους στο χώρο οι οποίοι, ο καθένας με ξεχωριστό τρόπο, με βοήθησαν να φέρω εις πέρας την προσπάθειά μου. Θεωρώ, λοιπόν, χρέος μου να ευχαριστήσω όλους αυτούς και πιο συγκεκριμένα τους:

- κ. Ρογδάκη Εμμανουήλ, Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής, για την καθοδήγηση και την πολύτιμη υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

- κ. Πολίτη Ιωάννη, του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, για την επιλογή του θέματος, την υπομονή που έδειξε κατά τη διαδικασία της συγγραφής της παρούσας διατριβής αλλά κυρίως για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

- κ. Μπιζέλη Ιωσήφ, Αναπληρωτή Καθηγητή του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, για τις καίριες παρατηρήσεις και συμβουλές του κατά τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης.

- κ. Δεληγεώργη Στυλιανό, Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, για τα θετικά και ενθαρρυντικά του σχόλια κατά τη συγγραφή της μελέτης.

- κ. Ζέρβα Γεώργιο, Καθηγητή και Διευθυντή του εργαστηρίου Διατροφής Αγροτικών Ζώων, για τις χρήσιμες υποδείξεις του κατά τη διόρθωση της παρούσας διατριβής.

- κ. Κανδαράκη Ιωάννη, Αναπληρωτή Καθηγητή του εργαστηρίου Γαλακτοκομίας, ο οποίος δυστυχώς έφυγε από κοντά μας λίγες ημέρες πριν την υποστήριξη της διατριβής μου, για τις παρατηρήσεις και τις υποδείξεις του κατά τη διόρθωση της παρούσας διατριβής.

- κ. Οικονομόπουλο Ιωάννη, Επίκουρο Καθηγητή του εργαστηρίου Ανατομίας και Φυσιολογίας Αγροτικών Ζώων για τα εύστοχα σχόλια και παρατηρήσεις κατά τη διόρθωση της παρούσας διατριβής.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του τμήματος Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών και ειδικότερα του εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας, καθώς από την πρώτη μέρα με «αγκάλιασαν» και με βοήθησαν να αισθανθώ σαν να ήμουν χρόνια στο χώρο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αγαπητό φίλο Στέφο Γεώργιο, Γεωπόνο, για τις ατελείωτες εποικοδομητικές και μη συζητήσεις σε επιστημονικά και άλλα θέματα και τον αγαπητό φίλο Λαμπιδώνη Αντώνιο, Γεωπόνο, για τις συζητήσεις μας, τις διαφωνίες μας αλλά και τη προθυμία του να με βοηθήσει σε δύσκολες στιγμές στο εργαστήριο.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τη σύντροφο μου Νικολέτα για τη στήριξη και την κατανόηση τους.

Νοέμβριος, 2009

**Γεώργιος Θεοδώρου**

**ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ**

A/A	Τίτλος	Σελίδα
<b>A</b>	<b>Περίληψη</b>	<b>A1</b>
<b>B</b>	<b>Abstract</b>	<b>A2</b>
<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Περιγραφή του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1</b>	Βασικές αρχές	<b>1</b>
<b>1.1.2</b>	Πλασμινογόνο - Πλασμίνη	<b>2</b>
<b>1.1.3</b>	Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου	<b>4</b>
<b>1.1.4</b>	Αναστολείς των Ενεργοποιητών του Πλασμινογόνου	<b>6</b>
<b>1.1.5</b>	Αναστολείς της Πλασμίνης	<b>8</b>
<b>1.1.6</b>	Ο Υποδοχέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου τύπου Ουροκινάσης (ΥΕΠ-Ο)	<b>8</b>
<b>1.1.7</b>	Υποδοχείς του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου Ιστικού τύπου	<b>10</b>
<b>1.1.8</b>	Υποδοχείς του πλασμινογόνου	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Φυσιολογική σημασία του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου</b>	<b>12</b>
<b>1.2.1</b>	Σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου και γαλακτοπαραγωγή – παλινδρόμηση του μαστού	<b>12</b>
<b>1.2.1.1</b>	Παλινδρόμηση του μαστού	<b>12</b>
<b>1.2.1.2</b>	Έκφραση των γονιδίων – παραγωγή πρωτεϊνών του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο μαστό	<b>14</b>

1.2.1.3	Μεταβολές των επιπέδων των πρωτεϊνών του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο αγελαδινό και πρόβειο γάλα	17
1.2.2	Το σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου στο λιπώδη ιστό	23
1.3	<b>Συμπεράσματα</b>	<b>28</b>
2	<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	<b>30</b>
2.1	<b>Εισαγωγή – Σκοπός διδακτορικής διατριβής</b>	<b>30</b>
2.2	<b>Πρώτο Πείραμα: «Ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης και ο υποδοχέας του στο πρόβατο: κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός των cDNAs και μελέτη έκφρασης των γονιδίων σε διαφόρους ιστούς»</b>	<b>31</b>
2.2.1	Υλικά και μέθοδοι	31
2.2.1.1	Διαλύματα	31
2.2.1.2	Κλωνοποίηση των cDNAs των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο και in silico επεξεργασία	31
2.2.1.2.1	Απομόνωση ουδετερόφιλων	32
2.2.1.2.1	Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή	32
2.2.1.2.1	Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	33
2.2.1.2.1	Ενίσχυση των μέσων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	34
2.2.1.2.1	Ενίσχυση των ακραίων τμημάτων	36
2.2.1.2.1	Ηλεκτροφόρηση DNA και απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης	37
2.2.1.2.1	Εισαγωγή των τμημάτων DNA σε πλασμίδια φορείς	38
2.2.1.2.1	Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων	38

2.2.1.2.1	Αλληλούχιση των θετικών κλώνων	39
2.2.1.2.1	Χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής	39
2.2.1.3	Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο σε ιστούς προβάτου	40
2.2.1.3.1	Ζωικό υλικό	40
2.2.1.3.2	Δειγματοληψία ιστών και οργάνων	40
2.2.1.3.3	Απομόνωση RNA	41
2.2.1.3.4	Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής	41
2.2.1.3.5	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)	41
2.2.1.3.6	Στατιστική ανάλυση	43
2.2.2	Αποτελέσματα και σχολιασμός	44
2.2.2.1	Κλωνοποίηση των cDNAs του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο	44
2.2.2.1.1	Κλωνοποίηση των μεσαίων τμημάτων των cDNAs	44
2.2.2.1.2	Κλωνοποίηση των ακραίων τμημάτων των cDNAs	46
2.2.2.1.3	Χαρακτηρισμός των cDNAs του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο	48
2.2.2.2	Πρωτεϊνικά προϊόντα των cDNAs των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο	53
2.2.2.2.1	Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΕΠ-Ο	53
2.2.2.2.2	Φυλογενετική ανάλυση του ΕΠ-Ο	55
2.2.2.2.3	Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο	55

2.2.2.2.4	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο	56
2.2.2.2.5	Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο	57
2.2.2.2.6	Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΥΕΠ-Ο	59
2.2.2.2.7	Φυλογενετική ανάλυση του ΥΕΠ-Ο	61
2.2.2.2.8	Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο	61
2.2.2.2.9	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο	62
2.2.2.2.10	Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο	63
2.2.2.3	Μελέτη της έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο πρόβατο	65
2.2.2.3.1	Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο με την εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR	65
2.2.2.3.2	Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό	68
2.3	<b>Δεύτερο Πείραμα: «Οι δύο αναστολείς του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου ουροκινάσης (ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2) στο πρόβατο: κλωνοποίηση και χαρακτηρισμός των cDNAs και μελέτη έκφρασης των γονιδίων σε διαφόρους ιστούς»</b>	71
2.3.1	Υλικά και μέθοδοι	71
2.3.1.1	Κλωνοποίηση των cDNAs των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 και in silico επεξεργασία	71
2.3.1.1.1	Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	71
2.3.1.1.2	Ενίσχυση των μέσων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	72
2.3.1.1.3	Ενίσχυση των ακραίων τμημάτων	74

2.3.1.2	Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 σε ιστούς προβάτου	74
2.3.1.2.1	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)	74
2.3.2	Αποτελέσματα και σχολιασμός	76
2.3.2.1	Κλωνοποίηση των cDNAs του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2	76
2.3.2.1.1	Κλωνοποίηση των μεσαίων τμημάτων των cDNAs	76
2.3.2.1.2	Κλωνοποίηση των ακραίων τμημάτων των cDNAs	77
2.3.2.1.3	Χαρακτηρισμός των cDNAs του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2	79
2.3.2.2	Πρωτεϊνικά προϊόντα των cDNAs των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2	84
2.3.2.2.1	Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΑΕΠ-1	84
2.3.2.2.2	Φυλογενετική ανάλυση του ΑΕΠ-1	86
2.3.2.2.3	Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-1	86
2.3.2.2.4	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-1	87
2.3.2.2.5	Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-1	87
2.3.2.2.6	Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΑΕΠ-2	89
2.3.2.2.7	Φυλογενετική ανάλυση του ΑΕΠ-2	91
2.3.2.2.8	Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-2	91
2.3.2.2.9	Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-2	92
2.3.2.2.10	Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-2	92



2.3.2.3	Μελέτη της έκφρασης των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο πρόβατο	94
2.3.2.3.1	Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 με την εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR	94
2.3.2.3.2	Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό	96
2.4	<b>Τρίτο Πείραμα: «Μελέτη της συμπεριφοράς του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα»</b>	99
2.4.1	Υλικά και μέθοδοι	99
2.4.1.1	Ζωικό υλικό	99
2.4.1.2	Ανάλυση δειγμάτων γάλακτος	99
2.4.1.2.1	Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη και σωματικά κύτταρα	99
2.4.1.2.2	Προσδιορισμός ενεργότητας πλασμίνης και πλασμινογόνου	100
2.4.1.2.3	Προσδιορισμός ενεργότητας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου	100
2.4.1.3	Στατιστική ανάλυση	101
2.4.2	Αποτελέσματα και σχολιασμός	103
2.4.2.1	Επίδραση της φυλής στη γαλακτοπαραγωγή και τη σύσταση του γάλακτος	103
2.4.2.2	Επίδραση της φυλής στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου	105
2.4.2.3	Επίδραση του σταδίου της γαλακτοπαραγωγής στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου	107
2.4.2.4	Σχέσεις μεταξύ του αριθμού των σωματικών κυττάρων και του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου	109
3	<b>ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ &amp; ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	112

4	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>117</b>
	<b>Σύντομο Βιογραφικό σημείωμα</b>	<b>133</b>

**ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ  
ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ – ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ: Ο  
ΡΟΛΟΣ ΤΟΥΣ ΣΤΟ ΜΑΣΤΟ**

**ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών. Εργαστήριο  
Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας. Ιερά οδός 75, Αθήνα. erog@aia.gr*

**A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (ΠΓ) παίζει σημαντικό ρόλο σε μία πληθώρα φυσιολογικών φαινομένων, τα οποία χαρακτηρίζονται από σημαντικά επίπεδα πρωτεόλυσης. Η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη (ΠΛ) ελέγχεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ΕΠ) και των αναστολέων των ΕΠ (ΑΕΠ). Ο ΕΠ τύπου ουροκινάσης (ΕΠ-Ο) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πρωτεολυτικές διεργασίες που συνδέονται με διάφορα φαινόμενα ιστικής ανακατασκευής (π.χ. παλινδρόμηση του μαστού). Οι σημαντικότεροι ΑΕΠ είναι ο ΑΕΠ-1 και ο ΑΕΠ-2. Ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας του συστήματος είναι ο υποδοχέας του ΕΠ-Ο (ΥΕΠ-Ο), ο κύριος ρόλος του οποίου είναι η μεταφορά της πρωτεολυτικής δραστηριότητας στην επιφάνεια του κυττάρου.

Ο σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η κλωνοποίηση και η *in silico* επεξεργασία των cDNAs των ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο πρόβατο, μελέτη της έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων σε διάφορα όργανα και ιστούς κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο του προβάτου και ο προσδιορισμός των παραγόντων που επηρεάζουν το σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα τριών ελληνικών φυλών προβάτου.

Το cDNA του ΕΠ-Ο του προβάτου αποτελείται από 2.350 ζεύγη βάσεων (bp). Το cDNA του ΥΕΠ-Ο του προβάτου αποτελείται από 1.247 bp. Το cDNA του ΑΕΠ-1 του προβάτου αποτελείται από 1.460 bp. Το cDNA του ΑΕΠ-2 του προβάτου αποτελείται από 1.251 ζεύγη βάσεων. Με τη χρήση της Real Time PCR διαπιστώθηκε έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων στο λιπώδη ιστό του προβάτου. Η παρατήρηση αυτή γίνεται για πρώτη φορά σε οποιονδήποτε οργανισμό. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των ΕΠ-Ο (7x), ΥΕΠ-Ο (8,5x), ΑΕΠ-1 (31x) και ΑΕΠ-2 (90x) στο μαστό κατά την ξηρά περίοδο σε σύγκριση με τη γαλακτοπαραγωγή.

Όσον αφορά τη συμπεριφορά του συστήματος στο πρόβειο γάλα, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών φυλών. Ο λόγος ΠΓ/ΠΛ ήταν χαμηλότερος στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, υποδηλώνοντας υψηλότερο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Τέλος, παρατηρήθηκε μείωση των τιμών ενεργότητας του ΠΓ και του ΕΠ, καθώς και του λόγου ΠΓ/ΠΛ στο γάλα του τελευταίου σταδίου της γαλακτοπαραγωγής σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στο γάλα των δύο προηγούμενων σταδίων.

**Λέξεις κλειδιά:** Πλασμίνη, Πλασμινογόνο, μαστός, παλινδρόμηση, λιπώδης ιστός, γάλα

**ISOLATION OF THE OVINE cDNAs OF THE GENES INVOLVED  
IN THE PLASMIN-PLASMINOGEN SYSTEM: THEIR ROLE IN  
THE MAMMARY GLAND**

**THEODOROU GEORGIOS**

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών. Εργαστήριο  
Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας. Ιερά οδός 75, Αθήνα. erog@aia.gr*

**B. ABSTRACT**

The activation of plasminogen (PG) plays a crucial role in a variety of extracellular proteolytic events. The conversion of plasminogen to plasmin (PL) is controlled by an interplay between plasminogen activators (PA) and PA inhibitors (PAI). Urokinase PA (u-PA) is thought to play a crucial role in proteolytic events that accompany various tissue remodeling events (i.e. involution of the mammary gland). The most important, fast acting, PAI have been designated PAI-1 and PAI-2. Another important component of the plasmin – plasminogen system is the receptor for u-PA (u-PAR). The primary function of u-PAR is to localize plasminogen activation at the cell surface.

The objective of the present thesis was the isolation, molecular cloning and *in silico* characterization of the full-length cDNAs of u-PA, u-PAR, PAI-1 and PAI-2, the study of the expression of these genes in various ovine tissues during lactation and involution and the investigation of the factors that affect the the plasmin – plasminogen system in milk obtained from three Greek breeds of dairy sheep.

The ovine u-PA cDNA comprised of 2,350 bp. The ovine u-PAR cDNA is comprised of 1,247 bp. The ovine PAI-1 cDNA comprised of 1,460 bp. The ovine PAI-2 cDNA is comprised of 2,128 bp. Real Time PCR revealed expression of all four genes in the adipose tissue. This is the first study reporting expression of these four genes in the adipose tissue in any species. Furthermore, higher levels of gene expression were observed for u-PA (7x), u-PAR (8.5x), PAI-1 (31x) and PAI-2 (90x) in involuting mammary tissue obtained from non-lactating ewes compared to that detected in mammary tissue obtained from lactating ewes.

Regarding the behavior of the plasmin-plasminogen system in ovine milk, no significant differences were observed between the three breeds. The ratio of PG:PL was lower in the high-SCC group compared with the low-SCC group, which indicates an increased rate of conversion of PG to PL for the high-SCC group. There was a decrease in PG and PA activities as well as in the PG:PL ratio in late lactation milk when compared with early or mid lactation milk.

**Keywords:** Plasmin, Plasminogen, mammary gland, involution, adipose tissue, milk

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΕ ΠΛΑΣΜΙΝΗ

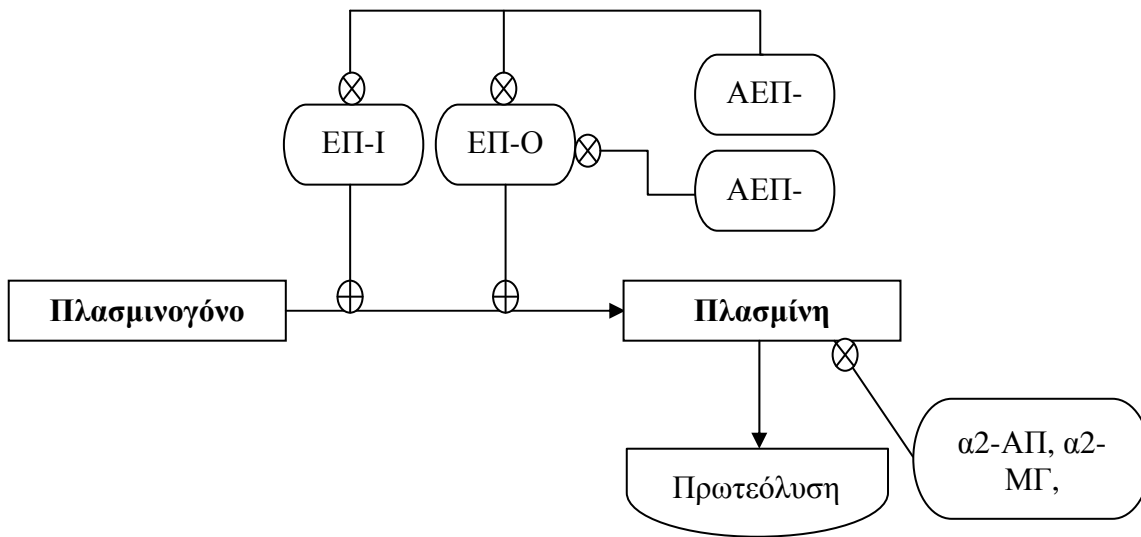
#### 1.1.1. Βασικές αρχές

Το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου ή σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου είναι ένα χρονικά ελεγχόμενο, πολλαπλών χρήσεων, ενζυμικό σύστημα. Η κύρια πρωτεΐνη του συστήματος είναι το πλασμινογόνο. Το πλασμινογόνο είναι ένα προένζυμο (ζυμογόνο) το οποίο δύναται να μετατραπεί στο ενεργό ένζυμο πλασμίνη, μέσω της δράσης των δύο ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ΕΠ), τύπου ουροκινάσης (ΕΠ-Ο) και ιστικού τύπου (ΕΠ-Ι). Η πλασμίνη ανήκει σε μία ευρύτερη ομάδα ενζύμων που ονομάζονται πρωτεΐνάσες τύπου σερίνης. Το ανενεργό ζυμογόνο πλασμινογόνο μετατρέπεται στο ενεργό ένζυμο της πλασμίνης μέσω της διάσπασης του πρωτεϊνικού δεσμού μεταξύ των αμινοξέων αργινίνης<sup>560</sup> και βαλίνης<sup>561</sup> στον άνθρωπο (Robbins et al. 1967, Sottrup-Jensen et al. 1975) και του δεσμού αργινίνης<sup>557</sup>-ισολευκίνης<sup>558</sup> στα βοοειδή (Schaller et al. 1985). Οι δύο ανωτέρω ΕΠ (ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι) είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων.

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη αναστέλλεται μέσω της δράσης δύο ειδικών αναστολέων των ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι (ΑΕΠ). Οι δύο ειδικοί αναστολείς, ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 1 (ΑΕΠ-1) και ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου τύπου 2 (ΑΕΠ-2) είναι προϊόντα δύο διαφορετικών γονιδίων (Bachmann 1987, Vassalli et al. 1991, Ny et al. 1993). Τέλος, η ενεργοποίηση του συστήματος μπορεί να ανασταλεί και στο επίπεδο της πλασμίνης. Η δράση της πλασμίνης αναστέλλεται από τον ειδικό αναστολέα της πλασμίνης  $\alpha_2$ -αντιπλασμίνη ( $\alpha_2$ -ΑΠ) καθώς και από μη ειδικούς αναστολείς, όπως η  $\alpha_2$ -μακρογλοβουλίνη ( $\alpha_2$ -ΜΓ) και η νεξίνη πρωτεΐνάσης τύπου 1 (ΠΝ-1). Οι δύο πρώτοι αναστολείς ( $\alpha_2$ -ΑΠ και  $\alpha_2$ -ΜΓ) απαντώνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις και υπολογίζεται ότι αποτελούν το 10% των πρωτεϊνών του πλάσματος (Saksela and Rifkin 1988). (Σχήμα 1)

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη ελέγχεται και σε κυτταρικό επίπεδο από την παρουσία ενός ειδικού υποδοχέα για τον ΕΠ-Ο. Ο Υποδοχέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου τύπου Ουροκινάσης (ΥΕΠ-Ο) απαντάται στην κυτταρική μεμβράνη διαφόρων τύπων κυττάρων μεταξύ των οποίων είναι: τα επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού (Politis 1996, Hildenbrand and Arens 2004), τα μακροφάγα και ουδετερόφιλα (Politis et al. 2002a, Politis et al. 2002b), τα αγγειακά επιθηλιακά κύτταρα (Mignatti et al. 1991), τα πνευμονικά ινοβλαστικά κύτταρα (Shetty et al. 1996), τα κύτταρα του ενδομητρίου και οι συγκυτιοτροφοβλάστες στον πλακούντα (Nishida et al. 1998), κύτταρα των όρχεων

(Huang et al. 2007), κ.α. Η παρουσία του ΥΕΠ-Ο θεωρείται εξαιρετικά σημαντική, διότι περιορίζει χωροταξικά την ενεργοποίηση του πλασμινογόνου στην επιφάνεια των κυττάρων.

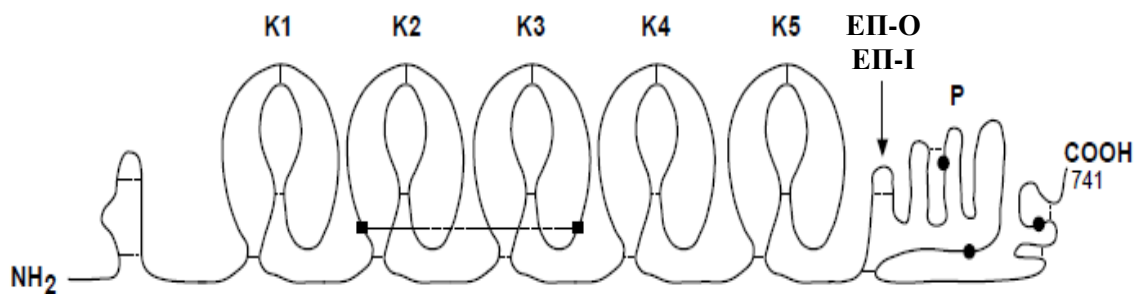


**Σχήμα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου και του ρόλου τους στην ενεργοποίηση του συστήματος (⊕=ενεργοποίηση, ⊗=αναστολή)

### 1.1.2. Πλασμινογόνο - Πλασμίνη

Το γονίδιο του πλασμινογόνου στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 6q26 (NCBI Gene ID: 5340), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 9 (NCBI Gene ID: 280897). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 19 εξόνια και 17 ιντρόνια. Το μετάγραφο του γονιδίου στον άνθρωπο αποτελείται από 2.759 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 2.433 νουκλεοτίδια (Murray et al. 1987). Στα βοοειδή το μετάγραφο αποτελείται από 2.770 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 2.439 νουκλεοτίδια (Berglund et al. 1995).

Το πλασμινογόνο απαντάται ως μία γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας και αποτελείται στον άνθρωπο από 791 αμινοξέα και κατά 2% από υδατάνθρακες, ενώ το μοριακό του βάρος ανέρχεται στα 92 kDa. Στα βοοειδή αποτελείται από 786 αμινοξέα και το μοριακό του βάρος ανέρχεται στα 90 kDa. Το μόριο του πλασμινογόνου αποτελείται από έξι δομικές περιοχές, με διαφορετικές ιδιότητες (Henkin et al. 1991, Ponting et al. 1992) (Σχήμα 2).



**Σχήμα 2:** Η δομή του πλασμινογόνου του ανθρώπου

Το μόριο του πλασμινογόνου αποτελείται από πέντε δομές τύπου Kringle (K1 έως K5) και την περιοχή της πρωτεΐνωσης σερίνης (P). Η μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη επιτυγχάνεται μέσω της διάσπασης του πεπτιδικού δεσμού 560-561 από τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (ΕΠ-I, ΕΠ-O). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο πολυπεπτιδικών αλυσίδων οι οποίες συνδέονται μέσω δύο δισουλφιδικών δεσμών. Τα αμινοξέα His603, Asp646 και Ser741 (●) αποτελούν μέρος του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνωσης. Οι δομές τύπου Kringle 2 και 3 συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό (■—■).

Το αμινοτελικό άκρο του μορίου αποτελείται από πέντε δομές τύπου kringle, με τις οποίες το πλασμινογόνο προσδένεται στο ινωδογόνο του πλάσματος, αλλά και σε διάφορα κύτταρα. Η δομή τύπου kringle περιγράφηκε πρώτα από τους Magnusson et al. (1975). Οι δομές τύπου kringle δίνουν στο πλασμινογόνο την ικανότητα να λαμβάνει διαφορετικές δομές στο χώρο. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου απαντάται στο καρβοξυλικό άκρο της πρωτεΐνης (His603, Asp646 και Ser741). Το ενεργό κέντρο παρουσιάζει ομοιότητες με τα ενεργά κέντρα άλλων πρωτεϊνών τύπου σερίνης (Bachmann 1994).

Το πλασμινογόνο απαντάται στο πλάσμα του αίματος σε διάφορες μορφές (Nieuwenhuizen and Traas 1989). Στον άνθρωπο, η φυσική μορφή του πλασμινογόνου στο πλάσμα έχει γλουταμινικό οξύ στο αμινοτελικό άκρο του και ονομάζεται Glu-πλασμινογόνο, ενώ στα βοοειδή στο αμινοτελικό άκρο υπάρχει ασπαραγινικό οξύ και ονομάζεται αντίστοιχα Asp-πλασμινογόνο (Schaller et al. 1985). Άλλες μορφές του πλασμινογόνου οι οποίες παράγονται από την καταλυτική διάσπαση του πλασμινογόνου από την πλασμίνη, στον άνθρωπο έχουν κατά κύριο λόγο λυσίνη στο αμινοτελικό τους άκρο και ονομάζονται Lys-πλασμινογόνα. Οι αντίστοιχες μορφές πλασμινογόνου στα βοοειδή έχουν αργινίνη στο αμινοτελικό τους άκρο και ονομάζονται Arg-πλασμινογόνα (Schaller et al. 1985). Το Glu-πλασμινογόνο βρίσκεται σε κλειστή διάταξη και εκτείνεται όταν προσδένεται σε λυσίνες. Παρόμοια αναδιάταξη στο χώρο παρατηρείται και κατά τη μετατροπή του σε Lys-πλασμινογόνο. Η αλλαγή αυτή στη δομή του έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας ενεργοποίησης του (Wu et al. 1990, Fredenburgh and Nesheim 1992). Το ακριβώς αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται κατά την παρουσία ανιόντων, ιδιαίτερα του χλωρίου, η οποία



σταθεροποιεί την κλειστή διάταξη του Glu-πλασμινογόνου με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας ενεργοποίησής του (Stack et al. 1991).

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου στην ενεργό πλασμίνη περιλαμβάνει τη διάσπαση ενός πεπτιδικού δεσμού, που έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του μορίου από πρωτεΐνη μονής αλυσίδας σε πρωτεΐνη διπλής αλυσίδας που συγκρατείται με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Η πλασμίνη συμμετέχει σε πληθώρα βιολογικών φαινομένων, όπως η θρομβόλυση, σε φαινόμενα στα οποία παρατηρείται ιστική ανακατασκευή (π.χ. παλινδρόμηση του μαστού) και στην μετακίνηση των κυττάρων κυρίως του ανοσολογικού συστήματος (Saksela and Rifkin 1988). Ο κύριος ρόλος της πλασμίνης στην ιστική ανακατασκευή είναι η διάσπαση πρωτεϊνών του εξωκυττάρου χώρου και της κυτταρικής μεμβράνης. Ωστόσο, διαδραματίζει και ένα δεύτερο, εξίσου σημαντικό ρόλο, καθώς υποκινεί μία σειρά διαδοχικών αντιδράσεων που καταλήγουν στην ενεργοποίηση μίας ομάδας πρωτεολυτικών ενζύμων, των μεταλλοπρωτεϊνολυτικών. Εκτός των άλλων, η πλασμίνη υδρολύει την  $\alpha_2$ -καζεΐνη και την  $\beta$ -καζεΐνη στο γάλα (Politis et al. 1989b). Τέλος, η πλασμίνη είναι μία θερμοσταθερή πρωτεΐνη ενώ το pH άριστης λειτουργίας της είναι 7.4 (Politis et al. 1989a).

Το πλασμινογόνο συντίθεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ (Raum et al. 1980). Ωστόσο, έχει αναφερθεί έκφραση του γονιδίου του και σε άλλα όργανα όπως στα επινεφρίδια, στους νεφρούς, στον εγκέφαλο, στους όρχεις, στην καρδιά, στους πνεύμονες, στο σπλήνα κ.α. (Zhang et al. 2002).

Το πλασμινογόνο είναι ένα μόριο ευρέως διαδεδομένο στα σωματικά υγρά. Η συγκέντρωσή του στο πλάσμα του αίματος είναι 2 $\mu$ M και εμπλέκεται κυρίως στην διατήρηση της αγγειακής ομοιόστασης (Fay et al. 2007). Περίπου 40% του πλασμινογόνου είναι εξωαγγειακό (Collen et al. 1972) και η παρουσία του έχει εντοπιστεί μεταξύ άλλων στο βόειο και πρόβειο γάλα (Politis et al. 2004, Albenzio et al. 2005) και στο θυλακοειδές υγρό (Ohnishi et al. 2004).

### 1.1.3. Ενεργοποιητές του πλασμινογόνου

Οι ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι ανήκουν στην ομάδα των πρωτεϊνολυτικών τύπου σερίνης και όπως έχει ήδη αναφερθεί καταλύουν την μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη μέσω της πρωτεόλυσης του πεπτιδικού δεσμού Αργινίνης560-Βαλίνης561 στον άνθρωπο και του δεσμού Αργινίνης557-Ισολευκίνης558 στα βοοειδή.

Το γονίδιο του ΕΠ-Ο στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 10 στη θέση 10q24 (Gene ID: 5328), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 28 (Gene ID: 281408). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 11 εξόνια και 10 ιντρόνια. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί δύο μετάγραφα, τα οποία αποτελούνται από 2.395 και 2.685 νουκλεοτίδια, ενώ οι κωδικεύουσες περιοχές αποτελούνται από 1.296 και 1.245 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα (Jacobs et al. 1985, Nagai et al. 1985). Στα βοοειδή έχει βρεθεί μόνο ένα μετάγραφο, το οποίο αποτελείται από 2.355 νουκλεοτίδια, ενώ η



κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.302 νουκλεοτίδια (Kratzschmar et al. 1993, Harhay et al. 2005).

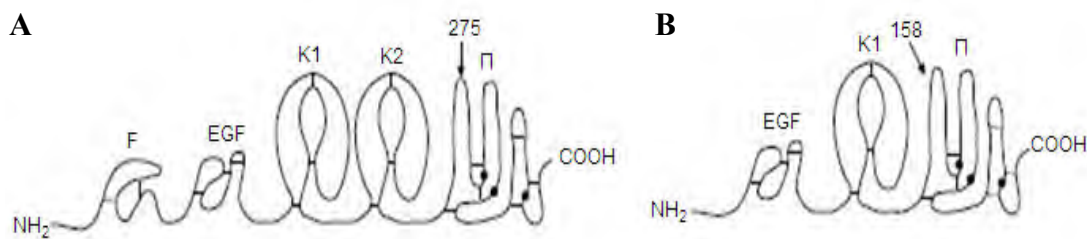
Ο ΕΠ-Ο συντίθεται ως πρωτεΐνη μονής αλυσίδας μήκους 411 αμινοξέων και μοριακού βάρους 54 kDa στον άνθρωπο (Riccio et al. 1985), ενώ στα βοοειδή αποτελείται από 433 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 56 kDa (Kratzschmar et al. 1993). Ο ΕΠ-Ο απαντάται σε δύο μορφές: με τη μορφή της μονής και τη μορφή της διπλής αλυσίδας. Μετατρέπεται στην τελευταία με τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού Λυσίνης158-Ισολευκίνης159. Η διάσπαση του πεπτιδικού αυτού δεσμού καταλύεται από μία σειρά πρωτεϊνών όπως η πλασμίνη, η καλλικρεΐνη, ο παράγοντας XIIa και η καθεψίνη Β (Bachmann 1987, Vassalli et al. 1991, List et al. 2000). Η μορφή διπλής αλυσίδας αποτελεί την ενεργό μορφή του ενζύμου και αποτελείται από δύο πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικό δεσμό. Η ενζυμική ενεργότητα του μορίου μονής αλυσίδας είναι κατά 250 φορές μικρότερη από αυτήν του μορίου διπλής αλυσίδας (Petersen et al. 1988). Η βαρύτερη Α αλυσίδα περιέχει μία δομή τύπου EGF και μία δομή τύπου Kringle. Οι δύο αυτές δομές αποτελούν το αμινοτελικό τμήμα της πρωτεΐνης (ATF – Amino Terminal Fragment), μέσω του οποίου προσδένεται ο ΕΠ-Ο στον υποδοχέα του. Η ελαφρύτερη Β αλυσίδα περιέχει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Alfano et al. 2005) (Σχήμα 3). Η πρόσδεση του ΕΠ-Ο στον ειδικό του υποδοχέα αυξάνει κατά πολύ την ενεργότητά του (Ellis et al. 1991). Συγκεκριμένα, η πρόσδεση του ΕΠ-Ο στον υποδοχέα του μειώνει κατά 40 φορές την Km της μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη, ενώ συγχρόνως αυξάνεται κατά 6 φορές η ταχύτητα μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη.

Το γονίδιο του ΕΠ-I στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 8 στη θέση 8p12 (Gene ID: 5327), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 27 (Gene ID: 281407). Το γονίδιο αποτελείται στον άνθρωπο από 14 εξόνια και 13 ιντρόνια, ενώ στα βοοειδή από 12 εξόνια και 11 ιντρόνια. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί δύο μετάγραφα, τα οποία αποτελούνται από 3.173 και 3.035 νουκλεοτίδια, ενώ οι κωδικεύουσες περιοχές αποτελούνται από 1.689 και 1.551 νουκλεοτίδια αντίστοιχα (Itagaki et al. 1991). Στα βοοειδή έχει βρεθεί μόνο ένα μετάγραφο, το οποίο αποτελείται από 2.504 νουκλεοτίδια ενώ η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.701 νουκλεοτίδια (Kratzschmar et al. 1993, Cao et al. 2004).

Ο ΕΠ-I συντίθεται ως πρωτεΐνη μονής αλυσίδας μήκους 530 αμινοξέων και μοριακού βάρους 68 kDa στον άνθρωπο (Itagaki et al. 1991), ενώ στα βοοειδή αποτελείται από 566 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 70 kDa (Cao et al. 2004). Ο ΕΠ-I παράγεται κυρίως από τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα και η συγκέντρωσή του στο αίμα ανέρχεται στα 5 ng/ml (Pennica et al. 1983). Η μετατροπή του ΕΠ-I σε πρωτεΐνη διπλής αλυσίδας επιτυγχάνεται με τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού αργινίνης257-ισολευκίνης276. Μεταξύ των πρωτεϊνών που καταλύουν τη διάσπαση του δεσμού αυτού είναι η πλασμίνη και η καλλικρεΐνη (Wallen et al. 1983). Η μετατροπή του ΕΠ-I σε μόριο διπλής αλυσίδας αυξάνει την ενεργότητά του κατά 5-10 φορές (Renatus et al. 1997). Η δομή του ΕΠ-I προσομοιάζει αυτή της πλασμίνης καθώς αποτελείται: α) από μία βαρύτερη Α αλυσίδα η οποία περιέχει μία δομή τύπου finger με ικανότητα

πρόσδεσης στο ινωδογόνο, μία δομή τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (Epidermal Growth Factor – EGF) και δύο δομές τύπου Kringle που φέρουν LBS υποδοχείς, και β) από μία ελαφρύτερη Β αλυσίδα η οποία περιέχει τη δραστική περιοχή της πρωτεΐνάσης (Ny et al. 1984) (Σχήμα 3).

Η πρόσδεση του ΕΠ-I στο ινωδογόνο αυξάνει την ενζυμική του ενεργότητα κατά 300-400 φορές (Ranby et al. 1982, Hoylaerts et al. 1982). Η ανωτέρω παρατήρηση εξηγεί γιατί ο ΕΠ-I χρησιμοποιείται κυρίως ως θρομβολυτικός παράγοντας ειδικότερα σε περιπτώσεις καρδιακών προσβολών.



**Σχήμα 3:** Η δομή των ΕΠ-I (Α) και ΕΠ-O (Β) του ανθρώπου.

Το μόριο του ΕΠ-I αποτελείται από μία δομή τύπου finger (F), μία δομή τύπου EGF, δύο δομές τύπου Kringle (K1, K2) και την περιοχή της πρωτεΐνάσης σερίνης (Π). Το μόριο του ΕΠ-O αποτελείται από μία δομή τύπου EGF, μία δομή τύπου Kringle (K1) και την περιοχή της πρωτεΐνάσης σερίνης (Π). Στο σχήμα με βέλος υποδεικνύονται οι θέσεις διάσπασης των πεπτιδικών δεσμών για τα δύο μόρια καθώς και οι θέσεις των αμινοξέων του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνάσης (●)

#### 1.1.4. Αναστολείς των Ενεργοποιητών του Πλασμινογόνου

Οι κύριοι αναστολείς των ΕΠ είναι οι ΑΕΠ (Αναστολείς του Ενεργοποιητή του πλασμινογόνου) 1 και 2 και ανήκουν στην υπεροικογένεια των σερπινών. Οι σερπίνες αναστέλλουν τη δράση των πρωτεϊνών «μιμούμενες» τα φυσικά τους υποστρώματα, μετά όμως τη διάσπαση τους δεσμεύουν την πρωτεΐναση σε 1:1 ανενεργό σύμπλεγμα. Για το λόγο αυτό, οι αναστολείς αυτοί αποκαλούνται «αναστολείς αυτοκτονίας». Όλες οι σερπίνες απαντώνται σε τρεις μορφές: ενεργό, διασπασμένη και λανθάνουσα (Carrell and Travis 1985, Pike et al. 2002).

Το γονίδιο του ΑΕΠ-1 στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 7 στη θέση 7q21.3-q22 (Klinger et al. 1987) (Gene ID: 5054), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 25 (Gene ID: 281375). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 9 εξόνια και 8 ιντρόνια. Το μετάγραφο του γονιδίου στον άνθρωπο αποτελείται από 2.876 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.209 νουκλεοτίδια (Ginsburg et al. 1986). Στα βοοειδή το μετάγραφο αποτελείται από 2.970 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.209 νουκλεοτίδια (Mimuro et al. 1989).

Ο ΑΕΠ-1 εκκρίνεται στον άνθρωπο ως μία μήκους 379 αμινοξέων γλυκοπρωτεΐνη μονής αλυσίδας με μοριακό βάρος 50 kDa (Ginsburg et al. 1986). Το γονίδιο του ΑΕΠ-1 στα βοοειδή κωδικεύει πρωτεΐνη μήκους 402 αμινοξέων (Mimuro et al. 1989). Αξιοσημείωτη είναι η παρουσία μίας μόνο κυστεΐνης στην πρωτεϊνική αλληλουχία τόσο του ανθρώπου όσο και των βοοειδών. Ο ΑΕΠ-1 αναστέλλει και τους δύο ενεργοποιητές του πλασμινογόνου (Ny et al. 1986, Pannekoek et al. 1986, Lindahl et al. 1990). Ο ΑΕΠ-1 ρυθμίζεται από δύο συμπαράγοντες, την βιτρονεκτίνη η οποία τον σταθεροποιεί στην ενεργό του μορφή, και την ηπαρίνη η οποία αυξάνει την ενεργότητα του ως προς την θρομβίνη. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ΑΕΠ-1 και της βιτρονεκτίνης στο εξωπλασματικό κυτταρικό δίκτυο, καθώς και μεταξύ του ΑΕΠ-1 και του δεσμευμένου στον υποδοχέα του ΕΠ-Ο ρυθμίζουν την κυτταρική προσκόλληση και επομένως την αγγειογένεση (Declerck et al. 1988, Mimuro and Loskutoff 1989, Gils and Declerck 1998).

Το γονίδιο του ΑΕΠ-2 στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 18 στη θέση 18q21.3 (Samia et al. 1990) (Gene ID: 5055), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 24 (Gene ID: 281376). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 8 εξόνια και 7 ιντρόνια. Το μετάγραφο του γονιδίου στον άνθρωπο αποτελείται από 1.922 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.248 νουκλεοτίδια (Ye et al. 1987). Στα βοοειδή το μετάγραφο αποτελείται από 2.095 νουκλεοτίδια και η κωδικεύουσα περιοχή αποτελείται από 1.251 νουκλεοτίδια (Larsen et al. 1996).

Ο ΑΕΠ-2 συντίθεται στον άνθρωπο ως μια πρωτεΐνη μήκους 415 αμινοξέων (Ye et al. 1987), ενώ στα βοοειδή το προβλεπόμενο πρωτεϊνικό προϊόν έχει μήκος 416 αμινοξέα (Larsen et al. 1996). Ο ΑΕΠ-2 δρα ανασταλτικά στον ΕΠ-Ο στον πλακούντα αλλά απαντάται επίσης στα κερατινοκύτταρα, στα μακροφάγα, στα μονοκύτταρα, στα μικρογλοία καθώς και σε διάφορους τύπους καρκινικών κυττάρων (Kruithof et al. 1995, Jensen 1997). Απαντάται σε δύο μορφές, η μία είναι ενδοκυττάρια, μη γλυκοζυλιωμένη με μοριακό βάρος 45 kDa, ενώ η δεύτερη είναι εξωκυττάρια γλυκοζυλιωμένη με μοριακό βάρος 60 kDa (Belin 1993). Η ακριβής βιολογική σημασία του ΑΕΠ-2 δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί. Διαγονιδιακοί επίμυες που δεν φέρουν το γονίδιο του ΑΕΠ-2 δεν έδειξαν ανεπάρκεια στη λειτουργία των μονοκυττάρων, στην επούλωση των πληγών ή στη γονιμότητα (Dougherty et al. 1999). Εκτός από την αναστολή του ΕΠ-Ο, ο ΑΕΠ-2 αναστέλλει και τη μορφή διπλής αλυσίδας του ΕΠ-Ι, όχι όμως και τη μορφή της μονής αλυσίδας (Thorsen et al. 1988). Ωστόσο, το μόριο μονής αλυσίδας του ΕΠ-Ι είναι το επικρατέστερο στο αίμα, και σε συνδυασμό με την προστασία που του παρέχει η πρόσδεση του στο ινωδογόνο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο ΑΕΠ-2 δε διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της θρομβόλυσης (ινωδόλυσης) μέσω του ΕΠ-Ι. Ο ρόλος του επομένως, περιορίζεται στη ρύθμιση της δράσης του ΕΠ-Ο σε καταστάσεις όπως η εγκυμοσύνη, ο καρκίνος και η απόκριση σε φλεγμονή (Bachmann 1987, Dear and Medcalf 1995, Kruithof et al. 1995).

### 1.1.5. Αναστολείς της Πλασμίνης

Ο κύριος αναστολέας της δράσης της πλασμίνης είναι η  $\alpha_2$ -αντιπλασμίνη ( $\alpha_2$ -ΑΠ) η οποία δρα μέσω της πρόσδεσης της στην πλασμίνη, δημιουργώντας με τον τρόπο αυτό ένα σταθερό σύμπλεγμα χωρίς πρωτεολυτική ικανότητα (Robbie et al. 1996). Η  $\alpha_2$ -ΑΠ είναι μία γλυκοπρωτεΐνη με μήκος 452 αμινοξέα και μοριακό βάρος 67 kDa στον άνθρωπο (Holmes et al. 1987) και 470 αμινοξέα στα βοοειδή (Christensen et al. 1994). Η  $\alpha_2$ -ΑΠ είναι ο κύριος αναστολέας της πλασμίνης στο πλάσμα (Collen 1976, Moroi and Aoki 1976, Saksela and Rifkin 1988) και στο βόειο γάλα (Precetti et al. 1997). Όπως και το πλασμινογόνο, η  $\alpha_2$ -ΑΠ παράγεται στο ήπαρ και δρα κατά κύριο λόγο στο αίμα, καθώς η ικανότητα της να δεσμεύει την πλασμίνη μειώνεται δραστικά όταν η πλασμίνη έχει προσδεθεί στο ινωδογόνο (Longstaff and Gaffney 1991). Επομένως, η ενεργότητα της ελεύθερης πλασμίνης αναστέλλεται γρήγορα από τη δράση της  $\alpha_2$ -ΑΠ για να περιορίσει τη δραστηριότητά της στην επιφάνεια του ινώδους και η δραστηριότητα της συνδεδεμένης με ινώδες πλασμίνης προφυλάσσεται από αναστολή έως ότου διαλυθεί το ινώδες (Wallen 1980, Bachmann 1987, Longstaff and Gaffney 1991). Η  $\alpha_2$ -ΜΓ και η ΠΝ-1 είναι αναστολείς ευρείας δράσης, που αναστέλλουν μια σειρά από πρωτεΐνες μεταξύ των οποίων την πλασμίνη και τους δύο ενεργοποιητές του πλασμινογόνου ΕΠ-Ι και ΕΠ-Ο (Scott et al. 1985, de Boer et al. 1993). Η  $\alpha_2$ -ΑΠ και ο ΠΝ-1 όπως και οι δύο ΑΕΠ ανήκουν στην υπερικογένεια των σερπινών.

### 1.1.6. Ο Υποδοχέας του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου τύπου Ουροκινάσης (ΥΕΠ-Ο)

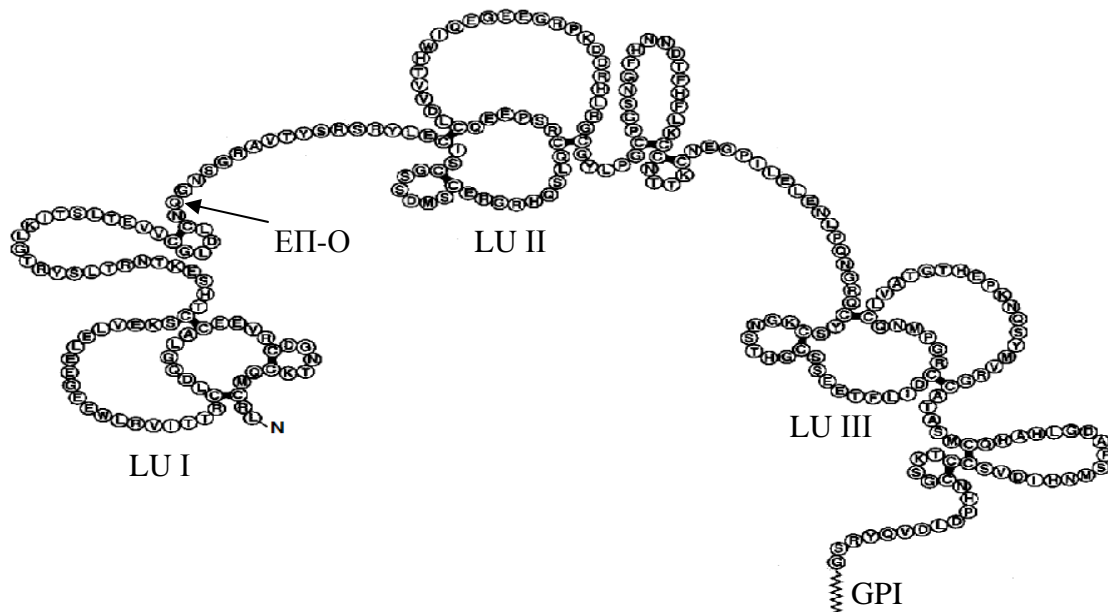
Το γονίδιο του ΥΕΠ-Ο στον άνθρωπο εδράζεται στο χρωμόσωμα 19 στη θέση 19q13.1-q13.2 (Vagnarelli et al. 1992, Borglum et al. 1992) (Gene ID: 5329), ενώ στα βοοειδή στο χρωμόσωμα 18 (Gene ID: 281983). Το γονίδιο αποτελείται και στους δύο οργανισμούς από 7 εξόνια και 6 ιντρόνια. Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί τρία μετάγραφα τα οποία αποτελούνται από 1.548, 1.437 και 1.413 νουκλεοτίδια, ενώ οι κωδικεύουσες περιοχές αποτελούνται από 1008, 846 και 873 νουκλεοτίδια, αντίστοιχα (Roldan et al. 1990, Min et al. 1992, Pyke et al. 1993). Στα βοοειδή μόνο ένα μετάγραφο έχει βρεθεί, μήκους 1.335 νουκλεοτιδίων με κωδικεύουσα περιοχή μήκους 993 νουκλεοτιδίων (Reuning et al. 1993).

Ο ΥΕΠ-Ο απομονώθηκε πρώτη φορά από μονοκύτταρα και από κύτταρα της μονοκυτταροειδούς κυτταρικής σειράς U937 ως πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης με ικανότητα να προσδένει το αμινοτελικό άκρο του ΕΠ-Ο με μεγάλη χημική συγγένεια ( $kD \approx 0,5 \text{ nM}$ ) (Vassalli et al. 1985, Cubellis et al. 1986). Ο ΥΕΠ-Ο αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και συμπεριφέρεται ως αμφίφυλη πρωτεΐνη της κυτταρικής μεμβράνης (Estreicher et al. 1989). Στον άνθρωπο το γονίδιο του ΥΕΠ-Ο κωδικεύει πρωτεΐνη μήκους 335 αμινοξέων η οποία όμως περιέχει πεπτίδια σηματοδότησης τόσο

στο αμινοτελικό όσο και στο καρβοξυτελικό άκρο, μήκους 22 και 30 αμινοξέων αντίστοιχα (Roldan et al. 1990). Η αφαίρεση του καρβοξυτελικού πεπτιδίου σηματοδότησης λαμβάνει χώρα κατά το τελικό στάδιο επεξεργασίας της πρωτεΐνης και το τελικό (ώριμο) προϊόν μήκους 283 αμινοξέων προσαρτάται μέσω του καρβοξυτελικού άκρου της πρωτεΐνης σε μία προσχηματισμένη γλυκολιπιδική «άγκυρα» (glycosylphosphatidylinositol anchor – GPI) στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης (Moller et al. 1992). Στα βοοειδή το γονίδιο του ΥΕΠ-Ο κωδικεύει πρωτεΐνη μήκους 330 αμινοξέων (Reuning et al. 1993). Το θεωρητικό μοριακό βάρος της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο είναι 35 kDa, εξαιτίας όμως του υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης, το πειραματικά εξακριβωμένο μοριακό του βάρος ανέρχεται στα 55-60 kDa. Η υψηλή διακύμανση του πειραματικού μοριακού βάρους της πρωτεΐνης οφείλεται πιθανώς σε διαφορετικό βαθμό γλυκοζυλίωσης των μορίων (Behrendt et al. 1990).

Όπως προαναφέρθηκε το καρβοξυτελικό άκρο του ΥΕΠ-Ο είναι συνδεδεμένο μέσω της GPI «άγκυρας» στην κυτταρική μεμβράνη. Ο τρόπος αυτός πρόσδεσης του ΥΕΠ-Ο στην κυτταροπλασματική μεμβράνη διευκολύνει την αλληλεπίδραση του μορίου με άλλες διαμεμβρανικές πρωτεΐνες (Myohanen et al. 1993). Το αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει το σημείο πρόσδεσης για την τύπου EGF δομή του ΕΠ-Ο (Kratzschmar et al. 1993). Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του ΥΕΠ-Ο χαρακτηρίζεται από τρεις δομικά ομόλογες περιοχές (LU δομικές περιοχές) (Σχήμα 4). Οι επαναλαμβανόμενες αυτές δομικές περιοχές παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με αντίστοιχες δομές μελών της οικογένειας λευκοκυτταρικού αντιγόνου 6 καθώς και με τη δομή των α-νευροτοξινών στο δηλητήριο των φιδιών (Ploug and Ellis 1994).





**Σχήμα 4:** Η δομή του ΥΕΠ-Ο του ανθρώπου.

Το μόριο του ΥΕΠ-Ο αποτελείται από τρεις ομόλογες δομικές περιοχές (LU I, II και III). Το σημείο πρόσδεσης του ΕΠ-Ο βρίσκεται ανάμεσα στις LU I και LU II και συνδέεται με την κυτταροπλασματική μεμβράνη μέσω μίας γλυκολιπιδικής «άγκυρας» (GPI)

### 1.1.7. Υποδοχείς του Ενεργοποιητή του Πλασμινογόνου Ιστικού τύπου

Σε αντίθεση με τον ΕΠ-Ο δεν έχει μέχρι στιγμής αναφερθεί κάποιος ειδικός υποδοχέας για τον ΕΠ-Ι. Ωστόσο, υπάρχουν αναφορές για πρόσδεση του ΕΠ-Ι σε χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς (Orth et al. 1994, Zhang et al. 2009). Οι πρωτεϊνικοί αυτοί υποδοχείς όμως δεσμεύουν εκτός του ΕΠ-Ι, τον ΕΠ-Ο (Horn et al. 1995) και τον ΑΕΠ-1 (Stefansson et al. 1998). Η πρόσδεση των ΕΠ διευκολύνεται όταν βρίσκονται σε σύμπλεγμα με τον ΑΕΠ-1, ενώ δεν παρατηρείται πρόσδεση του συμπλέγματος ΕΠ-Ο/ΑΕΠ-2.

Ένας δεύτερος μη ειδικός υποδοχέας για τον ΕΠ-Ι είναι η αννεξίνη-II. Η αννεξίνη-II αναφέρεται επίσης και ως υποδοχέας του πλασμινογόνου (Cesarman et al. 1994). Ο σχηματισμός συμπλέγματος των τριών αυτών μορίων (Αννεξίνη-II, Πλασμινογόνο και ΕΠ-Ι) αυξάνει το ρυθμό ενεργοποίησης του πλασμινογόνου 20-60 φορές σε σύστημα ελεύθερο κυττάρων (Hajjar et al. 1994). Ωστόσο, έρευνα σε κύτταρα έδειξε αύξηση της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου μόνο κατά τέσσερις φορές (Hajjar et al. 1987). Τέλος, οι Smedsrod et al. (1988) διαπίστωσαν ότι τα ηπατικά κύτταρα ενδοκυτταρώνουν τον ΕΠ-Ι μέσω των υποδοχέων μαννόζης και γαλακτόζης.

### 1.1.8. Υποδοχείς του πλασμινογόνου

Τα κύρια χαρακτηριστικά των υποδοχέων του πλασμινογόνου είναι: 1) Η χαμηλή χημική τους συγγένεια, 2) Η υψηλή πυκνότητα τους και 3) Η παρουσία τους σε μεγάλη ποικιλία κυτταρικών τύπων. Η πρόσδεση του Glu-πλασμινογόνου στους κυτταρικούς υποδοχείς είναι μία ειδική και κορεστή διαδικασία (Miles and Plow 1985, Hajjar et al. 1986, Gonzalez-Gronow et al. 1989, Gonias et al. 1989). Οι σταθερές διάστασης για τους υποδοχείς του πλασμινογόνου κυμαίνονται μεταξύ των 100 και 2.000 nM (Miles and Plow 1988). Η χαμηλή χημική συγγένεια που παρατηρείται μεταξύ υποδοχέων και πλασμινογόνου έρχεται σε αντίθεση με τη γενική αντίληψη που υπάρχει για τους ειδικούς υποδοχείς. Παρόλα αυτά, εξαιτίας των υψηλών συγκεντρώσεων του πλασμινογόνου στο αίμα (2,2  $\mu$ M) (Collen and Verstraete 1975), παρατηρείται σημαντική κατάληψη των υποδοχέων του σε κύτταρα που εκτίθενται στο αίμα (Adelman et al. 1988, Miles et al. 1988). Η χαμηλή χημική συγγένεια μεταξύ υποδοχέων και πλασμινογόνου ενδεχομένως να διευκολύνει την εντοπισμένη δράση της πλασμίνης και να περιορίζει την πρωτεόλυση. Η πλασμίνη που προέρχεται από τη μετατροπή του δεσμευμένου στους υποδοχείς πλασμινογόνου αντικαθιστάται από νέα μόρια πλασμινογόνου, τα οποία με τη σειρά τους μετατρέπονται σε πλασμίνη. Η αποδέσμευση της πλασμίνης από τους κυτταρικούς υποδοχείς έχει ως συνέπεια την απενεργοποίηση της από την  $\alpha_2$ -ΑΠ.

Με εξαίρεση τα ερυθροκύτταρα, όλα τα κύτταρα του αίματος έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το πλασμινογόνο (Miles and Plow 1987). Πολλές καρκινικές κυτταρικές σειρές δεσμεύουν το πλασμινογόνο, γεγονός το οποίο ενισχύει τη σύνδεση του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου με τον καρκίνο, και σε γενικές γραμμές η ικανότητα δέσμευσης των καρκινικών κυττάρων είναι υψηλότερη στα καρκινικά κύτταρα σε σχέση με τα αντίστοιχα φυσιολογικά.

Υποδοχείς του πλασμινογόνου που έχουν απομονωθεί από κύτταρα θηλαστικών είναι επίσης η  $\alpha$ -ενολάση (Redlitz et al. 1995), η αννεξίνη II (Cesarman et al. 1994) και η αμφοτερίνη (Parkkinen and Rauvala 1991).

## **1.2. ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ - ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ**

Το σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλά φυσιολογικά φαινόμενα κατά τη διάρκεια ζωής ενός οργανισμού και συνδέεται κυρίως με το φαινόμενο της ιστικής ανακατασκευής (tissue remodeling). Η διαδικασία της ιστικής ανακατασκευής συνοδεύει την αγγειογένεση, την επούλωση πληγών, την ανοσολογική απόκριση στις φλεγμονές, την ωοθυλακιορρηξία καθώς και μεγάλης κλίμακας διαδικασίες απόπτωσης όπως είναι η παλινδρόμηση του μαστού. Παρακάτω αναλύεται ο ρόλος του συστήματος στο μαστό και το λιπώδη ιστό, επειδή τα δύο ανωτέρω όργανα-ιστοί μελετώνται αναλυτικά στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

### **1.2.1. ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ – ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΓΑΛΑΚΤΟΠΑΡΑΓΩΓΗ – ΠΑΛΙΝΔΡΟΜΗΣΗ ΤΟΥ ΜΑΣΤΟΥ**

#### **1.2.1.1. Παλινδρόμηση του μαστού**

Η συνθετική ικανότητα του μαστού παρουσιάζει κυκλικές μεταβολές. Μετά τον τοκετό, η παραγωγή γάλακτος π.χ. στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής αυξάνεται έως ότου φτάσει σε ένα μέγιστο, το οποίο συνήθως επιτυγχάνεται στο διάστημα από ένα έως δύο μήνες μετά τον τοκετό. Στη συνέχεια η γαλακτοπαραγωγή μειώνεται σταδιακά έως την πλήρη παύση της, η οποία συνδυάζεται με τη διακοπή της άμελης στα παραγωγικά ζώα. Υπό κανονικές συνθήκες, η γαλακτοπαραγωγή επαναλαμβάνεται, εφόσον προηγηθεί νέα κυοφορία κατά την οποία σχηματίζεται εκ νέου μαστικός εκκριτικός ιστός. Οι κυκλικές αυτές μεταβολές επαναλαμβάνονται πολλές φορές στη διάρκεια ζωής του θηλυκού ζώου. Η πτωτική φάση της γαλακτοπαραγωγής, επειδή λαμβάνει χώρα σταδιακά, αναφέρεται και ως σταδιακή παλινδρόμηση του μαστού.

Η παραγόμενη ποσότητα γάλακτος εξαρτάται κατά κύριο λόγο από τον αριθμό των εκκριτικών κυττάρων στο μαστό και από τη βιοσυνθετική και εκκριτική τους δραστηριότητα. Ο πληθυσμός των εκκριτικών κυττάρων του μαστού βρίσκεται σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου: αυξάνεται κατά τα πρώτα στάδια της γαλακτοπαραγωγής (Knight and Peaker 1982, Knight and Peaker 1984), αρχίζει να μειώνεται μετά το μέγιστο της γαλακτοπαραγωγής (Wilde and Knight 1989) και ακολουθεί πτωτική πορεία και μετά τη διακοπή άμελης/θηλασμού (Wilde et al. 1997, Caruco et al. 1997). Ο αριθμός των εκκριτικών κυττάρων καθορίζεται από την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού πολλαπλασιασμού και του ρυθμού θανάτου τους μέσω απόπτωσης.



Η παλινδρόμηση του μαστού είναι μία πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία ο γαλακτοποιός αδένας «επιστρέφει» μορφολογικά στην κατάσταση στην οποία βρισκόταν πριν από την κύηση του ζώου. Το φαινόμενο της παλινδρόμησης του μαστού χαρακτηρίζεται από μεγάλο βαθμό απόπτωσης των επιθηλιακών κυττάρων και ιστικής ανακατασκευής.

Τρεις τύποι παλινδρόμησης του μαστού έχουν περιγραφεί στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Hurley 1989): 1) Η επαγόμενη παλινδρόμηση, η οποία αρχίζει αμέσως μετά τη διακοπή της άμελξης. 2) Η σταδιακή παλινδρόμηση, η οποία αποτελεί φυσικό στάδιο της γαλακτικής περιόδου και περιλαμβάνει τη φθίνουσα φάση της γαλακτοπαραγωγής, η οποία αρχίζει μετά το μέγιστο της γαλακτοπαραγωγής και ολοκληρώνεται με τη διακοπή της άμελξης. 3) Η «γεροντική» παλινδρόμηση, η οποία λαμβάνει χώρα στο τέλος της παραγωγικής ηλικίας του ζώου.

Στη γαλακτοπαραγωγό αγελάδα η άμελξη διακόπτεται περίπου 50 ημέρες πριν από τον αναμενόμενο τοκετό. Το διάστημα αυτό είναι γνωστό ως ξηρά περίοδος. Η παλινδρόμηση του μαστού κατά την ξηρά περίοδο χαρακτηρίζεται από εντονότερες λειτουργικές και μορφολογικές αλλαγές από ό,τι η παλινδρόμηση του κατά την πτωτική φάση της γαλακτοπαραγωγής. Η παλινδρόμηση του μαστού στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατά την ξηρά περίοδο χωρίζεται σε τρία στάδια: 1) στο στάδιο της ενεργητικής παλινδρόμησης, το οποίο αρχίζει 12 ώρες μετά τη διακοπή της άμελξης και ολοκληρώνεται μετά την παρέλευση 3-4 εβδομάδων, 2) στο στάδιο της δυναμικής ισορροπίας κατά την οποία ο μαστός βρίσκεται σε κατάσταση πλήρους παλινδρόμησης και 3) στο στάδιο της πρωτογαλακτογένεσης η οποία αρχίζει λίγο πριν από ή κατά τον τοκετό και χαρακτηρίζεται από αύξηση του αριθμού των εκκριτικών κυττάρων και την παραγωγή πρωτογάλακτος 24 ώρες πριν από τον αναμενόμενο τοκετό (Smith and Todhunter 1982).

Στους επίμυες η διαδικασία της παλινδρόμησης του μαστού λαμβάνει χώρα μέσα σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα από ό,τι στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες και χωρίζεται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο διαρκεί τις πρώτες 3 μέρες μετά τη διακοπή του θηλασμού και χαρακτηρίζεται από απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Το δεύτερο στάδιο ολοκληρώνεται 10 με 15 μέρες μετά τη διακοπή του θηλασμού και χαρακτηρίζεται από την πρωτεόλυση της βασικής μεμβράνης και την ανακατασκευή της (Lascelles and Lee 1978, Lund et al. 1996).

Στο πρόβατο η διακοπή της άμελξης, σε αντίθεση με τις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, συνήθως γίνεται πριν από την εκ νέου κύηση του ζώου. Συνεπώς, οι παρατηρήσεις που έχουν πραγματοποιηθεί στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής μπορεί να μην ισχύουν στην περίπτωση της γαλακτοπαραγωγού προβατίνας. Το κύριο χαρακτηριστικό στη γαλακτοπαραγωγό προβατίνα μετά τη διακοπή της άμελξης είναι η απόπτωση των γαλακτικών κυττάρων. Απόπτωση παρατηρείται από τη δεύτερη μέρα μετά τη διακοπή της άμελξης στα επιθηλιακά κύτταρα του γαλακτοφόρου πόρου και των αδενοκυψελίδων. Αντίθετα, δεν παρατηρείται απόπτωση στα μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Ο μεγαλύτερος βαθμός απόπτωσης παρατηρείται κατά την τέταρτη ημέρα μετά τη διακοπή της άμελξης, ενώ η όλη διαδικασία ολοκληρώνεται

μέσα σε διάστημα 30 ημερών από τη διακοπή της άμελξης (Tatarczuch et al. 1997). Σε μία άλλη μελέτη ο μεγαλύτερος βαθμός απόπτωσης παρατηρήθηκε την 8<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή της άμελξης (Colitti and Farinacci 2009).

### **1.2.1.2. Έκφραση των γονιδίων – παραγωγή πρωτεϊνών του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο μαστό**

Το σύστημα πλασμίνης πλασμινογόνου συνδέεται με την παλινδρόμηση του μαστού μέσω της πρωτεολυτικής δραστηριότητας της πλασμίνης αλλά και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών. Παρακάτω αναλύονται οι σημαντικότερες εργασίες που μελετούν την έκφραση γονιδίων ή την παραγωγή από το μαστό πρωτεϊνών του συστήματος κατά τη διάρκεια του γαλακτικής περιόδου στους επίμυες και τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

Οι Ossowski et al. (1979) μελέτησαν την παραγωγή ΕΠ-Ο σε διαφορετικά στάδια της γαλακτικής περιόδου στους επίμυες. Περαιτέρω, μελέτησαν την επίδραση διαφόρων ορμονών στην ικανότητα παραγωγής ΕΠ-Ο από τα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού. Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή ΕΠ-Ο ήταν ιδιαίτερος χαμηλή καθόλη τη διάρκεια της γαλουχίας. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση της παραγωγής ΕΠ-Ο κατά την έναρξη της διαδικασίας της παλινδρόμησης του μαστού κατά τις πρώτες ώρες μετά τη διακοπή του θηλασμού. Η προσθήκη της προλακτίνης, της υδροκορτιζόνης και της ωκυτοκίνης, ορμονών που ευνοούν τη γαλακτοπαραγωγή και παρεμποδίζουν τη διαδικασία της παλινδρόμησης, είχαν ως αποτέλεσμα τη δραματική μείωση της παραγωγής του ΕΠ-Ο από κυτταρικές καλλιέργειες επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Συμπερασματικά, η παραγωγή του ΕΠ-Ο είναι πρακτικά ασήμαντη κατά τη διάρκεια της γαλουχίας και αναστέλλεται πλήρως στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστού που καλλιεργούνται σε συνθήκες ορμονικού περιβάλλοντος που ευνοούν την γαλακτοπαραγωγή. Αντίθετα, η παραγωγή του ΕΠ-Ο αυξήθηκε κατακόρυφα κατά τα πρώτα στάδια της παλινδρόμησης του μαστού, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η παραγωγή του ΕΠ-Ο εμπλέκεται στην ανακατασκευή του μαστικού αδένου.

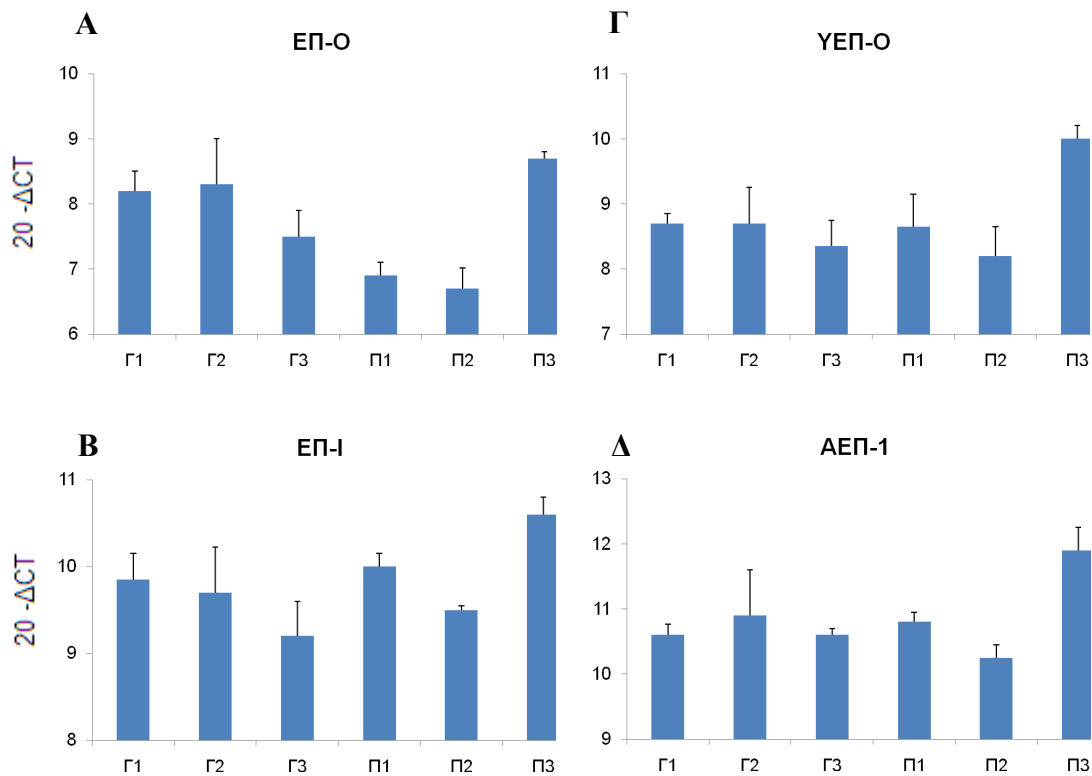
Οι Busso et al. (1989) μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων του ΕΠ-Ο και του ΕΠ-Ι στο μαστικό αδένου κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στους επίμυες. Παρατηρήθηκε έκφραση και των δύο γονιδίων, αλλά η έκφραση του ΕΠ-Ο ήταν πολύ μεγαλύτερη σε σύγκριση με αυτή του ΕΠ-Ι. Παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του ΕΠ-Ο τις δύο πρώτες μέρες μετά τη διακοπή του θηλασμού συγκριτικά με την έκφραση του γονιδίου κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η έκφραση του ΕΠ-Ο αυξήθηκε εκ νέου κατά το 2<sup>ο</sup> στάδιο της παλινδρόμησης, 3-5 ημέρες μετά τη διακοπή θηλασμού, και παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα κατά το 3<sup>ο</sup> στάδιο, 6-16 ημέρες μετά τη διακοπή του θηλασμού. Περαιτέρω, παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων στο μαστικό αδένου επιμύων κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας, όπως επίσης και αμέσως μετά τον απογαλακτισμό, δηλαδή κατά την έναρξη της διαδικασίας παλινδρόμησης του μαστού.

Αντίθετα, η έκφραση των δύο ανωτέρω γονιδίων ήταν ιδιαίτερος χαμηλή καθόλη τη διάρκεια της γαλουχίας. Οι μεταβολές που παρατηρήθηκαν στο επίπεδο της πρωτεΐνης ήταν παρόμοιες με αυτές στο επίπεδο του mRNA μέσω μετρήσεων με την κατά Northern μεταφορά. Συμπερασματικά, η παραγωγή των ενζύμων αυξάνεται στα στάδια της γαλακτικής περιόδου όπου παρατηρείται αναδιάταξη του μαστού, π.χ. παλινδρόμηση. Η παραγωγή των δύο ενζύμων ελέγχεται στο επίπεδο της μεταγραφής.

Οι Talhouk et al. (1992) μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων του ΕΠ-Ι και του ΑΕΠ-1 κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του μαστού στους επίμυες. Διαπιστώθηκε έκφραση του γονιδίου του ΕΠ-Ι από την 4<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή του θηλασμού μέχρι και την 10<sup>η</sup>. Η έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-1 ανιχνεύθηκε από τη 2<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή του θηλασμού, ενώ έφτασε στο μέγιστο 2 έως 4 ημέρες αργότερα. Οι παρατηρήσεις αυτές σε συνάρτηση με τη διακοπή της παραγωγής της β-καζεΐνης από τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα την 5<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή του θηλασμού οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη παίζει σημαντικό ρόλο στην ανακατασκευή του μαστού στους επίμυες.

Οι Lund et al. (1996) μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων των ΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του μαστού στους επίμυες. Όσον αφορά το γονίδιο του ΕΠ-Ο, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης του κατά την 4<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή του θηλασμού σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές κατά τη γαλακτοπαραγωγή και τις τρεις πρώτες ημέρες μετά τη διακοπή του θηλασμού. Η έκφραση του ΕΠ-Ο παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα έως και το τέλος της πειραματικής περιόδου (10<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή του θηλασμού). Αντίθετα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 παρέμειναν χαμηλά καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής περιόδου.

Οι Rabot et al. (2007) μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων των ΕΠ-Ο, ΕΠ-Ι, ΥΕΠ-Ο και ΑΕΠ-1 κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Συγκεκριμένα, βιοψίες πραγματοποιήθηκαν σε τρία στάδια της γαλακτοπαραγωγής. Το 1<sup>ο</sup> δείγμα (Γ1) ελήφθη κατά το μέγιστο της γαλακτοπαραγωγής (2 έως 8 εβδομάδες μετά τον τοκετό), το 2<sup>ο</sup> δείγμα (Γ2) στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής (4 έως 5 μήνες μετά τον τοκετό) και το 3<sup>ο</sup> δείγμα (Γ3) στο τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (8 έως 12 μήνες μετά τον τοκετό). Επίσης τρία δείγματα ελήφθησαν κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου. Το 1<sup>ο</sup> δείγμα (Π1) ελήφθη 24 έως 48 ώρες μετά τη διακοπή της άμελξης, το 2<sup>ο</sup> δείγμα (Π2) 96 έως 108 ώρες μετά τη διακοπή της άμελξης και το 3<sup>ο</sup> δείγμα (Π3) 14 έως 28 μέρες μετά τη διακοπή της άμελξης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1.



**Διάγραμμα 1:** Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο (Α), ΥΕΠ-Ο (Β), ΕΠ-Ι (Γ) και ΑΕΠ-1 (Δ) κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου (Γ1-Γ3) και της ξηράς περιόδου (Π1-Π3) στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες

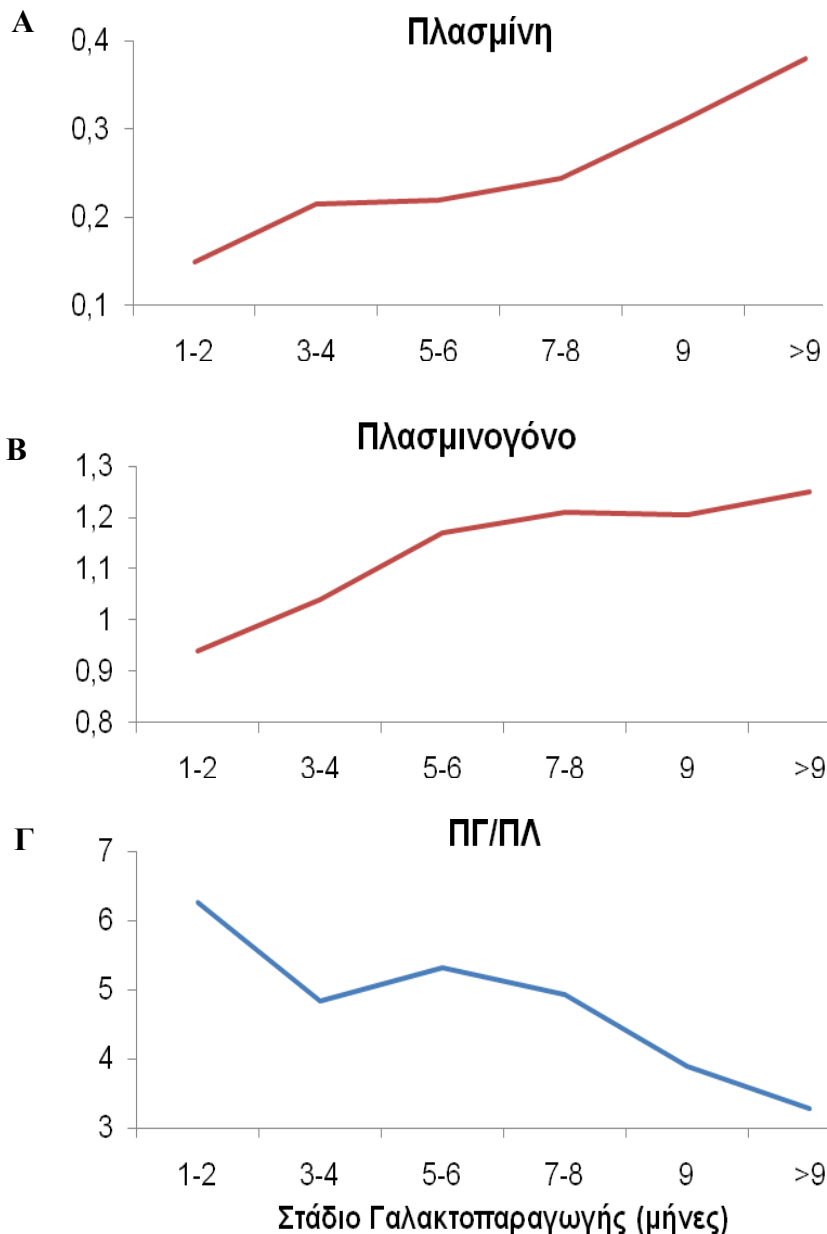
Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που έγιναν στους επίμνες, παρατηρήθηκε σημαντική έκφραση και των τριών γονιδίων καθόλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Η έκφραση των γονιδίων των ΥΕΠ-Ο και ΑΕΠ-1 στα δύο πρώτα στάδια της ξηράς περιόδου (Π1 και Π2) παρέμεινε στα ίδια περίπου επίπεδα με αυτά της γαλακτοπαραγωγής (Γ1 - Γ3). Η έκφραση του γονιδίου του ΕΠ-Ο μειώθηκε στα δύο πρώτα στάδια της ξηράς περιόδου (Π1 και Π2) σε σύγκριση με τη γαλακτική περίοδο (Γ1 - Γ3). Αντίθετα, η έκφραση και των τριών γονιδίων αυξήθηκε κατά το τρίτο στάδιο της παλινδρόμησης σε σύγκριση με τα δύο πρώτα στάδια της ξηράς περιόδου (Π1 και Π2). Τέλος, η έκφραση του γονιδίου του ΕΠ-Ι δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές μεταβολές κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου, παρά μόνο μία ελαφρά αυξητική τάση κατά το τρίτο στάδιο της ξηράς περιόδου (Π3). Με βάση τα ανωτέρω αποτελέσματα, τεκμαίρεται ότι το σύστημα πλασμίνης πλασμινογόνου εμπλέκεται στη διαδικασία ανακατασκευής του μαστού που λαμβάνει χώρα κατά την 2<sup>η</sup> -4<sup>η</sup> εβδομάδα μετά τη διακοπή της άμελης στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

Έως σήμερα δεν έχει ερευνηθεί στο πρόβατο η έκφραση των γονιδίων του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου στο μαστικό αδέν, τόσο κατά το στάδιο της παλινδρόμησης όσο και κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής.

### 1.2.1.3. Μεταβολές των επιπέδων των πρωτεϊνών του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο αγελαδινό και πρόβειο γάλα

Πέραν της παραγωγής των πρωτεϊνών από το μαστό, σημαντικό βάρος έχει δοθεί και στην παρουσία αυτών στο γάλα και τη σύνδεση της παρουσίας αυτής με την σταδιακή παλινδρόμηση του μαστού κατά την πτωτική φάση της γαλακτοπαραγωγής. Επιπλέον, η αυξημένη συγκέντρωση πλασμίνης στο γάλα συνδέεται με μειωμένη ικανότητα πήξης του γάλακτος (Srinivasan and Lucey 2002) και τη μειωμένη απόδοση σε τυρί (Zachos et al. 1992). Παρακάτω παρατίθενται ενδεικτικά εργασίες που έχουν διεξαχθεί τόσο στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες όσο και στα πρόβατα.

Οι Politis et al. (1989a) μελέτησαν την επίδραση του σταδίου της γαλακτοπαραγωγής στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 2. Η συγκέντρωση των ενζύμων ήταν ιδιαίτερος χαμηλή στα πρώτα στάδια της γαλακτικής περιόδου (1-2 μήνες μετά τον τοκετό). Επιπλέον, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης (ΠΓ/ΠΛ) ήταν υψηλός κατά το ίδιο στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Συνεπώς, το σύστημα παραμένει ανενεργό κατά τα πρώτα στάδια της γαλακτοπαραγωγής που συμπίπτουν με το μέγιστο της γαλακτοπαραγωγής. Ακολούθως, παρατηρείται μία σημαντική αυξητική τάση της ενεργότητας των ενζύμων κατά τον 3<sup>ο</sup> έως 4<sup>ο</sup> μήνα και τον 5<sup>ο</sup> έως 6<sup>ο</sup> μήνα της γαλακτοπαραγωγής. Η αυξητική τάση συνεχίζεται με συνέπεια να παρατηρούνται τα μέγιστα της ενεργότητας και για τα δύο ένζυμα στο τελικό στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (>9 μήνες μετά τον τοκετό). Επίσης ο λόγος ΠΓ/ΠΛ ο οποίος εκφράζει την ταχύτητα μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη είχε τη χαμηλότερη τιμή του την ίδια χρονική περίοδο (Διάγραμμα 2Γ), γεγονός που δείχνει ότι η διαδικασία της σταδιακής παλινδρόμησης του μαστού συνδέεται με αυξημένη ταχύτητα μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη.



**Διάγραμμα 2:** Διαγραμματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων πλασμίνης (Α) και πλασμινογόνου (Β) καθώς και του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης (Γ) κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες

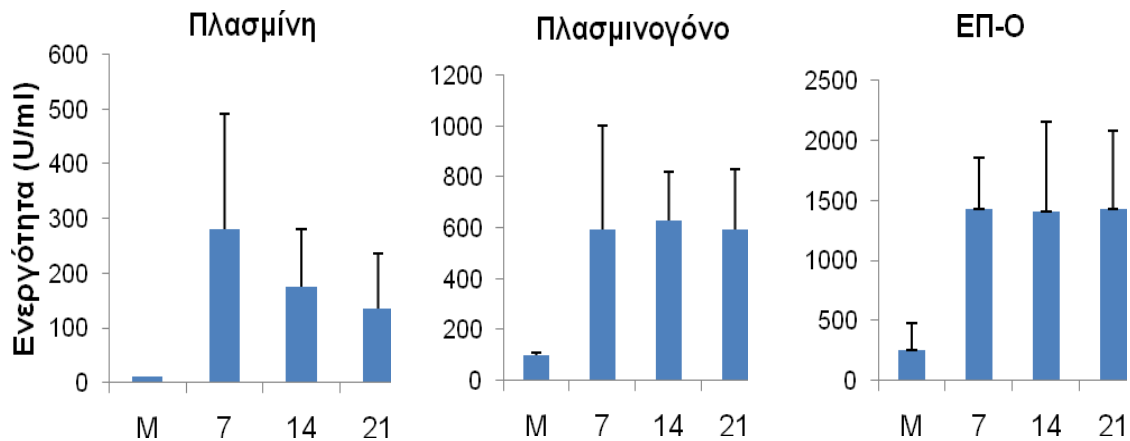
Οι Gilmore et al. (1995) μελέτησαν την ενεργότητα του ΕΠ-Ο στο γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων από γαλακτοπαραγωγές αγελάδες κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Οι ερευνητές παρατήρησαν αυξημένες τιμές ενεργότητας του ΕΠ-Ο κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές στην αρχή και το μέσο της γαλακτοπαραγωγής στο κλάσμα της καζεΐνης. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ενεργότητα του ΕΠ-Ο κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής στο κλάσμα του ορού του γάλακτος. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με αυτά των Politis et al. (1989a)

σύμφωνα με τα οποία το σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου ενεργοποιείται στο 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής και ενισχύουν τη σχέση του συστήματος με την σταδιακή παλινδρόμηση του μαστού (πρωτική φάση γαλακτοπαραγωγής).

Οι Baldi et al. (1996) μελέτησαν τις αλλαγές στην ενεργότητα του πλασμινογόνου, της πλασμίνης και του ΕΠ-Ο στο γάλα γαλακτοπαραγωγών αγελάδων κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής. Δείγματα γάλακτος συλλέχθηκαν κατά τον 1<sup>ο</sup>, 3<sup>ο</sup>, 5<sup>ο</sup> και 7<sup>ο</sup> μήνα μετά τον τοκετό. Η ενεργότητα των ενζύμων (πλασμινογόνο, πλασμίνη και ΕΠ-Ο) δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του 1<sup>ου</sup> και του 3<sup>ου</sup> μήνα γαλακτοπαραγωγής, αν και υπήρχε μία αυξητική τάση της ενεργότητας του ΕΠ-Ο. Οι μέγιστες τιμές και για τα τρία ένζυμα παρατηρήθηκαν κατά τον 5<sup>ο</sup> μήνα της γαλακτοπαραγωγής. Εν συνεχεία στον 7<sup>ο</sup> μήνα της γαλακτοπαραγωγής παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του πλασμινογόνου ενώ οι τιμές της ενεργότητας πλασμίνης και του ΕΠ-Ο παρέμειναν περίπου ίδιες. Η αύξηση του πλασμινογόνου αποδόθηκε στην αυξημένη εισροή πλασμινογόνου από το αίμα προς το γάλα λόγω της χαλάρωσης των συνδέσμων των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Επιπλέον ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης είχε τις χαμηλότερες τιμές προς το τέλος της γαλακτοπαραγωγής (5<sup>ος</sup> και 7<sup>ος</sup> μήνας), γεγονός που καταδεικνύει ενεργοποίηση του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη τη χρονική αυτή περίοδο. Ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης θεωρείται ο χρησιμότερος δείκτης καθώς η μέτρηση αυτή είναι ανεξάρτητη από την παραγόμενη ποσότητα γάλακτος. Αντίθετα, μία αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης της πλασμίνης μπορεί να μη συνδέεται με ενεργοποίηση ή απενεργοποίηση του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου, αλλά να οφείλεται σε αντίστοιχη μείωση ή αύξηση του όγκου του παραγόμενου γάλακτος. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι παρόμοια με αυτά που προέκυψαν από τη μελέτη των Politis et al. (1989a) με μοναδική διαφορά ότι η παρατηρούμενη ενεργοποίηση του συστήματος εντοπίζεται χρονικά στον 5<sup>ο</sup> μήνα της γαλακτοπαραγωγής. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η παρατηρούμενη αυξημένη ενεργοποίηση του πλασμινογόνου οφείλεται τόσο στην αυξημένη εισροή πλασμινογόνου από το αίμα, λόγω της αυξημένης διαπερατότητας του μαστικού επιθηλίου κατά τα τελευταία στάδια της γαλακτοπαραγωγής όσο και στην αύξηση της παραγωγής του ΕΠ-Ο από το μαστό.

Οι Aslam και Hurley (1997) μελέτησαν την ενεργότητα του πλασμινογόνου, της πλασμίνης και του ΕΠ-Ο στο μαστικό έκκριμα γαλακτοπαραγωγών αγελάδων κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου. Ελήφθησαν δείγματα την 7<sup>η</sup>, την 14<sup>η</sup> και την 21<sup>η</sup> μέρα μετά τη διακοπή της άμελξης καθώς και την 7<sup>η</sup> μέρα μετά τον τοκετό. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 3.





**Διάγραμμα 3:** Διαγραμματική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ΕΠ-Ο κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου (7, 14 και 21 μέρες μετά τη διακοπή της άμελξης) στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες. Ως δείγμα μάρτυρα (M) χρησιμοποιήθηκε δείγμα που ελήφθη 7 μέρες μετά τον τοκετό

Παρατηρήθηκαν αυξημένες τιμές ενεργότητας του πλασμινογόνου, της πλασμίνης και του ΕΠ-Ο στα δείγματα που ελήφθησαν κατά την ξηρά περίοδο σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα δείγματα που συλλέχθηκαν μετά τον τοκετό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, ιδιαίτερος όμως της αυξημένης ενεργότητας του ΕΠ-Ο, το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη πιθανότατα ενεργοποιείται κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του μαστού, αν και αυτό δεν προκύπτει από τη μέτρηση του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης.

Οι Athie et al. (1997) μελέτησαν τη συμπεριφορά του συστήματος πλασμίνης πλασμινογόνου σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες στις οποίες η διαδικασία παλινδρόμησης του μαστού είχε επιταχυνθεί με χορήγηση οιστραδιόλης-17β. Για το σκοπό της μελέτης χρησιμοποιήθηκαν 44 αγελάδες γαλακτοπαραγωγής οι οποίες χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες. Στην πρώτη ομάδα χορηγήθηκαν σε ενέσιμη μορφή 4 ημερήσιες δόσεις των 15 mg οιστραδιόλης-17β τις τέσσερις τελευταίες μέρες της άμελξης, ενώ η δεύτερη ομάδα ήταν η ομάδα του μάρτυρα. Ελήφθησαν δείγματα μαστικού εκκρίματος και από τις δύο ομάδες τις ημέρες 0, 3, 11 και 25 ή τις ημέρες 1, 7, 18 και 30 της ξηράς περιόδου. Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις του πλασμινογόνου και της πλασμίνης αυξήθηκαν νωρίτερα στα ζώα της πρώτης ομάδας. Ομοίως, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης μειώθηκε νωρίτερα στα ζώα της πρώτης ομάδας. Τα παραπάνω αποτελέσματα ευνοούν την υπόθεση της ενεργοποίησης του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης του μαστού στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες.

Οι Albenzio et al. (2004) μελέτησαν την ενεργότητα του πλασμινογόνου και της πλασμίνης στο γάλα προβάτων της φυλής Comisana. Τα ζώα χωρίστηκαν σε δύο πειραματικές ομάδες ανάλογα με τη συγκέντρωση των σωματικών κυττάρων στο γάλα τους. Η πρώτη ομάδα ζώων είχε συγκέντρωση σωματικών κυττάρων στο γάλα <500.000/ml ενώ η δεύτερη είχε >1.000.000/ml. Η υψηλότερη τιμή ενεργότητας του



πλασμινογόνου παρατηρήθηκε στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής (110 έως 130 ημέρες μετά τον τοκετό) και για τις δύο ομάδες. Η ενεργότητα της πλασμίνης παρέμεινε σταθερή καθόλη τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής για την πρώτη ομάδα, ενώ για τη δεύτερη ομάδα παρατηρήθηκε υψηλότερη τιμή ενεργότητας στο 1<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (<70 ημέρες μετά τον τοκετό). Επιπλέον, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης ήταν υψηλότερος στο 3<sup>ο</sup> (>160 ημέρες μετά τον τοκετό) και το 1<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής σε σχέση με το μέσο της γαλακτοπαραγωγής, υποδεικνύοντας μεγαλύτερο βαθμό ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη κατά το μέσο της γαλακτοπαραγωγής. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν ότι το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη συμπεριφέρεται διαφορετικά στα πρόβατα από ότι στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι, αντίθετα με ό,τι συμβαίνει στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης στα πρόβατα ήταν υψηλός κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, γεγονός που δείχνει ότι το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου είναι ουσιαστικά ανενεργό.

Οι Bianchi et al. (2004) εξέτασαν την ενεργότητα του πλασμινογόνου, της πλασμίνης και του ΕΠ-Ο στο γάλα προβάτων της φυλής Σαρδηνίας κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

**Πίνακας 1:** Ενεργότητα πλασμινογόνου, πλασμίνης και ΕΠ-Ο, και ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης (ΠΓ/ΠΛ) στο γάλα γαλακτοπαραγωγών προβάτων κατά τη γαλακτική περίοδο

	Ενεργότητα (Units/ml)		
	Ημέρες μετά τον τοκετό		
	90 +/- 13	121 +/- 12	157 +/- 16
Πλασμινογόνο	29,69 <sup>β</sup>	25,99 <sup>α</sup>	24,79 <sup>α</sup>
Πλασμίνη	14,01 <sup>α</sup>	15,63 <sup>α</sup>	20,20 <sup>β</sup>
ΕΠ-Ο	342,70 <sup>α</sup>	551,85 <sup>β</sup>	610,72 <sup>β</sup>
ΠΓ/ΠΛ	2,40 <sup>γ</sup>	1,77 <sup>β</sup>	1,08 <sup>α</sup>

<sup>α,β,γ</sup> Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο P<0.05

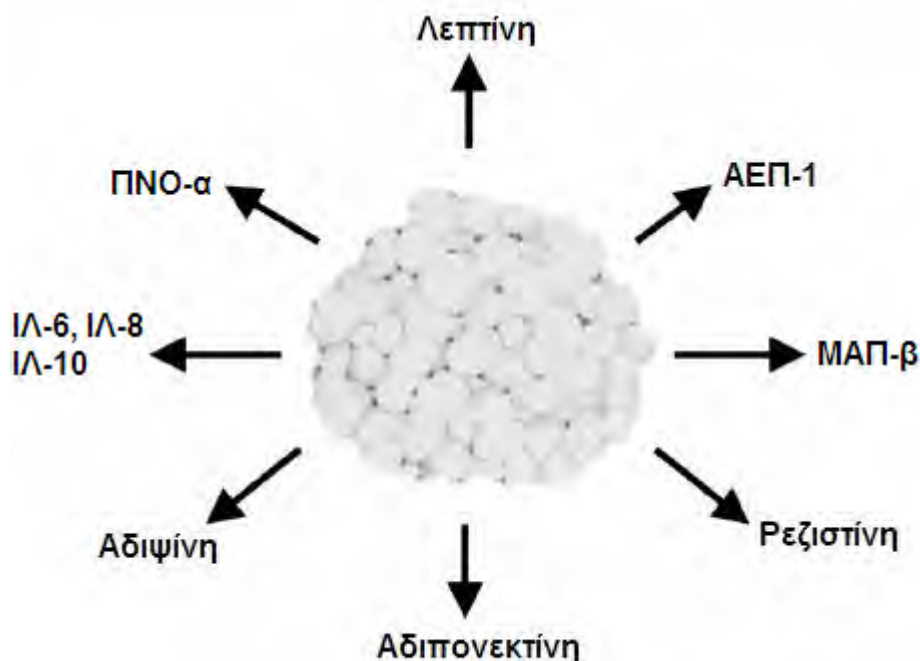
Παρατηρήθηκε μείωση της ενεργότητας του πλασμινογόνου στο δεύτερο στάδιο της γαλακτικής περιόδου, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση της ενεργότητας της πλασμίνης στο τρίτο στάδιο της γαλακτικής περιόδου και της ενεργότητας του ΕΠ-Ο στο δεύτερο στάδιο. Ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης μειώθηκε κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου υποδηλώνοντας αυξημένο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου

σε πλασμίνη με την πτώση της γαλακτοπαραγωγής. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη ενεργοποιείται κατά τα τελευταία στάδια της γαλακτοπαραγωγής, προσομοιάζοντας την εικόνα η οποία παρατηρείται στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Θα πρέπει να επισημανθεί η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων της παραπάνω εργασίας με την προηγούμενη των Albenzio et al. (2004).

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των ανωτέρω ερευνών, το σύστημα πλασμίνης πλασμινογόνου εμπλέκεται στη διαδικασία παλινδρόμησης του μαστού. Η έκφραση των γονιδίων των δύο ενεργοποιητών του πλασμινογόνου ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι αυξάνεται κατά τη διαδικασία της παλινδρόμησης του μαστού στους επίμυες. Στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες παρατηρείται αύξηση της έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο και ΑΕΠ-1 από τη 2<sup>η</sup> έως την 4<sup>η</sup> εβδομάδα της ξηράς περιόδου που συμπίπτει με το τελευταίο στάδιο της παλινδρόμησης. Επιπλέον, στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες παρατηρείται αύξηση του ρυθμού ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη στο γάλα στο τέλος της γαλακτικής περιόδου, που συμπίπτει με τη σταδιακή παλινδρόμηση του μαστού. Τέλος, μελέτες στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες αναφέρουν αύξηση του ρυθμού ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη κατά τη διάρκεια της ενεργητικής παλινδρόμησης με βάση αναλύσεις του μαστικού εκκρίματος των ζώων κατά την περίοδο αυτή. Στο πρόβατο υπάρχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα όσον αφορά την εικόνα του συστήματος στο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Στη μία εκ των δύο εργασιών τα δεδομένα ήταν ανάλογα με εκείνα που προέκυψαν από τις μελέτες στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, ενώ στην άλλη τα συμπεράσματα ήταν ακριβώς τα αντίθετα, παρά το γεγονός ότι και οι δύο μελέτες έγιναν στην ίδια φυλή προβάτου. Είναι προφανές ότι απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τη διερεύνηση της σημασίας του συστήματος στο πρόβατο.

### 1.2.2. ΤΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ - ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΛΙΠΩΔΗ ΙΣΤΟ

Το λιποκύτταρο αποτελεί σημαντική βιοσυνθετική μηχανή. Είναι πηγή πολλών βιοδραστικών πεπτιδίων και έτσι επηρεάζει τη λειτουργία πολλών οργάνων και ιστών, συμπεριλαμβανομένου και του ίδιου του λιπώδους ιστού, με αυτοκρινή, παρακρινή και ενδοκρινή τρόπο. Παρόλο που οι περισσότεροι παράγοντες που εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα συνήθως λειτουργούν με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, αξίζει να σημειωθεί ότι ένας σημαντικός αριθμός προϊόντων των λιποκυττάρων εισέρχεται στην κυκλοφορία και έχει ενδοκρινή δράση. Τα προϊόντα των λιποκυττάρων ονομάζονται λιποκίνες καθώς πολλά από αυτά παρουσιάζουν δομικές ομοιότητες με τις κυτταροκίνες. Στις λιποκίνες συμπεριλαμβάνονται η λεπτίνη, ο παράγοντας νέκρωσης όγκων- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , ΠΝΟ- $\alpha$ ), ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας - $\beta$  (Tumor Growth Factor - $\beta$ , ΜΑΠ- $\beta$ ), οι ιντερλευκίνες 6, 8 και 10 (ΙΛ-6, ΙΛ-8 και ΙΛ-10), η αδιψίνη, η ρεζιστίνη η αδιπονεκτίνη κ.α. (Σχήμα 5), και τέλος ο ΑΕΠ-1, ο ρόλος του οποίου θα αναλυθεί διεξοδικότερα στη συνέχεια (MacDougald and Burant 2007).



**Σχήμα 5:** Διαγραμματική απεικόνιση των κυριότερων λιποκινών που παράγονται από τα λιποκύτταρα

Ο ρόλος του ΑΕΠ-1 και συνεπώς του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο λιπώδη ιστό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Ο ΑΕΠ-1 είχε συνδεθεί από τη δεκαετία του '90 με φαινόμενα όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2 λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του στο πλάσμα. Οι δύο ανωτέρω παθολογικές καταστάσεις συνοδεύονται από φαινόμενα όπως υπεργλυκαιμία, υπερινσουλιναίμια, υπερτριγλυκεριδαιμία καθώς και χαμηλά επίπεδα HDL χοληστερόλης. (Juhan-Vague et al. 1991). Επιπλέον, ο συσχετισμός των επιπέδων του ΑΕΠ-1 στο αίμα με τη συσσώρευση σπλαγγχνικού λίπους στους επίμυες δημιουργήσε

ερωτήματα ως προς τη σύνδεση του ΑΕΠ-1 με το λιπώδη ιστό και οδήγησε στη μελέτη του ρόλου του στο λιπώδη ιστό (Samad et al. 1996).

Οι Alessi et al. (1997) πρώτοι εξέτασαν την έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-1 στο λιπώδη ιστό και τα κυτταρικά του κλάσματα στον άνθρωπο. Επιπλέον, επιχείρησαν να συγκρίνουν την παραγωγή του ΑΕΠ-1 στον υποδόριο και το σπλαγγνικό λιπώδη ιστό. Παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-1 σε ολικό λιπώδη ιστό καθώς και στο κλάσμα των λιποκυττάρων και των στρωματικών κυττάρων του λιπώδους ιστού σε συνθήκες κυτταροκαλλιέργειας. Επιπλέον, η προσθήκη ΜΑΠ-β είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής του ΑΕΠ-1 από τα λιποκύτταρα. Αντίθετα, η προσθήκη ΑΠΟ-α δεν επηρέασε την παραγωγή του ΑΕΠ-1 από τα λιποκύτταρα. Τέλος, τα κύτταρα που προήλθαν από το σπλαγγνικό λιπώδη ιστό είχαν μεγαλύτερη παραγωγή του ΑΕΠ-1 σε σύγκριση με τα κύτταρα από τον υποδόριο λιπώδη ιστό, ενώ παρόμοια εικόνα παρουσίασε και η παραγωγή λεπτίνης. Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την παραγωγή του ΑΕΠ-1 από το λιπώδη ιστό. Τόσο τα στρωματικά κύτταρα όσο και τα λιποκύτταρα εκφράζουν το γονίδιο του ΑΕΠ-1. Επιπλέον, η παραγωγή του ΑΕΠ-1 είναι μεγαλύτερη στο σπλαγγνικό σε σύγκριση με τον υποδόριο λιπώδη ιστό και η έκφραση του γονιδίου ρυθμίζεται θετικά από τον ΜΑΠ-β.

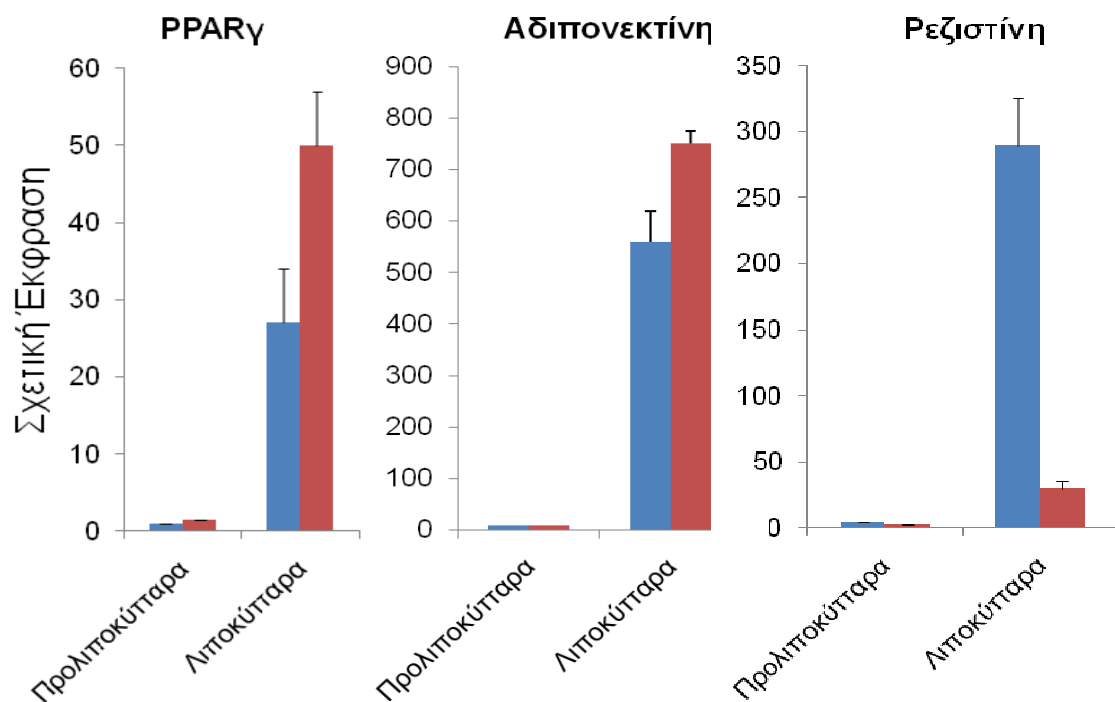
Οι Morange et al. (1999) μελέτησαν τη σχέση της παραγωγής του ΑΕΠ-1 από το λιπώδη ιστό με τη συγκέντρωση του ΑΕΠ-1 στο πλάσμα καθώς και με παράγοντες που συνδέονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη στον άνθρωπο. Παρατηρήθηκε σημαντική θετική συσχέτιση της παραγωγής ΑΕΠ-1 στον υποδόριο λιπώδη ιστό τόσο με τη συγκέντρωση του στο πλάσμα όσο και με τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα. Αντίθετα, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της παραγωγής ΑΕΠ-1 στον υποδόριο ιστό με τα επίπεδα HDL χοληστερόλης. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ισχυρός συσχετισμός μεταξύ της παραγωγής ΑΕΠ-1 στον υποδόριο και τον σπλαγγνικό λιπώδη ιστό. Τέλος, παρατηρήθηκε διπλάσια παραγωγή ΑΕΠ-1 από τον σπλαγγνικό σε σύγκριση με τον υποδόριο λιπώδη ιστό. Από την παραπάνω εργασία μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι ο λιπώδης ιστός αποτελεί σημαντικό όργανο για την αύξηση του ΑΕΠ-1 στο φαινόμενο της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Οι He et al. (2003) μελέτησαν *in vitro* σε λιποκύτταρα την επίδραση της γλυκόζης στην παραγωγή τριών λιποκινών, του ΑΕΠ-1, του ΑΠΟ-α και της ΙΛ-8, των οποίων η αυξημένη παραγωγή συνδέεται με αντίσταση στην ινσουλίνη και τον διαβήτη τύπου 2. Η προσθήκη γλυκόζης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση παραγωγής του ΑΕΠ-1 και της ΙΛ-8, όχι όμως του ΑΠΟ-α. Επιπλέον, η προσθήκη γλυκοζαμίνης παρουσίασε παρόμοια αποτελέσματα. Ωστόσο, συγκεντρώσεις γλυκόζης μεγαλύτερες των 5mM δεν επέφεραν επιπρόσθετη αύξηση στην παραγωγή των δύο λιποκινών. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι οι παρατηρηθείσες αυξημένες συγκεντρώσεις των λιποκινών δεν οφείλονται στην υπεργλυκαιμία που παρατηρείται στις παθολογικές αυτές καταστάσεις.

Οι Liang et al. (2006) μελέτησαν *in vitro* το ρόλο του ΑΕΠ-1 στην πρόσληψη γλυκόζης από τα λιποκύτταρα καθώς και στη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, χρησιμοποιώντας κύτταρα από διαγονιδιακούς επίμυες που δεν εκφράζουν τον ΑΕΠ-1 [ΑΕΠ-1(-/-)] και επίμυες φυσικού τύπου. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ποσοστό

διαφοροποίησης (75%) των προλιποκυττάρων που προήλθαν από τους διαγονιδιακούς επίμυες ΑΕΠ-1(-/-) σε σύγκριση με αυτό που παρατηρήθηκε στα προλιποκύτταρα που προήλθαν από τους επίμυες φυσικού τύπου (60%). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αυξημένη πρόσληψη γλυκόζης παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων ινσουλίνης (0, 10 και 100 nM) στα διαφοροποιημένα ΑΕΠ-1(-/-) λιποκύτταρα. Παρόμοια αύξηση πρόσληψης γλυκόζης στα διαφοροποιημένα ΑΕΠ-1(-/-) λιποκύτταρα παρατηρήθηκε για τις ίδιες συγκεντρώσεις ινσουλίνης παρουσία ΑΠΟ-α (3 ng/ml).

Στην ίδια μελέτη εξετάστηκε, στους δύο προαναφερθέντες τύπους κυττάρων, η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η έκφραση της αδιπονεκτίνης, του υποδοχέα PPAR $\gamma$  (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ ) και της ρεζιστίνης σε προλιποκύτταρα και ώριμα λιποκύτταρα. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έκφρασης παρουσιάζονται στο διάγραμμα 4.



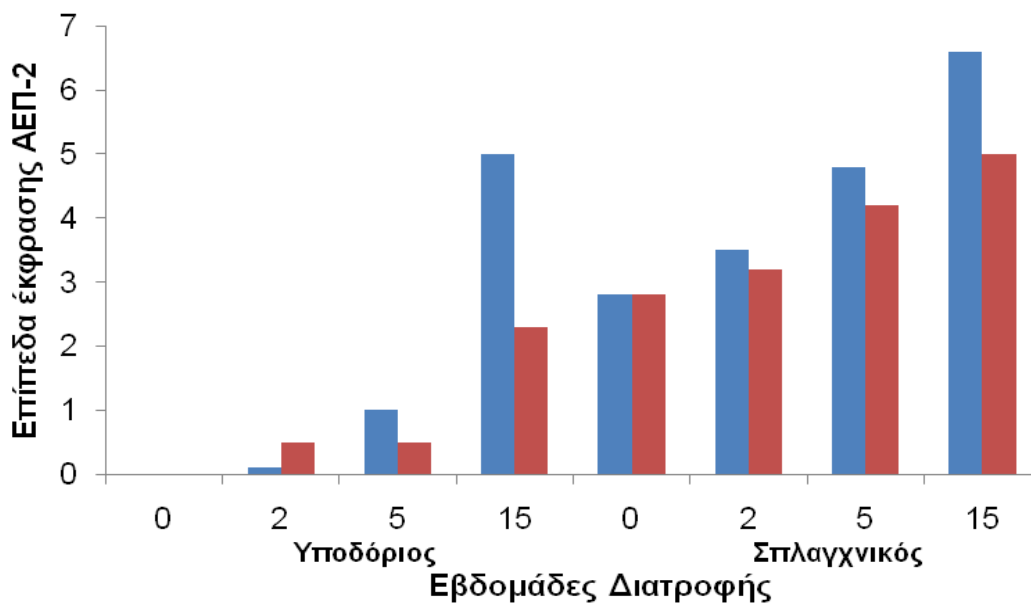
**Διάγραμμα 4:** Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης των PPAR $\gamma$ , αδιπονεκτίνης και ρεζιστίνης σε προλιποκύτταρα και ώριμα λιποκύτταρα που προέρχονται από ΑΕΠ-1(-/-) (ερυθρές στήλες) και φυσικού τύπου (γαλάζιες στήλες) επίμυες.

Όσον αφορά τα ώριμα λιποκύτταρα παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση της αδιπονεκτίνης και του υποδοχέα PPAR $\gamma$  στα ΑΕΠ-1(-/-) λιποκύτταρα σε σχέση με την έκφραση των λιποκυττάρων φυσικού τύπου. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση της ρεζιστίνης στα ΑΕΠ-1(-/-) λιποκύτταρα σε σύγκριση με τα λιποκύτταρα φυσικού τύπου. Όσον αφορά τα προλιποκύτταρα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην έκφραση των ανωτέρω τριών γονιδίων μεταξύ των ΑΕΠ-1(-/-) και φυσικού τύπου προλιποκυττάρων. Στην ίδια εργασία μελετήθηκαν και οι επιπτώσεις υπερέκφρασης του

γονιδίου του ΑΕΠ-1 σε 3T3-L1 λιποκύτταρα. Παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του ΕΠ-Ο καθώς και αναστολή της δράσης της πλασμίνης. Οι ερευνητές με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεράναν ότι ο ΑΕΠ-1 συμμετέχει στη ρύθμιση τόσο της διαφοροποίησης των λιποκυττάρων όσο και της πρόσληψης γλυκόζης από αυτά.

Οι Crandall et al. (2000) μελέτησαν *in vitro* την επίδραση της ινσουλίνης και σωματομεδίνης C (IGF-1) στην παραγωγή ΑΕΠ-1 από πρωτογενείς καλλιέργειες προλιποκυττάρων και λιποκυττάρων του ανθρώπου. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στην παραγωγή ΑΕΠ-1 κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιποκύτταρα. Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στην παραγωγή ΑΕΠ-1 καθώς και στην έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου με την προσθήκη ινσουλίνης ή IGF-1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Με βάση τα παραπάνω η παραγωγή του ΑΕΠ-1 είναι ανεξάρτητη από την ινσουλίνη και την IGF-1.

Οι Lijnen et al. (2007) μελέτησαν την έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-2 *in vitro* κατά τη διαφοροποίηση 3T3-F442A προλιποκυττάρων και *in vivo* με τη χρήση ενός μοντέλου διατροφικά επαγόμενης παχυσαρκίας στους επίμυες. Επιπλέον, μελέτησαν την επίδραση της απουσίας του ΑΕΠ-2 στο λιπώδη ιστό, αλλά και στο σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου, χρησιμοποιώντας διαγονιδιακούς επίμυες οι οποίοι δεν εκφράζουν τον ΑΕΠ-2 [ΑΕΠ-2(-/-)] και επίμυες φυσικού τύπου. Στο *in vitro* πείραμα δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές μεταβολές στην έκφραση του ΑΕΠ-2 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων. Στο *in vivo* πείραμα οι επίμυες χωρίστηκαν σε δύο διατροφικές ομάδες, στην πρώτη χορηγήτο τροφή υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος, ενώ στη δεύτερη χορηγήτο τροφή κανονικής περιεκτικότητας σε λίπος. Η έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-2 μετρήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο RT-PCR και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο διάγραμμα 5.



**Διάγραμμα 5:** Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης του γονιδίου του ΑΕΠ-2 στον υποδόριο και σπλαγχνικό λιπώδη ιστό επιμύων σε σιτηρέσιο υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (γαλάζιες στήλες) και κανονικής περιεκτικότητας σε λίπος (ερυθρές στήλες).



Παρατηρήθηκαν παρόμοια επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-2 μεταξύ των δύο διατροφικών ομάδων στους επίμυες φυσικού τύπου (wild type) τόσο στον υποδόριο όσο και στο σπλαγχνικό λιπώδη ιστό. Επιπλέον, στους επίμυες ΑΕΠ-2(-/-) παρατηρήθηκε μειωμένη μάζα υποδόριου λιπώδους ιστού σε σύγκριση με αυτή στους επίμυες φυσικού τύπου, ενώ δεν παρατηρήθηκε διαφορά στη μάζα του σπλαγχνικού λιπώδους ιστού μεταξύ των επιμύων ΑΕΠ-2(-/-) και των επιμύων φυσικού τύπου. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μικρότερη διάμετρος και αυξημένη πυκνότητα λιποκυττάρων στον υποδόριο λιπώδη ιστό, των διαγονιδιακών επιμύων σε σύγκριση με τα λιποκύτταρα των επιμύων φυσικού τύπου. Τέλος, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην παρουσία ΕΠ-Ο, ΕΠ-Ι και ΑΕΠ-1 στο λιπώδη ιστό μεταξύ των επιμύων ΑΕΠ-2(-/-) και των επιμύων φυσικού τύπου. Συμπερασματικά, προκύπτει ότι ο ΑΕΠ-2 διαδραματίζει πιθανότατα κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του υποδόριου λιπώδους ιστού στους επίμυες ανεξάρτητα όμως από το ρόλο του στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου.

Οι Seki et al. (2001) εξέτασαν *in vitro* την παραγωγή των ΕΠ-Ι, ΕΠ-Ο και ΑΕΠ-1 κατά τη διαφοροποίηση προλιποκυττάρων της κυτταρικής σειράς 3T3-L1, καθώς και την ορμονική ρύθμιση των παραπάνω πρωτεϊνών σε ώριμα λιποκύτταρα. Παρατηρήθηκε μείωση της παραγωγής των ΕΠ-Ι και ΑΕΠ-1 κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων, ενώ αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής του ΕΠ-Ο. Περαιτέρω, η προσθήκη ινσουλίνης, ενός μη ειδικού αναστολέα φωσφοδιεστερασών, της ισοβουτυλο-μεθυλο-ξανθίνης (ΙΒΜΞ), ή της δεξαμεθαζόνης μίας φαρμακευτικής ουσίας με δράση παρόμοιας της κορτιζόλης, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση παραγωγής ΕΠ-Ι και ΕΠ-Ο από ώριμα λιποκύτταρα. Αντίθετα, η προσθήκη των ανωτέρω είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του παραγόμενου ΑΕΠ-1. Τέλος, η προσθήκη γλυκαγόνης δεν επηρέασε την παραγωγή των τριών ενζύμων. Από τα ανωτέρω αποτελέσματα προκύπτει ότι ο ΕΠ-Ο είναι δείκτης διαφοροποίησης των προλιποκυττάρων 3T3-L1 και οι ορμόνες ινσουλίνη και κορτιζόλη καθώς και η κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη (cAMP) ρυθμίζουν την παραγωγή των πρωτεϊνών του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στα διαφοροποιημένα 3T3-L1 κύτταρα.

Οι Hoover-Plow et al. (2002) μελέτησαν το ρόλο του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου στο φαινότυπο χαμηλού σωματικού βάρους που παρατηρείται στους διαγονιδιακούς επίμυες οι οποίοι δε φέρουν το γονίδιο του πλασμινογόνου [ΠΓ(-/-)]. Παρατηρήθηκε μειωμένο σωματικό βάρος λόγω μειωμένου ρυθμού συσσώρευσης λιπώδους ιστού (25 %) και σωματικού λίπους (30 %) στους διαγονιδιακούς επίμυες ΠΓ (-/-) σε σύγκριση με τους επίμυες φυσικού τύπου. Με βάση τα παραπάνω οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το πλασμινογόνο εμπλέκεται στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού.

Οι Morange et al. (2002) μελέτησαν το ρόλο των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου (ΕΠ-Ο και ΕΠ-Ι) στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού στους επίμυες με τη χρήση ενός μοντέλου διατροφικά επαγόμενης παχυσαρκίας σε διαγονιδιακούς επίμυες, οι οποίοι δεν έφεραν το γονίδιο του ΕΠ-Ο ή το γονίδιο του ΕΠ-Ι. Οι ΕΠ-Ι(-/-) διαγονιδιακοί επίμυες παρουσίασαν σημαντικές διαφορές σε σύγκριση με τους επίμυες

φυσικού τύπου. Συγκεκριμένα, είχαν αυξημένο σωματικό βάρος, αυξημένη μάζα υποδόριου λίπους και αυξημένη διάμετρο των λιποκυττάρων. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά σε καμία από τις παραπάνω παραμέτρους μεταξύ των ΕΠ-Ο(-/-) διαγονιδιακών επιμύων και των επιμύων φυσικού τύπου. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτει ότι από τους δύο ενεργοποιητές του πλασμινογόνου μόνο ο ΕΠ-Ι εμπλέκεται στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού.

Συμπερασματικά, με βάση τα αποτελέσματα των ανωτέρω ερευνών, ο ΑΕΠ-1 διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε παθολογικές καταστάσεις όπως η αντίσταση στην ινσουλίνη και ο διαβήτης τύπου 2. Επιπλέον, το σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου εμπλέκεται στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού καθώς διαγονιδιακοί επίμυες, οι οποίοι δεν εκφράζουν τα γονίδια των ΑΕΠ-2, ΕΠ-Ι ή του πλασμινογόνου, παρουσιάζουν διαφορές στο φαινότυπο ως προς την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Οι επίμυες ΕΠ-Ι (-/-) παρουσιάζουν αυξημένο σωματικό βάρος, αυξημένη μάζα υποδόριου λίπους και αυξημένη διάμετρο λιποκυττάρων. Οι επίμυες ΠΓ(-/-) παρουσιάζουν μειωμένο σωματικό βάρος και μικρότερη μάζα λιπώδους ιστού. Οι επίμυες ΑΕΠ-2(-/-) παρουσιάζουν μειωμένη μάζα υποδόριου λιπώδους ιστού και μικρότερη διάμετρο λιποκυττάρων. Αντίθετα, οι ΕΠ-Ο(-/-) επίμυες δεν παρουσίασαν διαφορετικό φαινότυπο από τους επίμυες φυσικού τύπου όσον αφορά το λιπώδη ιστό. Ωστόσο, ο ακριβής ρόλος του συστήματος στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Περαιτέρω, στις *in vitro* μελέτες παρατηρείται διακύμανση της έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1, ΕΠ-Ι και ΕΠ-Ο. Έως σήμερα μόνο η έκφραση των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 έχει επιβεβαιωθεί *in vivo*, αντίθετα δεν υπάρχουν *in vivo* μελέτες που αναφέρουν έκφραση των γονιδίων του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη στα παραγωγικά ζώα.

### 1.3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν ανωτέρω για το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε πλασμίνη προκύπτουν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- 1) Το σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε έναν αριθμό φυσιολογικών διαδικασιών μεταξύ των οποίων η παλινδρόμηση του μαστού και ανάπτυξη του λιπώδους ιστού.
- 2) Δεν υπάρχουν αλληλουχίες των μεταγράφων (cDNAs) των γονιδίων του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο πρόβατο.
- 3) Δεν έχει μελετηθεί η έκφραση των ανωτέρω γονιδίων σε διάφορους ιστούς του προβάτου.
- 4) Δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ο ρόλος του συστήματος κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στο πρόβατο. Σε αντίθεση ο ρόλος του συστήματος έχει μελετηθεί πληρέστερα στις αγελάδες και εξαντλητικά στους επίμυες.



- 5) Δεν υπάρχουν παρατηρήσεις σχετικά με την έκφραση των τεσσάρων γονιδίων στο λιπώδη ιστό σε κανένα από τα παραγωγικά ζώα

## 2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση διαπιστώνεται ο σημαντικός ρόλος του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου σε ένα μεγάλο αριθμό φυσιολογικών λειτουργιών του ζωικού οργανισμού (π.χ. γαλακτοπαραγωγή, παλινδρόμηση του μαστού). Με βάση το γεγονός ότι, όπως έχει ήδη αναφερθεί, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες για το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο πρόβατο, το πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής σχεδιάστηκε με σκοπό την εύρεση των αλληλουχιών των cDNAs τεσσάρων γονιδίων του συστήματος (ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2), τη διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών κατά τη γαλακτική περίοδο στο πρόβατο και τη μελέτη του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής.

Ο σχεδιασμός περιελάμβανε τη διεξαγωγή των παρακάτω τριών πειραμάτων:

**1<sup>ο</sup> Πείραμα:** Σκοπός του πειράματος ήταν η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός της αλληλουχίας των cDNAs των γονιδίων του προβάτου που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη (ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο), η *in silico* επεξεργασία των αλληλουχιών που θα προέκυπταν και η μελέτη έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων σε διάφορους ιστούς και όργανα του προβάτου, με έμφαση στην έκφραση των γονιδίων στο μαστικό αδένα και το λιπώδη ιστό.

**2<sup>ο</sup> Πείραμα:** Σκοπός του πειράματος ήταν η κλωνοποίηση και ο χαρακτηρισμός της αλληλουχίας των cDNAs των γονιδίων του προβάτου που εμπλέκονται στην αναστολή της ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2), η *in silico* επεξεργασία των αλληλουχιών που θα προέκυπταν και η μελέτη έκφρασης των ανωτέρω γονιδίων σε διάφορους ιστούς και όργανα του προβάτου, με έμφαση στην έκφραση των γονιδίων στο μαστικό αδένα και το λιπώδη ιστό.

**3<sup>ο</sup> Πείραμα:** Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου στο γάλα από τρεις διαφορετικές ελληνικές φυλές προβάτων, που διαφέρουν ως προς το ύψος της γαλακτοπαραγωγής.

**2.2. ΠΡΩΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: «Ο ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΥΡΟΚΙΝΑΣΗΣ ΚΑΙ Ο ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ: ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ cDNAs ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ».**

**2.2.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

**2.2.1.1. Διαλύματα**

**TAE**

4,84 g/l Tris base

1,142 ml/l κρυσταλλικό οξικό οξύ

1 mM EDTA (pH 0,8)

**TE (pH 8)**

10 mM Tris·Cl

1 mM EDTA

**Τρυβλία Petri με LB και αμπικιλίνη**

1000 ml LB (Invitrogen)

15 g Άγαρ (Fluca)

Αποστείρωση στους 121 °C/20 psi για 15 λεπτά

Όταν το αποστειρωμένο μίγμα φτάσει σε θερμοκρασία 50 °C περίπου, προστίθενται 30 μg/ml αμπικιλίνη και μοιράζεται σε τρυβλία Petri (περίπου 20 ml ανά τρυβλίο).

**2.2.1.2. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ cDNAs ΤΩΝ ΕΠ-Ο ΚΑΙ ΥΕΠ-Ο ΚΑΙ *IN SILICO* ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του cDNA των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο, κλωνοποιήθηκαν αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του cDNA για το κάθε γονίδιο, από την ένωση των οποίων προκύπτει ολόκληρη η αλληλουχία των δύο cDNA. Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων ήταν cDNA προερχόμενο από ουδετερόφιλα.

### 2.2.1.2.1. Απομόνωση ουδετερόφιλων

Τα ουδετερόφιλα απομονώθηκαν από δείγμα αίματος από προβατίνα μίας συνθετικής φυλής (50% Ορεινή φυλή Ηπείρου, 25% φυλή Άρτας και 25% φυλή Χίου) σύμφωνα με τη μέθοδο των Politis et al. (2003), η οποία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

- Ανάμειξη 7.5 ml ολικού αίματος με 7.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος (Hanks Balanced Salt Solution, Sigma).
- Τοποθέτηση του μίγματος στο ανώτερο μέρος στοιβάδας 10 ml διαλύματος πολυσουκρόζης και διατριζοϊκού νατρίου, πυκνότητας 1,077 g/ml (Histopaque, Sigma), σε πλαστικό σωλήνα 50 ml τύπου Falcon.
- Φυγοκέντρηση του μίγματος στα 500 x g στους 4°C για 45 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση παρατηρείται σχηματισμός τριών καλά διαχωριζόμενων κυτταρικών στοιβάδων. Τα ουδετερόφιλα μαζί με τα ερυθροκύτταρα εντοπίζονται στην κατώτερη στοιβάδα.
- Ανάκτηση όλων των κυττάρων της κατώτερης στοιβάδας με πλαστική πιπέτα.
- Λύση των ερυθροκυττάρων με την προσθήκη 20 ml υπερκαθαρού νερού για 45 δευτερόλεπτα.
- Αποκατάσταση ισοτονικότητας του διαλύματος με προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος NaCl (2,7% κ.ο.).
- Φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 1000 x g στους 4°C για 5 λεπτά.
- Ανάκτηση των ουδετερόφιλων σε νέο ρυθμιστικό διάλυμα.

### 2.2.1.2.2. Απομόνωση RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε ολικό RNA από ουδετερόφιλα. Για την απομόνωση του ολικού RNA χρησιμοποιήθηκε το RNAqueous 4PCR kit (Ambion). Εν συντομία, στα κύτταρα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης και αιθανόλη. Έπειτα από έντονη ανακίνηση, το μίγμα μεταφέρθηκε σε στήλη που δεσμεύει το RNA, η οποία διατίθεται με το kit, και φυγοκεντρήθηκε. Έπειτα από τρεις εκπλύσεις της στήλης με ρυθμιστικά διαλύματα, το δεσμευμένο RNA επαναδιαλύθηκε σε ειδικό διάλυμα έκλουσης.

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Omniscript Reverse Transcriptase kit (Qiagen). Σε τελικό όγκο 20  $\mu$ l, αναμίχθηκαν τα εξής:

- 500 ng – 1 $\mu$ g RNA
- 2  $\mu$ l 10x Buffer RT
- 2mM dNTPs
- 1  $\mu$ M μίγμα τυχαίων εξαμερών
- 10 units RNase inhibitor
- 4 units Omniscript Reverse Transcriptase

Το μίγμα επώαστηκε στους 48 °C για μία ώρα.

### **2.2.1.2.3. Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης**

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων που συνιστούν τα μετάγραφα των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο σχεδιάστηκαν συνολικά 9 εκκινητές (πίνακας 2). Οι UPAf1, UPAr1 και UPAr2 σχεδιάστηκαν βάσει των συντηρημένων περιοχών των ήδη γνωστών αλληλουχιών του ΕΠ-Ο στα βοοειδή (GenBank: NM\_174147) στον άνθρωπο (GenBank: NM\_002658), στους επίμυες (GenBank: AF408407), στον αρουραίο (GenBank: NM\_013085) και στο χοίρο (GenBank: NM\_213945). Στη συνέχεια σχεδιάστηκε ο εκκινητής UPAf3 βάσει των αλληλουχιών των μεσαίων τμημάτων του ΕΠ-Ο του προβάτου που κλωνοποιήθηκαν. Οι UPARf1, UPARf2, και UPARr1 σχεδιάστηκαν βάσει των συντηρημένων περιοχών των ήδη γνωστών αλληλουχιών του ΥΕΠ-Ο στα βοοειδή (GenBank: NM\_174423), στον άνθρωπο (GenBank: NM\_002659), στους επίμυες (GenBank: NM\_011113) και στον αρουραίο (GenBank: NM\_017350). Στη συνέχεια σχεδιάστηκαν οι εκκινητές UPARf3 και UPARrRACE βάσει των αλληλουχιών των μεσαίων τμημάτων του ΥΕΠ-Ο του προβάτου που κλωνοποιήθηκαν αρχικά.

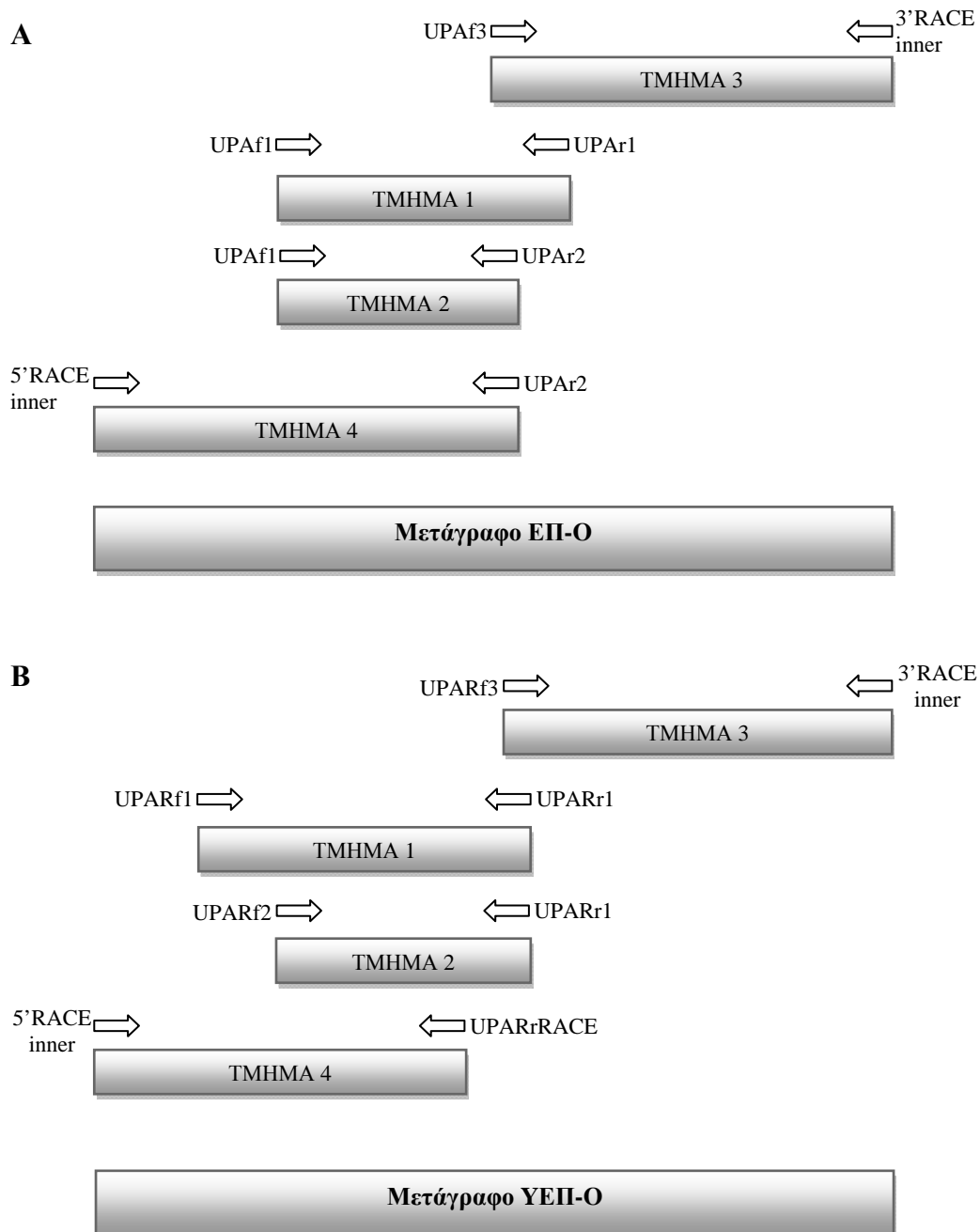
**Πίνακας 2:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην κλωνοποίηση των cDNAs των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο. (Tm: σημείο τήξης του εκκινητή)

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος	Tm	Θέση Πρόσδεσης
UPAf1	GTGGCAGCCTCATCAGTCC	19 nt	62	746-782
UPAf3	AATGCTATGTGCGGCTGACC	20 nt	62	1209-1228
UPAr1	GAGACCCTTGTGTAGACTCCA	21 nt	64	1336-1355
UPAr2	TGGGTCAGCCGCACATAGC	19 nt	62	1194-1212
UPARf1	GGACCTCTGCAGGACCACG	19 nt	64	170-188
UPARf2	GAAACCGCTACCTCGAATGTG	21 nt	64	373-393
UPARf3	AGAAACTTTCCTCATTTGACTGC	22 nt	62	722-743
UPARr1	CCTGTCGTTCCAGACATTTG	20 nt	62	759-778
UPARrRACE	CAGGTTTTGAATCTCCAGGACT	22 nt	62	638-659

#### 2.2.1.2.4. Ενίσχυση των μέσων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την κλωνοποίηση των cDNAs των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο. Για τα τμήματα 1 και 2 των cDNAs και των δύο μεταγράφων χρησιμοποιήθηκε cDNA από ουδετερόφιλα ως μήτρα για την PCR.

Για το τμήμα 1 του ΕΠ-Ο χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UPAf1 και UPAr1, για το τμήμα 2 του ΕΠ-Ο οι εκκινητές UPAf1 και UPAr2, για το τμήμα 1 του ΥΕΠ-Ο οι εκκινητές UPARf1 και UPARr1 και για το τμήμα 2 του ΥΕΠ-Ο οι εκκινητές UPARf2 και UPARr1 (Πίνακας 2).



**Σχήμα 6:** Σχετική θέση των επιμέρους τμημάτων που συνιστούν τα μετάγραφα του ΕΠ-Ο (Α) και ΥΕΠ-Ο (Β) του προβάτου, καθώς και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση τους.



Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για όλες τις αντιδράσεις PCR ήταν ίδιες. Σε τελικό όγκο 50 μl προστέθηκαν τα εξής:

- 5-100 ng DNA
- 0,2 mM από κάθε εκκινητή
- 2,5 units DNA πολυμεράση Taq DNA Polymerase (New England Biolabs)
- 0,8 mM dNTPs
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 5 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X ThermoPol Reaction Buffer (New England Biolabs)

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν το εξής:

- 94 °C για 5 min
- 30-35 κύκλοι
  - 94 °C για 30 sec
  - 62 °C για 30 sec
  - 72 °C για 1 min
- 72 °C για 10 min

#### **2.2.1.2.5. Ενίσχυση των ακραίων τμημάτων**

Τα 5' και 3' ακραία τμήματα του cDNA παρουσιάζονται στο σχήμα 6 ως τμήματα 3 και 4 τόσο για το μετάγραφο του ΕΠ-Ο όσο και για το μετάγραφο του ΥΕΠ-Ο. Για την κλωνοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε το FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω. Αρχικά συντίθεται cDNA το οποίο στο 5' ή στο 3' άκρο φέρει έναν προσαρμοστή. Για την περίπτωση του 5' άκρου, με τη βοήθεια του ενζύμου T4 RNA λιγάση συνδέεται ο προσαρμοστής στα μόρια του RNA. Ακολουθεί η αντίστροφη μεταγραφής για τη σύνθεση του cDNA, με τη χρήση τυχαίων δεκαμερών ως εκκινητών. Για την περίπτωση του 3' άκρου, το cDNA συντίθεται χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή, ο οποίος φέρει δύο τμήματα. Το ένα τμήμα αποτελείται μόνο από θυμίνες, ούτως ώστε να υβριδίζει στην πολύ-A ουρά των mRNAs, ενώ το άλλο τμήμα αντιστοιχεί στον προσαρμοστή. Εφόσον συντεθεί το cDNA, τόσο για την κλωνοποίηση του 5' άκρου όσο και για την κλωνοποίηση του 3' άκρου, εφαρμόζονται δύο διαδοχικές PCR, μία εξωτερική και μία εσωτερική. Και στις

δύο PCR χρησιμοποιείται ένας εξειδικευμένος για το γονίδιο εκκινητής και ένας που υβριδίζει στον προσαρμοστή.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 3 ακολουθήθηκε επακριβώς το πρωτόκολλο του FirstChoice RLM-RACE Kit. Για την εξωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 3' RACE Outer Primer, που περιέχεται στο kit, σε συνδυασμό με τον UPAf1 για τον ΕΠ-Ο και με τον UPAf2 για τον ΥΕΠ-Ο. Για την εσωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο 3' RACE Inner Primer σε συνδυασμό με τον UPAf3 για τον ΕΠ-Ο και με τον UPARf3 για τον ΥΕΠ-Ο. Οι αντιδράσεις PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.4.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 4 ακολουθήθηκε επακριβώς το πρωτόκολλο του FirstChoice RLM-RACE Kit. Για την εξωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 5' RACE Outer Primer, που περιέχεται στο kit, σε συνδυασμό με τον UPAr1 για τον ΕΠ-Ο και με τον UPARr1 για τον ΥΕΠ-Ο. Για την εσωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο 5' RACE Inner Primer σε συνδυασμό με τον UPAr2 για τον ΕΠ-Ο και με τον UPARrRACE για τον ΥΕΠ-Ο. Οι αντιδράσεις PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.4.

#### **2.2.1.2.6. Ηλεκτροφόρηση DNA και απομόνωση από πήκτωμα αγαρόζης**

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 1 - 2 % κ.ο., ανάλογα με το μέγεθος των αναμενόμενων τμημάτων. Για την παρασκευή του πηκτώματος, η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύθηκε με θέρμανση σε διάλυμα TAE και προστέθηκαν 0,45 μl/1 διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου.

Οι ζώνες του DNA που αντιστοιχούσαν στα τμήματα προς κλωνοποίηση, αφαιρέθηκαν με αποστειρωμένο νυστέρι από το πήκτωμα. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε το QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) για την απομόνωση του DNA από το πήκτωμα. Συγκεκριμένα, το τμήμα του πηκτώματος διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα που παρέχεται με το kit. Στη συνέχεια το διάλυμα μεταφέρθηκε στις στήλες του kit και φυγοκεντρήθηκε για να δεσμευτεί το DNA στις στήλες. Ακολούθησε έκπλυση με ρυθμιστικά διαλύματα για την απομάκρυνση υπολειμμάτων αγαρόζης και τέλος, επαναδιάλυση του DNA σε TE.

#### **2.2.1.2.7. Εισαγωγή των τμημάτων DNA σε πλασμίδια φορείς**

Το DNA που απομονώθηκε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.1.5, εισήχθη στον πλασμιδιακό φορέα pGEM-T Easy Vector (Promega) χρησιμοποιώντας το kit pGEM-T Easy Vector System I (Promega). Σε τελικό όγκο 10 µl προστέθηκαν:

- 0,5-100 ng DNA
- 5 µl Ligation Buffer (Promega)
- 50 ng pGEM-T Easy Vector
- 3 units T4 DNA λιγάση

Το μίγμα επώαστηκε στους 4 °C για 16-20 ώρες.

#### **2.2.1.2.8. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων**

Βακτηριακά επιλεκτικά κύτταρα E. Coli JM109 Competent Cells (Promega) μετασχηματίστηκαν με ανασυνδυασμένα πλασμίδια ακολουθώντας την παρακάτω διαδικασία.

- Σε φιαλίδια 1,5 ml προστέθηκαν 50 µl E. Coli, 5-50 ng ανασυνδυασμένου πλασμιδίου και επώαστηκαν σε πάγο για 20 min.
- Ακολούθησε επώαση στους 42 °C για 45-50 sec.
- Ακολούθησε επώαση σε πάγο για 2 min.
- Προστέθηκαν 900 µl θρεπτικού υλικού LB (Invitrogen)
- Ακολούθησε επώαση στους 37 °C με ανακίνηση 200 rpm για μία ώρα.
- 100 µl από το μίγμα μαζί με 30 µl X-Gal επιστρώθηκαν σε LB τρυβλία Petri με αμπικιλίνη
- Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 16-20 ώρες.

Οι βακτηριακές αποικίες που προέκυψαν στα τρυβλία Petri πολλαπλασιάστηκαν σε υγρή καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, μεταφέρθηκαν σε σωληνάρια 15 ml που περιείχαν 3 ml LB με αμπικιλίνη (50 µg/ml) και επώαστηκαν στους 37 °C με ανακίνηση 200 rpm για 14-18 ώρες. Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια εξήχθησαν από τα βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιώντας το Plasmid mini kit (Qiagen). Εν συντομία, έγινε λύση των κυττάρων

και τα προϊόντα της λύσης μεταφέρθηκαν στις στήλες που διατίθενται με το kit. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για τη δέσμευση του κυκλικού DNA στις στήλες και εκπλύσεις ούτως ώστε να απομακρυνθούν τα ανεπιθύμητα συστατικά. Στο τέλος, το δεσμευμένο πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύθηκε σε TE.

#### **2.2.1.2.9. Αλληλούχιση των θετικών κλώνων**

Η διαδικασία αλληλούχισης πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας, IMBB – ITE μέσω του αυτοματοποιημένου συστήματος ALFexpress II (Amersham Pharmacia – Biotech).

#### **2.2.1.2.10. Χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής**

Η αναζήτηση αλληλουχιών στο διαδίκτυο έγινε στη βάση δεδομένων INSDC (International Nucleotide Sequence Database Collaboration), χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα αναζήτησης που προσφέρεται από το NCBI στην ηλεκτρονική διεύθυνση [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Η αναζήτηση ομόλογων αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990), το οποίο προσφέρεται επίσης από το NCBI στην ηλεκτρονική διεύθυνση [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).

Η *in silico* μετάφραση των cDNAs σε πρωτεΐνες έγινε με το πρόγραμμα ORF finder (Stothard 2000), το οποίο προσφέρεται από το Bioinformatics Organization στην ηλεκτρονική διεύθυνση [http://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)

Η στοίχιση πολλαπλών αλληλουχιών έγινε με το πρόγραμμα Multalin (Corpet 1988), που προσφέρεται από το INRA στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>.

Η εύρεση συντηρημένων δομικών και λειτουργικών περιοχών στις πρωτεΐνες έγινε με τη χρήση του προγράμματος ScanProsite (Gattiker et al. 2002), που προσφέρεται από το SIB (Swiss Institute of Bioinformatics) στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://au.expasy.org/tools/scanprosite/>, καθώς και μέσω της βάσης δεδομένων Conserved Domain Database (CDD) (Marchler-Bauer et al. 2009), με τη χρήση του εργαλείου CD-search (Marchler-Bauer and Bryant 2004), το οποίο προσφέρεται από το NCBI στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>.

Η πρόβλεψη θέσεων γλυκοσυλίσωσης των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του προγράμματος Glycosylation Predictor (Hamby and Hirst 2008), το οποίο προσφέρεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://comp.chem.nottingham.ac.uk/glyco/>.

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών έγινε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED (Jones 1999, McGuffin et al. 2000), που προσφέρεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>.

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων έγινε με το υπολογιστικό πακέτο Phylip (Felsenstein 1989), που προσφέρεται στην ηλεκτρονική διεύθυνση <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.

Η κατασκευή των πρωτεϊνικών μοντέλων έγινε με το πρόγραμμα SWISS-MODEL (Arnold et al. 2006) και η απεικόνισή τους με το πρόγραμμα DeepView (Guex and Peitsch 1997). Τα παραπάνω προγράμματα προσφέρονται από την SIB στις ηλεκτρονικές διευθύνσεις <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html> και <http://spdbv.vital-it.ch/> αντίστοιχα.

### **2.2.1.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΠ-Ο ΚΑΙ ΥΕΠ-Ο ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ**

Για τη μελέτη της έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο εφαρμόστηκε η μέθοδος της Real Time PCR. Οι αντιδράσεις και η μέτρηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν σε ποσοτικό θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

#### **2.2.1.3.1. Ζωικό υλικό**

Για το πείραμα έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 12 προβατίνες. Οι 6 από αυτές βρίσκονταν στο μέσο της γαλακτικής περιόδου, 120 ημέρες μετά τον τοκετό, ενώ οι υπόλοιπες 6 βρίσκονταν στην ξηρά περίοδο, 7-14 ημέρες μετά τη διακοπή της άμελης. Οι 6 προβατίνες και στις δύο ομάδες αποτελούνταν από 3 προβατίνες της Ορεινής φυλής Ηπείρου και 3 προβατίνες μίας συνθετικής φυλής (50% Ορεινή φυλή Ηπείρου, 25% φυλή Άρτας και 25% φυλή Χίου). Όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα στεγάζονταν στις εγκαταστάσεις του Κτηνοτροφείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό τις ίδιες συνθήκες εκτροφής.

#### **2.2.1.3.2. Δειγματοληψία ιστών και οργάνων**

Με σκοπό να απομονωθεί RNA από διάφορους ιστούς προβάτου, 12 προβατίνες εσφάγησαν. Λήφθηκαν δείγματα από το μαστό, το λιπώδη ιστό, το ήπαρ, τα επινεφρίδια, τις ωοθήκες, το σπλήνα, την παρεγκεφαλίδα, το νεφρό και την καρδιά. Τα δείγματα από όλα τα ζώα αμέσως μετά την λήψη τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

### 2.2.1.3.3. Απομόνωση RNA

Για την απομόνωση του RNA, περίπου 50 mg από κάθε δείγμα λειοτριβήθηκαν παρουσία υγρού αζώτου. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε το RNAqueous 4PCR kit (Ambion). Η διαδικασία απομόνωσης του RNA περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.2. Τα δείγματα RNA ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 2 % κ.ο για την ποιοτική αξιολόγηση των δειγμάτων. Επιπλέον τα δείγματα RNA φωτομετρήθηκαν στα 260 και 280 nm με σκοπό την ποιοτική αξιολόγηση και την ποσοτικοποίηση τους.

### 2.2.1.3.4. Αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το Omniscript RT kit (Qiagen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η ίδια με αυτή που περιγράφεται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.2. Η ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής κυμάνθηκε μεταξύ των 500 ng και των 2 μg ανάλογα με την διαθέσιμη ποσότητα του RNA που απομονώθηκε από τους ιστούς.

### 2.2.1.3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Για την Real time PCR κατασκευάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές και ανιχνευτές για τα μετάγραφα των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο, βάσει των αλληλουχιών των cDNAs των δύο γονιδίων (Πίνακας 3). Οι ανιχνευτές έφεραν στο 5' άκρο τη φθορίζουσα ουσία FAM. Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκε ως ενδογενής μάρτυρας (housekeeping gene) το ριβοσωμικό RNA 18S. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές και ανιχνευτής που έφερε στο 5' άκρο του τη φθορίζουσα ουσία VIC. Οι εκκινητές και ο ανιχνευτής για κάθε γονίδιο βρίσκονταν σε έτοιμο μίγμα αντιδραστηρίων ειδικών για την αλληλουχία στόχο (Assay mix, Applied Biosystems). Σε κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιήθηκαν ταυτοχρόνως δύο assay mix, ένα για το υπό μελέτη γονίδιο (ΕΠ-Ο ή ΥΕΠ-Ο) και ένα για το ενδογενές γονίδιο (multiplex PCR).

**Πίνακας 3:** Αλληλουχίες και θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real Time PCR.

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Θέση
ΕΠ-Ο	UPA-T2F	CCACAGTGGGAAACAGATTCCT	1228-1249
	UPA-T2R	CGGCCTTGGATGGTACAGA	1277-1295
ΥΕΠ-Ο	UPAR-T2F	CGTGGCTGAAGCCTTCGA	851-868
	UPAR-T2R	TGGTTACAGCCATTTCCAGTACAG	893-916
	Ανιχνευτής		
ΕΠ-Ο	UPA-T2M2	CCAGCGGGCCTCCTGA	1261-1276
ΥΕΠ-Ο	UPAR-T2M1	ACCCACGTCAACGTC	873-887

Για την αντίδραση της PCR, σε τελικό όγκο 20 µl, αναμίχθηκαν τα παρακάτω:

- 0,5 µl από τα προϊόντα της αντίδρασης της αντίστροφης μεταγραφής (κεφ. 2.2.1.3.4)
- 1 µl Assay mix γονιδίου στόχου (ΕΠ-Ο ή ΥΕΠ-Ο)
- 1 µl Assay mix ενδογενούς μάρτυρα 18S
- 10 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix
- 8 µl H<sub>2</sub>O

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν το εξής:

- 50 °C για 2 min
- 95 °C για 10 min
- 40 κύκλοι
  - 95 °C για 15 sec
  - 60 °C για 1 min

Κάθε αντίδραση πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν, ενώ για κάθε πιάτο αντίδρασης (Reaction plate) πραγματοποιούνταν αντιδράσεις αρνητικού μάρτυρα (απουσία cDNA) εις τριπλούν για κάθε assay mix.

Για τον υπολογισμό των λόγων έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο, στη σχετική ποσοτικοποίηση εφαρμόστηκε το μαθηματικό μοντέλο 2-ΔΔCt (Livak and Schmittgen 2001), με τη χρήση του λογισμικού 7500 Software v2.0.1 (Applied Biosystems).



#### 2.2.1.3.6. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του t-test. Οι τιμές εκφράστηκαν ως μέσοι όροι μαζί με τα τυπικά τους σφάλματα. Το διάστημα εμπιστοσύνης τέθηκε στο 95%. Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος PASW Statistics 17 (SPSS Inc).

## 2.2.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 2.2.2.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ cDNAs ΤΟΥ ΕΠ-Ο ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΕΠ-Ο

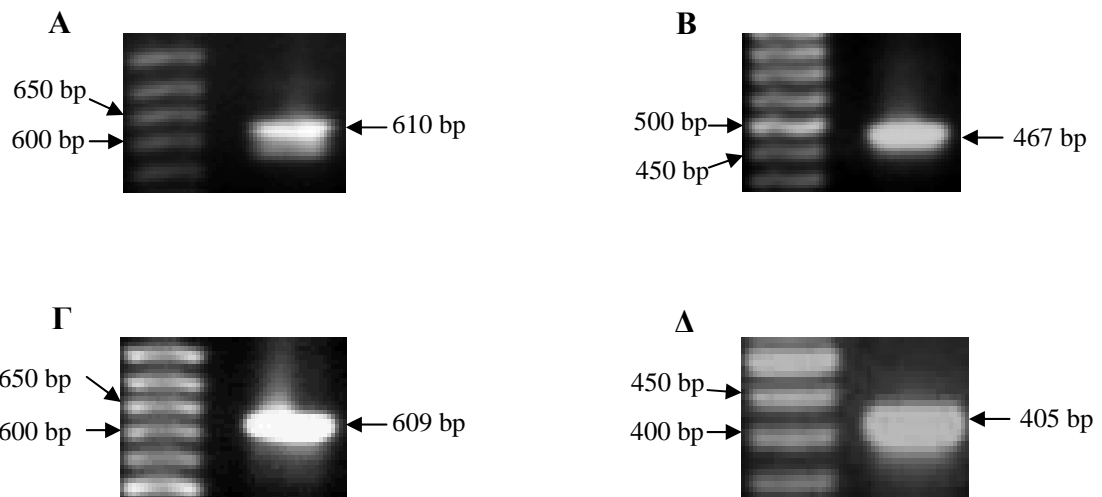
Από την κλωνοποίηση των cDNAs του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο προέκυψε ένα μετάγραφο για το κάθε γονίδιο. Οι ολοκληρωμένες αλληλουχίες των δύο μεταγράφων προέκυψαν από την ένωση τεσσάρων αλληλοεπικαλυπτόμενων τμημάτων για το κάθε γονίδιο.

#### 2.2.2.1.1. Κλωνοποίηση των μεσαίων τμημάτων των cDNAs

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 1 του ΕΠ-Ο, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UPAf1 και UPAr1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1Α, από την PCR προέκυψαν δύο ζώνες. Από τις δύο αυτές ζώνες επιλέχθηκε η εντονότερη από τις δύο, καθώς το μέγεθος της, περί τα 600bp (ζεύγη βάσεων), αντιστοιχούσε στο αναμενόμενο, σύμφωνα με τη θέση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, τμήμα DNA. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 1. Το τμήμα 1 έχει μήκος 610 bp και εμφανίζει ομολογία 93, 87, 86, 79 και 80 % με το cDNA των βοοειδών (Kratzschmar et al. 1993), του χοίρου (Nagamine et al. 1984), του ανθρώπου (Jacobs et al. 1985, Nagai et al. 1985), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Belin et al. 1985) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 746<sup>η</sup> ως την 1355<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΕΠ-Ο του προβάτου.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 2 του ΕΠ-Ο, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UPAf1 και UPAr2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1Β, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 2. Το τμήμα 2 έχει μήκος 467 bp και εμφανίζει ομολογία 92, 86, 85, 78 και 79 % με το cDNA των βοοειδών (Kratzschmar et al. 1993), του χοίρου (Nagamine et al. 1984), του ανθρώπου (Jacobs et al. 1985, Nagai et al. 1985), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Belin et al. 1985) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 746<sup>η</sup> ως την 1212<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΕΠ-Ο του προβάτου. Το τμήμα 2 αποτελεί ουσιαστικά το μεγαλύτερο μέρος του τμήματος 1. Η ομοιότητα που παρουσιάζει το τμήμα 2 με την αντίστοιχη περιοχή του τμήματος 1 είναι 100 %.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 1 του ΥΕΠ-Ο, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UPARf1 και UPARr1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1Γ, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 1. Το τμήμα 1 έχει μήκος 609 bp και εμφανίζει ομολογία 95, 77, 72 και 72 % με το cDNA των βοοειδών (Reuning et al. 1993), του ανθρώπου (Roldan et al. 1990, Min et al. 1992, Pyke et al. 1993), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Suh et al. 1994) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 170<sup>η</sup> ως την 778<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΥΕΠ-Ο του προβάτου.

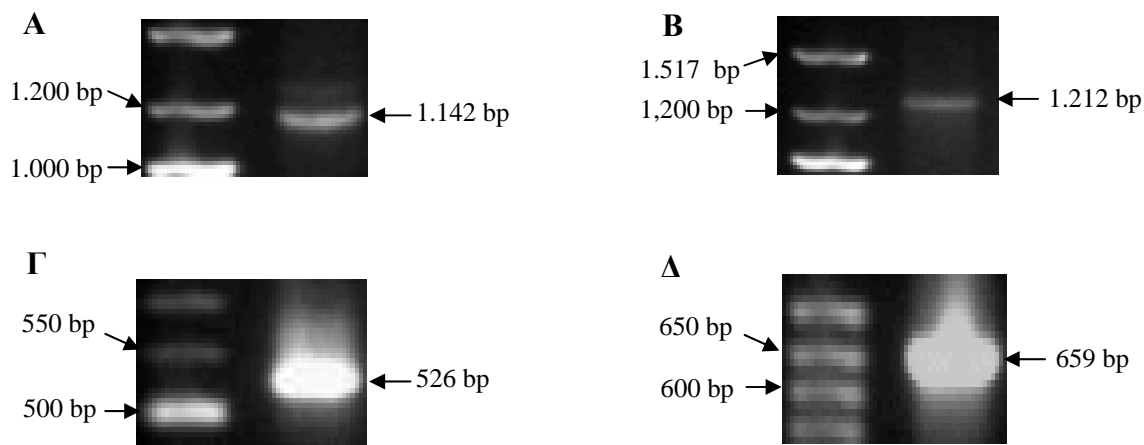


**Εικόνα 1:** Προϊόντα PCR από την ενίσχυση των τμημάτων 1 και 2 των μεταγράφων του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο. Σε όλες τις φωτογραφίες, στην αριστερή θέση βρίσκεται ο δείκτης μοριακού βάρους. **Α.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 1 του ΕΠ-Ο. **Β.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 2 του ΕΠ-Ο. **Γ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 1 του ΥΕΠ-Ο. **Δ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 2 του ΥΕΠ-Ο.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 2 του ΥΕΠ-Ο, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές UPARf2 και UPARr1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 1Δ, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 2. Το τμήμα 2 έχει μήκος 405 bp και εμφανίζει ομολογία 96, 79, 74 και 74 % με το cDNA των βοοειδών (Reuning et al. 1993), του ανθρώπου (Roldan et al. 1990, Min et al. 1992, Pyke et al. 1993), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Suh et al. 1994) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 373<sup>η</sup> ως την 778<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΥΕΠ-Ο του προβάτου. Το τμήμα 2 αποτελεί ουσιαστικά μέρος του τμήματος 1. Η ομοιότητα που παρουσιάζει το τμήμα 2 με την αντίστοιχη περιοχή του τμήματος 1 είναι 100 %.

### 2.2.2.1.2. Κλωνοποίηση των ακραίων τμημάτων των cDNAs

Το τμήμα 3 του ΕΠ-Ο περιλαμβάνει το 3'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρη την 3' μη κωδικεύουσα περιοχή (UTR). Στην εικόνα 2Α παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 3' RACE Inner και UPAf3. Το τμήμα 3 αποτελείται από 1142 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με το τμήμα 1 περιοχή, μεγέθους 147 bp. Τα τμήματα 1 και 3 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή. Οι πρώτες 223 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν μέρος της κωδικεύουσας περιοχής, ενώ οι επόμενες 919 βάσεις αποτελούν το 3' UTR του γονιδίου. Η αλληλουχία που αποτελεί μέρος της κωδικεύουσας περιοχής εμφανίζει ομολογία 95, 87, 86, 82 και 83 % με το cDNA των βοοειδών (Kratzschmar et al. 1993), του χοίρου (Nagamine et al. 1984), του ανθρώπου (Jacobs et al. 1985, Nagai et al. 1985), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Belin et al. 1985) αντίστοιχα. Στο 3' UTR εμφανίζεται σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές στα βοοειδή (92 %), στο χοίρο (83 %) και στον άνθρωπο (77 %), ενώ μικρότερη ομολογία παρουσιάζει με τις αντίστοιχες περιοχές στον αρουραίο (69 %) και στους επίμυες (71 %).



**Εικόνα 2:** Προϊόντα PCR από την ενίσχυση των τμημάτων 3 και 4 των μεταγράφων του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο. Σε όλες τις φωτογραφίες, στην αριστερή θέση βρίσκεται ο δείκτης μοριακού βάρους. **Α.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 3 του ΕΠ-Ο. **Β.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 4 του ΕΠ-Ο. **Γ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 3 του ΥΕΠ-Ο. **Δ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 4 του ΥΕΠ-Ο.

Το τμήμα 4 του ΕΠ-Ο περιλαμβάνει το 5'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρο το 5' UTR. Στην εικόνα 2Β παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 5' RACE Inner και UPAr2. Το τμήμα 4 αποτελείται από 1212 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με τα τμήματα 1 και 2 περιοχή, μεγέθους

467 bp. Τα τμήματα 1, 2 και 4 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή. Οι πρώτες 129 βάσεις του τμήματος 4 αποτελούν το 5' UTR του γονιδίου, ενώ οι επόμενες 1083 είναι μέρος της κωδικεύουσας περιοχής. Η αλληλουχία που αποτελεί μέρος της κωδικεύουσας περιοχής εμφανίζει ομολογία 93, 85, 84, 78 και 78 % με το cDNA των βοοειδών (Kratzschmar et al. 1993), του χοίρου (Nagamine et al. 1984), του ανθρώπου (Jacobs et al. 1985, Nagai et al. 1985), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Belin et al. 1985) αντίστοιχα. Στο 5' UTR εμφανίζεται σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές στα βοοειδή (96 %) και στο χοίρο (70 %), ενώ δεν εμφανίζεται σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές στον άνθρωπο, στον αρουραίο και στους επίμυες. Ωστόσο, άξια αναφοράς είναι η παρουσία μίας αλληλουχίας 13 νουκλεοτιδίων (CTGTCTAGAGCCC) που εμφανίζεται στο πρόβατο, τα βοοειδή, το χοίρο και τους επίμυες, 26 νουκλεοτίδια ανωφερικά του κωδικονίου έναρξης της μετάφρασης.

Το τμήμα 3 του ΥΕΠ-Ο περιλαμβάνει το 3'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρη το 3' UTR. Στην εικόνα 2Γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 3' RACE Inner Primer και UPARf3. Το τμήμα 3 αποτελείται από 526 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με τα τμήματα 1 και 2 περιοχή, μεγέθους 57 bp. Τα τμήματα 1, 2 και 3 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή. Οι πρώτες 280 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν μέρος της κωδικεύουσας περιοχής, ενώ οι επόμενες 246 βάσεις αποτελούν το 3' UTR του γονιδίου. Η αλληλουχία που αποτελεί μέρος της κωδικεύουσας περιοχής εμφανίζει ομολογία 96, 72 και 70 % με το cDNA των βοοειδών (Reuning et al. 1993), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Suh et al. 1994) αντίστοιχα, ενώ εμφανίζει 76 % ομολογία με τα μετάγραφα 1 και 3 του ανθρώπου (Min et al. 1992, Pyke et al. 1993). Το μετάγραφο 2 του ανθρώπου (Roldan et al. 1990) παρουσιάζει υψηλή (90 %) ομολογία με τμήμα που αντιστοιχεί στο 22 % περίπου του συνολικού μήκους της αλληλουχίας. Το 3' UTR του μεταγράφου του ΥΕΠ-Ο του προβάτου παρουσιάζει σημαντική ομολογία μόνο με τις αντίστοιχες περιοχές του μεταγράφου των βοοειδών (93%) και των μεταγράφων 1 και 3 του ανθρώπου (84% και για τα δύο).

Το τμήμα 4 του ΥΕΠ-Ο περιλαμβάνει το 5'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρο το 5' UTR. Στην εικόνα 2Δ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 5' RACE Inner Primer και UPARfRACE. Το τμήμα 4 αποτελείται από 659 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη περιοχή με το τμήμα 1 μεγέθους 490 bp και μία με το τμήμα 2 μεγέθους 287 bp. Το τμήμα 4 παρουσιάζει 100 % ομολογία στις αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές με τα τμήματα 1 και 2. Οι πρώτες 44 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν το 5' UTR του γονιδίου, ενώ οι επόμενες 615 είναι μέρος της κωδικεύουσας περιοχής. Η αλληλουχία που αποτελεί μέρος της κωδικεύουσας περιοχής εμφανίζει ομολογία 93, 76, 70 και 71 % με το cDNA των βοοειδών (Reuning et al. 1993), του ανθρώπου (Roldan et al. 1990, Min et al. 1992, Pyke et al. 1993), του αρουραίου (Strausberg et al. 2002) και των επιμύων (Suh et al.

1994), αντίστοιχα. Το 5' UTR του μεταγράφου του ΥΕΠ-Ο του προβάτου παρουσιάζει σημαντική ομολογία μόνο με την αντίστοιχη περιοχή του μεταγράφου των βοοειδών (97%).

### 2.2.2.1.3. Χαρακτηρισμός των cDNAs του ΕΠ-Ο και του ΥΕΠ-Ο

Από το συνδυασμό των τμημάτων 1, 2, 3 και 4 του ΕΠ-Ο προκύπτει η συνολική αλληλουχία του μεταγράφου του ΕΠ-Ο του προβάτου μήκους 2350 bp. Στην εικόνα 3 παρουσιάζεται η αλληλουχία του cDNA του ΕΠ-Ο στο πρόβατο. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μεταγράφου αποκάλυψε ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μήκους 1302 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στις βάσεις 130-132 και το κωδικόνιο λήξης στις βάσεις 1429-1431. Η κωδικεύουσα περιοχή (coding sequence, CDS) του ΕΠ-Ο του πρόβατο είναι ίδια σε μήκος με αυτή των βοοειδών και των επιμύων. Αντίθετα, είναι μεγαλύτερη από τις CDS του ανθρώπου και των επιμύων κατά 6 και 3 βάσεις αντίστοιχα. Η CDS του ΕΠ-Ο του προβάτου παρουσιάζει 93 % ομοιότητα με την CDS των βοοειδών (GenBank NM\_174147), 86 % ομοιότητα με την CDS του χοίρου (GenBank NM\_213945), 85 % με την CDS και των δύο μεταγράφων του ανθρώπου (GenBank NM\_002658 και NM\_001145031), 80 % με την CDS του αρουραίου (GenBank NM\_013085) και 78 % με την CDS των επιμύων (GenBank AF408407).

Όσον αφορά τις μη μεταφραζόμενες περιοχές του μεταγράφου κλωνοποιήθηκαν ολόκληρες οι 3' και 5' UTR περιοχές. Το 3' UTR έχει μήκος 919 bp και παρουσιάζει σημαντική ομολογία με όλα τα είδη που ελέγχθηκαν (69 - 91 %). Ωστόσο, ενώ στα βοοειδή, το χοίρο και τον άνθρωπο το ποσοστό αυτό ομολογίας αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 90 % του συνολικού μήκους του, στον αρουραίο και τους επίμυες η ομολογία αυτή αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 50% του συνολικού μήκους του. Το 3' UTR του προβάτου είναι το μικρότερο ανάμεσα στα είδη που εξετάστηκαν χωρίς ωστόσο να υπολείπεται πολύ των υπολοίπων των οποίων τα μεγέθη κυμαίνονται από 937 έως 1056 bp. Στο 3' UTR παρατηρείται ένα μόνο κανονικό σήμα πολυαδενυλίωσης (AAUAAA) το οποίο βρίσκεται 26 νουκλεοτίδια ανωφερικά του 3' άκρου, ωστόσο δεν παρατηρείται πολύ(A) ουρά.

Το 5' UTR έχει μήκος 129 bp και παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με το 5' UTR των βοοειδών (96 %), ενώ παρουσιάζει μικρότερο βαθμό ομολογίας με το 5' UTR του χοίρου (70 %). Και στις δύο περιπτώσεις η ομολογία αυτή αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε ποσοστό >95 % του συνολικού μήκους του. Τέλος, δε βρέθηκε σημαντική ομολογία του 5'UTR του προβάτου με τις αντίστοιχες περιοχές των cDNAs του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Το 5' UTR του προβάτου είναι το δεύτερο μεγαλύτερο μετά από αυτό του μεταγράφου 1 του ανθρώπου (147 bp). Τα 5' UTR των βοοειδών, του χοίρου και του μεταγράφου 2 του ανθρώπου είναι παραπλήσια σε μέγεθος με αυτό του προβάτου (118 και 115 bp

αντίστοιχα), ενώ του αρουραίου και των επιμύων είναι σημαντικά μικρότερα (63 και 58 bp αντίστοιχα). Στο 5' UTR παρατηρείται ότι η αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, (5'-ACCATGA-3'), βρίσκεται σε μερική ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία [A/G]XXAUGG που παρατηρείται σε όλα τα θηλαστικά (Kozak 1981) και χαρακτηρίζεται ως επαρκής συναινετική αλληλουχία (Kozak 1986). Η αντικατάσταση της γουανίνης με αδερίνη στη θέση 7 της αλληλουχίας ενδέχεται να επηρεάζει την ποσότητα της παραγόμενης πρωτεΐνης (Kozak 1984).

Η αλληλουχία του cDNA του ΕΠ-Ο του προβάτου καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων της GenBank με κωδικό FJ803199.





2101 - GGTGATGATATGTATAAAATGTATCATTCTAGGGCACAGACTGTGAGAAGCACTAAATTTG  
 2161 - CAGTTTCAGTTTCACATAGACGTTTTCTTGGCCAGTTTTCCCTTCTGACCTTCTAACTGA  
 2221 - ATTCAATCCAATATTCACACTGAGTGAGGTGAGGACCACTCCTGTACACTGAATATTTAATAA  
 2281 - TTATATTCTGGTATTTTTATTTATATCTATTTTGTAAATTTGAAATAAATATGAAAAAAA  
 2341 - ATTAGGTGAA

**Εικόνα 3:** Αλληλουχία του cDNA και πρωτεϊνική αλληλουχία του ΕΠ-Ο του προβάτου. Τα σημεία έναρξης και λήξης της μετάφρασης έχουν σκιαστεί. Σε πλαίσιο βρίσκονται στο 5' άκρο του μεταγράφου η αλληλουχία τύπου Kozak και στο 3' άκρο το μοναδικό σήμα πολυαδενυλίωσης του μεταγράφου.

Από το συνδυασμό των τμημάτων 1, 2, 3 και 4 του ΥΕΠ-Ο προκύπτει η αλληλουχία του μεταγράφου του ΥΕΠ-Ο του προβάτου συνολικού μήκους 1247 bp. Στην εικόνα 4 παρουσιάζεται η αλληλουχία του cDNA του ΥΕΠ-Ο στο πρόβατο. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μεταγράφου αποκάλυψε ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μήκους 957 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στις βάσεις 45-47 και το κωδικόνιο λήξης στις βάσεις 999-1001. Το μήκος της CDS του ΥΕΠ-Ο στο πρόβατο είναι το μικρότερο από τα πέντε είδη που εξετάστηκαν με εξαίρεση τα μετάγραφα 2 και 3 του ανθρώπου (846 και 873 bp αντίστοιχα). Για τα υπόλοιπα είδη το μήκος της CDS κυμαίνεται από 948 έως 1008 bp. Η CDS του ΥΕΠ-Ο του προβάτου παρουσιάζει 95 % ομοιότητα με την CDS των βοοειδών (GenBank NM\_174423), 76 % με την CDS και των τριών μεταγράφων του ανθρώπου (GenBank NM\_002659, NM\_001005376 και NM\_001005377), 71 % με την CDS του αρουραίου (GenBank NM\_017350) και 71 % με την CDS των επιμύων (GenBank NM\_011113).

Όσον αφορά τις μη μεταφραζόμενες περιοχές του μεταγράφου κλωνοποιήθηκαν ολόκληρες οι 3' και 5' UTR περιοχές. Το 3' UTR έχει μήκος 246 bp και παρουσιάζει σημαντική ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή στα βοοειδή (93 %) και με τα μετάγραφα 1 και 2 του ανθρώπου (84 % και για τα δύο). Αντίθετα, δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των μεταγράφων του αρουραίου και των επιμύων. Στα βοοειδή, το ποσοστό αυτό ομολογίας αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 95 % του συνολικού μήκους του, ενώ στον άνθρωπο η ομολογία αυτή και στις δύο περιπτώσεις αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου, το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 70 % του συνολικού μήκους του. Το 3' UTR του προβάτου είναι σαφώς το μικρότερο ανάμεσα στα είδη που εξετάστηκαν καθώς το μήκος των 3' UTR των μεταγράφων των υπολοίπων ειδών κυμαίνεται μεταξύ 272 και 402 bp. Στο 3' UTR παρατηρούνται δύο αλληλεπικαλυπτόμενα πιθανά σήματα πολυαδενυλίωσης (AAAAAA και AAAAAG) τα οποία βρίσκονται 33 και 32 νουκλεοτίδια αντίστοιχα ανωφερικά της πολύ(A) ουράς, ενώ παρατηρείται πολύ(A) ουρά μήκους 14 νουκλεοτιδίων.

Το 5' UTR έχει μήκος 44 bp και παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας μόνο με το 5' UTR των βοοειδών (96 %), ενώ δε βρέθηκε σημαντική ομολογία του 5' UTR του προβάτου με τις αντίστοιχες περιοχές των μεταγράφων του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Το 5' UTR του προβάτου είναι μεγαλύτερο σε μήκος από τις

αντίστοιχες περιοχές των βοοειδών (33 bp), του αρουραίου (33 bp) και των επιμύων (33 bp). Στο 5' UTR παρατηρείται ότι η αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, (5'-GACATGG-3'), βρίσκεται σε απόλυτη ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία [A/G]XXAUGG που παρατηρείται σε όλα τα θηλαστικά (Kozak 1981) και χαρακτηρίζεται ως ισχυρή συναινετική αλληλουχία (Kozak 1986).

Η αλληλουχία του cDNA του ΥΕΠ-Ο του προβάτου καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων της GenBank με κωδικό FJ803200.

```

1 - AAAGAGAGGTGCAGGAAGATCGCGAGCAGGAGCCACCGTCCGACATGGACCAAAAACCGC
                                     M D Q K P L
61 - TGCTGCTACTGCTGTTGGTTCACACCTACGTTCCAGCCTCTTGGGGCCTGCGATGCGTCC
    L L L L L V H T Y V P A S W G L R C V Q
121 - AGTGTAAAGAACGCAACGAGCTGCAGTGTGAAGAGTGTGCTCCTGGTCAGGACCTCTGCA
    C K N A T S C S V E E C A P G Q D L C R
181 - GGACCACGGTCTTGAGTGTGTGGGAAGGCAGCAACAAGATGAATGTGATGAGGAAAGGCT
    T T V L S V W E G S N K M N V M R K G C
241 - GTACCCATCCGGACAAGACCAACAGGTCCATGAGCTATCGGGCTGGAAATCAGATCATCA
    T H P D K T N R S M S Y R A G N Q I I T
301 - CCCTTTCAGAGGCCGTGTGCGGGTCAGACTTGTGCAACAAGCCCAACCCTGGTCCAGATG
    L S E A V C G S D L C N K P N P G P D A
361 - CTACTTTTCCAGAAACCGCTACCTTGAATGTGCTTCCCTGTGSCCTCGACAGACCTCACCT
    T F S R N R Y L E C A S C A S T D L T C
421 - GTGAGAGGGGCTGGGACCAGAGCATGCAATGCCTCAAATCTAGAGATCAGTGCCTGGATG
    E R G W D Q S M Q C L K S R D Q C V D V
481 - TGATAACCCACCGGAGCCTGAAAGAGAATCCAGAGGATGAGCGCCACATGAAAGGCTGCG
    I T H R S L K E N P E D E R H M K G C G
541 - GCATCCTTCCCTGGCTGCCAGGCCCCACCGGATTCACAACAACCACACCTTCCACTTCC
    I L P G C P G P T G F H N N H T F H F L
601 - TCGGTTGCTGCAACACCACCAAAATGCAATGCGGGCCAGTCCCTGGAGATTCAAAACCTGC
    R C C N T T K C N A G P V L E I Q N L P
661 - CACCAAACGGCTTGCAGTGTACAGCTGTGAGGGGAACAGCGCCACAGGTGTTCTCTCTG
    P N G L Q C Y S C E G N S A H R C S S E
721 - AAGAACTTTCCTCATGACTGCCCGGCCCTATGAATCAATGTCTGGAAGCGACAGGCA
    E T F L I D C R G P M N Q C L E A T G T
781 - CTAAGGACTGAGGAACCCAAGCTACACCATCAGAGGCTGCGCAGCCCCCTCGTGGTGCC
    K G L R N P S Y T I R G C A A P S W C Q
841 - AAAGCCTCCACGTGGCTGAAGCCTTCGACCTCACCCACGTCAACGTCTCCTGCTGTACTG
    S L H V A E A F D L T H V N V S C C T G
901 - GAAATGGCTGTAACCACCCAGCCAGGGACGCCAGCCCCGCAAGGGGGTGGCCCCCAGAC
    N G C N H P A R D A Q P R K G V P P R P
961 - CAGCCCTGCCACCTCAGCTTCTTGTGAGCCTGCTGTGACTGCCAGGCTTTGGGGAGC
    A L P T S A S L S A C C *
1021 - CACTCTCCTCTGCACTTGAACCCACATTCACCCACACTGGCTGGATCCAGGGGACCCC
1081 - TTTGCCCTTCCCTCAGTTCACAGCCCTACTAACTTACTGTGTGACCTCAGGCCAGTGGGC
1141 - TGCCCTCTCTGGGCTTCACTTTCCAGCTGCCAGAGAGAGCTGTGAGAACCAGAGA
1201 - AAAAAAGCTAGCAAAAAGGCTGCCGGCCAGCTGGAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

**Εικόνα 4:** Αλληλουχία του cDNA και πρωτεϊνική αλληλουχία του ΥΕΠ-Ο του προβάτου. Τα σημεία έναρξης και λήξης της μετάφρασης έχουν σκιαστεί. Σε πλαίσιο βρίσκονται στο 5' άκρο του μεταγράφου η αλληλουχία τύπου Kozak και στο 3' άκρο τα αλληλεπικαλυπτόμενα σήματα πολυαδενυλίωσης του μεταγράφου, ενώ η πολυ-(A) ουρά υπογραμμίζεται.

Από τα ποσοστά ομολογίας των αλληλουχιών των κωδικεύουσων και των UTR περιοχών των cDNAs των δύο γονιδίων με τις ορθόλογες αλληλουχίες με άλλα θηλαστικά προκύπτει ότι και τα δύο γονίδια συντηρούνται σε μεγάλο βαθμό, ωστόσο παρατηρείται μεγαλύτερος βαθμός ομολογίας με τα βοοειδή σε σύγκριση με τα υπόλοιπα θηλαστικά. Το εύρημα αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς και οι δύο οργανισμοί ανήκουν στα μηρυκαστικά.

## **2.2.2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΩΝ cDNAs ΤΩΝ ΕΠ-Ο ΚΑΙ ΥΕΠ-Ο**

### **2.2.2.2.1. Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΕΠ-Ο**

Το cDNA του ΕΠ-Ο του προβάτου κωδικεύει μια πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 434 αμινοξέα, με θεωρητικό μοριακό βάρος 48,5 KDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI), 8,2. Ωστόσο το πειραματικό βάρος της πρωτεΐνης αναμένεται να διαφέρει εξαιτίας της γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη του προβάτου έχει εννέα αμινοξέα λιγότερα από αυτή του χοίρου (NCBI: P014185) ενώ έχει δύο αμινοξέα περισσότερα από αυτή του ανθρώπου (CAI13969) και ένα αμινοξύ περισσότερο από αυτή του αρουραίου (P29598). Επιπλέον, έχει τον ίδιο αριθμό αμινοξέων με τις πρωτεΐνες των βοοειδών (NP\_776572) και των επιμύων (NP\_032899). Η πρωτεΐνη του προβάτου παρουσιάζει αρκετά υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες των υπολοίπων οργανισμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη (88 %) ομοιότητα με την πρωτεΐνη των βοοειδών, ενώ ακολουθούν του χοίρου (82 %), του ανθρώπου (78 %), του αρουραίου (71 %) και των επιμύων (70 %). Η σημαντικότερη ένθεση παρατηρείται στο χοίρο στο σημείο 157 όπου παρατηρείται η ένθεση 9 αμινοξέων σε σχέση με τις πρωτεΐνες των άλλων οργανισμών.

Στην εικόνα 5 έχουν στοιχηθεί οι πρωτεΐνες του προβάτου, των βοοειδών του χοίρου, του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων.

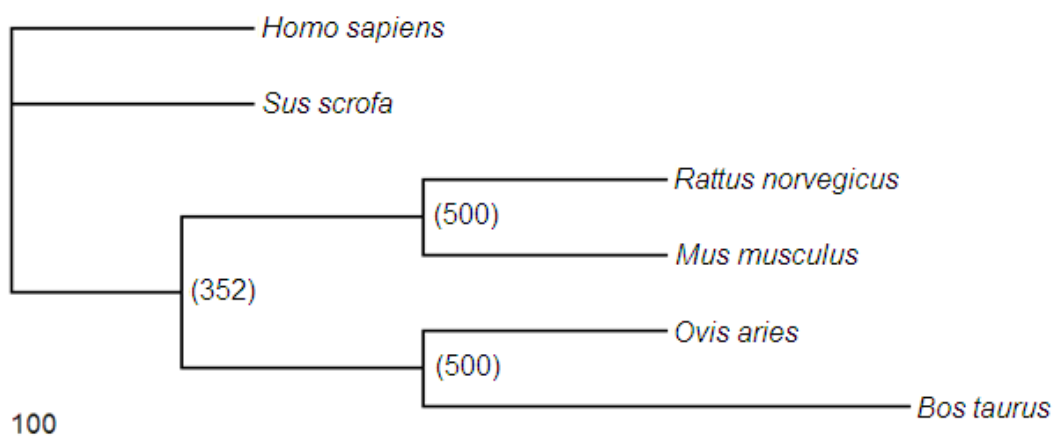


Ovis aries	VRVLAACILVQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	100
Bos taurus	VRVLAACILVQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	100
Sus scrofa	VRVLAACILVQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	100
Homo sapiens	VRVLAACILVQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	98
Rattus norvegicus	KRVWIASIFLQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	98
Mus musculus	KRVWIASIFLQCLVVSLSGNSNEVHRKESG	SDCCNGGCVSKYFSIQRCCHKFCGEICEDIS	TCVGNCHSYRGRANITLGRPCLMDSAT	99
consensus m	a l c lv s g	s c c n g g c v k y f s i q r c c h k f c g e i c e d i s t c v g n c h s y r g r a n i t l g r p c l m d s a t	g r p l m d s a t	
Ovis aries	VILKVFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	191
Bos taurus	VILKVFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	191
Sus scrofa	VILNIFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	200
Homo sapiens	VLCQIFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	189
Rattus norvegicus	VLCQIFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	189
Mus musculus	VLCQIFYAHRRDAICLGLGKHNRYCRNPN	CRPWCYVQIGKQFVQECMVQICGAS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	190
consensus vl	y a h r d a i c l g l g k h n y c r n p d n	r p w c y v q i g k q f v q e c m v q i c g a s	k p s	f q c g q k l r p r f i g g t e i p s
Ovis aries	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	290
Bos taurus	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	290
Sus scrofa	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	299
Homo sapiens	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	288
Rattus norvegicus	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	289
Mus musculus	QPWEAAIYRRHRGGSV	TYLCCGSLISPCWVSAHCFINLHFKEDYVVILGRSLNS	SPHNGEMFEVRLILHEDYSADSLAHNDIALLKIRISLCC	290
consensus qpweaaay	ggs	c g g s l i s p c w v s a h c f i n l h f k e d y v v i l g r s l n s	g e m f e v r l i l h e d y s a d s l a h n d i a l l k i r i s l c c	
Ovis aries	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	390
Bos taurus	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	390
Sus scrofa	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	399
Homo sapiens	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	388
Rattus norvegicus	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	389
Mus musculus	AQPSRSIQITICLIEFHEHDAHSRIRCEIIGFGFENPFS	DYDYEELKRMVIVSEEDCQPHYYGDEVIT	KMLCAADPQWIDSCGDSGGPIVCIICGR	390
consensus aqpsr	iqticl i e f h e h d a h s r i r c e i i g f g f e n p f s	d y d y e e l k r m v i v s e e d c q p h y y g d e v i t	k m l c a a d p q w i d s c g d s g g p i v c i i c g r	
Ovis aries	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	433
Bos taurus	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	433
Sus scrofa	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	442
Homo sapiens	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	431
Rattus norvegicus	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	432
Mus musculus	ILIGIVSWGRCCKKKEGVYTRVSEIWIHTRCEINLVI	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	.....KHESSPKERVFQCGQQLRPRFIVGGEFTIPS	433
consensus tl	g i v s w g r c c k k e g v y t r v s e i w i h t r c e i n l v i			

**Εικόνα 5:** Στοιχισμός των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos Taurus*), του χοίρου (*Sus scrofa*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*) για τον ΕΠ-Ο. Τα μη συντηρημένα αμινοξέα δεν έχουν σκιαστεί. Τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε όλα τα είδη έχουν κυανή σκίαση, τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε πέντε από τα έξι είδη έχουν γαλάζια σκίαση και τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε τρία ή τέσσερα από τα έξι είδη έχουν ερυθρή σκίαση. Στην εικόνα με υπογράμμιση σημειώνονται η δομή τύπου EGF (ερυθρό), το σημείο πρόσδεσης του ΥΕΠ-Ο (διπλή ερυθρή υπογράμμιση) η δομή τύπου Kringle (γαλάζιο) και η δομή της πρωτεΐνης τύπου σερίνης (πράσινο).

### 2.2.2.2.2. Φυλογενετική ανάλυση του ΕΠ-Ο

Το φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΕΠ-Ο στα διάφορα είδη παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Η πιθανότητα κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Το δενδρόγραμμα της εικόνας 6 αντιπροσωπεύει το πιθανότερο δέντρο, μετά από 500 bootstrap επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στην εικόνα σχηματίζονται δύο φυλογενετικές ομάδες, αυτή των τρωκτικών και αυτή των μηρυκαστικών ζώων. Η φυλογενετική συγγένεια της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο του προβάτου με την αντίστοιχη στα βοοειδή ήταν αναμενόμενη καθώς η ομολογία τους ήταν πολύ υψηλή.



**Εικόνα 6:** Φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΕΠ-Ο του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos taurus*), του χοίρου (*Sus scrofa*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*). Στις διακλαδώσεις, εντός παρενθέσεως, αναγράφεται ο αριθμός των επιτυχημένων bootstrap επαναλήψεων, ενώ κάτω αριστερά παρουσιάζεται η κλίμακα για τη γενετική απόσταση. Η κατασκευή του φυλογενετικού δενδρογράμματος έγινε με τη χρήση του προγράμματος PHYLIP.

### 2.2.2.2.3. Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο

Η εύρεση χαρακτηριστικών δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαδικτυακών προγραμμάτων ScanProsite και CD-search.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων η πρωτεΐνη του ΕΠ-Ο του προβάτου αποτελείται από ένα πεπτίδιο σηματοδότησης μήκους 20 αμινοξέων (αμινοξέα 1-20), μία δομή τύπου επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) (αμινοξέα 29-65), μία δομή τύπου Kringle (αμινοξέα 69-154) και την περιοχή πρωτεΐνωσης τύπου σερίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης (αμινοξέα 181-424). Εντός της δομής



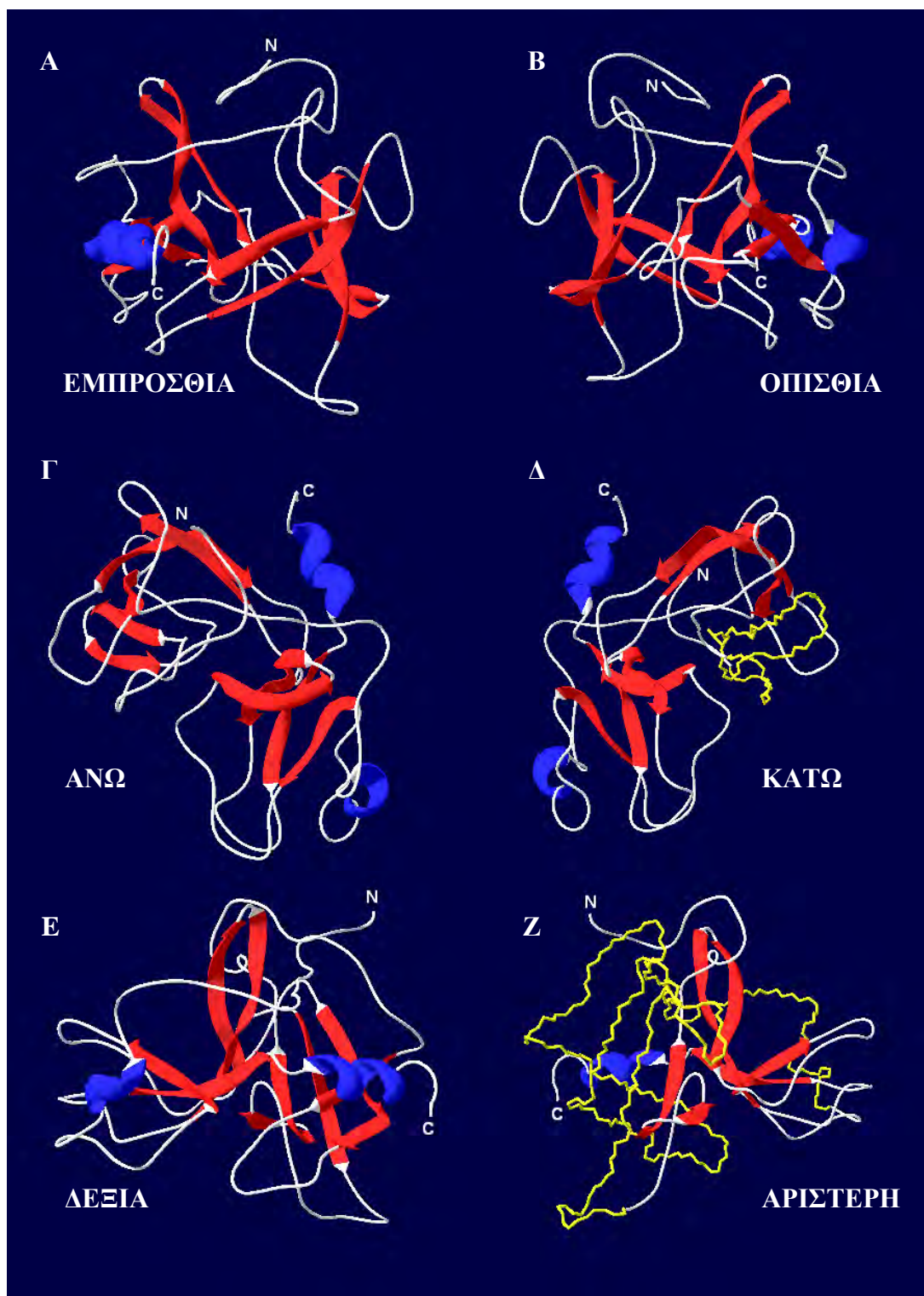
τύπου EGF εμπεριέχεται το σημείο πρόσδεσης του ΕΠ-Ο στον υποδοχέα του (αμινοξέα 36-59). Επιπλέον τα αμινοξέα 96, 106, 134, 136 και 144 αναγνωρίστηκαν ως σημεία πρόσδεσης συνδετών. Τα αμινοξέα αυτά είναι συντηρημένα σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν με εξαίρεση τη φαινυλαλανίνη144, η οποία στο χοίρο και τον άνθρωπο αντικαθιστάται με λευκίνη. Τέλος, η σημαντικότερη περιοχή του ΕΠ-Ο όπου βρίσκεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, η περιοχή πρωτεΐνάσης τύπου σερίνης περιλαμβάνει την καταλυτική τριάδα της ιστιδίνης226, ασπαραγινικού οξέος277 και σερίνης378. Επιπρόσθετα, στη δομή πρωτεΐνάσης τύπου σερίνης κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, υπάρχουν τρία σημεία πρόσδεσης υποστρώματος (ασπαραγινικό οξύ372, σερίνη397 και γλυκίνη399). Τόσο τα αμινοξέα της καταλυτικής τριάδας όσο και τα αμινοξέα πρόσδεσης του υποστρώματος συντηρούνται σε όλους τους οργανισμούς που εξετάστηκαν. Τέλος, παρουσιάζονται πέντε πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης από τις οποίες οι 4 είναι συντηρημένες σε όλους τους οργανισμούς (ασπαραγίνη76, 122, 129 και 276).

#### **2.2.2.2.4. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο**

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΕΠ-Ο έγινε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 10. Η ώριμη πρωτεΐνη του ΥΕΠ-Ο μήκους 413 αμινοξέων παρουσιάζει 5 δομές α-έλικας και 20 δομές β-πτυχωτής επιφάνειας.







**Εικόνα 8:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ΕΠ-Ο του προβάτου. Έξι διαφορετικές όψεις του πρωτεϊνικού μοντέλου του ΕΠ-Ο (Α-Ζ) το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα 28-234. Με ερυθρό χρώμα έχουν επισημανθεί οι β-πτυχωτές επιφάνειες, με κυανό οι α-έλικες, ενώ με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται, η θέση πρόσδεσης του ΥΕΠ-Ο (αμινοξέα 36-59) (Δ) και η δομή τύπου Kringle (αμινοξέα 69-154) (Ζ).

#### 2.2.2.2.6. Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΥΕΠ-Ο

Το cDNA του ΥΕΠ-Ο του προβάτου κωδικεύει μια πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 318 αμινοξέα, με θεωρητικό μοριακό βάρος 34,6 KDa και pI 7,9. Ωστόσο, το πραγματικό βάρος της πρωτεΐνης αναμένεται να διαφέρει σημαντικά εξαιτίας του υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη του προβάτου είναι η μικρότερη σε μήκος από τις πρωτεΐνες των οργανισμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, έχει 12 αμινοξέα λιγότερα από την πρωτεΐνη των βοοειδών (NP\_776848), 4 αμινοξέα λιγότερα από την ανθρώπινη πρωτεΐνη (AAF71751), 9 αμινοξέα λιγότερα από την πρωτεΐνη του αρουραίου (P49616) και 8 αμινοξέα λιγότερα από την πρωτεΐνη των επιμύων (NP\_035243). Η πρωτεΐνη του προβάτου παρουσιάζει αρκετά υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες των υπολοίπων οργανισμών που εξετάστηκαν. Αναλυτικότερα, παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ομολογία με την πρωτεΐνη των βοοειδών με 89 % ομολογία, ενώ σημαντικά μειωμένη παρουσιάζεται στους υπόλοιπους οργανισμούς, συγκεκριμένα ακολουθούν του ανθρώπου με 61 %, του αρουραίου με 61 % και των επιμύων με 57 %.

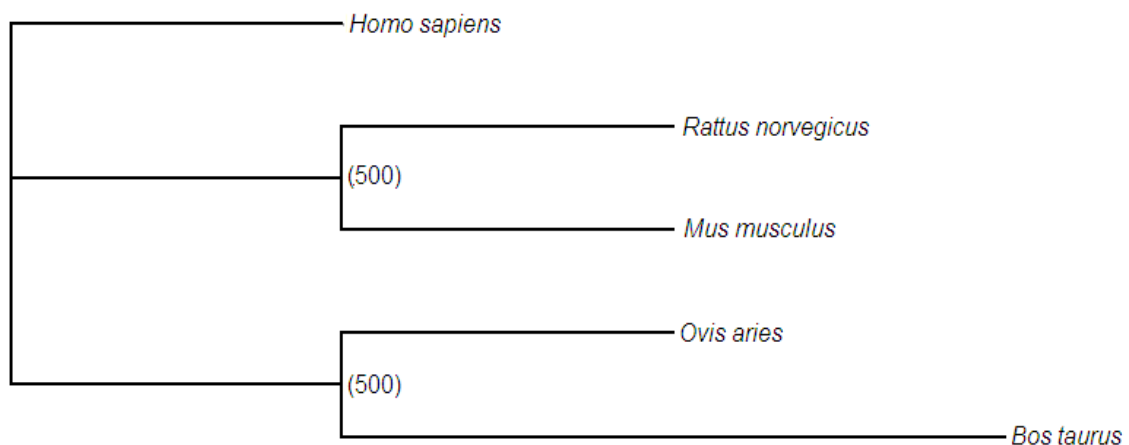
Στην εικόνα 9 έχουν στοιχηθεί οι πρωτεΐνες του προβάτου, των βοοειδών, του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Όπως φαίνεται στην εικόνα, παρουσιάζονται ενθέσεις ή απαλοιφές νουκλεοτιδίων σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης.





### 2.2.2.2.7. Φυλογενετική ανάλυση του ΥΕΠ-Ο

Το φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΥΕΠ-Ο στα διάφορα είδη παρουσιάζεται στην εικόνα 10. Η πιθανότητα κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Το δενδρόγραμμα της εικόνας 6 αντιπροσωπεύει το πιθανότερο δέντρο, μετά από 500 bootstrap επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στην εικόνα, σχηματίζονται δύο φυλογενετικές ομάδες, αυτή των τρωκτικών και αυτή των μηρυκαστικών ζώων. Ωστόσο, παρατηρείται απόσταση μεταξύ των βοοειδών και του προβάτου σε αντίθεση με τα τρωκτικά, υποδηλώνοντας ότι το πρόβατο με τα βοοειδή συνδέονται με χαμηλότερο βαθμό συγγένειας από ό,τι ο αρουραίος με τους επίμυες. Η φυλογενετική συγγένεια της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο του προβάτου με την αντίστοιχη στα βοοειδή ήταν αναμενόμενη καθώς η ομολογία τους ήταν πολύ υψηλή.



100

**Εικόνα 10:** Φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΥΕΠ-Ο του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos taurus*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*). Στις διακλαδώσεις, εντός παρενθέσεως, αναγράφεται ο αριθμός των επιτυχημένων bootstrap επαναλήψεων, ενώ κάτω αριστερά παρουσιάζεται η κλίμακα για τη γενετική απόσταση. Η κατασκευή του φυλογενετικού δενδρογράμματος έγινε με τη

### 2.2.2.2.8. Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο

Η εύρεση χαρακτηριστικών δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαδικτυακών προγραμμάτων ScanProsite και CD-search.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των αναλύσεων η πρωτεΐνη του ΥΕΠ-Ο του προβάτου αποτελείται από ένα αμινοτελικό πεπτιδίο σηματοδότησης μήκους 19

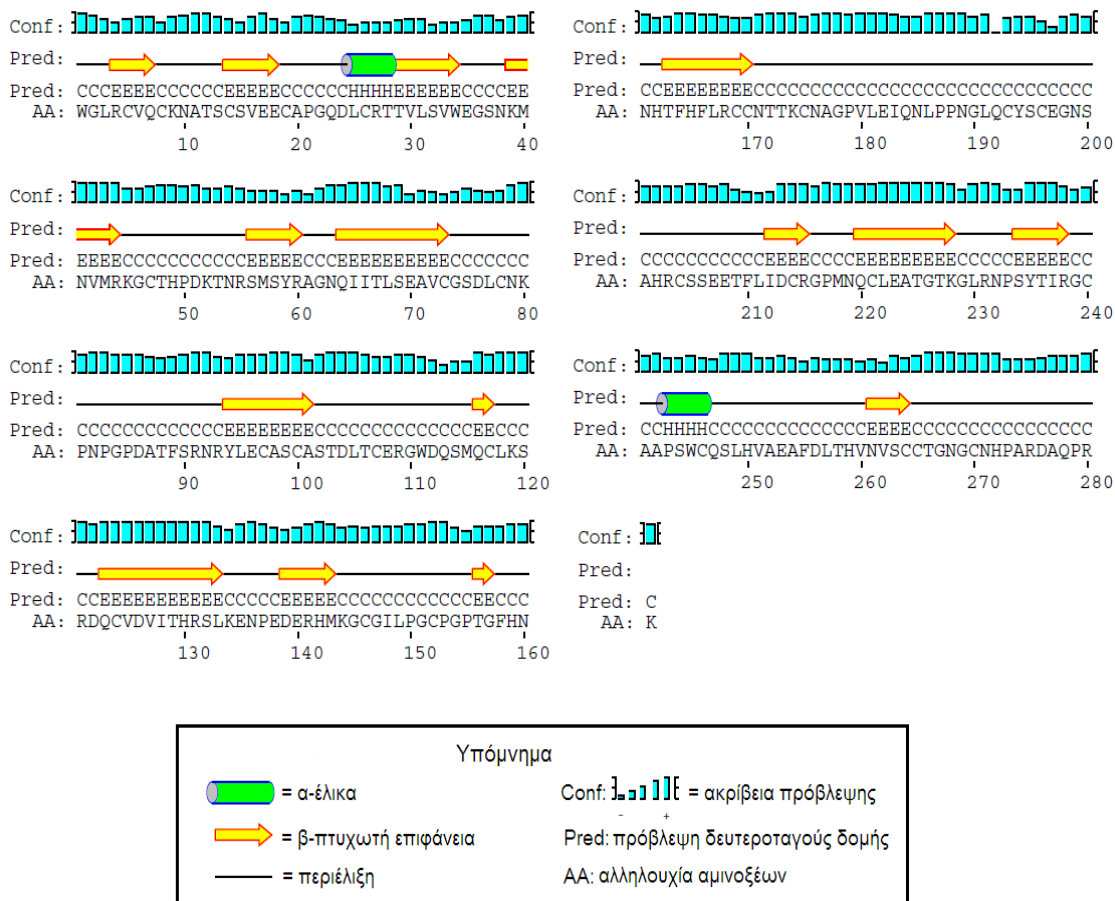
αμινοξέων (αμινοξέα 1-19), από τρεις δομικές περιοχές τύπου LU, και από ένα καρβοξυλικό πεπτίδιο σηματοδότησης μήκους 18 αμινοξέων (αμινοξέα 301-318). Η πρώτη από τις LU δομές εκτείνεται από το αμινοξύ 22 έως το αμινοξύ 100 (δομική περιοχή LU I), η δεύτερη εκτείνεται από το αμινοξύ 114 έως το αμινοξύ 197 (δομική περιοχή LU II) και η τρίτη εκτείνεται από το αμινοξύ 210 έως το αμινοξύ 292 (δομική περιοχή LU III). Η δομική περιοχή LU III του ΥΕΠ-Ο του προβάτου παρουσιάζει μεγαλύτερη ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή στους υπόλοιπους οργανισμούς σε σύγκριση με τις άλλες δύο LU δομικές περιοχές. Τέλος, παρουσιάζονται δέκα πιθανές θέσεις N-γλυκοζυλίωσης από τις οποίες όμως μόνο οι 5 είναι συντηρημένες σε όλους τους οργανισμούς (ασπαραγίνη73, 180, 190, 218 και 251).

Τα δύο πεπτίδια σηματοδότησης είναι σημαντικά μικρότερα στο πρόβατο σε σύγκριση με τους άλλους οργανισμούς. Ως εκ τούτου, το τελικό πρωτεϊνικό προϊόν στο πρόβατο δε διαφέρει σημαντικά από αυτά των υπολοίπων οργανισμών.

Οι δομές τύπου LU, που απαντώνται στον ΥΕΠ-Ο του προβάτου, εμφανίζουν υψηλό ποσοστό ομολογίας με τις αντίστοιχες δομές των άλλων οργανισμών που εξετάστηκαν. Αντίθετα, δεν παρατηρείται σημαντική ομολογία με τους υπόλοιπους οργανισμούς στα πεπτίδια σηματοδότησης.

#### **2.2.2.2.9. Πρόβλεψη δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο**

Η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του ΥΕΠ-Ο έγινε με τη χρήση του προγράμματος PSIPRED. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 11. Η ώριμη πρωτεΐνη του ΥΕΠ-Ο, μήκους 281 αμινοξέων, παρουσιάζει δύο δομές α-έλικας και 16 δομές β-πτυχωτής επιφάνειας.

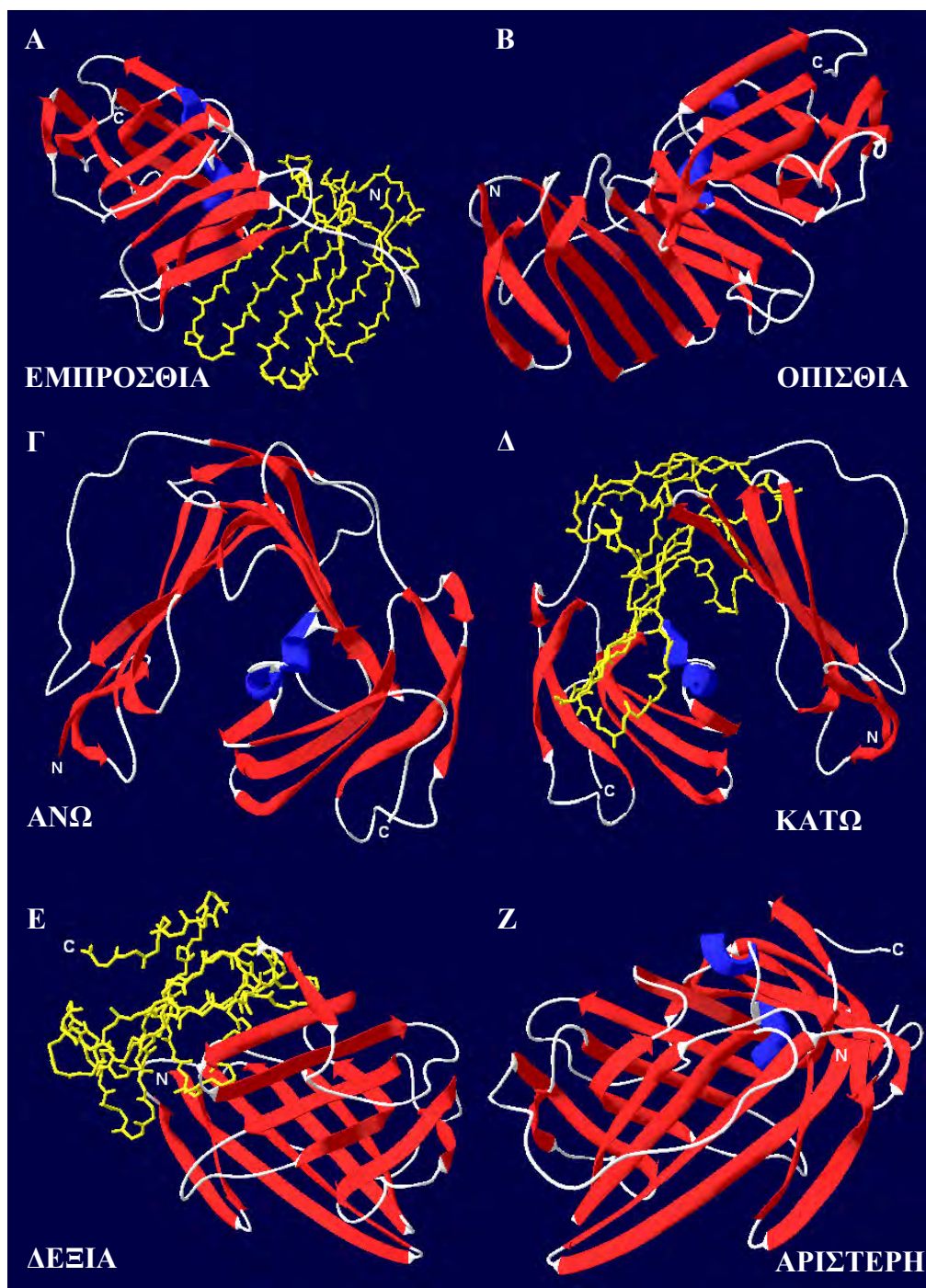


**Εικόνα 11:** Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης του YEP-O

### 2.2.2.2.10. Δομικό μοντέλο της πρωτεΐνης του YEP-O

Για την κατασκευή του τρισδιάστατου πρωτεϊνικού μοντέλου χρησιμοποιήθηκαν προσδιορισμένες δομές αντίστοιχων πρωτεϊνών από άλλους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε η δομή του συμπλέγματος του YEP-O του ανθρώπου με τον ΕΠ-O και τη βιτρονεκτίνη με κωδικό καταχώρησης στην τράπεζα δεδομένων PDB 3bt1U (Huai et al. 2006). Το μοντέλο επιλέχθηκε με βάση την υψηλότερη ομολογία (59 %), σε σχέση με τα υπόλοιπα διαθέσιμα μοντέλα, που εμφάνισε η πρωτεΐνη του YEP-O του προβάτου. Στην εικόνα 12 (Α-Ε), παρουσιάζεται το τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης, σε διαφορετικά οπτικά πεδία (όψεις).





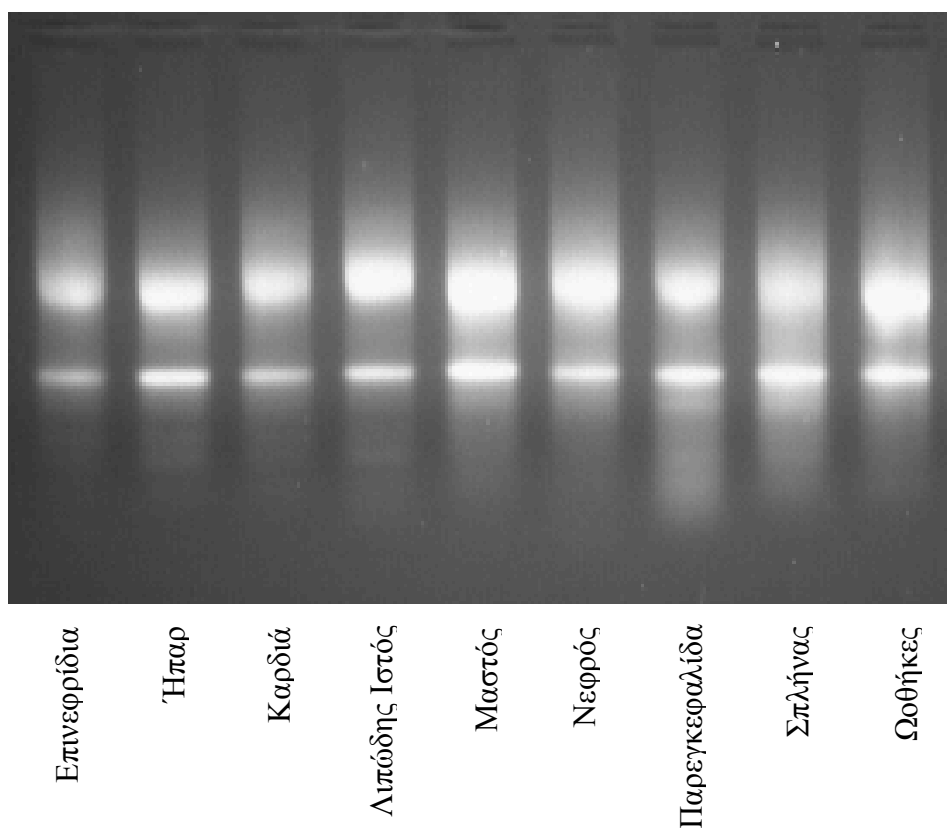
**Εικόνα 12:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ΥΕΠ-Ο του προβάτου. Έξι διαφορετικές όψεις του πρωτεϊνικού μοντέλου του ΥΕΠ-Ο (Α-Ζ) το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα 22-292. Με ερυθρό χρώμα έχουν επισημανθεί οι β-πτυχωτές επιφάνειες, με κυανό οι α-έλικες, ενώ με κίτρινο χρώμα επισημαίνονται, η LU I δομική περιοχή (αμινοξέα 22-100) (Α), η LU II δομική περιοχή (αμινοξέα 114-197) (Δ) και η LU III δομική περιοχή (αμινοξέα 210-292) (Ε).



### 2.2.2.3. Μελέτη της έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο πρόβατο

#### 2.2.2.3.1. Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο με την εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR

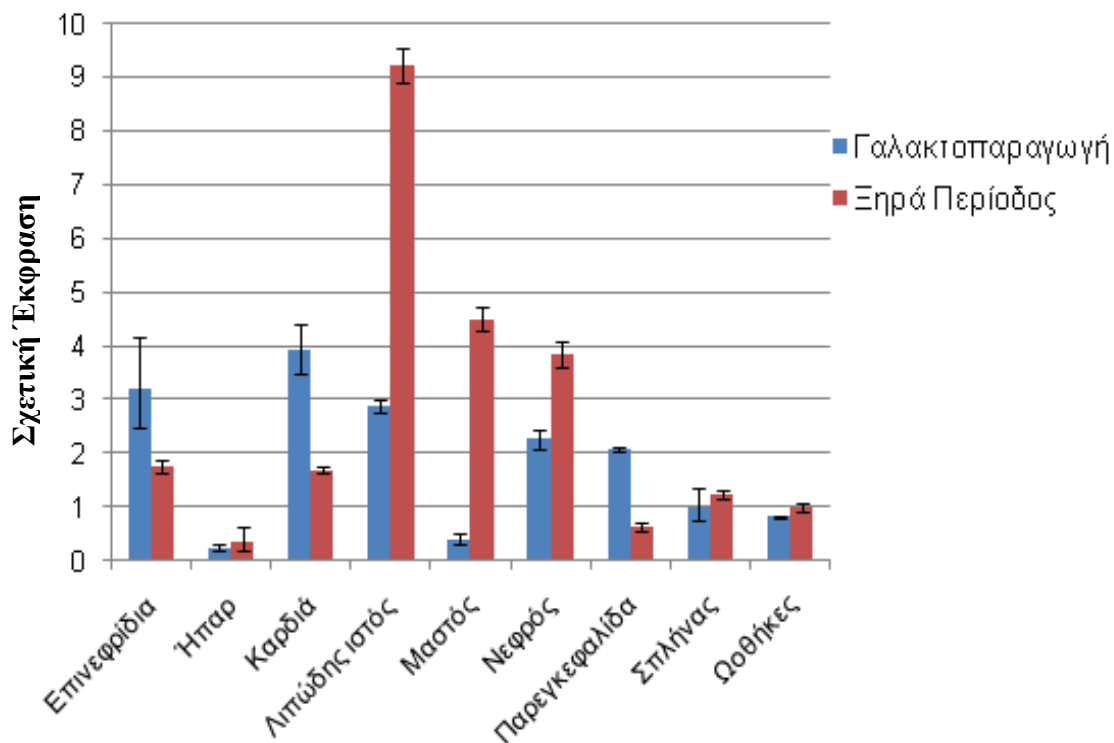
Για τη σύγκριση των επιπέδων μεταγραφής των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο μεταξύ διαφορετικών ιστών, αρχικά έγινε απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς. Στην εικόνα 13 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης 5 μl RNA από κάθε ιστό ενός ζώου. Μετά την απομόνωση του RNA, ακολούθησε η σύνθεση του cDNA. Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων RNA από την ηλεκτροφόρηση και την φωτομέτρηση τους, χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες RNA από κάθε ιστό για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.



**Εικόνα 13:** Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης ολικού RNA από ιστούς προβάτου. Σε κάθε θέση ηλεκτροφορήθηκαν 5 μl δείγματος.

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα RNA που προήλθε από τους ιστούς ενός ζώου της συνθετικής φυλής, το οποίο βρισκόταν στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής και ενός ζώου της συνθετικής φυλής, το οποίο βρισκόταν στην ξηρά περίοδο.

Στο διάγραμμα 6 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Real Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του ΕΠ-Ο.

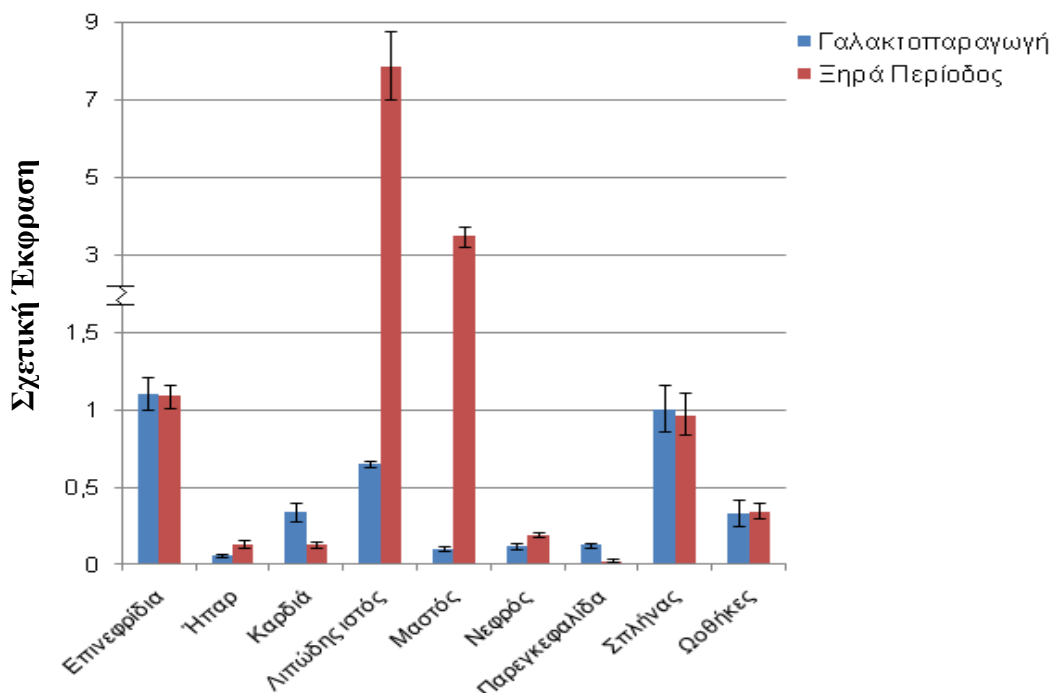


**Διάγραμμα 6:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων των μεταγράφων του ΕΠ-Ο σε διάφορους ιστούς του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε ιστό προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΕΠ-Ο παρατηρούνται στην καρδιά και στα επινεφρίδια. Ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, στο νεφρό, στην παρεγκεφαλίδα, στο σπλήνα και στις ωοθήκες, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο μαστό και στο ήπαρ. Σε αντίθεση με τη γαλακτοπαραγωγή, κατά την ξηρά περίοδο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, ενώ υψηλές τιμές παρατηρούνται και στο μαστό και στο νεφρό. Ενδιάμεσες τιμές παρατηρούνται στην καρδιά, στα επινεφρίδια, στο σπλήνα και στις ωοθήκες, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στην παρεγκεφαλίδα και στο ήπαρ.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έκφραση του ΕΠ-Ο έχει διαπιστωθεί σε άλλα θηλαστικά στο μαστό (Rabot et al. 2007), στο λιπώδη ιστό (Liang et al. 2006), στην καρδιά (Cheng et al. 2009), στο ήπαρ (Bisgaard et al. 1998), στο νεφρό (Colucci et al. 1995), στην παρεγκεφαλίδα (Dent et al. 1993) και στις ωοθήκες (Cao et al. 2006b).

Στο διάγραμμα 7 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Μελέτη των επιπέδων έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο σε ιστούς προβάτου



**Διάγραμμα 7:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων των μεταγράφων του ΥΕΠ-Ο σε διάφορους ιστούς του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε ιστό προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων προκύπτει ότι κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΥΕΠ-Ο παρατηρούνται στο σπλήνα και στα επινεφρίδια. Ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, στην καρδιά, και στις ωοθήκες, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο νεφρό, στην παρεγκεφαλίδα, στο σπλήνα, στο μαστό και στο ήπαρ. Σε αντίθεση με τη γαλακτοπαραγωγή, κατά την ξηρά περίοδο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, ενώ υψηλή τιμή έκφρασης παρατηρείται και στο μαστό. Ενδιάμεσες τιμές παρατηρούνται στα επινεφρίδια και στο σπλήνα ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στις ωοθήκες, στην καρδιά, στο ήπαρ. και στην παρεγκεφαλίδα.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έκφραση του ΥΕΠ-Ο έχει διαπιστωθεί σε άλλα θηλαστικά στο μαστό (Rabot et al. 2007), στην καρδιά (Almus-Jacobs et al. 1995), στο ήπαρ (Bisgaard et al. 1998), στο νεφρό (Almus-Jacobs et al. 1995), στην παρεγκεφαλίδα (Cunningham et al. 2009), στο σπλήνα (Almus-Jacobs et al. 1995) και στις ωοθήκες (Kliem et al. 2007).

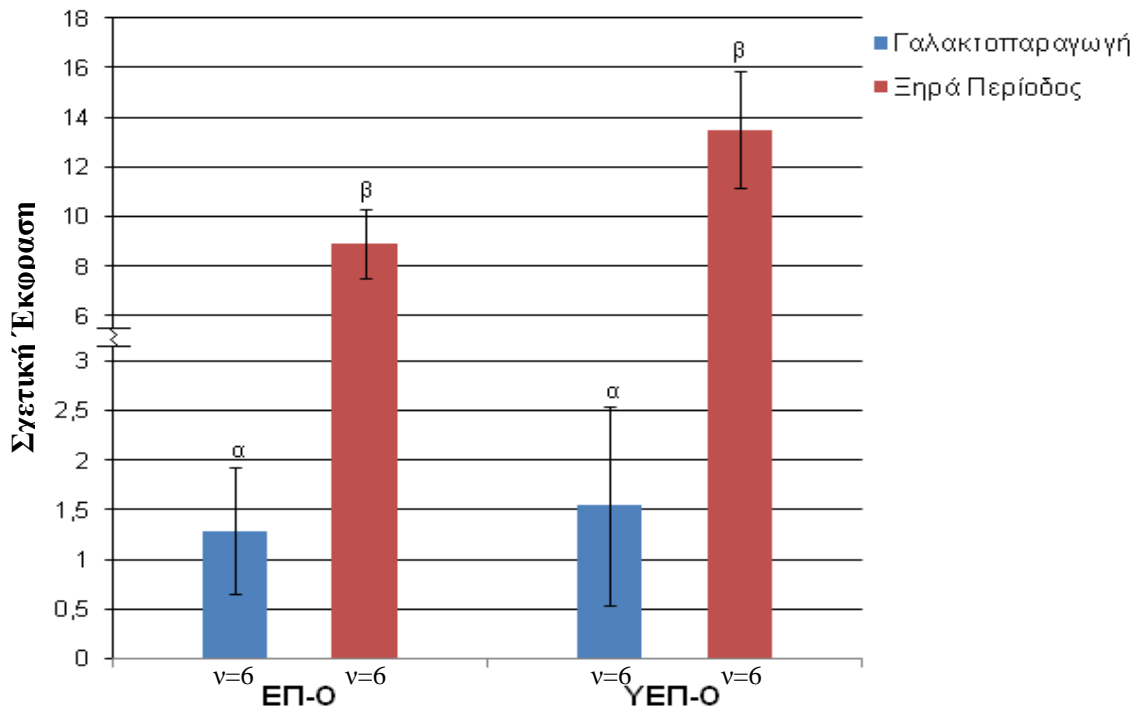
Συμπερασματικά, από τη μελέτη της έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο πρόβατο σε διάφορους ιστούς και όργανα, προέκυψε ότι και τα δύο γονίδια εκφράζονται σε όλους τους ιστούς και τα όργανα που μελετήθηκαν. Αυτό προφανώς οφείλεται στο

γεγονός ότι το σύστημα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό φυσιολογικών διαδικασιών. Από μελέτες σε άλλους οργανισμούς ήταν ήδη γνωστό ότι και τα δύο γονίδια εκφράζονται σε μία πληθώρα ιστών και οργάνων. Ιδιαίτερης αναφοράς χρήζει η διαπίστωση έκφρασης των δύο γονιδίων στο λιπώδη ιστό, καθώς είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται έκφραση του ΕΠ-Ο και του υποδοχέα του στο λιπώδη ιστό στα αγροτικά ζώα. Από τη σύγκριση των πρότυπων έκφρασης στην γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο και για τα δύο γονίδια παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά στην έκφραση των γονιδίων στο μαστό και το λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα, η έκφραση των δύο γονιδίων ήταν πολύ χαμηλότερη κατά τη γαλακτοπαραγωγή σε σχέση με την ξηρά περίοδο τόσο στο μαστό όσο και στο λιπώδη ιστό. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο λιπώδη ιστό δηλώνουν ενεργοποίηση του συστήματος πλασμίνης πλασμινογόνου κατά την ξηρά περίοδο.

#### **2.2.2.3.2. Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό.**

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής ως μήτρα χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RNA που προήλθαν από τους μαστούς έξι προβατίνων, οι οποίες βρίσκονταν στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής (περίπου 120 ημέρες μετά τον τοκετό) και έξι προβατίνων, οι οποίες βρίσκονταν στην ξηρά περίοδο (7-14 ημέρες μετά τη διακοπή της άμελης). Οι δύο πειραματικές ομάδες αποτελούνταν από τρία ζώα της ορεινής φυλής Ηπείρου και από τρία ζώα της συνθετικής φυλής.

Στο διάγραμμα 8 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Real Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό του προβάτου.



**Διάγραμμα 8:** Μέσες τιμές και τυπικό σφάλμα των επιπέδων των μεταγράφων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

<sup>α,β</sup> Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,01$

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα 8, υπάρχει μεγάλη διαφορά στην έκφραση των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στους μαστούς των ζώων που βρίσκονταν στη γαλακτοπαραγωγή σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές που παρατηρήθηκαν στους μαστούς των ζώων που βρίσκονταν στην ξηρά περίοδο. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν και για τα δύο γονίδια στατιστικώς σημαντικές. Συγκεκριμένα, η έκφραση του ΕΠ-Ο ήταν 7,5 φορές μεγαλύτερη στα δείγματα της ξηράς περιόδου σε σύγκριση με τα δείγματα της γαλακτοπαραγωγής ( $p < 0,01$ ), ενώ η έκφραση του ΥΕΠ-Ο ήταν αυξημένη κατά 8,5 φορές στα δείγματα της ξηράς περιόδου σε σύγκριση με τα δείγματα της γαλακτοπαραγωγής ( $p < 0,01$ ).

Η μελέτη έκφρασης των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο του προβάτου έδειξε μία στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης, τόσο του ΕΠ-Ο (7x) όσο και του ΥΕΠ-Ο (8,5x), κατά την ξηρά περίοδο σε σύγκριση με την γαλακτοπαραγωγή. Τα αποτελέσματα αυτά συνηγορούν υπέρ της υπόθεσης ενεργοποίησης του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου κατά την παλινδρόμηση του μαστού. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί σε άλλους οργανισμούς. Συγκεκριμένα, οι Rabot et al. (2007) μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής καθόλη τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου. Οι ανωτέρω ερευνητές αναφέρουν υψηλότερη έκφραση των γονιδίων κατά το τρίτο στάδιο της

ξηράς περιόδου (14-28 ημέρες μετά τη διακοπή άμελξης) σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές τόσο κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (8-12 μήνες μετά τον τοκετό) όσο και κατά τα δύο πρώτα στάδια της ξηράς περιόδου (24-48 ώρες και 96-108 ώρες μετά τη διακοπή της άμελξης). Συνεπώς, για τις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής η ενεργοποίηση του συστήματος δεν παρατηρείται αμέσως μετά τη διακοπή της άμελξης αλλά αρκετά αργότερα και πιθανότητα συμπίπτει με τη διαδικασία ανακατασκευής του μαστικού αδένα. Επιπλέον, οι Busso et al. (1989), μελέτησαν την έκφραση του γονιδίου του ΕΠ-Ο στον μαστικό αδένα κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στους επίμυες. Οι ανωτέρω ερευνητές παρατήρησαν χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης του ΕΠ-Ο, καθώς και έκφρασης του γονιδίου του, κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Μετά τη διακοπή της γαλουχίας, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του ΕΠ-Ο και της έκφρασης του γονιδίου του, παρουσιάζοντας τις υψηλότερες τιμές κατά την 3<sup>η</sup> ημέρα μετά τη διακοπή της γαλουχίας και παραμένοντας σε υψηλά επίπεδα μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. Οι Lund et al. (Lund et al. 1996), μελέτησαν την έκφραση των γονιδίων των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο στο μαστό κατά το διάστημα μετά τη γαλουχία στους επίμυες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραπάνω έρευνας, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου του ΕΠ-Ο παραμένουν χαμηλά κατά τη γαλουχία και τις τρεις πρώτες μέρες μετά τη διακοπή της. Την τέταρτη ημέρα μετά τη διακοπή της γαλουχίας παρατηρείται σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου του ΕΠ-Ο (30x) για να ακολουθήσει σταδιακή μείωση έως τη δέκατη μέρα μετά τη διακοπή της γαλουχίας. Στην ίδια ερευνητική εργασία αναφέρεται επίσης ότι η έκφραση του γονιδίου του ΥΕΠ-Ο σημείωσε αύξηση κατά την περίοδο μετά τη διακοπή της γαλουχίας σε σύγκριση με τη γαλακτοπαραγωγή, ακολουθώντας τις διακυμάνσεις του ΕΠ-Ο. Τέλος, οι Ossowski et al. (1979) διαπίστωσαν αύξηση της παραγωγής του ΕΠ-Ο κατά την περίοδο μετά τη διακοπή της γαλουχίας στο μαστό των επιμύων και συγκεκριμένα κατά τις δύο πρώτες ημέρες μετά τη διακοπή της γαλουχίας, αλλά θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι μετρήσεις στην συγκεκριμένη μελέτη δεν ήταν για την έκφραση του γονιδίου αλλά για τη συγκέντρωση του πρωτεϊνικού προϊόντος. Οι μελέτες που έχουν γίνει τόσο στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, όσο και στους επίμυες, δείχνουν ότι το σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου δεν ενεργοποιείται με τον ίδιο τρόπο. Στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, η ενεργοποίηση του συστήματος παρατηρείται σε ύστερο στάδιο της ξηράς περιόδου και όχι στα πρώτα στάδια, όπου απαιτούνται σημαντικά επίπεδα πρωτεόλυσης για την επικείμενη ανακατασκευή του μαστού. Αντίθετα, στους επίμυες η ενεργοποίηση του συστήματος αρχίζει σχεδόν αμέσως μετά τη διακοπή της γαλουχίας και πιθανότατα συμπίπτει με την ανάγκη για αυξημένα επίπεδα πρωτεόλυσης για την ανακατασκευή του μαστού. Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης προσομοιάζουν με αυτά των Rabbot et al. (2007) στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Ωστόσο, ο περιορισμένος αριθμός χρονικών σημείων δειγματοληψίας δεν επιτρέπει να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα όσον αφορά τον ακριβή χρόνο ενεργοποίησης του συστήματος στο πρόβατο.

**2.3. ΔΕΥΤΕΡΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: «ΟΙ ΔΥΟ ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ ΤΟΥ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΗ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΤΥΠΟΥ ΟΥΡΟΚΙΝΑΣΗΣ (ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΑΕΠ-2) ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ: ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ cDNAs ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΙΣΤΟΥΣ».**

**2.3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του δεύτερου πειράματος ήταν παρόμοια με αυτά που περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2.2.1. για το πρώτο πείραμα. Οι διαφορές στη μεθοδολογία και τα υλικά μεταξύ των δύο πειραμάτων παρατίθενται παρακάτω.

**2.3.1.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ cDNAs ΤΩΝ ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΑΕΠ-2 ΚΑΙ *IN SILICO* ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ**

Για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του cDNA των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2, κλωνοποιήθηκαν αλληλεπικαλυπτόμενα τμήματα του cDNA για το κάθε γονίδιο, από την ένωση των οποίων προκύπτει ολόκληρη η αλληλουχία των cDNA. Το γενετικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την κλωνοποίηση των αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων ήταν cDNA προερχόμενο από ουδετερόφιλα κύτταρα.

**2.3.1.1.1. Εκκινητές για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Για την κλωνοποίηση των τμημάτων που συνιστούν τα μετάγραφα των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 σχεδιάστηκαν συνολικά 8 εκκινητές (πίνακας 4). Οι εκκινητές PAI-1f1, PAI-1f2, PAI-1r2 και PAI-1r2 σχεδιάστηκαν, βάσει των συντηρημένων περιοχών των ήδη γνωστών αλληλουχιών του ΑΕΠ-1 στα βοοειδή (GenBank: NM\_174137), στον άνθρωπο (GenBank: NM\_00062), στους επίμυες (GenBank: NM\_008871), στον αρουραίο (GenBank: NM\_012620) και στο χοίρο (GenBank: NM\_213910). Οι εκκινητές PAI-2f1, PAI-2f2, PAI-1r1 και PAI-2r2 σχεδιάστηκαν, βάσει των συντηρημένων περιοχών των ήδη γνωστών αλληλουχιών του ΑΕΠ-2 στα βοοειδή (GenBank: XM\_581432), στον άνθρωπο (GenBank: NM\_001143818), στους επίμυες (GenBank: NM\_011111) και στον αρουραίο (GenBank: NM\_021696).

**Πίνακας 4:** Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην κλωνοποίηση των cDNAs των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2. (Tm: σημείο τήξης του εκκινητή)

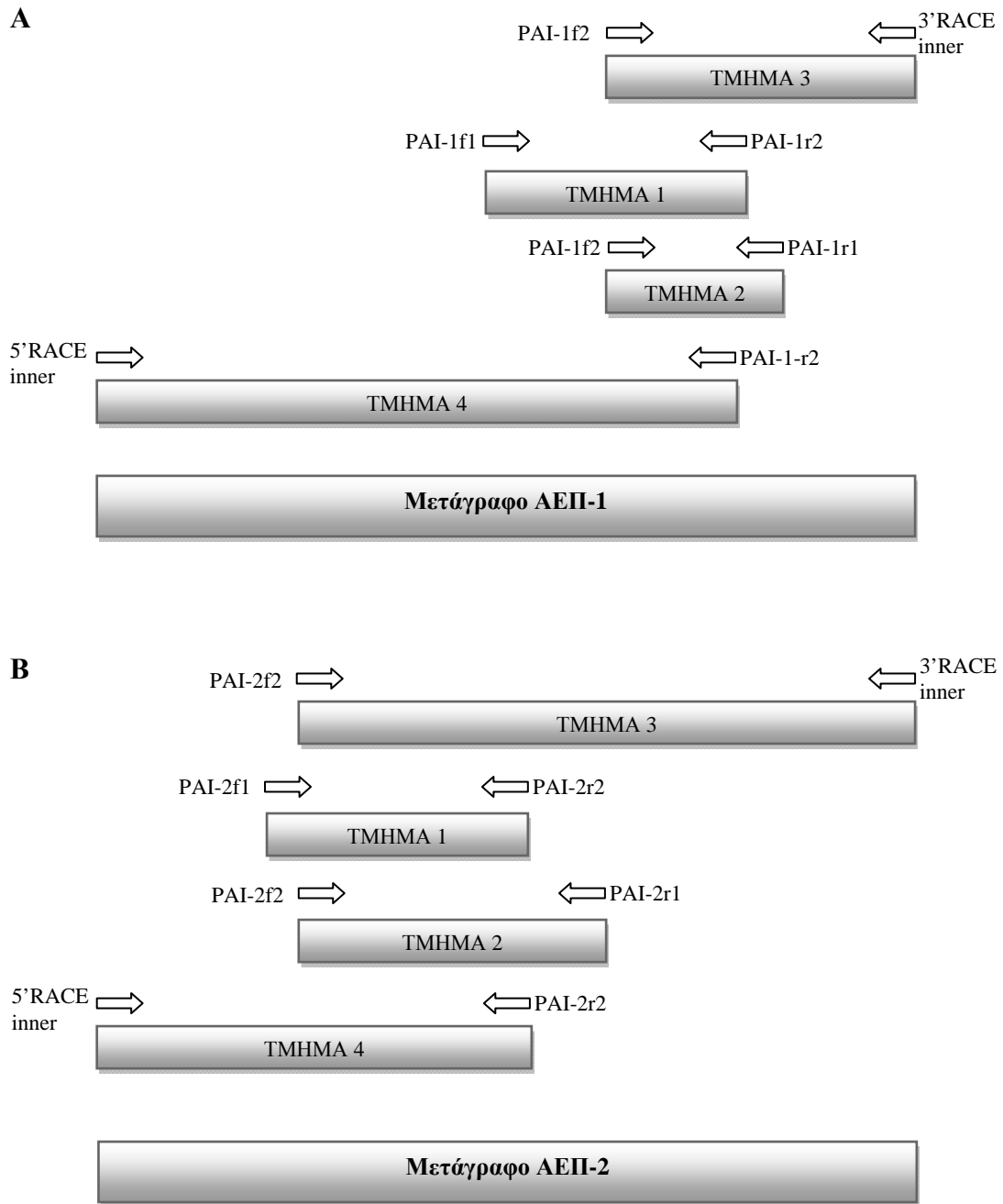
Εκκινητής	Αλληλουχία	Μήκος	Tm	Θέση Πρόσδεσης
PAI-1f1	CCTGGAATTGCCCTACCACG	20 nt	64	885-904
PAI-1f2	TGGGAATGACCGACATGTTC	20 nt	60	1094-1113
PAI-1r1	TCAGGGTTCATCACTTGGC	20 nt	62	1337-1356
PAI-1r2	CCACGAAGAGGAAGGGTCTG	20 nt	64	1281-1300
PAI-2f1	AGAATGTGCAGAAGATGCCAG	21 nt	62	538-558
PAI-2f2	TCCCAAACCTTGTTACCTGAAGG	22 nt	64	603-624
PAI-2r1	GAAGAGGAAAGGATGGTCTGC	21 nt	64	1229-1249
PAI-2r2	CTGACATGCCTGAGAAATTGG	21 nt	62	1074-1094

### 2.3.1.1.2. Ενίσχυση των μέσων τμημάτων με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Στο σχήμα 6 παρουσιάζεται η στρατηγική που ακολουθήθηκε για την κλωνοποίηση των cDNAs των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2.

Για τα τμήματα 1 και 2 των cDNAs και των δύο μεταγράφων χρησιμοποιήθηκε cDNA από ουδετερόφιλα κύτταρα ως μήτρα για την PCR.





**Σχήμα 7:** Σχετική θέση των επιμέρους τμημάτων που συνιστούν τα μετάγραφα του ΑΕΠ-1 (Α) και ΑΕΠ-2 (Β) του προβάτου, καθώς και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίησή τους.

Για το τμήμα 1 του ΑΕΠ-1 χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAI-1f1 και PAI-1r2, για το τμήμα 2 του ΑΕΠ-1 οι εκκινητές PAI-1f2 και PAI-1r1, για το τμήμα 1 του ΑΕΠ-2 οι εκκινητές PAI-2f1 και PAI-2r2 και για το τμήμα 2 του ΑΕΠ-2 οι εκκινητές PAI-2f2 και PAI-2r1 (Σχήμα 6). Οι αντιδράσεις PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.4.

### 2.3.1.1.3. Ενίσχυση των ακραίων τμημάτων

Τα 5' και 3' ακραία τμήματα του cDNA παρουσιάζονται στο σχήμα 7 ως τμήματα 3 και 4 για το μετάγραφο του ΑΕΠ-1 και τμήματα 3 έως 5 για τα μετάγραφα του ΑΕΠ-2. Για την κλωνοποίηση τους χρησιμοποιήθηκε το FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion).

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 3 ακολουθήθηκε επακριβώς το πρωτόκολλο του FirstChoice RLM-RACE Kit. Για την εξωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 3' RACE Outer Primer, που περιέχεται στο kit, σε συνδυασμό με τον PAI-1f1 για τον ΑΕΠ-1 και με τον PAI-2f1 για τον ΑΕΠ-2. Για την εσωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο 3' RACE Inner Primer σε συνδυασμό με τον PAI-1f2 για τον ΑΕΠ-1 και με τον PAI-2f2 για τον ΑΕΠ-2. Οι αντιδράσεις PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.4.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 4 ακολουθήθηκε επακριβώς το πρωτόκολλο του FirstChoice RLM-RACE Kit. Για την εξωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής 5' RACE Outer Primer, που περιέχεται στο kit, σε συνδυασμό με τον PAI-1r1 για τον ΑΕΠ-1 και με τον PAI-2r1 για τον ΑΕΠ-2. Για την εσωτερική PCR χρησιμοποιήθηκε ο 5' RACE Inner Primer σε συνδυασμό με τον PAI-1r2 για τον ΑΕΠ-1 και με τον PAI-2r2 για τον ΑΕΠ-2. Οι αντιδράσεις PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.2.4.

### 2.3.1.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΕΠΙΠΕΔΩΝ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΑΕΠ-2 ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΠΡΟΒΑΤΟΥ

#### 2.3.1.2.1. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

Για την Real time PCR συντέθηκαν κατάλληλοι εκκινητές και ανιχνευτές για τα μετάγραφα των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 βάσει των αλληλουχιών των cDNAs των δύο γονιδίων (Πίνακας 5). Οι αντιδράσεις της Real-Time PCR καθώς και το πρόγραμμα του θερμικού κυκλοποιητή που εφαρμόστηκε ήταν ίδια με αυτά που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.2.1.3.5.

**Πίνακας 5:** Αλληλουχίες και θέσεις πρόσδεσης των εκκινήτων και των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν στην Real Time PCR.

Γονίδιο	Εκκινήτης	Αλληλουχία	Θέση
ΑΕΠ-1	PAI-1-T1F	GACCCGCCTCCTGGTT	1023-1038
	PAI-1-T1R	GCCTCCTGAGGTTCGATTTTCG	1062-1081
ΑΕΠ-2	PAI-2-T1F	GCCAATTTCTCAGGCATGTCAGA	1073-1095
	PAI-2-T1R	CGTTCACATCCACAGAAGCTTGAT	1128-1151
	Ανιχνευτής		
ΑΕΠ-1	PAI-1-T1M1	CTGCCCAAGTTCTCC	1039-1053
ΑΕΠ-2	PAI-2-T1M1	ACACTTCAGACAGAAACAG	1106-1024

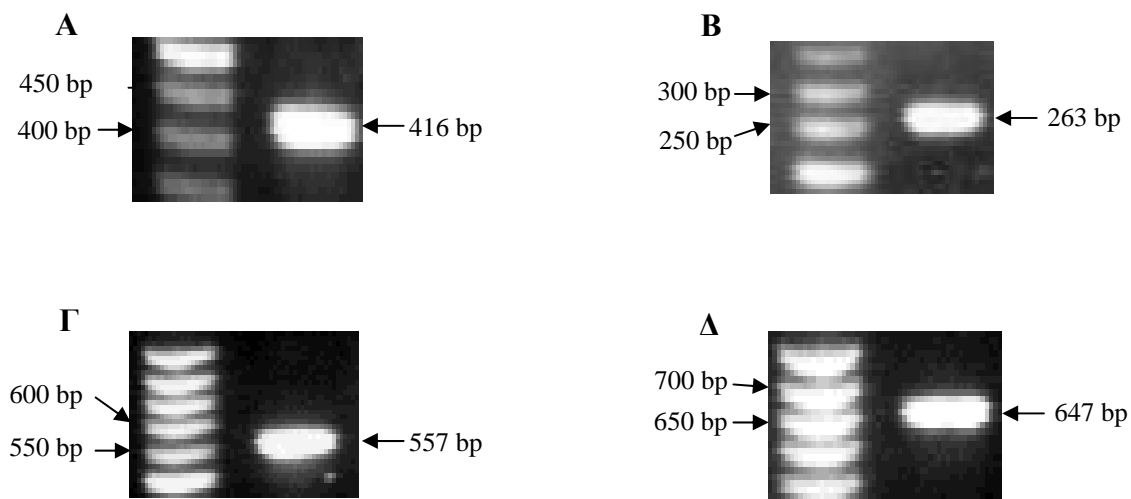
## 2.3.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 2.3.2.1. ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ cDNAs ΤΟΥ ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΕΠ-2

Από την κλωνοποίηση των cDNAs του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2 προέκυψε ένα μετάγραφο για το κάθε γονίδιο. Οι ολοκληρωμένες αλληλουχίες των δύο μεταγράφων προέκυψαν από την ένωση τεσσάρων αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων για το κάθε γονίδιο.

#### 2.3.2.1.1. Κλωνοποίηση των μεσαίων τμημάτων των cDNAs

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 1 του ΑΕΠ-1, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAI-1f1 και PAI-1-r2. Όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 14Α, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 1. Το τμήμα 1 έχει μήκος 416 bp και εμφανίζει ομολογία 96, 90, 87, 79 και 79 % με το cDNA των βοοειδών (Mimuro et al. 1989), του χοίρου (Bijnens et al. 1997), του ανθρώπου (Ginsburg et al. 1986), του αρουραίου (Zeheb and Gelehrter 1988) και των επιμύων (Prendergast et al. 1990) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 885<sup>η</sup> έως τη 1300<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΑΕΠ-1 του προβάτου.



**Εικόνα 14:** Προϊόντα PCR από την ενίσχυση των τμημάτων 1 και 2 των μεταγράφων του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2. Σε όλες τις φωτογραφίες, στην αριστερή θέση βρίσκεται ο δείκτης μοριακού βάρους. **Α.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 1 του ΑΕΠ-1. **Β.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 2 του ΑΕΠ-1. **Γ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 1 του ΑΕΠ-2. **Δ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 2 του ΑΕΠ-2.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 2 του ΑΕΠ-1, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAI-1f2 και PAI-1-r1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14B, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχηση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 2. Το τμήμα 2 έχει μήκος 263 bp και εμφανίζει ομολογία 96, 90, 88, 78 και 78 % με το cDNA των βοοειδών (Mimuro et al. 1989), του χοίρου (Bijnens et al. 1997), του ανθρώπου (Ginsburg et al. 1986), του αρουραίου (Zeheb and Gelehrter 1988) και των επιμύων (Prendergast et al. 1990) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 1094<sup>η</sup> ως την 1356<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΑΕΠ-1 του προβάτου. Το τμήμα 2 φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με το τμήμα 1 περιοχή, μεγέθους 207 bp. Τα τμήματα 1 και 2 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή.

Για την κλωνοποίηση του τμήματος 1 του ΑΕΠ-2, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAI-2f1 και PAI-2r2. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14Γ, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχηση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 1. Το τμήμα 1 έχει μήκος 557 bp και εμφανίζει ομολογία 92, 85, 77 και 79 % με το cDNA των βοοειδών (Larsen et al. 1996), του ανθρώπου (Ye et al. 1987, Antalis et al. 1988), του αρουραίου και των επιμύων (Strausberg et al. 2002) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 538<sup>η</sup> ως την 1094<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΑΕΠ-2 του προβάτου.

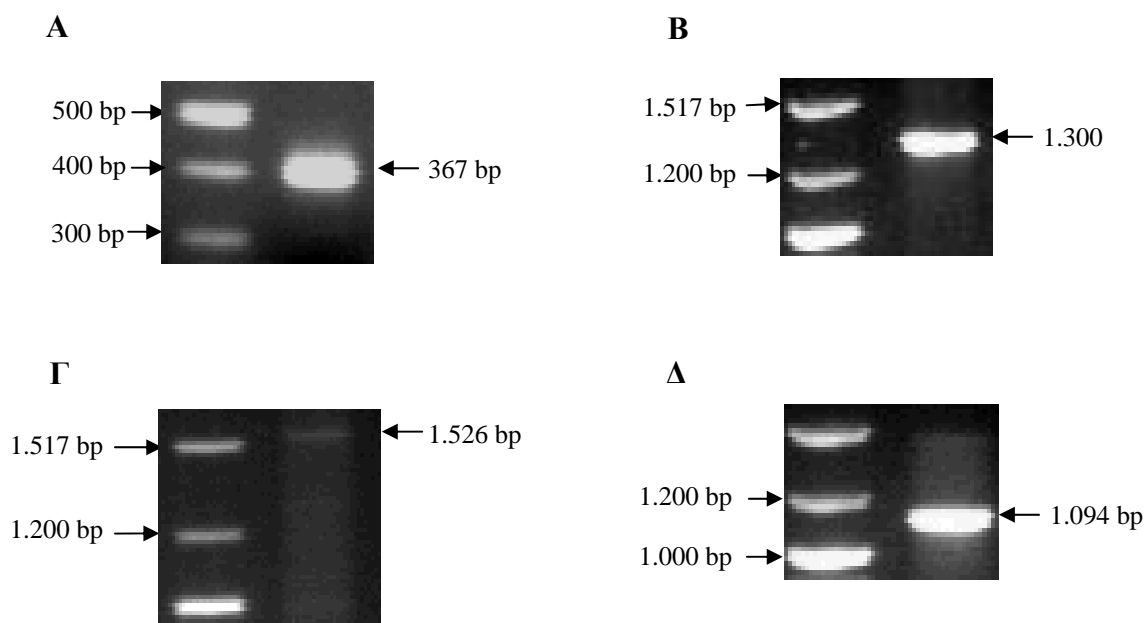
Για την κλωνοποίηση του τμήματος 2 του ΑΕΠ-2, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές PAI-2f2 και PAI-2r1. Όπως φαίνεται στην εικόνα 14Δ, από την PCR προέκυψε μόνο μία ζώνη. Μετά την κλωνοποίηση και αλληλούχηση της ζώνης αυτής, προέκυψε το τμήμα 2. Το τμήμα 2 έχει μήκος 647 bp και εμφανίζει ομολογία 94, 84, 78 και 79 % με το cDNA των βοοειδών (Larsen et al. 1996), του ανθρώπου (Ye et al. 1987, Antalis et al. 1988), του αρουραίου και των επιμύων (Strausberg et al. 2002) αντίστοιχα. Το τμήμα αυτό εκτείνεται από την 603<sup>η</sup> ως την 1249<sup>η</sup> βάση του cDNA του ΑΕΠ-2 του προβάτου. Το τμήμα 2 φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με το τμήμα 1 περιοχή, μεγέθους 492 bp. Τα τμήματα 1 και 2 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή.

### **2.3.2.1.2. Κλωνοποίηση των ακραίων τμημάτων των cDNAs**

Το τμήμα 3 του ΑΕΠ-1 περιλαμβάνει το 3'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρη την 3' μη κωδικεύουσα περιοχή (UTR). Στην εικόνα 15A παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 3' RACE Inner Primer και PAI-1f2. Το τμήμα 3 αποτελείται από 367 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με το τμήμα 1 περιοχή, μεγέθους 207 bp, ενώ περιλαμβάνει και ολόκληρη την αλληλουχία του τμήματος 2. Οι αλληλουχίες των αλληλεπικαλυπτόμενων περιοχών μεταξύ του τμήματος 3 και των τμημάτων 1 και 2 παρουσιάζουν 100 % ομολογία. Οι πρώτες 263 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν μέρος της κωδικεύουσας περιοχής, ενώ οι επόμενες 104 βάσεις αποτελούν το 3' UTR του γονιδίου. Στο 3' UTR εμφανίζεται σημαντική ομολογία μόνο με τα

βοοειδή (92 %) (Mimuro et al. 1989), ενώ δεν εμφανίζεται σημαντική ομολογία με το χοίρο (Bijnens et al. 1997), τον άνθρωπο (Ginsburg et al. 1986), τον αρουραίο (Zeheb and Gelehrter 1988) και τους επίμυες (Prendergast et al. 1990).

Το τμήμα 4 του ΑΕΠ-1 περιλαμβάνει το 5'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρο το 5' UTR. Στην εικόνα 15B παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 5' RACE Inner Primer και PAI-1r2. Το τμήμα 4 αποτελείται από 1300 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με τα τμήματα 2 και 3 περιοχή, μεγέθους 207 bp, ενώ περιλαμβάνει και ολόκληρη την αλληλουχία του τμήματος 1. Οι αλληλουχίες των αλληλεπικαλυπτόμενων περιοχών μεταξύ του τμήματος 4 και των τμημάτων 1, 2 και 3 παρουσιάζουν 100 % ομολογία. Οι πρώτες 147 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν το 5' UTR του γονιδίου, ενώ οι επόμενες 1.153 αποτελούν μέρος της κωδικεύουσας περιοχής. Στο 5' UTR εμφανίζεται σημαντική ομολογία με τα βοοειδή (90 %) (Mimuro et al. 1989) και τον άνθρωπο (Ginsburg et al. 1986) (71 %), ενώ δεν εμφανίζεται σημαντική ομολογία με το χοίρο, τον αρουραίο και τους επίμυες.



**Εικόνα 15:** Προϊόντα PCR από την ενίσχυση των τμημάτων 3 και 4 των μεταγράφων του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2. Σε όλες τις φωτογραφίες, στην αριστερή θέση βρίσκεται ο δείκτης μοριακού βάρους. **Α.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 3 του ΑΕΠ-1. **Β.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 4 του ΑΕΠ-1. **Γ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 3 του ΑΕΠ-2. **Δ.** προϊόν ενίσχυσης του τμήματος 4 του ΑΕΠ-2.

Το τμήμα 3 του ΑΕΠ-2 περιλαμβάνει το 3'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρη το 3' UTR. Στην εικόνα 15Γ παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 3' RACE Inner Primer και PAI-2f2. Το τμήμα 3

αποτελείται από 1.526 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη με τα τμήματα 1 και 2 περιοχή, μεγέθους 57 bp. Τα τμήματα 1, 2 και 3 παρουσιάζουν 100 % ομολογία στην αλληλεπικαλυπτόμενη αυτή περιοχή. Οι πρώτες 280 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν μέρος της κωδικεύουσας περιοχής, ενώ οι επόμενες 246 βάσεις αποτελούν το 3' UTR του γονιδίου. Το 3' UTR του μεταγράφου του ΑΕΠ-2 του προβάτου παρουσιάζει σημαντική ομολογία μόνο με το μετάγραφο των βοοειδών (Larsen et al. 1996) (88%) και με τα δύο μετάγραφα του ανθρώπου (Ye et al. 1987, Antalis et al. 1988) (73% και για τα δύο).

Το τμήμα 4 του ΑΕΠ-2 περιλαμβάνει το 5'-άκρο της κωδικεύουσας περιοχής και ολόκληρο το 5' UTR. Στην εικόνα 15Δ παρουσιάζεται φωτογραφία του ηλεκτροφόρου αгарόζης στο οποίο έχουν ηλεκτροφορηθεί τα προϊόντα της εσωτερικής PCR, στην οποία έχουν χρησιμοποιηθεί οι εκκινητές 5' RACE Inner Primer και PAI-2r2. Το τμήμα 4 αποτελείται από 1094 bp και φέρει μία αλληλεπικαλυπτόμενη περιοχή με το τμήμα 1 μεγέθους 557 bp και μία με το τμήμα 2 μεγέθους 492 bp. Το τμήμα 4 παρουσιάζει 100 % ομολογία στις αλληλεπικαλυπτόμενες περιοχές με τα τμήματα 1 και 2. Οι πρώτες 44 βάσεις του τμήματος 3 αποτελούν το 5' UTR του γονιδίου, ενώ οι επόμενες 1050 είναι μέρος της κωδικεύουσας περιοχής. Το 5' UTR του μεταγράφου του ΑΕΠ-2 του προβάτου παρουσιάζει σημαντική ομολογία (90%) μόνο με την αντίστοιχη περιοχή του μεταγράφου των βοοειδών (Larsen et al. 1996).

### **2.3.2.1.3. Χαρακτηρισμός των cDNAs του ΑΕΠ-1 και του ΑΕΠ-2**

Από το συνδυασμό των τμημάτων 1, 2, 3 και 4 του ΑΕΠ-1 προκύπτει η αλληλουχία του μεταγράφου του ΑΕΠ-1 του προβάτου. Στην εικόνα 16 παρουσιάζεται η αλληλουχία του cDNA του ΑΕΠ-1 στο πρόβατο συνολικού μήκους 1460 bp. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μεταγράφου αποκάλυψε ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μήκους 1209 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στις βάσεις 148-150 και το κωδικόνιο λήξης στις βάσεις 1354-1356. Το μήκος της κωδικεύουσας περιοχής (coding sequence, CDS) του ΑΕΠ-1 στο πρόβατο είναι το ίδιο με αυτό στα βοοειδή, το χοίρο, τον άνθρωπο τον αρουραίο και τους επίμους. Η CDS του ΑΕΠ-1 του προβάτου παρουσιάζει 96 % ομοιότητα με την CDS των βοοειδών (GenBank NM\_174137), 90 % ομοιότητα με την CDS του χοίρου (GenBank NM\_213910), 88 % με την CDS του ανθρώπου (GenBank NM\_000602), 79 % με την CDS του αρουραίου (GenBank NM\_012620) και 80 % με την CDS των επιμύων (GenBank NM\_008871).

Όσον αφορά τις μη μεταφραζόμενες περιοχές του μεταγράφου κλωνοποιήθηκαν ολόκληρες οι 3' και 5' UTR περιοχές. Το 3' UTR έχει μήκος μόλις 104 bp και παρουσιάζει σημαντική ομολογία μόνο με την αντίστοιχη περιοχή των βοοειδών. Το 3' UTR του προβάτου είναι κατά πολύ μικρότερο από τις αντίστοιχες περιοχές των μεταγράφων των υπόλοιπων οργανισμών που εξετάστηκαν και οι οποίες κυμαίνονται σε μήκος μεταξύ 1640 και 1819 bp. Η διαφορά αυτή του 3' UTR του προβάτου με τους

υπόλοιπους οργανισμούς πιθανόν οφείλεται στην παρουσία του εξανουκλεοτιδίου AATTAT το οποίο βρίσκεται 22 νουκλεοτίδια ανωφερικά της πολύ(A) ουράς και προσομοιάζει την αλληλουχία του σήματος πολυαδενυλίωσης AAUUA. Στο 3' UTR παρατηρείται επίσης ένα εναλλακτικό σήμα πολυαδενυλίωσης (AAGAAA) (Sheets et al. 1990) το οποίο βρίσκεται 41 νουκλεοτίδια ανωφερικά του 3' άκρου. Τέλος, η πολύ(A) ουρά που παρατηρείται έχει μήκος 13 νουκλεοτιδίων.

Το 5'-UTR έχει μήκος 147 bp και παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας με το 5' UTR των βοοειδών (90 %), ενώ παρουσιάζει χαμηλότερο βαθμό ομολογίας με το 5' UTR του χοίρου (71 %). Και στις δύο περιπτώσεις η ομολογία αυτή αναφέρεται σε τμήμα του 5' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε ποσοστό >85 % του συνολικού μήκους του. Τέλος, δε βρέθηκε σημαντική ομολογία του 5'UTR του προβάτου με τις αντίστοιχες περιοχές των cDNAs του χοίρου, του αρουραίου και των επιμύων. Το 5' UTR του προβάτου είναι το δεύτερο μεγαλύτερο μετά από αυτό του ανθρώπου (148 bp). Τα 5'UTR του χοίρου και των επιμύων είναι παραπλήσια σε μέγεθος με το πρόβατο (137 και 145 bp αντίστοιχα), ενώ των βοοειδών και του αρουραίου είναι σημαντικά μικρότερα (121 και 118 bp αντίστοιχα). Στο 5' UTR παρατηρείται ότι η αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, (5'-AGGATGC-3'), βρίσκεται σε μερική ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία [A/G]XXAUGG που παρατηρείται σε όλα τα θηλαστικά (Kozak 1981) και χαρακτηρίζεται ως επαρκής συναινετική αλληλουχία (Kozak 1986).

Η αλληλουχία του cDNA του AEΠ-1 του προβάτου καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων της GenBank με κωδικό GQ855215.





Από το συνδυασμό των τμημάτων 1, 2, 3 και 4 του ΑΕΠ-2 προκύπτει η αλληλουχία του μεταγράφου του ΑΕΠ-2 του προβάτου συνολικού μήκους 2128 bp. Στην εικόνα 17 παρουσιάζεται η αλληλουχία του cDNA του ΑΕΠ-2 στο πρόβατο. Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του μεταγράφου αποκάλυψε ένα ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο μήκους 1251 bp. Το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης εντοπίζεται στις βάσεις 59-61 και το κωδικόνιο λήξης στις βάσεις 1307-1309. Το μήκος της CDS του ΑΕΠ-2 στο πρόβατο είναι ίδιο με αυτό στα βοοειδή και τον αρουραίο, ενώ είναι μεγαλύτερο κατά 3 bp των επιμύων και των δύο μεταγράφων του ανθρώπου. Αυτό οφείλεται στην απαλοιφή μίας τριπλέτας νουκλεοτιδίων (GAC) στη θέση 131-133 για το μετάγραφο του προβάτου που παρατηρείται στα μετάγραφα του ανθρώπου και των επιμύων σε σύγκριση με τα μετάγραφα των υπολοίπων οργανισμών. Η CDS του ΑΕΠ-2 του προβάτου παρουσιάζει 93 % ομοιότητα με την CDS των βοοειδών (GenBank XM\_581432), 83 % με την CDS και των δύο μεταγράφων του ανθρώπου (GenBank NM\_001143818 και NM\_002575), 75 % με την CDS του αρουραίου (GenBank NM\_021696) και 77 % με την CDS των επιμύων (GenBank NM\_011111).

Όσον αφορά τις μη μεταφραζόμενες περιοχές του μεταγράφου κλωνοποιήθηκαν ολόκληρες οι 3' και 5' UTR περιοχές. Το 3' UTR έχει μήκος 819 bp και παρουσιάζει σημαντική ομολογία με την αντίστοιχη περιοχή στα βοοειδή (93 %) και με τα μετάγραφα 1 και 2 του ανθρώπου (73 % και για τα δύο). Αντίθετα, δεν παρουσιάζει σημαντική ομολογία με τις αντίστοιχες περιοχές των μεταγράφων του αρουραίου και των επιμύων. Στα βοοειδή, το ποσοστό αυτό ομολογίας αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 95 % του συνολικού μήκους του, ενώ στον άνθρωπο η ομολογία αυτή και στις δύο περιπτώσεις αναφέρεται σε τμήμα του 3' UTR του προβάτου το οποίο αντιστοιχεί σε περίπου 50 % του συνολικού μήκους του. Το 3' UTR του προβάτου είναι σαφώς το μεγαλύτερο ανάμεσα στα είδη που εξετάστηκαν καθώς το μήκος των 3' UTR των μεταγράφων των υπολοίπων κυμαίνεται μεταξύ 599 bp για τα δύο μετάγραφα του ανθρώπου και 778 bp για το μετάγραφο των βοοειδών. Στο 3' UTR παρατηρείται ένα κανονικό σήμα πολυαδενυλίωσης (AATAAA) (Wahle and Keller 1996), το οποίο βρίσκεται 17 νουκλεοτίδια ανωφερικά της πολύ(A) ουράς και ένα εναλλακτικό σήμα πολυαδενυλίωσης (AATATA) (Graber et al. 1999, Beaudoing et al. 2000), το οποίο βρίσκεται 26 νουκλεοτίδια ανωφερικά της πολύ(A) ουράς. Τέλος, η πολύ(A) ουρά που παρατηρείται έχει μήκος 31 νουκλεοτιδίων.

Το 5'-UTR έχει μήκος 58 bp και παρουσιάζει υψηλό βαθμό ομολογίας μόνο με το 5' UTR των βοοειδών (96 %), ενώ δε βρέθηκε σημαντική ομολογία του 5'UTR του προβάτου με τις αντίστοιχες περιοχές των μεταγράφων του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Το 5' UTR του προβάτου είναι μεγαλύτερο σε μήκος από την αντίστοιχη περιοχή του αρουραίου (24 bp), ενώ αντίθετα είναι μικρότερο από τις αντίστοιχες περιοχές των βοοειδών (67 bp), του ανθρώπου (333 και 75 bp) και των επιμύων (33 bp). Στο 5' UTR παρατηρείται ότι η αλληλουχία γύρω από το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης, (5'-ACAATGG-3'), βρίσκεται σε απόλυτη ομολογία με την αντίστοιχη αλληλουχία [A/G]XXAUGG που παρατηρείται σε όλα τα θηλαστικά (Kozak 1981) και χαρακτηρίζεται ως ισχυρή συναινετική αλληλουχία (Kozak 1986).

Η αλληλουχία του cDNA του ΑΕΠ-2 του προβάτου καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων της GenBank με κωδικό GQ855216.

```

1 - TAAAAACAACACTCAGAAGACTGTTTCCTGTCAGGCAGAGAAGAACCAGATTGAGACAAT
61 - GGAAGAACTTAATGTGGCAAATACAATCTTTGCCCTCAATTTCTTCAAGCACCTGGCAAA
E E L N V A N T I F A L N F F K H L A N
121 - TACAGGCGCCGACACCCAGAATATCTTCTTCTGTCCCTGGAGCGTCTCCTCCACCATGGC
T G A D T Q N I F F C P W S V S S T M A
181 - CATGGTCTACCTGGGCGCCCGGGGAAATACTGCAGACCAGATAGCCAGGTGCTTCAGTT
M V Y L G A R G N T A D Q I A Q V L Q F
241 - TAACCAAGTTGGAGTCCACAAGGCACCCCGAGTGACCAACAGAGTCTCACCAGTTGTGA
N Q V G V H K G T P V T Q Q S L T S C D
301 - TTTTCATGCAGCAGATCCAGAGGGACACCTATCCTGATGCTATTTTGCAGGCACAAGCTGC
F M Q Q I Q R D T Y P D A I L Q A Q A A
361 - CGGGGAAATCCATTCATCTCCCTTCTCTCAGCAACGCCATCAACGCGTCCAGGGGGGA
G E I H S S F R S L S N A I N A S T G E
421 - GTATTTATTTGGAAAGTGCCAATAAGCTATTTGGGGAGAAGTCTGCAAGATTCAAGGAAGA
Y L L E S A N K L F G E K S A R F K E E
481 - ATACATGCAACTCTCCAAGAGATATTACTCTACAGAACCCAGGCGAGTGGACTTCTTAGA
Y M Q L S K R Y Y S T E P Q A V D F L E
541 - ATGTGCAGAAGACACCAGAAAAGAGATTAATTCCTGGGTCAAGACCCAAACTAAAGGCAA
C A E D T R K E I N S W V K T Q T K G K
601 - AATCCCAAACCTTGCTACCTGAAGGTTCTGTTAATGTAGACACCAAGATGGTCTGGTGAA
I P N L L P E G S V N V D T K M V L V N
661 - TGCTGTCTACTTCAAAGGAAGGTGGAAGACTCCGTTTCAGAAGAAATTAAGGGACTTTA
A V Y F K G R W K T P F Q K K L K G L Y
721 - TCCTTTCCGAGTGAACCTGCAGCACAATCAGTAGAGATGATGTTCTGAAATGAAAA
P F R V N S T Q H K S V E M M F L N E K
781 - GCTAAACATTTGGATACATAGCAGACCTGAAGGTCCAGATTCTAGAACTCCCATATGCTGG
L N I G Y I A D L K V Q I L E L P Y A G
841 - CGATGTCAGTATGTTTCTGCTGCCAGATGGAATTGCTGAATCCTCTACAGGCTTGGGA
D V S M F L L L P D G I A E S S T C G L E
901 - GTTGTCTGGAAAGTGAATCACCTATGACAAACTCAACAAGTGGCTCAGTGAAGACACCAT
L L E S E I T Y D K L N K W L S E D T M
961 - GGTCTGAGGATGACGTGGTGGTGTATATCCCCGAGTTCAAATTAGAAGAGCGTTATGAACT
A E D D V V V Y I P E F K L E E L
1021 - CAAAACCATTTCTACAAGCATGGGCATGGGCGATGCCTTCAGCCAGGGCCGAGCCAATTT
K T I L T S M G M G D A F S Q G R A N F
1081 - CTCAGGCATGTCAGAAAAGAATGACCTGTTTCTGTCTGAAGTGTTCATCAAGCTTCTGT
S G M S E K N D L F L S E V F H Q A S V
1141 - GGATGTGAACGAGGAGGGCACTGAGGCTGCTGCCGGCACTGGGGCCATCGTAACAGGGAG
D V N E E G T E A A A G T G A I V T G R
1201 - AACAGGCCATGGAGGCCCGCAGTTTGTGGCAGACCATCCTTTCTCTTCTTATCATGCA
T G H G G P Q F V A D H P F L F I M H
1261 - CAAGATAACCAAGAGCATTTCTTTTGGGGCAGATTTGCACCACCTAAATTTGAAAGTTT
K I T K S I L F W G R F A P P *
1321 - CCGTTTCTGCACAGAAATCTGTAATATGAGGTATAAGCCTCAGGAGTTCTGCAAGTGCCA
1381 - AAGCTTTAGAGGCCCTCCGCGTGTCTGCTTCTGAGCTTCTATCCCACAATAACTAGG
1441 - AACACAGACATGGTGTGGCGTCTGTCAAGTCAACATCGCCACCCCGCCATTAATCG
1501 - TTTGGCCCCCTAAAATGGGATGATCTCTCATTTAGCTCTTTCTTACTCTCAGTTTATTTT
1561 - ATAGCATTAACCTTTACTGTATTATTTATGTTTTATATACCTTTTTTAAAATTATGGTCA
1621 - TTGTCTACTGTAGCTGATACATTTATAGAAGCCGGTCACTACTTATTTCTTTCTCAGG
1681 - AAATATATGTATCTGTGGGCGTCCCTGGTGGCTCAGAGGGTGAAAAATCCACCTGCAATG
1741 - CAGGATACCTGAGTTTCAGTCCCTGGGTGAGGAAGATCTCCTGGAGAAGGGAATGGCTACC
1801 - CACTTCAGTGTCTTTGCCCTGGGGAATCCATGGACAGAGGAGCCTAGCAGGCTACAGTCC
1861 - ATGGGGTTGCAACAAGTGAAGCATGACTTAGTGACTAAGCATGTAGGCATATGTATTTGT
1921 - TCTTATAATGAAGGATAAGTAGGTGGCCTCCATGCCCTTTTGTAGGAGAGACCTAGAAG
1981 - AAAGCATTTGAACATCAGGGAAATGTATACTGCATGCATTTCTAGCGCTATGTATCCCATG
2041 - CACATGGCTGTAACCTTACATAAGGTTGCAAAATAATATAAGAAATAAACTATTTTACAAA
2101 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

**Εικόνα 17:** Αλληλουχία του cDNA και πρωτεϊνική αλληλουχία του ΑΕΠ-2 του προβάτου. Τα σημεία έναρξης και λήξης της μετάφρασης έχουν σκιαστεί. Σε πλαίσιο βρίσκονται στο 5' άκρο του μεταγράφου η αλληλουχία τύπου Kozak και στο 3' άκρο τα δύο εναλλακτικά σήματα πολυαδενυλίωσης του μεταγράφου, ενώ η πολυ-(A) ουρά υπογραμμίζεται.

### **2.3.2.2. ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΩΝ cDNAs ΤΩΝ ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΑΕΠ-2**

#### **2.3.2.2.1. Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΑΕΠ-1**

Το cDNA του ΑΕΠ-1 του προβάτου κωδικεύει μια πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 402 αμινοξέα, με θεωρητικό μοριακό βάρος 45 KDa και θεωρητικό ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 5.8. Ωστόσο, το πειραματικό βάρος της πρωτεΐνης αναμένεται να διαφέρει εξαιτίας της γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης. Οι πρωτεΐνες του ΑΕΠ-1 είναι ίδιες σε μήκος σε όλους τους οργανισμούς που ελέγχθηκαν. Η πρωτεΐνη του προβάτου παρουσιάζει αρκετά υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες των υπολοίπων οργανισμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πρωτεΐνη των βοοειδών (NP\_776562) με 95 % ομοιότητα, ενώ ακολουθούν του χοίρου (NP\_999075) με 89 %, του ανθρώπου (NP\_000593) με 85 %, του αρουραίου (P20961) με 79 % και των επιμύων (P22777) με 77 %.

Στην εικόνα 18 έχουν στοιχηθεί οι πρωτεΐνες του προβάτου, των βοοειδών του χοίρου, του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Δεν παρουσιάζονται ενθέσεις ή απαλοιφές αμινοξέων στα πρωτεϊνικά προϊόντα των οργανισμών που εξετάστηκαν.

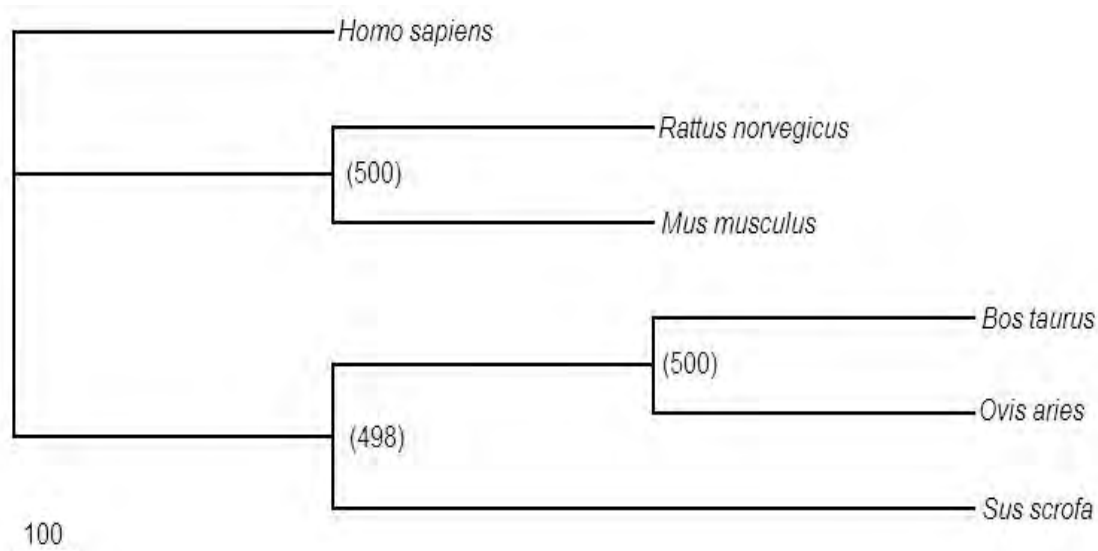


Ovis aries	KMSPVFPCIAIGLILFEGCSASVQPCSAASLAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
Bos taurus	KMSPVFPCIAIGLILFEGCSASVQPCSAASLAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
Sus scrofa	KMSVPCIAIGLILFEGCSASVQPCSAASLAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
Homo sapiens	KMSPVFPCIAIGLILFEGCSASVQPCSAASLAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
Rattus norvegicus	KMSAALCLLGLIVKSGKTIPLRSHHCAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
Mus musculus	KMSAALCLLGLIVKSGKTIPLRSHHCAIIFGVKVFVVASKDRNVVFSYGVASVLAMIQITIGGTRCQIQDAMFKRIBFGVAFAHR	100
consensus m ms	cl gl l g s a at fgkvf vv askdrnvvsfygv svlamiq tt g t qiq am f e g a a	
Ovis aries	LVKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
Bos taurus	LVKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
Sus scrofa	LVKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
Homo sapiens	LVKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
Rattus norvegicus	LKKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
Mus musculus	LKKEILGEMNKFEISTADAIIVQVDIIVLVEGEMFELFRITIVKQVDFSEVERARFINDWVRRHTKGMISDILIGGAVLITRILVIVNALYF	200
consensus l	kel g wnk eistadaifvqrdi lv gfmf el fr it iv kqvd fse ver ar fi ndwv r rhtk gmi s dil i g g av l i tr il v iv na ly f g qw kt	
Ovis aries	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
Bos taurus	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
Sus scrofa	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
Homo sapiens	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
Rattus norvegicus	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
Mus musculus	PFPESSITHRLEFHKSDGSTIVSVPMMACINKENYTFEIPDGHYVDIIELPYHGNTLSMIAAAPFEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEKVEK	300
consensus pf e	th rlfhksd gst iv svp mma c in ken ytf e ip dg h yv di i el py hg n t l s m i a a a p f e k v e k v e k v e k v e k v e k v e k	
Ovis aries	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
Bos taurus	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
Sus scrofa	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
Homo sapiens	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
Rattus norvegicus	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
Mus musculus	FSLEFDLRPLELGMIDLRPSCADFSISDQELVSCALQKVIEVNESGTIVASSTAVISARMAPFEMVIDRSELFVVRHNPTETLIFMGQVM	400
consensus fsle e	dlr ple l g m d l r p s c a d f s i s d q e l v s c a l q k v i e v n e s g t i v a s s t a v i s a r m a p f e m v i d r s e l f v v r h n p t e t l i f m g q v m	
Ovis aries	EP	402
Bos taurus	EP	402
Sus scrofa	EP	402
Homo sapiens	EP	402
Rattus norvegicus	EP	402
Mus musculus	EP	402
consensus ep		402

**Εικόνα 18:** Στοιχισή των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos Taurus*), του χοίρου (*Sus scrofa*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*) για τον ΑΕΠ-1. Τα μη συντηρημένα αμινοξέα δεν έχουν σκιαστεί. Τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε όλα τα είδη έχουν κυανή σκίαση, τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε πέντε από τα έξι είδη έχουν ερυθρή σκίαση και τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε τρία ή τέσσερα από τα έξι είδη έχουν γαλάζια σκίαση. Στην εικόνα με υπογράμμιση σημειώνονται το πεπτικό σηματοδότησης (γαλάζιο) και το ενεργό κέντρο του ενζύμου (ερυθρό)

### 2.3.2.2.2. Φυλογενετική ανάλυση του ΑΕΠ-1

Το φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΑΕΠ-1 στα διάφορα είδη παρουσιάζεται στην εικόνα 19. Η πιθανότητα κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Το δενδρόγραμμα της εικόνας 19 αντιπροσωπεύει το πιθανότερο δέντρο, μετά από 500 bootstrap επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στην εικόνα σχηματίζονται δύο φυλογενετικές ομάδες, αυτή των τρωκτικών και αυτή των μηρυκαστικών ζώων. Η φυλογενετική συγγένεια της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-1 του προβάτου με την αντίστοιχη στα βοοειδή ήταν αναμενόμενη καθώς η ομολογία τους ήταν πολύ υψηλή.



**Εικόνα 19:** Φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΑΕΠ-1 του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos taurus*), του χοίρου (*Sus scrofa*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*). Στις διακλαδώσεις, εντός παρενθέσεως, αναγράφεται ο αριθμός των επιτυχημένων bootstrap επαναλήψεων, ενώ κάτω αριστερά παρουσιάζεται η κλίμακα για τη γενετική απόσταση. Η κατασκευή του φυλογενετικού δενδρογράμματος έγινε με τη χρήση του προγράμματος PHYLIP.

### 2.3.2.2.3. Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-1

Η εύρεση χαρακτηριστικών δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαδικτυακών προγραμμάτων ScanProsite και CD-search.

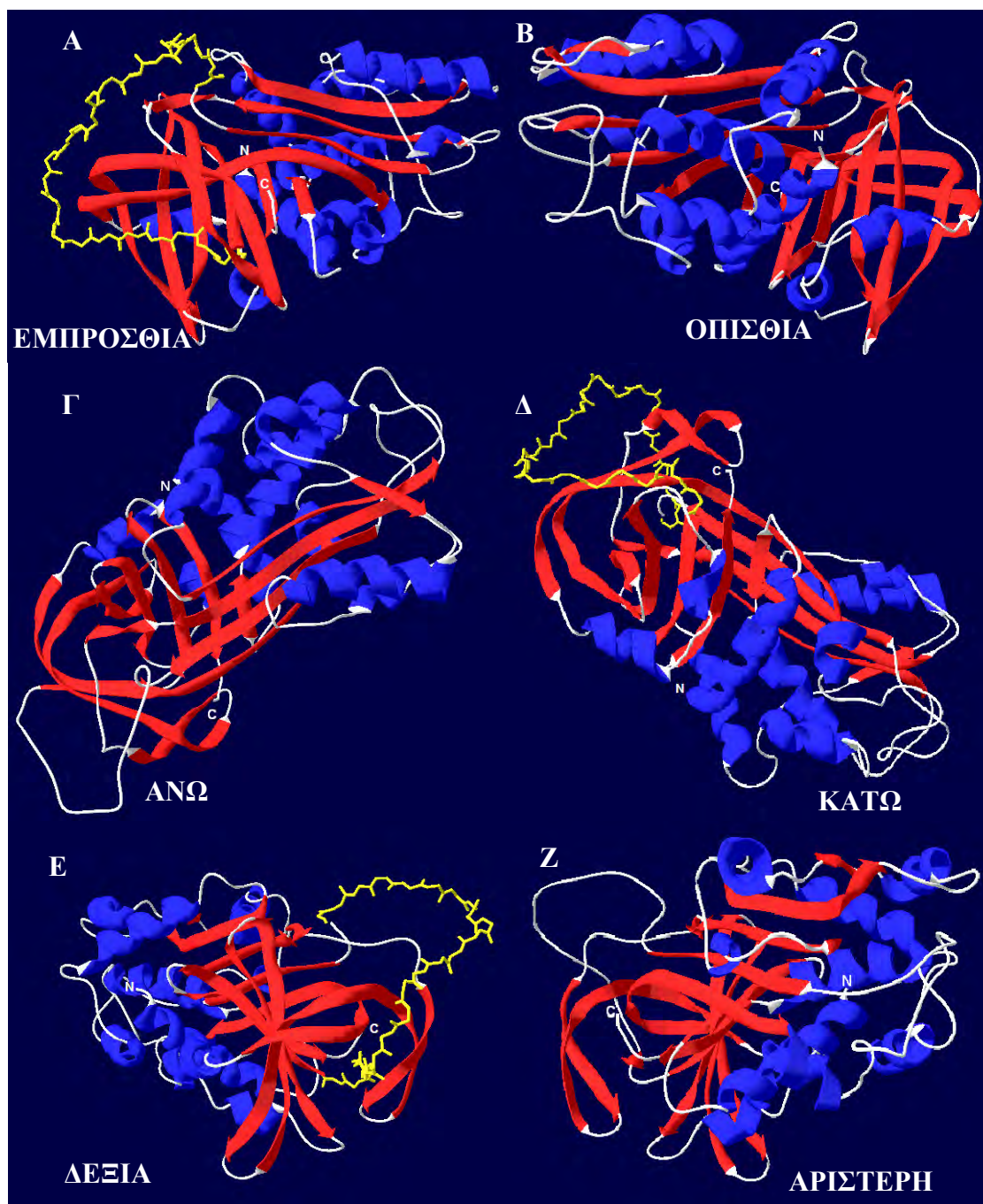
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η πρωτεΐνη του ΑΕΠ-1 του προβάτου αποτελείται από ένα πεπτίδιο σηματοδότησης μήκους 23 αμινοξέων (αμινοξέα 1-23). Επιπλέον, παρουσιάζει μία συντηρημένη περιοχή, η οποία είναι χαρακτηριστική για τις σερπίνες,







ανθρώπου με κωδικό 1b3kC καταχώρησης στην τράπεζα δεδομένων PDB (Sharp et al. 1999). Το μοντέλο επιλέχθηκε με βάση την υψηλότερη ομολογία (86 %), σε σχέση με τα υπόλοιπα διαθέσιμα μοντέλα, που εμφάνισε η πρωτεΐνη του ΑΕΠ-1 του προβάτου. Στην εικόνα 21 (Α-Ε), παρουσιάζεται το τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης, σε διαφορετικά οπτικά πεδία (όψεις).



**Εικόνα 21:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ΑΕΠ-1 του προβάτου. Έξι διαφορετικές όψεις του πρωτεϊνικού μοντέλου του ΑΕΠ-1 (Α-Ζ) το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα 32-402. Με ερυθρό χρώμα έχουν επισημανθεί οι β-πτυχωτές επιφάνειες, με κυανό οι α-έλικες, ενώ με κίτρινο χρώμα επισημαίνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (αμινοξέα 355-380) (Α, Δ και Ε).

### 2.3.2.2.6. Πρωτεϊνική αλληλουχία του ΑΕΠ-2

Το cDNA του ΑΕΠ-2 του προβάτου κωδικεύει μια πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 416 αμινοξέα, με θεωρητικό μοριακό βάρος 46,5 KDa και pI 5,6. Ωστόσο το πραγματικό βάρος της πρωτεΐνης αναμένεται να διαφέρει σημαντικά εξαιτίας του υψηλού βαθμού γλυκοζυλίωσης της πρωτεΐνης. Η πρωτεΐνη του προβάτου είναι ίδια σε μήκος με την πρωτεΐνη των βοοειδών (XP\_581432) και του αρουραίου (P29524), ενώ είναι μεγαλύτερη κατά ένα αμινοξύ από τις πρωτεΐνες του ανθρώπου (AAA36413), και των επιμύων (P12388). Η πρωτεΐνη του προβάτου παρουσιάζει αρκετά υψηλή ομολογία με τις πρωτεΐνες των υπολοίπων οργανισμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, παρουσιάζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την πρωτεΐνη των βοοειδών με 94 % ομοιότητα, ενώ ακολουθούν του ανθρώπου με 78 %, των επιμύων με 71 % και του αρουραίου με 69 %.

Στην εικόνα 22 έχουν στοιχηθεί οι πρωτεΐνες του προβάτου, των βοοειδών, του ανθρώπου, του αρουραίου και των επιμύων. Όπως φαίνεται στην εικόνα, στα βοοειδή και το πρόβατο παρουσιάζεται ένθεση ενός αμινοξέος σε σύγκριση με τους υπόλοιπους οργανισμούς στη θέση 25. Για τα βοοειδή το αμινοξύ αυτό είναι το ασπαραγινικό οξύ, ενώ για το πρόβατο είναι η ασπαραγίνη. Επιπλέον, παρατηρείται ένθεση μίας αργινίνης στην θέση 118 για την πρωτεΐνη του αρουραίου σε σύγκριση με τις πρωτεΐνες των άλλων οργανισμών.

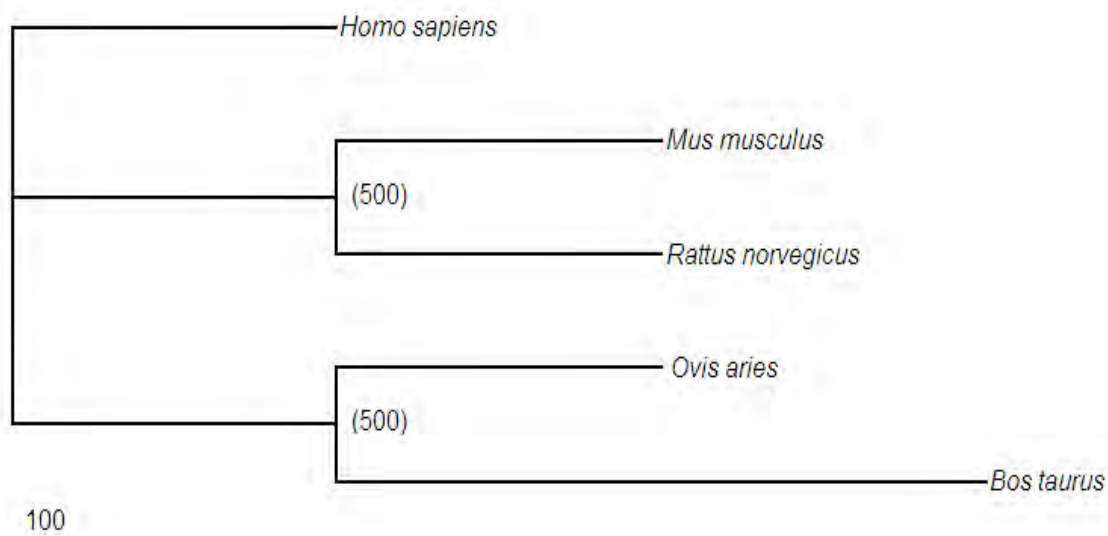


Ovis aries	MBLWANTFALNFRHLANTGADIQNIFPCPWSSSSIVAVYIGARGITACAVLIFNAGVHKGPTVLSSTLSCFFICIQRDITFFAILQAQA	100
Bos taurus	MBLWANTFALNFRHLANTSANIQNIFPCPWSSSSIVAVYIGARGITACAVLIFNAGVHRGPTVLSSTLSCFFICIQRGTFFAILQAQA	100
Homo sapiens	MBLWANTFALNFRHLAKASP.IQNIFPCPWSSSSIVAVYIGARGITACAVLIFNAGVHRGPTVLSSTLSCFFICIQRGSFFAILQAQA	99
Rattus norvegicus	MELSLVANTFALNFKLQIEQNS.IQNIFPCPWSSSSIVAVYIGARGITACAVLIFNAGVHRGPTVLSSTLSCFFICIQRDYFFAILQAQA	99
Mus musculus	MELSLVANTFALNFKLQIEKNS.IQNIFPCPWSSSSIVAVYIGARGITACAVLIFNAGVHRGPTVLSSTLSCFFICIQKENYPSAILQAQA	99
consensus re l ant faIn k tqn f pws sst a v g t q a v l i g t c i q i q yp ailqaa		
Ovis aries	ACEIHSFSLSNAINMS.IGEYLLESANLFGKESAFREEMQLSKRYSYSEHVAVDFFLECEDRKEINSVWKTQTKGIPNLLPEGSVMDDTMMVL	199
Bos taurus	AGQIHSFSLSNAINMS.MGEYLLESANLFGKESAFREEMQLSKRYSYSEHVAVDFFLECAEDARKINSVWKTQTKGIPNLLPEGSVDDTMMVL	199
Homo sapiens	AKIHSFSLSNAINMS.TGEYLLESANLFGKESAFREEMQLSKRYSYSEHVAVDFFLECAEERAKINSVWKTQTKGIPNLLPEGSVDDTMMVL	198
Rattus norvegicus	RPKIHSFSLSNAINPRTIGYLLESANLFGKESAFREEMQLSKRYSYSEHVAVDFFLECAERAKINSVWKTQTKGIPNLLPEGSVDDTMMVL	199
Mus musculus	SDKIHSFSLSNAINFP.QEYLLESANLFGKESAFREEMQLSKRYSYSEHVAVDFFLECAERAKINSVWKTQTKGIPNLLPEGSVDDTMMVL	198
consensus ihs f sls in g ylles nklfgekse f eey yys ep avdfleca x inswvktqtkg ipnllpegsv dt mvl		
Ovis aries	VNAVYFKGKWKTPFRKLLGLYPRVNSLQKRSVMMFLNKRINIGYIDLKKQIILELRYAGVSMFLLLPDCIAESSTIGLELPSSEITVTKIKKWSQD	299
Bos taurus	VNAVYFKGKWKTPFRKLLGLYPRVNSLQKRSVMMFLNKRINIGYIDLKKQIILELRYAGVSMFLLLPDCIAESSTIGLELPSSEITVTKIKKWSQD	299
Homo sapiens	VNAVYFKGKWKTPFRKLLGLYPRVNSLQKRSVMMFLNKRINIGYIDLKKQIILELRYAGVSMFLLLPDCIAESSTIGLELPSSEITVTKIKKWSQD	298
Rattus norvegicus	VNAVYFKGKWKTPFRKLLGLYPRVNSLQKRSVMMFLNKRINIGYIDLKKQIILELRYAGVSMFLLLPDCIAESSTIGLELPSSEITVTKIKKWSQD	299
Mus musculus	VNAVYFKGKWKTPFRKLLGLYPRVNSLQKRSVMMFLNKRINIGYIDLKKQIILELRYAGVSMFLLLPDCIAESSTIGLELPSSEITVTKIKKWSQD	298
consensus vn yfkg wktprf k l glypr vn s l q r s v m m f l n k r i n i g y i d l k k q i i l e l r y a g v s m f l l l p d c i a e s s t i g l e l p s s e i t v t k i k k w s q d		
Ovis aries	ILMEDIVVYIPFRKLEERYSKILLSMGMGDAFSCGRAFSGMSEKNDLFLSEVHQAVDVVEEGIDAAAGTGCAIVIGRIGHGGPQFVADHPFLFI	399
Bos taurus	ILMEDIVVYIPFRKLEERYSKILLSMGMGDAFSCGRAFSGMSEKNDLFLSEVHQAVDVVEEGIDAAAGTGCAIVIGRIGHGGPQFVADHPFLFI	399
Homo sapiens	KMEDIVVYIPFRKLEERYSKILLSMGMGDAFSCGRAFSGMSEKNDLFLSEVHQAVDVVEEGIDAAAGTGCAIVIGRIGHGGPQFVADHPFLFI	398
Rattus norvegicus	ILMEDIVVYIPFRKLEERYSKILLSMGMGDAFSCGRAFSGMSEKNDLFLSEVHQAVDVVEEGIDAAAGTGCAIVIGRIGHGGPQFVADHPFLFI	399
Mus musculus	ILMEDIVVYIPFRKLEERYSKILLSMGMGDAFSCGRAFSGMSEKNDLFLSEVHQAVDVVEEGIDAAAGTGCAIVIGRIGHGGPQFVADHPFLFI	398
consensus ed v vyip fkl y l il n g m d a f g a f s g m s e k n d l f l s e v h q a v d v v e e g i d a a g t g c a i v i g r i g h g g p q f v a d h p f l f i		
Ovis aries	MRITKSLIFGRFAP	416
Bos taurus	MRIIRSLIFGRFAP	416
Homo sapiens	MRIIRSLIFGRFAP	415
Rattus norvegicus	MRIIRSLIFGRFAP	416
Mus musculus	MRIIRSLIFGRFAP	415
consensus it ilf grf p		

**Εικόνα 22:** Στοιχισμός των πρωτεϊνικών αλληλουχιών του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos Taurus*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*) για τον ΑΕΠ-2. Τα μη συντηρημένα αμινοξέα δεν έχουν σκιαστεί. Τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε όλα τα είδη έχουν κυανή σκίαση, τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε τέσσερα από τα πέντε είδη έχουν ερυθρή σκίαση και τα αμινοξέα που είναι συντηρημένα σε τρία από τα πέντε είδη έχουν γαλάζια σκίαση. Στην εικόνα με υπογράμμιση σημειώνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (ερυθρό)

### 2.3.2.2.7. Φυλογενετική ανάλυση του ΑΕΠ-2

Το φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΑΕΠ-2 στα διάφορα είδη παρουσιάζεται στην εικόνα 23. Η πιθανότητα κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Το δενδρόγραμμα της εικόνας 23 αντιπροσωπεύει το πιθανότερο δέντρο, μετά από 500 bootstrap επαναλήψεις. Όπως φαίνεται στην εικόνα σχηματίζονται δύο φυλογενετικές ομάδες, αυτή των τρωκτικών και αυτή των μηρυκαστικών ζώων. Η φυλογενετική συγγένεια της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-2 του προβάτου με την αντίστοιχη στα βοοειδή ήταν αναμενόμενη καθώς η ομολογία τους ήταν πολύ υψηλή.



**Εικόνα 23:** Φυλογενετικό δενδρόγραμμα για τις πρωτεΐνες του ΑΕΠ-2 του προβάτου (*Ovis aries*), των βοοειδών (*Bos taurus*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*), του αρουραίου (*Rattus norvegicus*) και των επιμύων (*Mus musculus*). Στις διακλαδώσεις, εντός παρενθέσεως, αναγράφεται ο αριθμός των επιτυχημένων bootstrap επαναλήψεων, ενώ κάτω αριστερά παρουσιάζεται η κλίμακα για τη γενετική απόσταση. Η κατασκευή του φυλογενετικού δενδρογράμματος έγινε με τη χρήση του προγράμματος PHYLIP.

### 2.3.2.2.8. Δομικές και λειτουργικές περιοχές της πρωτεΐνης του ΑΕΠ-2

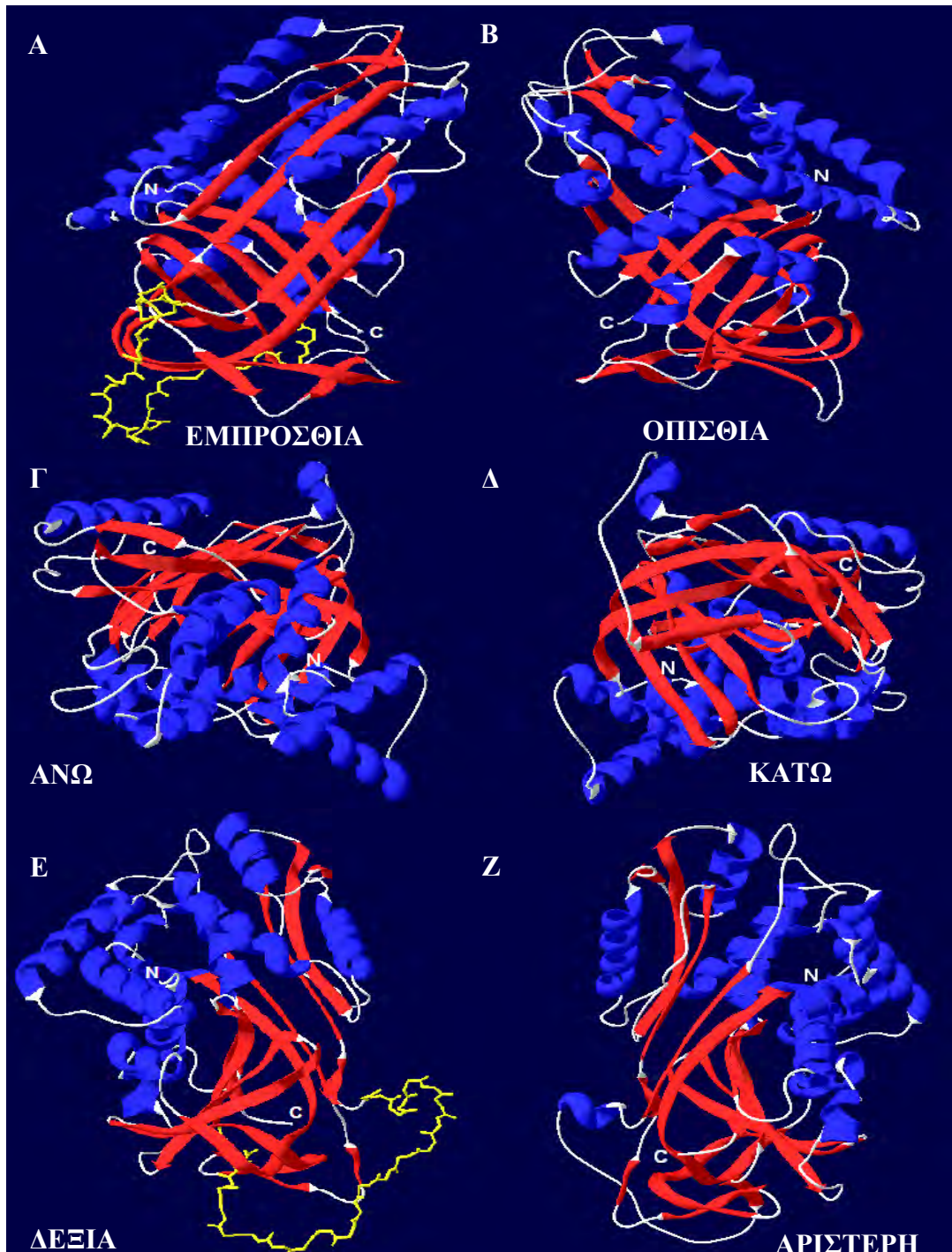
Η εύρεση χαρακτηριστικών δομικών και λειτουργικών περιοχών της πρωτεϊνικής αλληλουχίας, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των διαδικτυακών προγραμμάτων ScanProsite και CD-search.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πρωτεΐνη του ΑΕΠ-2 του προβάτου παρουσιάζει μία συντηρημένη περιοχή, η οποία είναι χαρακτηριστική για τις σερπίνες, και καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος της πρωτεϊνικής αλληλουχίας (αμινοξέα 4-416). Εντός της περιοχής αυτής εντοπίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (αμινοξέα 367-394). Τέλος,





υπόλοιπα διαθέσιμα μοντέλα, που εμφάνισε η πρωτεΐνη του ΑΕΠ-2 του προβάτου. Στην εικόνα 25 (Α-Ε), παρουσιάζεται το τρισδιάστατο μοντέλο της πρωτεΐνης, σε διαφορετικά οπτικά πεδία (όψεις).



**Εικόνα 25:** Τρισδιάστατη απεικόνιση της τριτοταγούς δομής του ΑΕΠ-2 του προβάτου. Έξι διαφορετικές όψεις του πρωτεϊνικού μοντέλου του ΑΕΠ-2 (Α-Ζ) το οποίο αποτελείται από τα αμινοξέα 3-416. Με ερυθρό χρώμα έχουν επισημανθεί οι β-πτυχωτές επιφάνειες, με γαλάζιο οι α-έλικες, ενώ με κίτρινο χρώμα επισημαίνεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου (αμινοξέα 367-394) (Α και Ε).

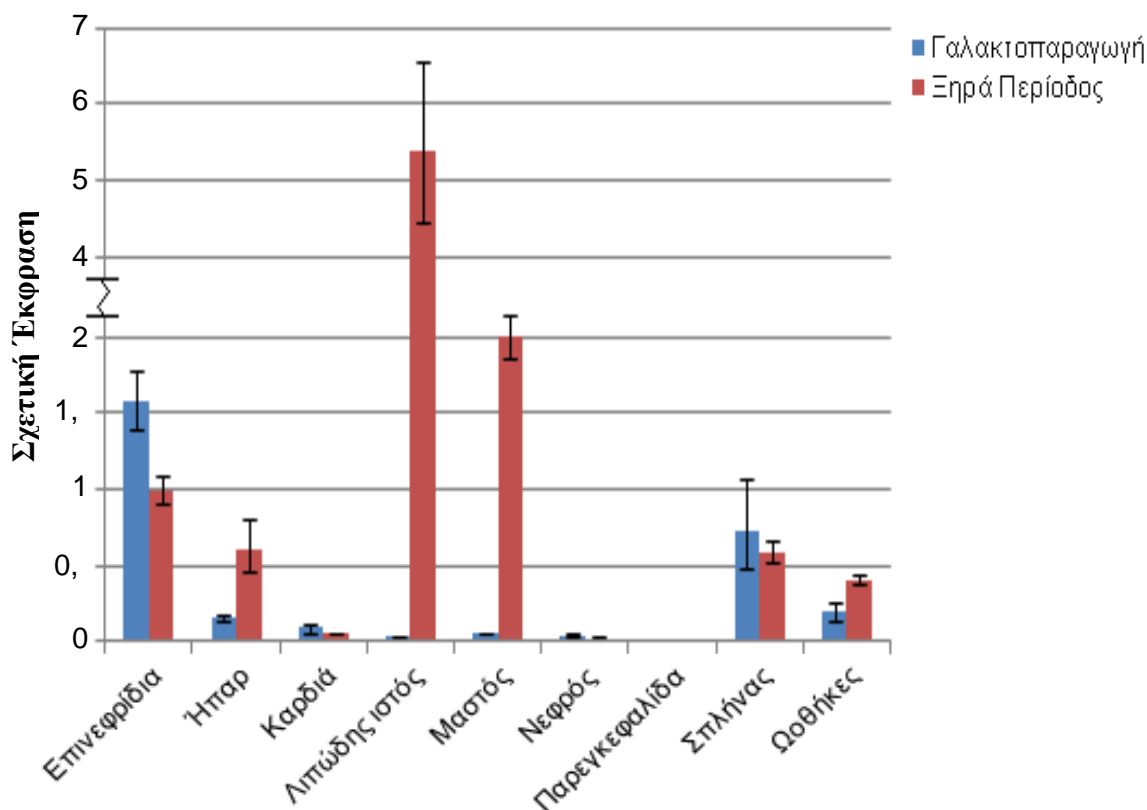
### 2.3.2.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΕΠ-1 ΚΑΙ ΑΕΠ-2 ΣΤΟ ΠΡΟΒΑΤΟ

#### 2.3.2.3.1. Προσδιορισμός του προτύπου έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 με την εφαρμογή της μεθόδου Real Time PCR

Αρχικά, για τη σύγκριση των επιπέδων μεταγραφής των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 μεταξύ διαφορετικών ιστών, αρχικά έγινε απομόνωση ολικού RNA από τους ιστούς. Μετά την απομόνωση του RNA, ακολούθησε η σύνθεση του cDNA. Με βάση τον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων RNA από την ηλεκτροφόρηση και την φωτομέτρηση τους, χρησιμοποιήθηκαν ίσες ποσότητες RNA από κάθε ιστό για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής.

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα RNA που προήλθε από τους ιστούς ενός ζώου της συνθετικής φυλής το οποίο βρισκόταν στο μέσο της γαλακτοπαραγωγής και ενός ζώου της συνθετικής φυλής το οποίο βρισκόταν στην ξηρά περίοδο.

Στο διάγραμμα 9 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Real Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του ΑΕΠ-1.



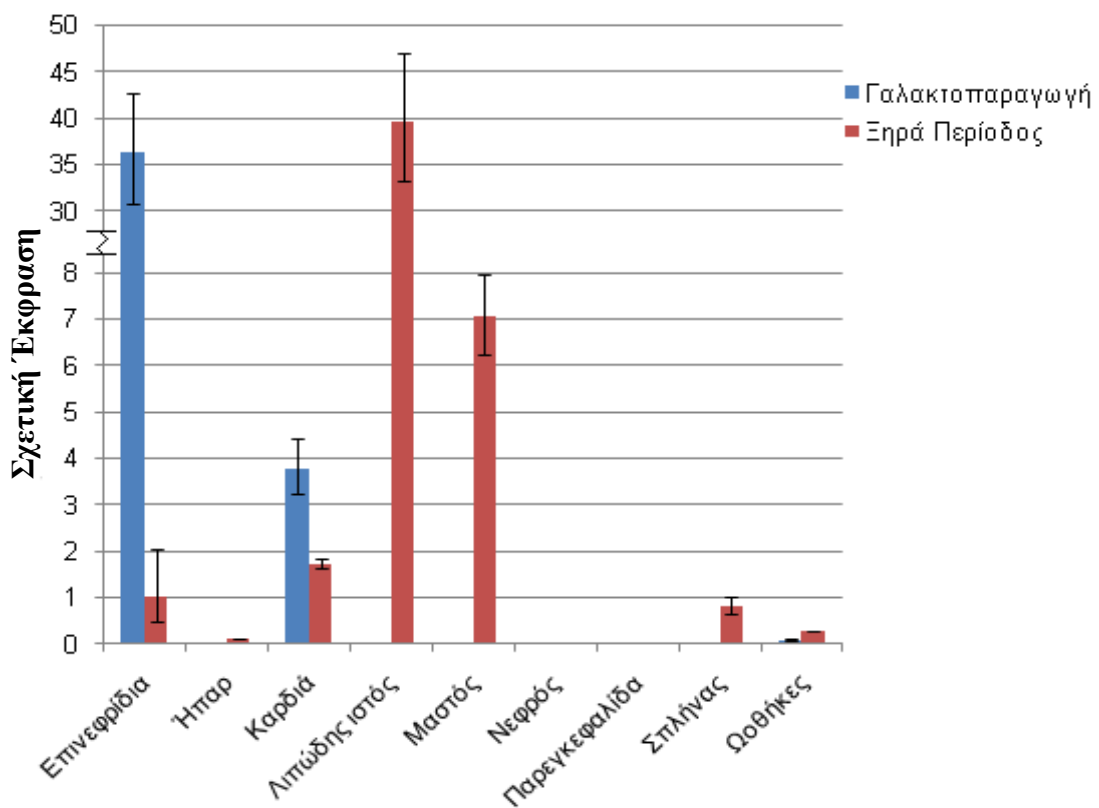
**Διάγραμμα 9:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων των μεταγράφων του ΑΕΠ-1 σε διάφορους ιστούς του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε ιστό προσδιορίστηκε εις τριπλούν.



Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων προκύπτει ότι κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-1 παρατηρούνται στα επινεφρίδια. Ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο σπλήνα, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στις ωθήκες, στο μαστό, στο λιπώδη ιστό, στην καρδιά στο νεφρό και στο ήπαρ. Σε αντίθεση με τη γαλακτοπαραγωγή, κατά την ξηρά περίοδο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, ενώ υψηλές τιμές παρατηρούνται και στο μαστό. Ενδιάμεσες τιμές παρατηρούνται στα επινεφρίδια, στο ήπαρ, στο σπλήνα και στις ωθήκες, ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο νεφρό και στην καρδιά. Τέλος, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του ΑΕΠ-1 στην παρεγκεφαλίδα καμία από τις δύο φυσιολογικές καταστάσεις.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έχει διαπιστωθεί και σε άλλα θηλαστικά έκφραση του ΑΕΠ-1 στο μαστό (Rabot et al. 2007), στο λιπώδη ιστό (Alessi et al. 1997), στην καρδιά (Masuda et al. 2009), στο ήπαρ (Dimova and Kietzmann 2008), στο νεφρό (Masuda et al. 2009), στην παρεγκεφαλίδα (Cunningham et al. 2009), στο σπλήνα (Samad and Loskutoff 1996) και στις ωθήκες (Cao et al. 2006a).

Στο διάγραμμα 10 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Real Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης του γονιδίου του ΑΕΠ-2.



**Διάγραμμα 10:** Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των επιπέδων των μεταγράφων του ΑΕΠ-2 σε διάφορους ιστούς του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε ιστό προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

Από τα αποτελέσματα των μετρήσεων προκύπτει ότι κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-2 παρατηρούνται στα επινεφρίδια. Ενδιάμεσα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στην καρδιά, ενώ στους υπόλοιπους ιστούς που μελετήθηκαν δε διαπιστώθηκε έκφραση του ΑΕΠ-2 κατά τη γαλακτοπαραγωγή. Σε αντίθεση με τη γαλακτοπαραγωγή, κατά την ξηρά περίοδο, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στο λιπώδη ιστό, ενώ υψηλή τιμή έκφρασης παρατηρείται και στο μαστό. Τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρούνται στην καρδιά, στα επινεφρίδια, στο σπλήνα και στις ωθήκες. Τέλος, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση του ΑΕΠ-2 στο νεφρό, στην παρεγκεφαλίδα και στο ήπαρ κατά την ξηρά περίοδο.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, έκφραση του ΑΕΠ-2 έχει διαπιστωθεί σε άλλα θηλαστικά στο μαστό (Lund et al. 1996), στο λιπώδη ιστό (Lijnen et al. 2007), στην καρδιά (Bloor et al. 1997), στο νεφρό (Colucci et al. 1995), στον εγκέφαλο (Dietzmann et al. 2000) και στις ωθήκες (Kliem et al. 2007).

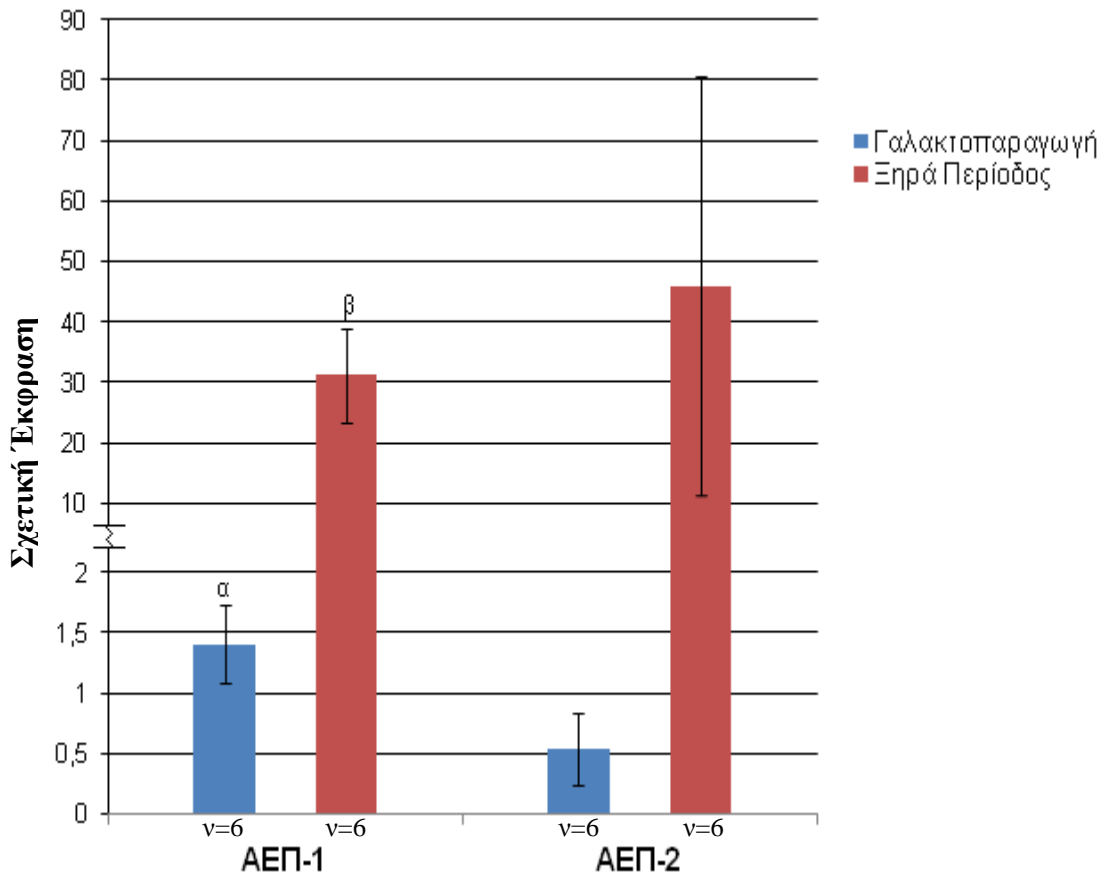
Συμπερασματικά, από τη μελέτη της έκφρασης των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο πρόβατο σε διάφορους ιστούς και όργανα, προέκυψε ότι ενώ το γονίδιο του ΑΕΠ-1, με εξαίρεση την παρεγκεφαλίδα, εκφράζεται σε όλους τους ιστούς/όργανα που εξετάστηκαν, το γονίδιο του ΑΕΠ-2 δεν εκφράζεται στην παρεγκεφαλίδα, το ήπαρ και το νεφρό. Αυτό οφείλεται στο ότι ο ΑΕΠ-1 είναι ο κύριος αναστολέας των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και πιθανώς η παρουσία του ΑΕΠ-2 να μην είναι απαραίτητη για τη λειτουργία του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στις περισσότερες των περιπτώσεων. Ιδιαίτερης αναφοράς χρήζει η ανίχνευση έκφρασης των δύο γονιδίων στο λιπώδη ιστό, καθώς είναι η πρώτη φορά που παρατηρείται έκφραση των δύο αναστολέων των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου στο λιπώδη ιστό στα αγροτικά ζώα. Από τη σύγκριση των πρότυπων έκφρασης στην γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο και για τα δύο γονίδια παρατηρήθηκε ότι παρουσιάζεται μεγάλη διαφορά στην έκφραση των γονιδίων στο μαστό και το λιπώδη ιστό. Συγκεκριμένα, η έκφραση του ΑΕΠ-1 ήταν πολύ χαμηλότερη κατά τη γαλακτοπαραγωγή σε σχέση με την ξηρά περίοδο τόσο στο μαστό όσο και στο λιπώδη ιστό, ενώ δεν ανιχνεύθηκε έκφραση για το γονίδιο του ΑΕΠ-2 σε κανέναν από τους δύο ιστούς/όργανα κατά τη γαλακτοπαραγωγή. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο λιπώδη ιστό καταδεικνύουν ενεργοποίηση του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου κατά την ξηρά περίοδο. Αντίθετα, παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης του ΑΕΠ-1 στα επινεφρίδια κατά την ξηρά περίοδο σε σύγκριση με τη γαλακτοπαραγωγή.

#### **2.3.2.3.2. Μελέτη έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό.**

Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα δείγματα RNA που προήλθαν από τους μαστούς έξι προβατίνων οι οποίες βρίσκονταν στο τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής και έξι προβατίνων οι οποίες βρίσκονταν

στην ξηρά περίοδο. Οι δύο πειραματικές ομάδες αποτελούνταν από τρία ζώα της ορεινής φυλής Ηπείρου και από τρία ζώα μίας συνθετικής φυλής.

Στο διάγραμμα 11 παρουσιάζονται γραφικά τα αποτελέσματα της εφαρμογής της Real Time PCR για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό του προβάτου.



**Διάγραμμα 11:** Μέσες τιμές και τυπικό σφάλμα των επιπέδων των μεταγράφων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό του προβάτου κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο. Το επίπεδο των μεταγράφων για κάθε δείγμα προσδιορίστηκε εις τριπλούν.

<sup>α,β</sup> Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,01$

Όπως προκύπτει από το διάγραμμα 11, υπάρχει μεγάλη διαφορά στην έκφραση των γονιδίων των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό μεταξύ των δύο φυσιολογικών σταδίων, της γαλακτοπαραγωγής και της ξηράς περιόδου. Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ήταν στατιστικώς σημαντικές για το ΑΕΠ-1 αλλά όχι για το ΑΕΠ-2. Συγκεκριμένα, η έκφραση του ΑΕΠ-1 ήταν 31 φορές μεγαλύτερη στα δείγματα της ξηράς περιόδου σε σύγκριση με τα δείγματα της γαλακτοπαραγωγής ( $p < 0,01$ ). Ο μέσος όρος των μετρήσεων για το ΑΕΠ-2 ήταν 90 φορές μεγαλύτερος για τα δείγματα της ξηράς περιόδου σε σύγκριση με αυτόν των δειγμάτων της γαλακτοπαραγωγής. Ωστόσο,

η διαφορά αυτή δεν αποδείχθηκε στατιστικώς σημαντική, προφανώς εξαιτίας της μεγάλης διακύμανσης που παρουσίασαν οι τιμές των δειγμάτων της ξηράς περιόδου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα τα γονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναστολή της ενεργοποίησης του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου ενεργοποιούνται κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου στο μαστό του προβάτου. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι η σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας μελέτης με αντίστοιχα αποτελέσματα σε άλλους οργανισμούς είναι εξαιρετικά δύσκολη, καθώς δεν υπάρχει επαρκής αριθμός μελετών για την έκφραση των δύο γονιδίων των αναστολέων των ΕΠ στο μαστό. Συγκεκριμένα, μόνο τρεις μελέτες έχουν διεξαχθεί για την έκφραση του ΑΕΠ-1, μία στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες (Rabot et al. 2007) και δύο στους επίμυες (Talhouk et al. 1992, Lund et al. 1996). Περαιτέρω, μόνο μία μελέτη στους επίμυες εξετάζει την έκφραση του ΑΕΠ-2 στο μαστό κατά τη διάρκεια της ξηράς περιόδου (Lund et al. 1996). Οι Rabot et al. (2007), οι οποίοι μελέτησαν την έκφραση του ΑΕΠ-1 στο μαστό κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στις γαλακτοπαραγωγές αγελάδες, αναφέρουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-1 κατά το τρίτο στάδιο της ξηράς περιόδου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές τόσο κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, από τον 8<sup>ο</sup> έως το 12<sup>ο</sup> μήνα μετά τον τοκετό, όσο και κατά τα δύο πρώτα στάδια της ξηράς περιόδου, δηλαδή 24-48 ώρες και 96-108 ώρες μετά τη διακοπή της άμελης. Επιπλέον, οι μεταβολές στην έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-1 κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου είναι παρόμοιες με εκείνες του ΕΠ-Ο. Συνεπώς, το τρίτο στάδιο της ξηράς περιόδου χαρακτηρίζεται από την ταυτόχρονη ενεργοποίηση του ΕΠ-Ο και του αναστολέα του. Τα δεδομένα των Rabot et al. (2007) προσομοιάζουν με τα δεδομένα της παρούσας μελέτης. Οι Talhouk et al. (1992), μελέτησαν την έκφραση του γονιδίου του ΑΕΠ-1 στο μαστό κατά το διάστημα μετά τη γαλουχία στους επίμυες και αναφέρουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-1 4 με 6 ημέρες μετά τη διακοπή θηλασμού. Αντίθετα, οι Lund et al. (1996), αναφέρουν ότι τα επίπεδα έκφρασης των ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2 στο μαστό των επιμύων παρέμειναν χαμηλά καθόλη τη διάρκεια της περιόδου μετά τη γαλουχία.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είναι η πρώτη εργασία στην οποία μελετήθηκε η έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων (ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2) του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η αυξημένη έκφραση των γονιδίων που αναστέλλουν την λειτουργία του συστήματος, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2, κατά την ξηρά περίοδο, σε συνδυασμό με την αύξηση της έκφρασης των δύο γονιδίων που ενεργοποιούν το σύστημα, ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο, κατά την ίδια χρονική περίοδο, δημιουργεί ορισμένα ερωτήματα, καθώς η αύξηση των αναστολέων ακυρώνει ουσιαστικά την αντίστοιχη αύξηση του ΕΠ-Ο και του υποδοχέα του. Το παράδοξο αυτό θα συζητηθεί αναλυτικότερα στο κεφάλαιο 3.

## **2.4. ΤΡΙΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑ: «ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ ΤΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΠΛΑΣΜΙΝΗΣ – ΠΛΑΣΜΙΝΟΓΟΝΟΥ ΣΤΟ ΠΡΟΒΕΙΟ ΓΑΛΛΑ».**

### **2.4.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **2.4.1.1. Ζωικό υλικό**

Για τους σκοπούς του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 38 προβατίνες: 12 προβατίνες της ορεινής φυλής Ηπείρου, 14 προβατίνες μίας συνθετικής φυλής (50% Ορεινή φυλή Ηπείρου, 25% φυλή Άρτας και 25% φυλή Χίου) και 12 προβατίνες της φυλής Χίου. Ο τοκετός στις προβατίνες αυτές έλαβε χώρα από τη 10<sup>η</sup> Νοεμβρίου του 2005 έως τη 10<sup>η</sup> Ιανουαρίου του 2006. Όλα τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα στεγάζονταν στις εγκαταστάσεις του Κτηνοτροφείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι προβατίνες της ορεινής φυλής Ηπείρου και της συνθετικής φυλής βρίσκονταν στην πρώτη γαλακτική περίοδο, ενώ οι προβατίνες της φυλής Χίου βρίσκονταν στη δεύτερη ή τρίτη γαλακτική περίοδο. Μετά τον απογαλακτισμό, 45 ημέρες μετά τον τοκετό, οι προβατίνες αμέλγονταν μηχανικά 2 φορές ημερησίως, την 5<sup>η</sup> πρωινή και την 5<sup>η</sup> απογευματινή ώρα, στις εγκαταστάσεις του Κτηνοτροφείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η καταγραφή του ύψους της ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής για κάθε ζώο γινόταν με συχνότητα δύο εβδομάδων. Την ίδια ημέρα γινόταν και η συλλογή δειγμάτων γάλακτος τόσο από την πρωινή όσο και από την απογευματινή άμελξη. Η συλλογή δειγμάτων γάλακτος πραγματοποιήθηκε καθόλη την περίοδο γαλακτοπαραγωγής. Τα δείγματα γάλακτος χωρίζονταν σε δύο αντιπροσωπευτικά δείγματα. Το πρώτο εξ αυτών χρησιμοποιούταν άμεσα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης λίπους, πρωτεΐνης, λακτόζης και σωματικών κυττάρων, ενώ το δεύτερο φυλασσόταν στους -20°C για το μετέπειτα προσδιορισμό της ενεργότητας της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου.

#### **2.4.1.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

##### **2.4.1.2.1. Προσδιορισμός περιεκτικότητας σε λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη και σωματικά κύτταρα**

Ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη στα δείγματα γάλακτος έγινε αυτόματα με τη χρήση του μηχανήματος Milkoscan 133 (Foss Electric, Hillerød, Denmark) βαθμονομημένο σύμφωνα με τις μεθόδους Mojonnier για το λίπος, Kjeldahl για την πρωτεΐνη και την πολωσιμετρική μέθοδο για τη λακτόζη

(AOAC 1980). Ο προσδιορισμός των σωματικών κυττάρων έγινε αυτοματοποιημένα με τη χρήση του μηχανήματος Fossomatic cell counter (Foss Electric).

#### **2.4.1.2.2. Προσδιορισμός ενεργότητας πλασμίνης και πλασμινογόνου**

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της πλασμίνης και του πλασμινογόνου στο γάλα χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι που περιγράφηκαν από τους Politis et al. (1989a, 1989b).

Αναλυτικότερα, 3 ml γάλακτος αναμίχθηκαν με 1 ml κιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 0,4 M και φυγοκεντρήθηκαν στα 27.000 x g για 20 λεπτά. Στη συνέχεια συλλέχθηκε το υπερκείμενο υγρό και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της πλασμίνης και του πλασμινογόνου. Ως ενεργότητα του πλασμινογόνου ορίζεται η ενεργότητα της πλασμίνης μετά την ενεργοποίηση του ανενεργού προενζύμου πλασμινογόνου με την προσθήκη εξωγενούς ΕΠ-Ο. Οι μετρήσεις έγιναν σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 0,1 M (pH 7,4), το οποίο περιείχε 0,6 mM βαλίνης-λευκίνης-λυσίνης-π-νιτροανιλίνης (Sigma Chemical Co., St Louis, MO) και 30 μl του υπερκειμένου υγρού μετά τη φυγοκέντρηση. Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του πλασμινογόνου στο μίγμα προστέθηκαν επιπλέον 30 μονάδες Plough (2,5 μL) ΕΠ-Ο (Sigma). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Το μίγμα αντίδρασης επώαστηκε στους 37°C και η απορρόφηση του φωτός στα 405 nm καταγραφόταν ανά μία ώρα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υδρόλυση της βαλίνης-λευκίνης-λυσίνης-π-νιτροανιλίνης από την πλασμίνη η οποία απελευθερώνει την π-νιτροανιλίνη. Το υπόστρωμα βαλίνης-λευκίνης-λυσίνης-π-νιτροανιλίνης στη μη διασπασθείσα του μορφή δεν απορροφά το φως στα 405 nm. Αντιθέτως, η ελεύθερη π-νιτροανιλίνη απορροφά το φως και η απορρόφηση μπορεί να μετρηθεί στα 405 nm. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χωρίς υπερκείμενο υγρό για την ανίχνευση αυτόματης διάσπασης του υποστρώματος. Σε όλες τις περιπτώσεις, η αυτόματη διάσπαση ήταν αμελητέα.

Οι ενεργότητες της πλασμίνης και του πλασμινογόνου υπολογίστηκαν από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο. Η μονάδα ενεργότητας της πλασμίνης και του πλασμινογόνου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου, η οποία προκαλεί την αλλαγή της απορρόφησης στα 405 nm κατά 0,1 μέσα σε 60 λεπτά.

#### **2.4.1.2.3. Προσδιορισμός ενεργότητας ενεργοποιητή του πλασμινογόνου**

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου χρησιμοποιήθηκε η χρωματομετρική μέθοδος των Gilmore et al. (1995).



Αναλυτικότερα, 5 ml γάλακτος φυγοκεντρήθηκαν στα 2.000 x g για 15 λεπτά στους 4°C, διαχωρίζοντας το σε λίπος, άπαχο γάλα και ίζημα σωματικών κυττάρων. Το άπαχο γάλα συλλέχθηκε και φυγοκεντρήθηκε εκ νέου στα 37.000 x g για 1 ώρα στους 4°C. Με τον τρόπο αυτό έγινε διαχωρισμός του δείγματος σε ορό του γάλακτος και ίζημα καζεΐνης. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 0,05 M (pH 8,0). Οι μετρήσεις έγιναν σε 250 μl ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 0,1 M (pH 7,4), το οποίο περιείχε 50 mg/ml πλασμινογόνου (Sigma), 0,6 mM βαλίνης-λευκίνης-λυσίνης-π-νιτροανιλίνης (Sigma) και 2 μl της επαναδιαλυμένης καζεΐνης. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Το μίγμα αντίδρασης επώαστηκε στους 37°C και η απορρόφηση του φωτός στα 405 nm καταγραφόταν ανά μία ώρα. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν δείγματα χωρίς πλασμινογόνο.

Η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στην ακόλουθη αρχή: ο ενεργοποιητής του πλασμινογόνου που βρίσκεται στο κλάσμα της καζεΐνης, μετατρέπει το εξωγενούς προέλευσης πλασμινογόνο που προστίθεται στο διάλυμα της τελικής αντίδρασης, στην ενεργή πλασμίνη η οποία υδρολύει το υπόστρωμα. Οι αλλαγές στην απορρόφηση του φωτός συνδέονται άμεσα με τη συγκέντρωση της πλασμίνης και ως εκ τούτου εμμέσως με την ενεργότητα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Η ενεργότητα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου υπολογίστηκε από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης της απορρόφησης σε σχέση με το χρόνο. Η μονάδα ενεργότητας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου, η οποία προκαλεί την αλλαγή της απορρόφησης στα 405 nm κατά 0,1 μέσα σε 60 λεπτά.

### 2.4.1.3. Στατιστική ανάλυση

Σημαντικές αποκλίσεις από την κανονική κατανομή για όλες τις μεταβλητές και ακραίες τιμές καθορίστηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας διαγράμματα Q-Q (quartile-quartile). Στα διαγράμματα παρατηρήθηκε καμπύλωση στα άκρα, υποδηλώνοντας ακραίες τιμές για τις 3 μεταβλητές (ενεργότητες πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου). Ο υπολογισμός των ESD (extreme studentized deviates) για τις παραπάνω μεταβλητές έγινε σύμφωνα με τον Grubbs (1969) και οι ακραίες τιμές αποκλείστηκαν με πιθανότητα 0,05 σε δοκιμασία δύο άκρων. Συγκεκριμένα, οι τιμές οι οποίες αποκλείστηκαν ήταν για την ενεργότητα της πλασμίνης (530, ESD = 13.27, P < 0.0001; 203, ESD = 4.67, P = 0.0017), του πλασμινογόνου (300, ESD = 5.48, P < 0.0001), και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (938, ESD = 8.19, P < 0.0001; 538, ESD = 3.97, P = 0.0336). Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν οι τετραγωνικές ρίζες των τιμών για την ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου, και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, καθώς και οι λογάριθμοι των τιμών της συγκέντρωσης των σωματικών κυττάρων, έτσι ώστε να ικανοποιούνται οι υποθέσεις της ANOVA (κανονική κατανομή και ομοιογένεια διακύμανσης within class effects). Οι μετασχηματισμένες τιμές των μεταβλητών



υποβλήθηκαν σε ανάλυση χρησιμοποιώντας ένα μικτό γραμμικό μοντέλο κατάλληλο για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις ανά ζώο με βαθμό αυτοσυσχέτισης 1<sup>ου</sup> βαθμού για τα υπόλοιπα. Οι σταθερές επιδράσεις που περιελήφθησαν στο μοντέλο ήταν οι επιδράσεις της φυλής (3 επίπεδα: Χίος, ορεινή Ηπείρου, και συνθετική), του σταδίου γαλακτοπαραγωγής (3 επίπεδα: 1 με 2 μήνες, 3 με 4 μήνες και 5 με 6 μήνες μετά τον απογαλακτισμό) και της συγκέντρωσης των σωματικών κυττάρων (2 επίπεδα: πάνω και κάτω από 300.000 κύτταρα/ml). Όλες οι επιδράσεις συμπεριλήφθησαν στην ανάλυση. Ωστόσο, βρέθηκαν να είναι μη σημαντικά και για το λόγο αυτό αποκλείστηκαν από την ανάλυση. Ως τυχαία επίδραση υπολογίστηκε η επίδραση του ζώου μέσα στη φυλή. Η κατανομή των παρατηρήσεων με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων ήταν ως εξής: 14 δείγματα στο 1<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (1-2 μήνες μετά τον απογαλακτισμό), 15 δείγματα στο 2<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (3-4 μήνες μετά τον απογαλακτισμό) και 24 δείγματα στο 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (5-6 μήνες μετά τον απογαλακτισμό). Η γαλακτική περίοδος βρέθηκε να συμπίπτει με την εποχή και ως εκ τούτου, δε μπορούσε να εκτιμηθεί η κάθε επίδραση χωριστά. Η μέθοδος κατά Satterthwaite χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των βαθμών ελευθερίας για τον έλεγχο των σταθερών επιδράσεων. Λόγω του ότι πραγματοποιήθηκαν πολλαπλές συγκρίσεις, για την εκτίμηση των τιμών P χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος κατά Tukey-Kramer. Τα αποτελέσματα της μικτής ANOVA παρουσιάζονται ως μέσοι όροι ελαχίστων τετραγώνων με τυπικά σφάλματα. Για την παράμετρο του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης, η οποία παρουσίαζε εμφανή απόκλιση από την κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ο μη παραμετρικός έλεγχος κατά Kruskal-Wallis. Με τον έλεγχο αυτό διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές στην επίδραση της κατηγορίας (φυλή, στάδιο γαλακτοπαραγωγής, ή επίπεδο υγείας του μαστού) όταν ο αριθμός των κατηγοριών ήταν μεγαλύτερος από δύο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος κατά Wilcoxon-Mann-Whitney για την ανίχνευση στατιστικώς σημαντικών διαφορών των διαμέσων κατά ζεύγη. Τα αποτελέσματα των μη παραμετρικών ελέγχων παρουσιάζονται ως διάμεσοι με ενδοτεταρτημοριακά εύρη (Q3-Q1). Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το υπολογιστικό πακέτο SAS (SAS Institute 2004).

## 2.4.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 2.4.2.1. Επίδραση της φυλής στη γαλακτοπαραγωγή και τη σύσταση του γάλακτος

Η επίδραση της φυλής στη συγκέντρωση των κύριων συστατικών του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνη και λακτόζη) παρουσιάζονται στον πίνακα 6. Η συγκέντρωση όλων των συστατικών του γάλακτος (λίπος, πρωτεΐνη, λακτόζη) ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερες στο γάλα των προβατινών της φυλής Χίου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στο γάλα των προβατινών της ορεινής φυλής Ηπείρου. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερες τιμές περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη και λακτόζη στο γάλα των προβατινών της φυλής Χίου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στο γάλα των προβατινών της συνθετικής φυλής.

**Πίνακας 6:** Συγκεντρώσεις των κύριων συστατικών του γάλακτος (%) ( $\pm$ SEM) στις 3 ελληνικές φυλές προβάτου

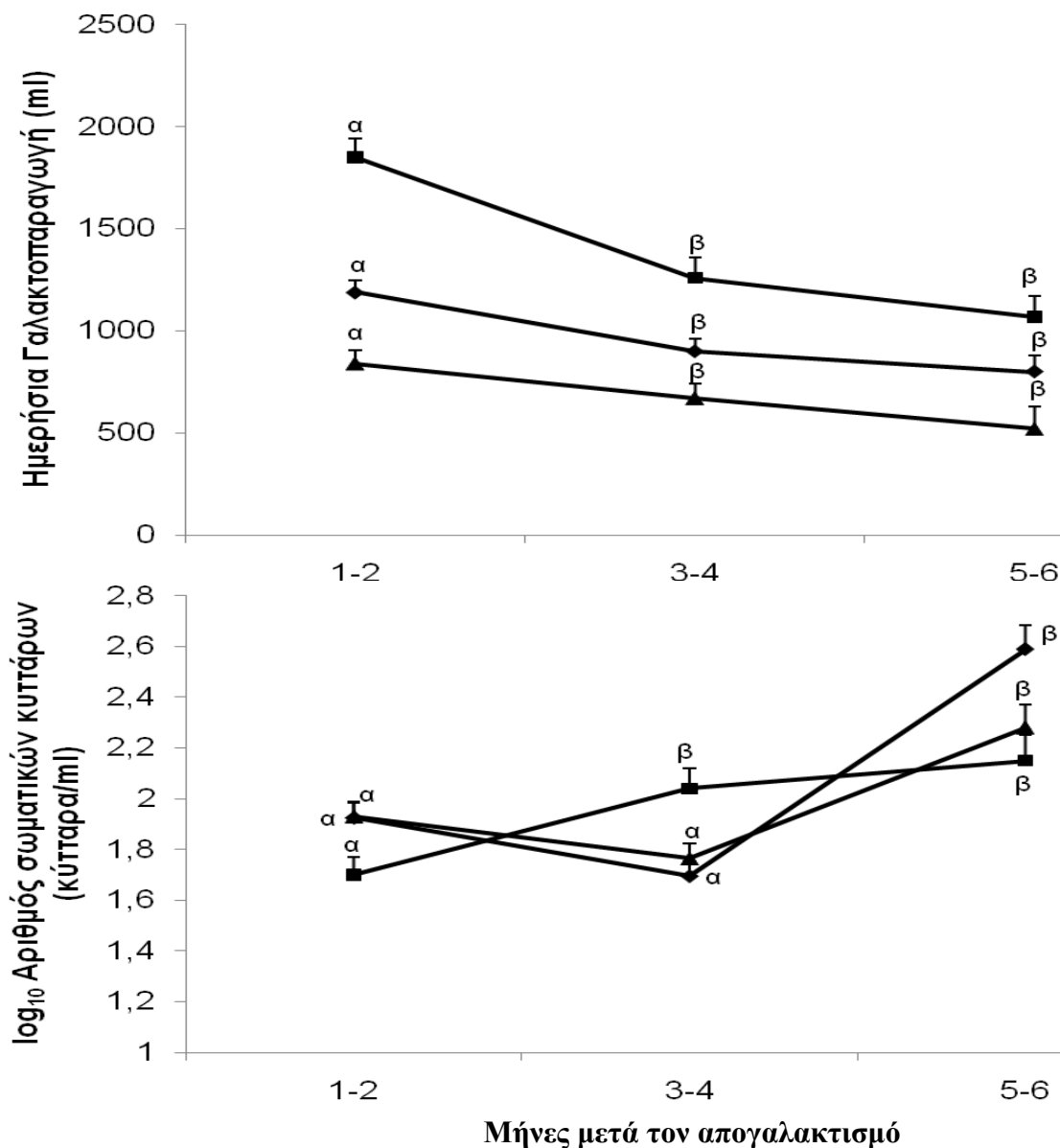
	Φυλή		
	Ορεινή Ηπείρου	Συνθετική	Χίου
Παρατηρήσεις (v)	112	146	124
Λίπος, %	7,07 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup>	6,39 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>	6,14 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup>
Πρωτεΐνη, %	5,85 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	5,74 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	5,49 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Λακτόζη, %	4,77 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	4,72 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	4,61 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,05$

Το ύψος της ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής και ο αριθμός των σωματικών κυττάρων στις τρεις φυλές προβάτου κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής παρουσιάζονται στο διάγραμμα 12.

Η υψηλότερη ημερήσια γαλακτοπαραγωγή παρατηρήθηκε στο πρώτο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, δηλαδή 1-2 μήνες μετά τον απογαλακτισμό, και στις τρεις φυλές, ενώ στη συνέχεια η γαλακτοπαραγωγή ακολούθησε, όπως αναμενόταν, πτωτική πορεία (Διάγραμμα 12A). Το ύψος της γαλακτοπαραγωγής ήταν μεγαλύτερο στα πρόβατα της φυλής Χίου, ακολούθησαν τα ζώα της συνθετικής φυλής, ενώ τα ζώα της ορεινής φυλής Ηπείρου, είχαν τη χαμηλότερη ημερήσια γαλακτοπαραγωγή. Ο αριθμός των σωματικών κυττάρων ήταν υψηλότερος στο γάλα του τρίτου σταδίου της γαλακτοπαραγωγής, δηλαδή 5-6 μήνες μετά τον απογαλακτισμό, και για τις τρεις φυλές (Διάγραμμα 12B), σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές στα δύο πρώτα στάδια. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των σωματικών κυττάρων μεταξύ

των τριών φυλών συνολικά κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής. Ωστόσο, το γάλα των προβάτων της φυλής Χίου παρουσίασε μία τάση για χαμηλότερο αριθμό σωματικών κυττάρων κατά το πρώτο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής και υψηλότερο αριθμό σωματικών κυττάρων στο δεύτερο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, δηλαδή 3-4 μήνες μετά τον απογαλακτισμό, σε σύγκριση με τις άλλες δύο φυλές.



**Διάγραμμα 12:** Ημερήσιο ύψος γαλακτοπαραγωγής (ml) (Α) και  $\log_{10}$  του αριθμού των σωματικών κυττάρων (κύτταρα/ml) (Β) κατά τη διάρκεια της γαλακτοπαραγωγής στο γάλα προβατινών της ορεινής φυλής Ηπειρού (▲), της συνθετικής φυλής (◆) και της φυλής Χίου (■).

<sup>αβ</sup> Διαφορετικοί εκθέτες δηλώνουν στατιστικές σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,05$

### 2.4.2.2. Επίδραση της φυλής στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου

Η επίδραση της φυλής στην ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, όπως επίσης και στο λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου παρουσιάζεται στον πίνακα 7.

**Πίνακας 7:** Ενεργότητες (U/ml) ( $\pm$ SEM) πλασμίνης (ΠΛ), πλασμινογόνου (ΠΓ), ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (ΕΠ), άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου (ΠΛ+ΠΓ), καθώς και οι διάμεσοι και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης (ΠΓ/ΠΛ) στο γάλα τριών ελληνικών φυλών προβάτου

	Φυλή		
	Ορεινή Ηπείρου	Συνθετική	Χίου
Παρατηρήσεις (ν)	112	144	123
ΠΛ, U/ml	6,70 $\pm$ 0,29	7,00 $\pm$ 0,26	7,30 $\pm$ 0,26
ΠΓ, U/ml	6,02 $\pm$ 0,33 <sup>α</sup>	7,09 $\pm$ 0,29 <sup>β</sup>	7,52 $\pm$ 0,30 <sup>β</sup>
ΕΠ, U/ml	10,57 $\pm$ 0,42	11,54 $\pm$ 0,38	11,62 $\pm$ 0,39
ΠΛ+ΠΓ, U/ml	9,17 $\pm$ 0,39 <sup>α</sup>	10,16 $\pm$ 0,35 <sup>αβ</sup>	10,67 $\pm$ 0,36 <sup>β</sup>
ΠΓ/ΠΛ			
Διάμεσος	0,98 <sup>α</sup>	1,38 <sup>β</sup>	1,75 <sup>β</sup>
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	0,43	1,18	1,32

<sup>α,β</sup> Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,05$

Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις ενεργότητες της πλασμίνης και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου μεταξύ των τριών φυλών. Αντιθέτως, παρατηρήθηκαν χαμηλότερες τιμές για την ενεργότητα του πλασμινογόνου και το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνη στο γάλα της ορεινής φυλής Ηπείρου σε σύγκριση με τις άλλες δύο φυλές. Συνεπώς, φαίνεται ότι ο ρυθμός μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη είναι υψηλότερος στο γάλα της ορεινής φυλής Ηπείρου σε σύγκριση με την αντίστοιχη τιμή του γαλακτος της φυλής Χίου. Επιπλέον, το άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου ήταν χαμηλότερο στο γάλα της ορεινής φυλής Ηπείρου σε σύγκριση με τη φυλή Χίου.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης για το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης βρίσκονται σε μερική συμφωνία με αυτά που αναφέρουν οι Bianchi et al. (2004) για το γάλα προβατίνων της φυλής Σαρδηνίας, όπου ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης κυμαίνεται μεταξύ 1,08 and 2,40. Οι Albenzio et al. (2004) αναφέρουν, για το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, τιμές χαμηλότερες της μονάδας για την πλειοψηφία των παρατηρήσεων, εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα από το μέσο της γαλακτοπαραγωγής

(110-130 ημέρες γαλακτοπαραγωγής). Αντιθέτως, μεγαλύτερες τιμές του λόγου (3.45) καταγράφηκαν στη μελέτη των Leitner et al. (2004) στο γάλα από υγιή ζώα της φυλής Assaf. Συμπερασματικά, στο πρόβειο γάλα η πλασμίνη απαντάται σε παραπλήσιες ή ελαφρά μειωμένες συγκεντρώσεις σε σχέση με αυτές του ανενεργού της προενζύμου. Αντίθετα, στο βόειο γάλα το ένζυμο βρίσκεται κατά κύριο λόγο στην ανενεργή του μορφή (πλασμινογόνο). Οι Politis et al. (1990) αναφέρουν ότι ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης στο γάλα κυμαινόταν μεταξύ 6,3 στην αρχή (1<sup>ος</sup> μήνας) και 3,6 στο τέλος της γαλακτικής περιόδου (>9 μήνες). Οι Baldi et al. (1996), μελέτησαν το σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου στο γάλα από 4 πληθυσμούς γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και ανέφεραν ότι ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης κυμαινόταν μεταξύ 2,4 και 6. Τέλος, σε δύο ερευνητικές εργασίες από τη Νέα Ζηλανδία (Stelwagen et al. 1994, Lacy-Hulbert et al. 1999) παρατηρηθήκαν πολύ υψηλές τιμές για το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης (31,29-81,2) στο βόειο γάλα, γεγονός που υποδηλώνει εξαιρετικά χαμηλές τιμές ενεργότητας πλασμίνης στο γάλα των αγελάδων της Νέας Ζηλανδίας. Είναι φανερό ότι στο αγελαδινό γάλα το ένζυμο απαντάται κυρίως στη μορφή του ανενεργού προενζύμου (πλασμινογόνο). Αντίθετα, στο πρόβειο γάλα το προένζυμο και ενεργό ένζυμο (πλασμίνη) απαντώνται σε παρόμοιες συγκεντρώσεις. Τα δεδομένα της παρούσας έρευνας, αναφορικά με το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των μελετών που αναφέρθηκαν παραπάνω, υποδεικνύουν ότι το πλασμινογόνο μετατρέπεται σε πλασμίνη αποτελεσματικότερα στο πρόβειο σε σύγκριση με το βόειο γάλα. Επομένως, διαπιστώνεται σημαντική διαφορά στο σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου μεταξύ αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος.

Το άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου είναι μία ενδιαφέρουσα παράμετρος που επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ενδεχόμενο πιθανής εισροής πλασμίνης και πλασμινογόνου από το αίμα στο γάλα, καθώς το γονίδιο του πλασμινογόνου δεν εκφράζεται στο μαστό (Politis 1996). Το άθροισμα πλασμίνης και πλασμινογόνου είναι χαμηλότερο στο γάλα της ορεινής φυλής Ηπείρου, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή γαλακτοπαραγωγή, σε σύγκριση με τις τιμές που απαντώνται στο γάλα της υψιπαραγωγής φυλής Χίου. Η διαφορά στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου μεταξύ φυλών με διαφορετικό ύψος γαλακτοπαραγωγής ωστόσο, δε μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική γαλακτοπαραγωγική ικανότητα των δύο φυλών, καθώς η προσθήκη του ημερήσιου ύψους γαλακτοπαραγωγής στο στατιστικό μοντέλο ως συμμεταβλητή δεν επηρέασε τα αποτελέσματα. Επιπρόσθετα, η διαφορά δε μπορεί να αποδοθεί στο φαινόμενο της αραίωσης, καθώς η φυλή Χίου με την μεγαλύτερη γαλακτοπαραγωγή ήταν αυτή που παρουσίασε τις υψηλότερες τιμές για το άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου. Ως εκ τούτου, πιθανώς υπάρχει μεγαλύτερη εισροή πρωτεϊνών του αίματος στο γάλα της φυλής Χίου, σε σύγκριση με το γάλα της ορεινής φυλής Ηπείρου.

### 2.4.2.3. Επίδραση του σταδίου της γαλακτοπαραγωγής στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου

Η επίδραση του σταδίου της γαλακτοπαραγωγής στην ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, όπως επίσης και στο λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου παρουσιάζεται στον πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Ενεργότητες (U/ml) ( $\pm$ SEM) πλασμίνης (ΠΛ), πλασμινογόνου (ΠΓ), ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (ΕΠ), άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου (ΠΛ+ΠΓ), καθώς και οι διάμεσοι και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης (ΠΓ/ΠΛ) στο γάλα σε τρεις περιόδους της γαλακτοπαραγωγής

	Μήνες μετά τον απογαλακτισμό		
	1-2	3-4	5-6
Παρατηρήσεις (v)	159	187	83
ΠΛ, U/ml	7,16 $\pm$ 0,26	7,30 $\pm$ 0,28	6,53 $\pm$ 0,29
ΠΓ, U/ml	7,25 $\pm$ 0,30 <sup>α</sup>	7,31 $\pm$ 0,31 <sup>α</sup>	6,07 $\pm$ 0,33 <sup>β</sup>
ΕΠ, U/ml	12,79 $\pm$ 0,39 <sup>α</sup>	12,36 $\pm$ 0,41 <sup>α</sup>	8,58 $\pm$ 0,43 <sup>β</sup>
ΠΛ+ΠΓ, U/ml	10,53 $\pm$ 0,36 <sup>α</sup>	10,50 $\pm$ 0,38 <sup>α</sup>	8,97 $\pm$ 0,39 <sup>β</sup>
ΠΓ/ΠΛ			
Διάμεσος	1,43 <sup>α</sup>	1,67 <sup>α</sup>	0,91 <sup>β</sup>
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	1,40	1,24	0,37

<sup>α,β</sup> Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,05$

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου και του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου και στο λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, μεταξύ του 1<sup>ου</sup> (1-2 μήνες) και του 2<sup>ου</sup> σταδίου της γαλακτοπαραγωγής (3-4 μήνες). Αντιθέτως, το γάλα από το 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (5-6 μήνες) παρουσίασε χαμηλότερες τιμές ενεργότητας πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές των άλλων περιόδων. Επιπλέον, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης ήταν χαμηλότερος στο 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής σε σύγκριση με τις άλλες δύο περιόδους. Η μείωση αυτή υποδηλώνει αυξημένο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτικής περιόδου. Τέλος, το άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου ήταν



χαμηλότερο στο τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής. Συνεπώς, η ενεργότητα της πλασμίνης στο γάλα στο τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής (5-6 μήνες) δεν είναι αυξημένη σε σύγκριση με τα προηγούμενα στάδια (1-4 μήνες), παρά τον αυξημένο ρυθμό μετατροπής πλασμινογόνου σε πλασμίνη, διότι το τελευταίο αυτό στάδιο χαρακτηρίζεται από το χαμηλότερο άθροισμα ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου. Επομένως, οι δύο σημαντικότερες παρατηρήσεις σχετικά με τη συμπεριφορά του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής είναι οι ακόλουθες. Πρώτον, η μειωμένη εισροή των δύο πρωτεϊνών (πλασμίνη και πλασμινογόνο) στο γάλα σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια. Δεύτερον, η αύξηση του ρυθμού μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη είχε ως αποτέλεσμα να μην παρατηρείται μείωση στην ενεργότητα της πλασμίνης κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, καθώς η μείωση εισροής του πλασμινογόνου εξισορροπείται από τον αυξημένο ρυθμό μετατροπής του σε πλασμίνη.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης βρίσκονται σε συμφωνία με αυτά των Albenzio et al. (2004), οι οποίοι παρατήρησαν στο γάλα προβατίνων της φυλής Comisana τις υψηλότερες τιμές της ενεργότητας της πλασμίνης στην αρχή (<70 ημέρες γαλακτοπαραγωγής) και τις χαμηλότερες τιμές στο τέλος της γαλακτοπαραγωγής (>160 ημέρες). Αντίθετα, οι Bianchi et al. (2004) αναφέρουν αυξημένες τιμές ενεργότητας για την πλασμίνη και τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου στο τέλος της γαλακτοπαραγωγής στο γάλα από προβατίνες της φυλής Σαρδηνίας. Είναι φανερό ότι η συμπεριφορά του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου επηρεάζεται καθοριστικά από τη φυλή. Συγκεκριμένα, η συμπεριφορά του συστήματος στο γάλα των τριών ελληνικών φυλών (χαμηλότερες ή ίδιες τιμές πλασμίνης στο τελευταίο στάδιο γαλακτοπαραγωγής) προσομοιάζει με αυτή στο γάλα της φυλής Comisana. Αντίθετα, η συμπεριφορά του συστήματος στο γάλα της φυλής Σαρδηνίας προσομοιάζει με αυτή στο γάλα των γαλακτοπαραγωγών αγελάδων.

Οι μεταβολές του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης στο γάλα των τριών ελληνικών φυλών προβάτου εμφανίζουν μία παράδοξη συμπεριφορά. Χαμηλός λόγος σημαίνει υψηλότερο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Άρα, όταν ο λόγος είναι χαμηλός, θα έπρεπε οι τιμές του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου να είναι υψηλότερες. Κάτι τέτοιο όμως δε διαπιστώθηκε στο γάλα κατά το 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, όπου παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές τόσο για το λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης όσο και για την ενεργότητα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, σε σύγκριση με τα δύο προηγούμενα στάδια. Η πιθανότερη εξήγηση για την παράδοξη αυτή παρατήρηση είναι η εισροή αναστολέων της πλασμίνης να αυξάνεται στο τέλος της γαλακτοπαραγωγής, με συνέπεια την υποτίμηση των τιμών ενεργότητας πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι οι αναλύσεις και για τα τρία μόρια μοιράζονται την ίδια τελική αντίδραση. Στην ανάλυση για το πλασμινογόνο, το ζυμογόνο μετατρέπεται στην ενεργή πλασμίνη με την προσθήκη ΕΠ-Ο, ενώ στην ανάλυση για τον ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, ο ενεργοποιητής μετατρέπεται εξωγενές πλασμινογόνο πάλι σε πλασμίνη. Επομένως, και στις τρεις αναλύσεις η πλασμίνη υδρολύει το υπόστρωμα βαλίνης-

λευκίνης-λυσίνης-π-νιτροανιλίνης. Είναι λοιπόν προφανές ότι η παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων αναστολέων της πλασμίνης θα επηρέαζε τις τιμές των τριών προαναφερθέντων παραμέτρων. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν και οι Albenzio et al. (2004), οι οποίοι αναφέρουν ότι η πιθανότερη εξήγηση για τις χαμηλές τιμές πλασμίνης και πλασμινογόνου που παρατήρησαν περί το τέλος της γαλακτικής περιόδου, είναι η αυξημένη εισροή αναστολέων της πλασμίνης. Η υπόθεση αυτή δε μπορεί ωστόσο να επιβεβαιωθεί καθώς δεν είναι εύκολος ο προσδιορισμός των ενεργοτήτων των αναστολέων της πλασμίνης με τις υπάρχουσες μεθοδολογίες.

#### 2.4.2.4. Σχέσεις μεταξύ του αριθμού των σωματικών κυττάρων και του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου

Η επίδραση του επιπέδου υγείας του μαστού, όπως αυτό εκφράζεται από τη συγκέντρωση των σωματικών κυττάρων στο γάλα, στην ενεργότητα της πλασμίνης, του πλασμινογόνου, του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, όπως επίσης και στο λόγο πλασμινογόνου/πλασμίνης, καθώς και στο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου παρουσιάζεται στον πίνακα 9.

**Πίνακας 9:** Ενεργότητες (U/ml) ( $\pm$ SEM) πλασμίνης, πλασμινογόνου (ΠΓ), ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (ΕΠ), άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου (ΠΛ+ΠΓ), καθώς και οι διάμεσοι και τα ενδοτεταρτημοριακά εύρη του λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης (ΠΓ/ΠΛ) στο γάλα σε σχέση με το επίπεδο υγείας του μαστού

	Αριθμός σωματικών κυττάρων / ml	
	<300.000	>300.000
Παρατηρήσεις (v)	326	53
ΠΛ, U/ml	5,43 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	8,56 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>
ΠΓ, U/ml	6,32 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	7,43 $\pm$ 0,41 <sup>b</sup>
ΕΠ, U/ml	9,08 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	13,40 $\pm$ 0,53 <sup>b</sup>
ΠΛ+ΠΓ, U/ml	8,40 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	11,60 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup>
ΠΓ/ΠΛ		
Διάμεσος	1,4 <sup>a</sup>	0,83 <sup>b</sup>
Ενδοτεταρτημοριακό εύρος	1,14	0,15

<sup>a,b</sup> Διαφορετικοί εκθέτες στην ίδια σειρά δηλώνουν στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε επίπεδο  $p < 0,05$

Τα δεδομένα ομαδοποιήθηκαν σε δύο ομάδες: σε μία ομάδα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (>300.000 κύτταρα/ml) και σε μία ομάδα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (<300.000 κύτταρα/ml). Το γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερες τιμές ενεργότητας πλασμίνης, πλασμινογόνου και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του γάλακτος με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων (<300.000 κύτταρα/ml). Επιπλέον, ο λόγος πλασμινογόνου/πλασμίνης ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερος στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές στο γάλα με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, η κατά 60% αύξηση της ενεργότητας της πλασμίνης στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές του γάλακτος με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων μπορεί να οφείλεται στους δύο παρακάτω μηχανισμούς. Πρώτον, την αυξημένη εισροή πρωτεϊνών του αίματος (πλασμίνη και πλασμινογόνο) στο γάλα των προβατίνων από τις οποίες προέρχονται τα δείγματα με αυξημένο αριθμό σωματικών κυττάρων, που τεκμαίρεται από το υψηλότερο άθροισμα των ενεργοτήτων πλασμίνης και πλασμινογόνου, και δεύτερον, τον αυξημένο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη στο γάλα με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων, λόγω του χαμηλότερου λόγου πλασμινογόνου/πλασμίνης που παρατηρείται στην ομάδα αυτή.

Τα δεδομένα της παρούσας μελέτης είναι παρόμοια με αυτά των Leitner et al. (2004), οι οποίοι μελέτησαν τις διαφορές στο σύστημα πλασμίνης - πλασμινογόνου στο γάλα που αποκτήθηκε από υγιείς και μη (μαστίτιδα) μαστούς της φυλής προβάτου Assaf. Στην παραπάνω μελέτη παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές ενεργότητας πλασμίνης και ενεργοποιητή του πλασμινογόνου και χαμηλότερες τιμές ενεργότητας πλασμινογόνου στο γάλα από μη υγιείς μαστούς, γεγονός που υποδηλώνει υψηλότερο ρυθμό μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη στους μη υγιείς μαστούς. Οι Bianchi et al. (2004) ανέφεραν υψηλότερη ενεργότητα πλασμίνης, αλλά χαμηλότερη ενεργότητα ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, στο γάλα από μη υγιείς σε σύγκριση με το γάλα από υγιείς μαστούς, στη φυλή προβάτου Σαρδηνίας. Τέλος, οι Albenzio et al. (2004) αναφέρουν υψηλότερες τιμές ενεργότητας της πλασμίνης στα δείγματα της ομάδας με υψηλό αριθμό σωματικών κυττάρων σε σύγκριση με τις τιμές που παρατηρήθηκαν στα δείγματα της ομάδας με χαμηλό αριθμό σωματικών κυττάρων. Ωστόσο το όριο διαχωρισμού μεταξύ των δύο ομάδων ήταν 1 εκατομμύριο κύτταρα/ml. Οι διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα μεταξύ των διαφορετικών μελετών δε μπορούν να εξηγηθούν με τα μέχρι στιγμής δεδομένα. Παράγοντες που είναι πιθανόν να συμβάλουν στη δημιουργία του φαινομένου αυτού, είναι οι διαφορές μεταξύ των φυλών που χρησιμοποιήθηκαν στις μελέτες, καθώς και οι διαφορές στη μεθοδολογία που εφαρμόστηκε.

Από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της αυξημένης ενεργότητας της πλασμίνης και του ύψους γαλακτοπαραγωγής των τριών ελληνικών γαλακτοπαραγωγών φυλών προβάτου. Το συμπέρασμα αυτό στηρίζεται σε δύο παρατηρήσεις. Πρώτον, η φυλή Χίου παρήγαγε

108 % περισσότερο γάλα από την ορεινή φυλή Ηπείρου και 49 % περισσότερο από τη συνθετική φυλή. Ωστόσο δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στην ενεργότητα της πλασμίνης μεταξύ των τριών φυλών. Δεύτερον, οι χαμηλότερες τιμές για την ενεργότητα της πλασμίνης παρατηρήθηκαν στο 3<sup>ο</sup> στάδιο της γαλακτοπαραγωγής, κατά το οποίο σημειώνονται και οι χαμηλότερες τιμές στο ύψος ημερήσιας γαλακτοπαραγωγής και για τις τρεις φυλές. Συνεπώς, η πλασμίνη δε φαίνεται να συνδέεται με το φαινόμενο της σταδιακής παλινδρόμησης για τις τρεις ελληνικές φυλές προβάτου που μελετήθηκαν. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα των Politis et al. (1989a, 1989b, 1990), οι οποίοι ανέφεραν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της πλασμίνης και του ύψους της γαλακτοπαραγωγής κατά το πρωτικό στάδιο της γαλακτοπαραγωγής στις αγελάδες. Επομένως σημαντικές διαφορές παρατηρούνται στη φυσιολογία του συστήματος πλασμίνης - πλασμινογόνου στο γάλα μεταξύ γαλακτοπαραγωγών αγελάδων και προβάτων.

### 3. ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ & ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ενεργοποίηση του πλασμινογόνου σε πλασμίνη παίζει καθοριστικό ρόλο σε μία σειρά φυσιολογικών φαινομένων, όπως η παλινδρόμηση του μαστού, η ωοθυλακιόρρηξια, η μετανάστευση των κυττάρων του ανοσολογικού συστήματος, η πήξη του αίματος και η ινωδόλυση. Ο κοινός παρονομαστής όλων των φαινομένων είναι η παρουσία σημαντικών επιπέδων εξωκυττάριας πρωτεόλυσης. Το ανενεργό προένζυμο πλασμινογόνο που απαντάται σχεδόν σε όλους τους ιστούς και τα όργανα των θηλαστικών μετατρέπεται σε πλασμίνη χάρις στη δράση ενός τρίτου ενζύμου, του ΕΠ-Ο. η δράση του ΕΠ-Ο μπορεί να παρεμποδιστεί (ανασταλεί) μέσω της δράσης μίας άλλης ομάδας ενζύμων, των ΑΕΠ (ΑΕΠ-1 και 2). Τέλος, το σύστημα περιλαμβάνει τον ΥΕΠ-Ο, ο οποίος δεσμεύει τον ΕΠ-Ο για τον εντοπισμό της πρωτεολυτικής δράσης στις κυτταρικές επιφάνειες.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι υπάρχουν ελάχιστες εργασίες για το σύστημα πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβατο, ενώ δεν υπάρχει καμία εργασία για την έκφραση των γονιδίων του συστήματος. Για να καταστεί δυνατή η μελέτη του συστήματος σε γονιδιακό επίπεδο, ως πρώτο βήμα επιλέχθηκε η κλωνοποίηση των cDNAs των γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία ενεργοποίησης του πλασμινογόνου (ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1 και ΑΕΠ-2). Σε αυτό οδήγησε η σκέψη ότι η μελέτη και των τεσσάρων γονιδίων και όχι καθενός αποσπασματικά μπορεί να μας οδηγήσει σε τεκμηριωμένα συμπεράσματα για τη φυσιολογική σημασία του συστήματος. Όπως περιγράφηκε αναλυτικά στα κεφάλαια 2.2 και 2.3 απομονώθηκαν οι πλήρεις αλληλουχίες των cDNAs των τεσσάρων γονιδίων. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των τεσσάρων γονιδίων είχαν τη μεγαλύτερη φυλογενετική συγγένεια με τις αντίστοιχες αλληλουχίες των βοοειδών. Από την *in silico* επεξεργασία των συναγόμενων πρωτεϊνικών αλληλουχιών παρατηρήθηκαν σημαντικές ομοιότητες με τις αντίστοιχες αλληλουχίες άλλων οργανισμών όσον αφορά το ενεργό κέντρο των ενζύμων και τις διάφορες δομές που παρουσιάζουν οι εν λόγω πρωτεΐνες (Kringle, EGF, LU). Τέλος, εντοπίστηκε μόνο ένα μετάγραφο για κάθε γονίδιο. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι οι αλληλουχίες των αναστολέων παρουσίασαν μεγαλύτερη ομολογία (94 – 95 %) με τις αντίστοιχες των βοοειδών σε σύγκριση με την ομολογία που παρατηρήθηκε για τις αλληλουχίες των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο (88 – 89 %). Συνεπώς, οι αναστολείς παρουσιάζουν μεγαλύτερο βαθμό συντήρησης.

Στη συνέχεια, με βάση τις αλληλουχίες των cDNAs των τεσσάρων γονιδίων, κατασκευάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές και ανιχνευτές για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων σε διάφορους ιστούς και όργανα με τη μέθοδο της Real Time PCR.

Τα κυριότερα συμπεράσματα των πειραμάτων έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων, καθώς και της μελέτης της συμπεριφοράς του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα παρατίθενται παρακάτω.

Το πρώτο συμπέρασμα από τα πειράματα έκφρασης είναι ότι τα δύο γονίδια που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο) εκφράζονται

σε όλους τους ιστούς. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του ΕΠ-Ο κατά την ξηρά περίοδο στο λιπώδη ιστό, στο μαστό και στο νεφρό. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα επινεφρίδια, στην καρδιά, στις ωοθήκες, στο σπλήνα, στο ήπαρ και στην παρεγκεφαλίδα. Αντιθέτως, κατά τη γαλακτοπαραγωγή παρατηρήθηκαν εμφανώς χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΕΠ-Ο στο λιπώδη ιστό και στο μαστό στο ήπαρ, ενώ παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στην καρδιά, στα επινεφρίδια και την παρεγκεφαλίδα σε σύγκριση με την ξηρά περίοδο. Παρόμοια εικόνα με την έκφραση του ΕΠ-Ο κατά την ξηρά περίοδο παρουσίασε και η έκφραση του ΥΕΠ-Ο, παρουσιάζοντας, ωστόσο, εμφανώς χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης στην καρδιά, στο ήπαρ και στην παρεγκεφαλίδα. Κατά τη γαλακτοπαραγωγή, τα επίπεδα έκφρασης του ΥΕΠ-Ο στο λιπώδη ιστό και στο μαστό ήταν χαμηλότερα σε σύγκριση με τις αντίστοιχες τιμές κατά τη γαλακτοπαραγωγή.

Το δεύτερο συμπέρασμα από τα πειράματα έκφρασης είναι ότι για τα γονίδια που εμπλέκονται στην αναστολή του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου εντοπίστηκαν ιστοί ή όργανα στους οποίους δεν ανιχνεύθηκε έκφραση τους. Συγκεκριμένα, δεν εντοπίστηκε έκφραση του ΑΕΠ-1 στην παρεγκεφαλίδα και του ΑΕΠ-2 στην παρεγκεφαλίδα, στο ήπαρ και στο νεφρό. Αναλυτικότερα, για την έκφραση των δύο γονιδίων στους διάφορους ιστούς και όργανα, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-1 κατά την ξηρά περίοδο στο λιπώδη ιστό και στο μαστό. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στα επινεφρίδια, στο ήπαρ, στο σπλήνα, στις ωοθήκες, στην καρδιά και το νεφρό. Αντιθέτως, κατά τη γαλακτοπαραγωγή παρατηρήθηκαν εμφανώς χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του ΑΕΠ-1 στο λιπώδη ιστό, στο μαστό και στο ήπαρ σε σύγκριση με την ξηρά περίοδο. Όσον αφορά την έκφραση του ΑΕΠ-2, υψηλά επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν κατά την ξηρά περίοδο στο λιπώδη ιστό και στο μαστό. Χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης παρατηρήθηκαν στην καρδιά, στα επινεφρίδια, στο σπλήνα και στις ωοθήκες. Σημαντικές αλλαγές στη συμπεριφορά έκφρασης του ΑΕΠ-2 παρατηρήθηκαν κατά τη γαλακτοπαραγωγή. Σε αντίθεση με την ξηρά περίοδο δεν παρατηρήθηκε έκφραση του ΑΕΠ-2 στο λιπώδη ιστό και στο μαστό, ενώ παρατηρήθηκαν σημαντικά αυξημένα επίπεδα έκφρασης στα επινεφρίδια.

Το τρίτο συμπέρασμα από τα πειράματα έκφρασης είναι ότι τα τρία από τα τέσσερα γονίδια (ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο και ΑΕΠ-1) εκφράστηκαν στο σπλαγγικό λιπώδη ιστό του προβάτου τόσο κατά τη γαλακτική περίοδο όσο και κατά την ξηρά περίοδο, ενώ το τέταρτο γονίδιο (ΑΕΠ-2) εκφράστηκε κατά την ξηρά περίοδο. Το γεγονός ότι όλα τα ανωτέρω γονίδια εκφράζονται στο λιπώδη ιστό ενισχύει τις θέσεις που έχουν διατυπωθεί τα τελευταία χρόνια ότι ο λιπώδης ιστός δεν είναι απλά και μόνο ένα αδρανές όργανο, οπού αποθηκεύεται ενέργεια με τη μορφή λίπους. Είναι ένας ενεργός ενδοκρινής αδένας που παράγει και εκκρίνει αρκετές ορμόνες και κυτταροκίνες (λιποκίνες). Οι ουσίες αυτές δρουν στο επίπεδο του εγκεφάλου και μεταβάλλουν την όρεξη, την πρόσληψη τροφής, την ενεργειακή κατανάλωση και την ενδοκρινή λειτουργία. Επίσης, δρουν και στο επίπεδο του μεταβολισμού, επηρεάζοντας το



μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, την ινσουλινοανοχή, την πιθανότητα ανάπτυξης μεταβολικού συνδρόμου και τον κίνδυνο για διαβήτη. Θα πρέπει να επισημανθεί ότι στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετάται για πρώτη φορά η έκφραση των τεσσάρων γονιδίων στο λιπώδη ιστό των αγροτικών ζώων.

Το τέταρτο συμπέρασμα προκύπτει από τη μελέτη έκφρασης των τεσσάρων γονιδίων στο μαστό. Τα δεδομένα της έκφρασης των γονιδίων στο μαστό κατά τη γαλακτοπαραγωγή και την ξηρά περίοδο, στηρίζουν την άποψη ότι το σύστημα παραμένει ουσιαστικά ανενεργό ή σε πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης κατά τη γαλακτική περίοδο και ενεργοποιείται κατά την ξηρά περίοδο. Η ενεργοποίηση αυτή του συστήματος πιθανότατα συνδέεται με τα πρωτεολυτικά φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα στο μαστό κατά το στάδιο της ανακατασκευής του.

Η παρατήρηση σχετικά με την αύξηση της έκφρασης και των 4 γονιδίων, δηλαδή αυτών που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του πλασμινογόνου (ΕΠ-Ο, ΥΕΠ-Ο) καθώς και των δύο γονιδίων που εμπλέκονται στην αναστολή της ενεργοποίησης του (ΑΕΠ-1, ΑΕΠ-2) παρουσιάζει εξαιρετικό ενδιαφέρον. Σε πρώτη ανάλυση, αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα επίπεδα πρωτεόλυσης παραμένουν σταθερά γιατί η ενεργοποίηση των δύο πρώτων γονιδίων αντισταθμίζεται από την ενεργοποίηση των δύο τελευταίων. Απάντηση σε αυτό το φαινομενικά παράδοξο αποτέλεσμα δίνουν τα δεδομένα της εργασίας του Politis που δημοσιεύτηκαν το 1996, όπου μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων στα επιθηλιακά και μυοεπιθηλιακά κύτταρα του μαστού της αγελάδας *in vitro*. Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ενεργοποιούνται πρώτα και σχεδόν ταυτόχρονα τα γονίδια των ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο, στη συνέχεια ο ΕΠ-Ο εξέρχεται από τα ανωτέρω κύτταρα και εγκαθίσταται-δεσμεύεται στον ΥΕΠ-Ο στην κυτταρική μεμβράνη. Στη φάση αυτή το ενεργό κέντρο του ΕΠ-Ο είναι ελεύθερο και μετατρέπει το πλασμινογόνο στην ενεργό πλασμίνη εντοπίζοντας με αυτό τον τρόπο την πρωτεόλυση στην κυτταρική μεμβράνη. Στη συνέχεια και με μια μικρή χρονική υστέρηση, ενεργοποιείται το γονίδιο του ΑΕΠ-1. Η πρωτεΐνη που παράγεται εξέρχεται από το κύτταρο και συνδέεται και αυτή με τον ΥΕΠ-Ο, δημιουργώντας ένα σύμπλεγμα υποδοχέα-ενεργοποιητή-αναστολέα (ΥΕΠ-Ο, ΕΠ-Ο, ΑΕΠ-1), παρεμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη δράση του ΕΠ-Ο και συνεπώς αναστέλλει την περαιτέρω ενεργοποίηση του πλασμινογόνου. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το σύμπλεγμα ΕΠ-Ο - ΥΕΠ-Ο - ΑΕΠ-1 εισέρχεται εκ νέου στο εσωτερικό του κυττάρου (*internalization*) με συνέπεια τη διάσπαση των πρωτεϊνών από ενδοκυτταρικά πρωτεϊνολυτικά ένζυμα. Στη συνέχεια αρχίζει ένας νέος κύκλος έκφρασης (ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο αρχικά και στη συνέχεια ΑΕΠ-1) με συνέπεια τη συνεχή ανανέωση της πρωτεολυτικής δραστηριότητας. Από τα ανωτέρω καθίσταται φανερό ότι σε *in vitro* πειράματα είναι δυνατός ο εντοπισμός μίας μικρής χρονικής υστέρησης της έκφρασης των αναστολέων σε σύγκριση με τον ενεργοποιητή και τον υποδοχέα του. Στο παρόν πείραμα ωστόσο, είναι φανερό πως αυτές οι μικροδιαφορές δεν ήταν δυνατό να εντοπιστούν, καθώς ο πληθυσμός των κυττάρων δεν είναι ομοιογενής, με συνέπεια να περιλαμβάνει κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο πρώτο στάδιο του κύκλου έκφρασης

(ΕΠ-Ο και ΥΕΠ-Ο), αλλά και κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο δεύτερο στάδιο του κύκλου έκφρασης (ΑΕΠ-1 και πιθανώς ΑΕΠ-2).

Το πέμπτο συμπέρασμα, το οποίο προκύπτει από τη μελέτη του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα είναι ότι δεν υπάρχουν σημαντικές μεταβολές στην ενεργοποίηση του συστήματος κατά τη διάρκεια της γαλακτικής περιόδου στο πρόβατο. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα της πλασμίνης είναι παρόμοια στο τέλος της γαλακτικής περιόδου με τα αντίστοιχα που παρατηρούνται κατά την αρχή και το μέσο της γαλακτικής περιόδου. Περαιτέρω, ο μηχανισμός μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη εμφανίζει μόνο μία μικρή αύξηση προς το τέλος της γαλακτικής περιόδου. Τα δεδομένα αυτά δε συμφωνούν με εκείνα που προέκυψαν από προηγούμενες μελέτες στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, στο γάλα των οποίων παρατηρείται μία σημαντική αύξηση της ενεργότητας της πλασμίνης κατά το τελευταίο στάδιο της γαλακτικής περιόδου, ως αποτέλεσμα του αυξημένου ρυθμού μετατροπής του πλασμινογόνου σε πλασμίνη. Επομένως, παρά τις ομοιότητες στο επίπεδο της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των προβάτων και των αγελάδων, φαίνεται ότι οι μηχανισμοί που ελέγχουν τη μετατροπή του πλασμινογόνου σε πλασμίνη διαφέρουν στο πρόβατο σε σχέση με εκείνους στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Συμπερασματικά, στο πρόβατο δεν προκύπτει η σταδιακή ενεργοποίηση του συστήματος που παρατηρείται στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής κατά την πτωτική φάση της γαλακτοπαραγωγής, ως προοίμιο των ευρύτερων ανακατατάξεων που συνοδεύουν την έναρξη της ξηράς περιόδου.

Το έκτο συμπέρασμα, το οποίο προκύπτει από τη μελέτη του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβειο γάλα είναι ότι δεν προέκυψαν διαφορές στα επίπεδα της πλασμίνης μεταξύ της υψιπαραγωγού φυλής Χίου και της ορεινής φυλής Ηπείρου, η οποία χαρακτηρίζεται από χαμηλή ικανότητα γαλακτοπαραγωγής. Και αυτή η παρατήρηση έρχεται σε αντίθεση με τα δεδομένα στις αγελάδες γαλακτοπαραγωγής, στις οποίες παρατηρήθηκε ότι οι αυξήσεις στα επίπεδα της πλασμίνης σχετίζονται με χαμηλή γαλακτοπαραγωγή.

Συνοπτικά, πέραν της κλωνοποίησης των cDNAs των τεσσάρων γονιδίων, θεωρούνται ως κυριότερα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής οι μεταβολές έκφρασης που παρατηρούνται στο μαστό και στο λιπώδη ιστό για τα τέσσερα γονίδια στην ξηρά περίοδο σε σύγκριση με τη γαλακτοπαραγωγή. Θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμο να μελετηθεί η έκφραση των τεσσάρων γονιδίων στο μαστό και στο λιπώδη ιστό σε περισσότερα χρονικά σημεία, π.χ. τρία χρονικά σημεία κατά τη γαλακτοπαραγωγή, τρία χρονικά σημεία κατά την ξηρά περίοδο και ενδεχομένως κατά τη διάρκεια της κυοφορίας πριν από τη γαλακτοπαραγωγή. Πιθανολογείται ότι η έκφραση των γονιδίων στο λιπώδη ιστό μπορεί να συνδέεται στενά με το φαινόμενο της γαλουχίας για το οποίο η παρασκευή λίπους αποτελεί ύψιστη προτεραιότητα. Επίσης θεωρείται σκόπιμη η επέκταση των πειραμάτων σε γονιδιακό επίπεδο με τη διερεύνηση της οργάνωσης των τεσσάρων γονιδίων με έμφαση στην περιοχή των υποκινητών για να διαπιστωθεί πόσο στενά συνδεδεμένα είναι η έκφραση τους.



#### **4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Adelman,B., Rizk,A., Hanners,E., 1988. Plasminogen interactions with platelets in plasma. *Blood* 72: 1530-1535.
- Albenzio,M., Caroprese,M., Santillo,A., Marino,R., Muscio,A., Sevi,A., 2005. Proteolytic patterns and plasmin activity in ewes' milk as affected by somatic cell count and stage of lactation. *J. Dairy Res.* 72, 86-92.
- Albenzio,M., Caroprese,M., Santillo,A., Marino,R., Taibi,L., Sevi,A., 2004. Effects of somatic cell count and stage of lactation on the plasmin activity and cheese-making properties of ewe milk. *Journal of Dairy Science* 87, 533-542.
- Alessi,M.C., Peiretti,F., Morange,P., Henry,M., Nalbone,G., Juhan-Vague,I., 1997. Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease. *Diabetes* 46, 860-867.
- Alfano,D., Franco,P., Vocca,I., Gambi,N., Pisa,V., Mancini,A., Caputi,M., Carriero,M.V., Iaccarino,I., Stoppelli,M.P., 2005. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. *Thromb. Haemost.* 93, 205-211.
- Almus-Jacobs,F., Varki,N., Sawdey,M.S., Loskutoff,D.J., 1995. Endotoxin stimulates expression of the murine urokinase receptor gene in vivo. *Am. J. Pathol.* 147, 688-698.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., Lipman,D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- Antalis,T.M., Clark,M.A., Barnes,T., Lehrbach,P.R., Devine,P.L., Schevzov,G., Goss,N.H., Stephens,R.W., Tolstoshev,P., 1988. Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte-derived plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 985-989.
- AOAC, 1980. *Official Methods of Analysis*, 13 edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Arnold,K., Bordoli,L., Kopp,J., Schwede,T., 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
- Aslam,M., Hurley,W.L., 1997. Proteolysis of milk proteins during involution of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science* 80: 2004-2010.
- Athie,F., Bachman,K.C., Head,H.H., Hayen,M.J., Wilcox,C.J., 1997. Milk plasmin during bovine mammary involution that has been accelerated by estrogen. *Journal of Dairy Science* 80: 1561-1568.

- Bachmann,F., 1987. Fibrinolysis. In: Arnout,J., Lijnen,H.R., Vermylen,J., Verstraete,M. (Eds.), *Thrombosis and Haemostasis*. Leuven University Press, Leuven, pp. 227-265.
- Bachmann,F., 1994. Molecular aspects of plasminogen, plasminogen activators and plasmin. In: Bloom,A.L., Forbes,C.D., Thomas,D.P., Tuddenham,E.G.D. (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 575-613.
- Baldi,A., Savoini,G., Cheli,F., Fantuz,F., Senatore,E., Bertocchi,L., Politis,I., 1996. Changes in plasmin-plasminogen-plasminogen activator system in milk from Italian Friesian herds. *Int. Dairy J.* 6, 1045-1053.
- Beaudoing,E., Freier,S., Wyatt,J.R., Claverie,J.M., Gautheret,D., 2000. Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 10, 1001-1010.
- Behrendt,N., Ronne,E., Ploug,M., Petri,T., Lober,D., Nielsen,L.S., Schleuning,W.D., Blasi,F., Appella,E., Dano,K., 1990. The human receptor for urokinase plasminogen activator. NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence and glycosylation variants. *J. Biol. Chem.* 265, 6453-6460.
- Belin,D., 1993. Biology and facultative secretion of plasminogen activator inhibitor-2. *Thromb. Haemost.* 70, 144-147.
- Belin,D., Vassalli,J.D., Combepine,C., Godeau,F., Nagamine,Y., Reich,E., Kocher,HP., Duvoisin,R.M., 1985. Cloning, nucleotide sequencing and expression of cDNAs encoding mouse urokinase-type plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 148, 225-232.
- Berglund,L., Andersen,M.D., Petersen,T.E., 1995. Cloning and characterization of the bovine plasminogen cDNA. *Int. Dairy J.* 5, 593-603.
- Bianchi,L., Bolla,A., Budelli,E., Caroli,A., Casoli,C., Pauselli,M., Duranti,E., 2004. Effect of udder health status and lactation phase on the characteristics of Sardinian ewe milk. *Journal of Dairy Science* 87, 2401-2408.
- Bijnens,A.P., Knockaert,I., Cousin,E., Kruithof,E.K., Declerck,P.J., 1997. Expression and characterization of recombinant porcine plasminogen activator inhibitor-1. *Thromb. Haemost.* 77, 350-356.
- Bisgaard,H.C., Santoni-Rugiu,E., Nagy,P., Thorgeirsson,S.S., 1998. Modulation of the plasminogen activator/plasmin system in rat liver regenerating by recruitment of oval cells. *Lab. Invest.* 78, 237-246.
- Bloor,C.M., Nimmo,L., McKirnan,M.D., Zhang,Y., White,F.C., 1997. Increased gene expression of plasminogen activators and inhibitors in left ventricular hypertrophy. *Mol. Cell. Biochem.* 176, 265-271.
- Borglum,A.D., Byskov,A., Ragno,P., Roldan,A.L., Tripputi,P., Cassani,G., Dano,K., Blasi,F., Bolund,L., Kruse,T.A., 1992. Assignment of the urokinase-type

- plasminogen activator receptor gene (PLAUR) to chromosome 19q13.1-q13.2. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 492-497.
- Busso,N., Huarte,J., Vassalli,J.D., Sappino,A.P., Belin,D., 1989. Plasminogen activators in the mouse mammary gland. Decreased expression during lactation. *J. Biol. Chem.* 264, 7455-7457.
- Cao,M., Buratini,J.Jr., Lussier,J.G., Carriere,P.D., Price,C.A., 2006a. Expression of protease nexin-1 and plasminogen activators during follicular growth and the periovulatory period in cattle. *Reproduction* 131, 125-137.
- Cao,M., Nicola,E., Portela,V.M., Price,C.A., 2006b. Regulation of serine protease inhibitor-E2 and plasminogen activator expression and secretion by follicle stimulating hormone and growth factors in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Matrix Biol.* 25, 342-354.
- Cao,M., Sahmi,M., Lussier,J.G., Price,C.A., 2004. Plasminogen activator and serine protease inhibitor-E2 (protease nexin-1) expression by bovine granulosa cells in vitro. *Biol. Reprod.* 71, 887-893.
- Capuco,A.V., Akers,R.M., Smith,J.J., 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *Journal of Dairy Science* 80, 477-487.
- Carrell,R., Travis,J., 1985.  $\alpha$ 1-Antitrypsin and the serpins: variation and countervariation. *Trends Biochem. Sci.* 10, 20-24.
- Cesarman,G.M., Guevara,C.A., Hajjar,K.A., 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* 269, 21198-21203.
- Cheng,Y.C., Chen,L.M., Chang,M.H., Chen,W.K., Tsai,F.J., Tsai,C.H., Lai,T.Y., Kuo,W.W., Huang,C.Y., Liu,C.J., 2009. Lipopolysaccharide upregulates uPA, MMP-2 and MMP-9 via ERK1/2 signaling in H9c2 cardiomyoblast cells. *Mol. Cell. Biochem.* 325, 15-23.
- Christensen,S., Berglund,L., Sottrup-Jensen,L., 1994. Primary structure of bovine  $\alpha$ 2-antiplasmin. *FEBS Lett.* 343, 223-228.
- Colitti,M., Farinacci,M., 2009. Cell turnover and gene activities in sheep mammary glands prior to lambing to involution. *Tissue Cell* In press.
- Collen,D., 1976. Identification and some properties of a new fast-reacting plasmin inhibitor in human plasma. *Eur. J. Biochem.* 69, 209-216.
- Collen,D., Tytgat,G., Claeys,H., Verstraete,M., Wallen,P., 1972. Metabolism of plasminogen in healthy subjects: effect of tranexamic acid. *J. Clin. Invest.* 51, 1310-1318.



- Collen,D., Verstraete,M., 1975. Molecular biology of human plasminogen. II. Metabolism in physiological and some pathological conditions in man. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 403-408.
- Colucci,M., Gesualdo,L., Montemurro,P., Cavallo,L.G., Conese,M., Mascolo,E., Ranieri,E., Di Paolo,S., Schena,F.P., Semeraro,N., 1995. Cultured human mesangial cells produce both type 1 and type 2 plasminogen activator inhibitors. *Thromb. Haemost.* 74, 1516-1520.
- Corpet,F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16, 10881-10890.
- Crandall,D.L., Groeling,T.M., Busler,D.E., Antrilli,T.M., 2000. Release of PAI-1 by human preadipocytes and adipocytes independent of insulin and IGF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 984-988.
- Cubellis,M.V., Nolli,M.L., Cassani,G., Blasi,F., 1986. Binding of single-chain prourokinase to the urokinase receptor of human U937 cells. *J. Biol. Chem.* 261, 15819-15822.
- Cunningham,O., Champion,S., Perry,V.H., Murray,C., Sidenius,N., Docagne,F., Cunningham,C., 2009. Microglia and the urokinase plasminogen activator receptor/uPA system in innate brain inflammation. *Glia* Epub (ahead of print).
- de Boer,J.P., Creasey,A.A., Chang,A., Abbink,J.J., Roem,D., Eerenberg,A.J., Hack,C.E., Taylor,F.B.Jr., 1993. Alpha-2-macroglobulin functions as an inhibitor of fibrinolytic, clotting, and neutrophilic proteinases in sepsis: studies using a baboon model. *Infect. Immun.* 61, 5035-5043.
- Dear,A.E., Medcalf,R.L., 1995. The cellular and molecular biology of plasminogen activator inhibitor type 2. *Fibrinolysis* 9, 321-330.
- Declerck,P.J., De Mol,M., Alessi,M.C., Baudner,S., Paques,E.P., Preissner,K.T., Muller-Berghaus,G., Collen,D., 1988. Purification and characterization of a plasminogen activator inhibitor 1 binding protein from human plasma. Identification as a multimeric form of S protein (vitronectin). *J. Biol. Chem.* 263, 15454-15461.
- Dent,M.A., Sumi,Y., Morris,R.J., Seeley,P.J., 1993. Urokinase-type plasminogen activator expression by neurons and oligodendrocytes during process outgrowth in developing rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 5, 633-647.
- Di Giusto,D.A., Sutherland,A.P., Jankova,L., Harrop,S.J., Curmi,P.M., King,G.C., 2005. Plasminogen activator inhibitor-2 is highly tolerant to P8 residue substitution--implications for serpin mechanistic model and prediction of nsSNP activities. *J. Mol. Biol.* 353, 1069-1080.
- Dietzmann,K., von Bossanyi,P., Krause,D., Wittig,H., Mawrin,C., Kirches,E., 2000. Expression of the plasminogen activator system and the inhibitors PAI-1 and PAI-2 in posttraumatic lesions of the CNS and brain injuries following dramatic

- circulatory arrests: an immunohistochemical study. *Pathol. Res. Pract.* 196, 15-21.
- Dimova,E.Y., Kietzmann,T., 2008. Metabolic, hormonal and environmental regulation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression: lessons from the liver. *Thromb. Haemost.* 100, 992-1006.
- Dougherty,K.M., Pearson,J.M., Yang,A.Y., Westrick,R.J., Baker,M.S., Ginsburg,D., 1999. The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 686-691.
- Ellis,V., Behrendt,N., Dano,K., 1991. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J. Biol. Chem.* 266, 12752-12758.
- Estreicher,A., Wohlwend,A., Belin,D., Schleuning,W.D., Vassalli,J.D., 1989. Characterization of the cellular binding site for the urokinase-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 264, 1180-1189.
- Fay,W.P., Garg,N., Sunkar,M., 2007. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 1231-1237.
- Felsenstein,J., 1989. PHYLIP -- Phylogeny Inference Package. *Cladistics* 5, 164-166.
- Fish,P.V., Barber,C.G., Brown,D.G., Butt,R., Collis,M.G., Dickinson,R.P., Henry,B.T., Horne,V.A., Huggins,J.P., King,E., O'Gara,M., McCleverty,D., McIntosh,F., Phillips,C., Webster,R., 2007. Selective urokinase-type plasminogen activator inhibitors. 4. 1-(7-sulfonamidoisoquinoliny)guanidines. *J. Med. Chem.* 50, 2341-2351.
- Fredenburgh,J.C., Nesheim,M.E., 1992. Lys-plasminogen is a significant intermediate in the activation of Glu-plasminogen during fibrinolysis in vitro. *J. Biol. Chem.* 267, 26150-26156.
- Gattiker,A., Gasteiger,E., Bairoch,A., 2002. ScanProsite: a reference implementation of a PROSITE scanning tool. *Applied Bioinformatics* 1, 107-108.
- Gilmore,J.A., White,J.H., Zavizion,B., Politis,I., 1995. Effects of stage of lactation and somatic cell count on plasminogen activator activity in bovine milk. *J. Dairy Res.* 62, 141-145.
- Gils,A., Declerck,P.J., 1998. Structure-function relationships in serpins: current concepts and controversies. *Thromb. Haemost.* 80, 531-541.
- Ginsburg,D., Zeheb,R., Yang,A.Y., Rafferty,U.M., Andreasen,P.A., Nielsen,L., Dano,K., Lebo,R.V., Gelehrter,T.D., 1986. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 78, 1673-1680.

- Gonias,S.L., Braud,L.L., Geary,W.A., VandenBerg,S.R., 1989. Plasminogen binding to rat hepatocytes in primary culture and to thin slices of rat liver. *Blood* 74, 729-736.
- Gonzalez-Gronow,M., Edelberg,J.M., Pizzo,S.V., 1989. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein a compete for the same site. *Biochemistry (Mosc)*. 28, 2374-2377.
- Graber,J.H., Cantor,C.R., Mohr,S.C., Smith,T.F., 1999. In silico detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 14055-14060.
- Grubbs,F., 1969. Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics* 11, 1-21.
- Gueux,N., Peitsch,M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- Hajjar,K.A., Hamel,N.M., Harpel,P.C., Nachman,R.L., 1987. Binding of tissue plasminogen activator to cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 80, 1712-1719.
- Hajjar,K.A., Harpel,P.C., Jaffe,E.A., Nachman,R.L., 1986. Binding of plasminogen to cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 261, 11656-11662.
- Hajjar,K.A., Jacovina,A.T., Chacko,J., 1994. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator. I. Identity with annexin II. *J. Biol. Chem.* 269, 21191-21197.
- Hamby,S.E., Hirst,J.D., 2008. Prediction of glycosylation sites using random forests. *BMC Bioinformatics* 9.
- Harhay,G.P., Sonstegard,T.S., Keele,J.W., Heaton,M.P., Clawson,M.L., Snelling,W.M., Wiedmann,R.T., Van Tassell,C.P., Smith,T.P., 2005. Characterization of 954 bovine full-CDS cDNA sequences. *BMC Genomics* 23, 166.
- He,G., Bruun,J.M., Lihn,A.S., Pedersen,S.B., Richelsen,B., 2003. Stimulation of PAI-1 and adipokines by glucose in human adipose tissue in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 878-883.
- Henkin,J., Marcotte,P., Yang,H.C., 1991. The plasminogen-plasmin system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 34, 135-164.
- Hildenbrand,R., Arens,N., 2004. Protein and mRNA expression of uPAR and PAI-1 in myoepithelial cells of early breast cancer lesions and normal breast tissue. *Br. J. Cancer* 91, 564-571.
- Holmes,W.E., Nelles,L., Lijnen,H.R., Collen,D., 1987. Primary structure of human alpha 2-antiplasmin, a serine protease inhibitor (serpin). *J. Biol. Chem.* 262, 1659-1664.

- Hoover-Plow,J., Ellis,J., Yuen,L., 2002. In vivo plasminogen deficiency reduces fat accumulation. *Thromb. Haemost.* 87, 1011-1019.
- Horn,I.R., Moestrup,S.K., van den Berg,B.M., Pannekoek,H., Nielsen,M.S., van Zonneveld,A.J., 1995. Analysis of the binding of pro-urokinase and urokinase-plasminogen activator inhibitor-1 complex to the low density lipoprotein receptor-related protein using a Fab fragment selected from a phage-displayed Fab library. *J. Biol. Chem.* 270, 11770-11775.
- Hoylaerts,M., Rijken,D.C., Lijnen,H.R., Collen,D., 1982. Kinetics of the activation of plasminogen by human tissue plasminogen activator. Role of fibrin. *J. Biol. Chem.* 257, 2912-2919.
- Huai,Q., Mazar,A.P., Kuo,A., Parry,G.C., Shaw,D.E., Callahan,J., Li,Y., Yuan,C., Bian,C., Chen,L., Furie,B., Furie,B.C., Cines,D.B., Huang,M., 2006. Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor. *Science* 311, 656-659.
- Huang,D.H., Zhao,H., Tian,Y.H., Li,H.G., Ding,X.F., Xiong,C.L., 2007. Gene expression changes of urokinase plasminogen activator and urokinase receptor in rat testes at postnatal stages. *Asian Journal of Andrology* 9, 679-683.
- Hurley,W.L., 1989. Mammary gland function during involution. *Journal of Dairy Science* 72, 1637-1646.
- Itagaki,Y., Yasuda,H., Morinaga,T., Mitsuda,S., Higashio,K., 1991. Purification and characterization of tissue plasminogen activator secreted by human embryonic lung diploid fibroblasts, IMR-90 cells. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1225-1232.
- Jacobs,P., Cravador,A., Loriau,R., Brockly,F., Colau,B., Chuchana,P., van Elsen,A., Herzog,A., Bollen,A., 1985. Molecular cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of human prourokinase cDNA. *DNA* 4, 139-146.
- Jensen,P.H., 1997. Structure and function of plasminogen activator inhibitor-2: an intracellular serine proteinase inhibitor modulating apoptosis. *Int. J. Oncol.* 11, 557-570.
- Jones,D.T., 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202.
- Juhan-Vague,I., Alessi,M.C., Vague,P., 1991. Increased plasma plasminogen activator inhibitor 1 levels. A possible link between insulin resistance and atherothrombosis. *Diabetologia* 34, 457-462.
- Kliem,H., Welter,H., Kraetzl,W.D., Steffl,M., Meyer,H.H., Schams,D., Berisha,B., 2007. Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitors during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Reproduction* 134, 535-547.
- Klinger,K.W., Winqvist,R., Riccio,R., Andreasen,A., Sartorio,R., Nielsen,L.S., Stuart,N., Stanislovitis,P., Watkins,P., Douglas,R., Grzeschik,K.H., Alitalo,K.,

- Blasi,F., Dano,K., 1987. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 8548-8552.
- Knight,C.H., Peaker,M., 1982. Development of the mammary gland. *J. Reprod. Fertil.* 65, 521-536.
- Knight,C.H., Peaker,M., 1984. Mammary development and regression during lactation in goats in relation to milk secretion. *Q. J. Exp. Physiol.* 69, 331-338.
- Kozak,M., 1981. Mechanism of mRNA recognition by eukaryotic ribosomes during initiation of protein synthesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 93, 81-123.
- Kozak,M., 1984. Point mutations close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo. *Nature* 308, 241-246.
- Kozak,M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 2, 283-292.
- Kratzschmar,J., Haendler,B., Kojima,S., Rifkin,D.B., Schleuning,W.D., 1993. Bovine urokinase-type plasminogen activator and its receptor: cloning and induction by retinoic acid. *Gene* 125, 177-183.
- Kruithof,E.K., Baker,M.S., Bunn,C.L., 1995. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 86, 4007-4024.
- Lacy-Hulbert,S.J., Woolford,M.W., Nicholas,G.D., Prosser,C.G., Stelwagen,K., 1999. Effect of milking frequency and pasture intake on milk yield and composition of late lactation cows. *Journal of Dairy Science* 82, 1232-1239.
- Larsen,N.J., Womack,J.E., Kirkpatrick,B.W., 1996. Seven genes from human chromosome 18 map to chromosome 24 in the bovine. *Cytogenet. Cell Genet.* 73, 184-186.
- Lascelles,A.K., Lee,C.S., 1978. Involution of the mammary gland. In , vol 4 (ed. B. L. Larson), pp. 115-177. New York, NY: Academic Press Inc. *Lactation: A Comprehensive Treatise.* Academic Press Inc., New York, NY, pp. 115-177.
- Leitner,G., Chaffer,M., Shamay,A., Shapiro,F., Merin,U., Ezra,E., Saran,A., Silanikove,N., 2004. Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science* 87, 46-52.
- Liang,X., Kanjanabuch,T., Mao,S.L., Hao,C.M., Tang,Y.W., Declerck,P.J., Hasty,A.H., Wasserman,D.H., Fogo,A.B., Ma,L.J., 2006. Plasminogen activator inhibitor-1 modulates adipocyte differentiation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 290, 103-113.
- Lijnen,H.R., Frederix,L., Scroyen,I., 2007. Deficiency of plasminogen activator inhibitor-2 impairs nutritionally induced murine adipose tissue development. *Journal of thrombosis and haemostasis* 5, 2259-2265.

- Lindahl,T.L., Ohlsson,P.I., Wiman,B., 1990. The mechanism of the reaction between human plasminogen-activator inhibitor 1 and tissue plasminogen activator. *Biochem. J.* 265, 109-113.
- List,K., Jensen,O.N., Bugge,T.H., Lund,L.R., Ploug,M., Dano,K., Behrendt,N., 2000. Plasminogen-independent initiation of the pro-urokinase activation cascade in vivo. Activation of pro-urokinase by glandular kallikrein (mGK-6) in plasminogen-deficient mice. *Biochemistry (Mosc).* 39, 508-515.
- Livak,K.J., Schmittgen,T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- Longstaff,C., Gaffney,P.J., 1991. Serpin-serine protease binding kinetics: alpha 2-antiplasmin as a model inhibitor. *Biochemistry (Mosc).* 30, 979-986.
- Lund,L.R., Romer,J., Thomasset,N., Solberg,H., Pyke,C., Bissell,M.J., Dano,K., Werb,Z., 1996. Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase-independent and -dependent pathways. *Development* 122, 181-193.
- MacDougald,O.A., Burant,C.F., 2007. The rapidly expanding family of adipokines. *Cell Metabolism* 6, 159-161.
- Magnusson,S., Sottrup-Jensen,L., Claeys,H., Zajdel,M., Petersen,T.E., 1975. Proceedings: Complete primary structure of prothrombin. Partial primary structures of plasminogen and hirudin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34, 562-563.
- Marchler-Bauer,A., Anderson,J.B., Chitsaz,F., Derbyshire,M.K., DeWeese-Scott,C., Fong,J.H., Geer,L.Y., Geer,R.C., Gonzales,N.R., Gwadz,M., He,S., Hurwitz,D.I., Jackson,J.D., Ke,Z., Lanczycki,C.J., Liebert,C.A., Liu,C., Lu,F., Lu,S., Marchler,G.H., Mullokandov,M., Song,J.S., Tasneem,A., Thanki,N., Yamashita,R.A., Zhang,D., Zhang,N., Bryant,S.H., 2009. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Reserach.* 37, 205-210.
- Marchler-Bauer,A., Bryant,S.H., 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.* 32, 327-331.
- Masuda,Y., Emoto,N., Nonaka,H., Yagita,K., Todo,T., Okamura,H., Yokoyama,M., Hirata,K., 2009. Role of angiotensin and the clock system in the circadian regulation of plasminogen activator inhibitor-1. *Kobe J. Med. Sci.* 54, 264-271.
- McGuffin,L.J., Bryson,K., Jones,D.T., 2000. The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16, 404-405.
- Mignatti,P., Mazzieri,R., Rifkin,D.B., 1991. Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J. Cell Biol.* 113, 1193-1201.
- Miles,L.A., Dahlberg,C.M., Plow,E.F., 1988. The cell-binding domains of plasminogen and their function in plasma. *J. Biol. Chem.* 263, 11928-11934.



- Miles,L.A., Plow,E.F., 1985. Binding and activation of plasminogen on the platelet surface. *J. Biol. Chem.* 260, 4303-4311.
- Miles,L.A., Plow,E.F., 1987. Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb. Haemost.* 58, 936-942.
- Miles,L.A., Plow,E.F., 1988. Plasminogen receptors: Ubiquitous sites for cellular regulation of fibrinolysis . *Fibrinolysis* 2, 61-71.
- Mimuro,J., Loskutoff,D.J., 1989. Purification of a protein from bovine plasma that binds to type 1 plasminogen activator inhibitor and prevents its interaction with extracellular matrix. Evidence that the protein is vitronectin. *J. Biol. Chem.* 264, 963-969.
- Mimuro,J., Sawdey,M., Hattori,M., Luskutoff,D.J., 1989. cDNA for bovine type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1). *Nucleic Acids Res.* 17, 8872.
- Min,H.Y., Semnani,R., Mizukami,I.F., Watt,K., Todd,R.F.3., Liu,D.Y., 1992. cDNA for Mo3, a monocyte activation antigen, encodes the human receptor for urokinase plasminogen activator. *J. Immunol.* 148, 3636-3642.
- Moller,L.B., Ploug,M., Blasi,F., 1992. Structural requirements for glycosyl-phosphatidylinositol-anchor attachment in the cellular receptor for urokinase plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 208, 493-500.
- Morange,P.E., Alessi,M.C., Verdier,M., Casanova,D., Magalon,G., Juhan-Vague,I., 1999. PAI-1 produced ex vivo by human adipose tissue is relevant to PAI-1 blood level. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 1361-1365.
- Morange,P.E., Bastelica,D., Bonzi,M.F., Van Hoef,B., Collen,D., Juhan-Vague,I., Lijnen,H.R., 2002. Influence of t-pA and u-PA on adipose tissue development in a murine model of diet-induced obesity. *Thromb. Haemost.* 87, 306-310.
- Moroi,M., Aoki,N., 1976. Isolation and characterization of alpha2-plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J. Biol. Chem.* 251, 5956-5965.
- Murray,J.C., Buetow,K.H., Donovan,M., Hornung,S., Motulsky,A.G., Disteche,C., Dyer,K., Swisshelm,K., Anderson,J., Giblett,E., Sadler,E., Eddy,R., Shows,T.B., 1987. Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27. *Am. J. Hum. Genet.* 40, 338-350.
- Myohanen,H.T., Stephens,R.W., Hedman,K., Tapiovaara,H., Ronne,E., Hoyer-Hansen,G., Dano,K., Vaheri,A., 1993. Distribution and lateral mobility of the urokinase-receptor complex at the cell surface. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 1291-1301.
- Nagai,M., Hiramatsu,R., Kaneda,T., Hayasuke,N., Arimura,H., Nishida,M., Suyama,T., 1985. Molecular cloning of cDNA coding for human preprourokinase. *Gene* 36, 183-188.

- Nagamine, Y., Pearson, D., Altus, M.S., Reich, E., 1984. cDNA and gene nucleotide sequence of porcine plasminogen activator. *Nucleic Acids Res.* 12, 9525-9541.
- Nieuwenhuizen, W., Traas, D.W., 1989. A rapid and simple method for the separation of four molecular forms of human plasminogen. *Thromb. Haemost.* 61, 208-210.
- Nishida, Y., Hayashi, Y., Imai, Y., Itoh, H., 1998. Expression and localization of the urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) in the human placenta. *Kobe J. Med. Sci.* 44, 31-43.
- Ny, T., Elgh, F., Lund, B., 1984. The structure of the human tissue-type plasminogen activator gene: correlation of intron and exon structures to functional and structural domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 5355-5399.
- Ny, T., Peng, X.R., Ohlsson, M., 1993. Hormonal regulation of the fibrinolytic components in the ovary. *Thromb. Res.* 71, 1-45.
- Ny, T., Sawdey, M., Lawrence, D., Millan, J.L., Loskutoff, D.J., 1986. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 6776-6780.
- Ohnishi, J., Yokota, J., Rajapakse, R.G., Ohnishi, E., Kudo, T., Wada, S., Takahashi, T., 2004. Activity of an enzyme converting single-chain tissue-type plasminogen activator to the two-chain form in preovulatory human follicular fluid. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 178-185.
- Orth, K., Willnow, T., Herz, J., Gething, M.J., Sambrook, J., 1994. Low density lipoprotein receptor-related protein is necessary for the internalization of both tissue-type plasminogen activator-inhibitor complexes and free tissue-type plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 269, 21117-21122.
- Ossowski, L., Biegel, D., Reich, E., 1979. Mammary plasminogen activator: correlation with involution, hormonal modulation and comparison between normal and neoplastic tissue. *Cell* 16, 929-940.
- Pannekoek, H., Veerman, H., Lambers, H., Diergaarde, P., Verweij, C.L., van Zonneveld, A.J., van Mourik, J.A., 1986. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J.* 5, 2539-2544.
- Parkkinen, J., Rauvala, H., 1991. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphotericin. *J. Biol. Chem.* 266, 16730-16735.
- Pennica, D., Holmes, W.E., Kohr, W.J., Harkins, R.N., Vehar, G.A., Ward, C.A., Bennett, W.F., Yelverton, E., Seeburg, P.H., Heyneker, H.L., Goeddel, D.V., Collen, D., 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* 301, 214-221.

- Petersen,L.C., Lund,L.R., Nielsen,L.S., Dano,K., Skriver,L., 1988. One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. *J. Biol. Chem.* 263, 11189-11195.
- Pike,R.N., Bottomley,S.P., Irving,J.A., Bird,P.I., Whisstock,J.C., 2002. Serpins: finely balanced conformational traps. *IUBMB Life* 54, 1-7.
- Ploug,M., Ellis,V., 1994. Structure-function relationships in the receptor for urokinase-type plasminogen activator. Comparison to other members of the Ly-6 family and snake venom alpha-neurotoxins. *FEBS Lett.* 349, 163-168.
- Politis,I., 1996. Plasminogen activator system: implications for mammary cell growth and involution. *Journal of Dairy Science* 79, 1097-1107.
- Politis,I., Bizelis,I., Rogdakis,E., 2002a. The urokinase-plasminogen activator system in ovine macrophages and neutrophils. *Small Ruminant Research* 44, 17-23.
- Politis,I., Bizelis,I., Tsiaras,A., Baldi,A., 2004. Effect of vitamin E supplementation on neutrophil function, milk composition and plasmin activity in dairy cows in a commercial herd. *J. Dairy Res.* 71, 273-278.
- Politis,I., Block,E., Turner,J.D., 1990. Effect of somatotropin on the plasminogen and plasmin system in the mammary gland: proposed mechanism of action for somatotropin on the mammary gland. *Journal of Dairy Science* 73, 1494-1499.
- Politis,I., Lachance,E., Block,E., Turner,J.D., 1989a. Plasmin and plasminogen in bovine milk: a relationship with involution? *Journal of Dairy Science* 72, 900-906.
- Politis,I., Ng Kwai Hang,K.F., Giroux,R.N., 1989b. Environmental factors affecting plasmin activity in milk. *Journal of Dairy Science* 72, 1713-1718.
- Politis,I., Voudouri,A., Bizelis,I., Zervas,G., 2003. The effect of various vitamin E derivatives on the urokinase-plasminogen activator system of ovine macrophages and neutrophils. *Br. J. Nutr.* 89, 259-265.
- Politis,I., Zavizjon,B., Cheli,F., Baldi,A., 2002b. Expression of urokinase plasminogen activator receptor in resting and activated bovine neutrophils. *J. Dairy Res.* 69, 195-204.
- Ponting,C.P., Holland,S.K., Cederholm-Williams,S.A., Marshall,J.M., Brown,A.J., Spraggon,G., Blake,C.C., 1992. The compact domain conformation of human Glu-plasminogen in solution. *Biochim. Biophys. Acta* 1159, 155-161.
- Precetti,A.S., Oria,M.P., Nielsen,S.S., 1997. Presence in bovine milk of two protease inhibitors of the plasmin system. *Journal of Dairy Science* 80, 1490-1496.
- Prendergast,G.C., Diamond,L.E., Dahl,D., Cole,M.D., 1990. The c-myc-regulated gene mrl encodes plasminogen activator inhibitor 1. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1265-1269.

- Pyke,C., Eriksen,J., Solberg,H., Nielsen,B.S., Kristensen,P., Lund,L.R., Dano,K., 1993. An alternatively spliced variant of mRNA for the human receptor for urokinase plasminogen activator. *FEBS Lett.* 326, 69-74.
- Rabot,A., Sinowatz,F., Berisha,B., Meyer,H.H., Schams,D., 2007. Expression and localization of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors in the bovine mammary gland during development, function, and involution. *Journal of Dairy Science* 90, 740-748.
- Ranby,M., Bergsdorf,N., Nilsson,T., 1982. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thromb. Res.* 27, 175-183.
- Raum,D., Marcus,D., Alper,C.A., Levey,R., Taylor,P.D., Starzl,T.E., 1980. Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science* 208, 1036-1037.
- Redlitz,A., Fowler,B.J., Plow,E.F., Miles,L.A., 1995. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur. J. Biochem.* 227, 407-415.
- Renatus, M., Engh, R. A., Stubbs, M. T., Huber, R., Fischer, S., Kohnert, U., and Bode, W., 1997. Lysine 156 promotes the anomalous proenzyme activity of tPA: X-ray crystal structure of single-chain human tPA. *EMBO Journal* 16, 4797-4805.
- Reuning,U., Little,S.P., Dixon,E.P., Johnstone,E.M., Bang,N.U., 1993. Molecular cloning of cDNA for the bovine urokinase-type plasminogen activator receptor. *Thromb. Res.* 72, 59-70.
- Riccio,A., Grimaldi,G., Verde,P., Sebastio,G., Boast,S., Blasi,F., 1985. The human urokinase-plasminogen activator gene and its promoter. *Nucleic Acids Res.* 13, 2759-2771.
- Robbie,L.A., Bennett,B., Croll,A.M., Brown,P.A., Booth,N.A., 1996. Proteins of the fibrinolytic system in human thrombi. *Thromb. Haemost.* 75, 127-133.
- Robbins,K.C., Summaria,L., Hsieh,B., Shah,R.J., 1967. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. *J. Biol. Chem.* 242, 2333-2342.
- Roldan,A.L., Cubellis,M.V., Masucci,M.T., Behrendt,N., Lund,L.R., Dano,K., Appella,E., Blasi,F., 1990. Cloning and expression of the receptor for human urokinase plasminogen activator, a central molecule in cell surface, plasmin dependent proteolysis. *EMBO J.* 9, 467-474.
- Saksela,O., Rifkin,D.B., 1988. Cell-associated plasminogen activation: regulation and physiological functions. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4, 93-126.
- Samad,F., Loskutoff,D.J., 1996. Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol. Med.* 2, 568-582.
- Samad,F., Yamamoto,K., Loskutoff,D.J., 1996. Distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in murine adipose tissue in vivo. Induction by tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.* 97, 37-46.

- Samia,J.A., Alexander,S.J., Horton,K.W., Auron,P.E., Byers,M.G., Shows,T.B., Webb,A.C., 1990. Chromosomal organization and localization of the human urokinase inhibitor gene: perfect structural conservation with ovalbumin. *Genomics* 6, 159-167.
- SAS Institute, 2004. SAS/STAT Software. Version 9.0 for Windows. SAS Inst. Inc., Cary,NC.
- Schaller,J., Moser,P.W., Danegger-Muller,G.A., Rosselet,S.J., Kampf,U., Rickli,E.E., 1985. Complete amino acid sequence of bovine plasminogen. Comparison with human plasminogen. *Eur. J. Biochem.* 149, 267-278.
- Scott,R.W., Bergman,B.L., Bajpai,A., Hersh,R.T., Rodriguez,H., Jones,B.N., Barreda,C., Watts,S., Baker,J.B., 1985. Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J. Biol. Chem.* 260, 7029-7034.
- Seki,T., Miyasu,T., Noguchi,T., Hamasaki,A., Sasaki,R., Ozawa,Y., Okukita,K., Declerck,P.J., Ariga,T., 2001. Reciprocal regulation of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators in the differentiation of murine preadipocyte line 3T3-L1 and the hormonal regulation of fibrinolytic factors in the mature adipocytes. *J. Cell. Physiol.* 189, 72-78.
- Sharp,A.M., Stein,P.E., Pannu,N.S., Carrell,R.W., Berkenpas,M.B., Ginsburg,D., Lawrence,D.A., Read,R.J., 1999. The active conformation of plasminogen activator inhibitor 1, a target for drugs to control fibrinolysis and cell adhesion. *Structure* 7, 111-118.
- Sheets,M.D., Ogg,S.C., Wickens,M.P., 1990. Point mutations in AAUAAA and the poly (A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res* 18, 5799-5805.
- Shetty,S., Kumar,A., Johnson,A.R., Pueblitz,S., Holiday,D., Raghu,G., Idell,S., 1996. Differential expression of the urokinase receptor in fibroblasts from normal and fibrotic human lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 78-87.
- Smedsrod,B., Einarsson,M., Pertoft,H., 1988. Tissue plasminogen activator is endocytosed by mannose and galactose receptors of rat liver cells. *Thromb. Haemost.* 59, 480-484.
- Smith, K. L. and Todhunter, D. A., 1982. The physiology of mammary glands during the dry period and the relationship to infection. 26th Annual Meeting National Mastitis Council, 87-100.
- Sottrup-Jensen,L., Zajdel,M., Claeys,H., Petersen,T.E., Magnusson,S., 1975. Amino-acid sequence of activation cleavage site in plasminogen: homology with "pro" part of prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 2577-2581.
- Srinivasan,M., Lucey,J.A., 2002. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. *Journal of Dairy Science* 85, 1070-1080.

- Stack,S., Gonzalez-Gronow,M., Pizzo,S.V., 1991. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen. *Arch. Biochem. Biophys.* 284, 58-62.
- Stefansson,S., Muhammad,S., Cheng,X.F., Battey,F.D., Strickland,D.K., Lawrence,D.A., 1998. Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J. Biol. Chem.* 273, 6358-6366.
- Stelwagen,K., Politis,I., White,J.H., Zavizion,B., Prosser,C.G., Davis,S.R., Farr,V.C., 1994. Effect of milking frequency and somatotropin on the activity of plasminogen activator, plasminogen, and plasmin in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 77, 3577-3583.
- Stothard,P., 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA. *Biotechniques* 28, 1102-1104.
- Strausberg,R.L., Feingold,E.A., Grouse,L.H., Derge,J.G., Klausner,R.D., Collins,F.S., Wagner,L., Shenmen,C.M., Schuler,G.D., Altschul,S.F., Zeeberg,B., Buetow,K.H., Schaefer,C.F., Bhat,N.K., Hopkins,R.F., Jordan,H., Moore,T., Max,S.I., Wang,J., Hsieh,F., Diatchenko,L., Marusina,K., Farmer,A.A., Rubin,G.M., Hong,L., Stapleton,M., Soares,M.B., Bonaldo,M.F., Casavant,T.L., Scheetz,T.E., Brownstein,M.J., Usdin,T.B., Toshiyuki,S., Carninci,P., Prange,C., Raha,S.S., Loquellano,N.A., Peters,G.J., Abramson,R.D., Mullahy,S.J., Bosak,S.A., McEwan,P.J., McKernan,K.J., Malek,J.A., Gunaratne,P.H., Richards,S., Worley,K.C., Hale,S., Garcia,A.M., Gay,L.J., Hulyk,S.W., Villalon,D.K., Muzny,D.M., Sodergren,E.J., Lu,X., Gibbs,R.A., Fahey,J., Helton,E., Ketteman,M., Madan,A., Rodrigues,S., Sanchez,A., Whiting,M., Madan,A., Young,A.C., Shevchenko,Y., Bouffard,G.G., Blakesley,R.W., Touchman,J.W., Green,E.D., Dickson,M.C., Rodriguez,A.C., Grimwood,J., Schmutz,J., Myers,R.M., Butterfield,Y.S., Krzywinski,M.I., Skalska,U., Smailus,D.E., Schnerch,A., Schein,J.E., Jones,S.J., Marra,M.A., Mammalian Gene Collection Program Team, 2002. Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 18999-18903.
- Suh,T.T., Nerlov,C., Dano,K., Degen,J.L., 1994. The murine urokinase-type plasminogen activator receptor gene. *J. Biol. Chem.* 269, 25992-25998.
- Talhouk,R.S., Bissell,M.J., Werb,Z., 1992. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J. Cell Biol.* 118, 1271-1282.
- Tatarczuch,L., Philip,C., Lee,C.S., 1997. Involution of the sheep mammary gland. *J. Anat.* 190, 405-416.



- Thorsen,S., Philips,M., Selmer,J., Lecander,I., Astedt,B., 1988. Kinetics of inhibition of tissue-type and urokinase-type plasminogen activator by plasminogen-activator inhibitor type 1 and type 2. *Eur. J. Biochem.* 175, 33-39.
- Vagnarelli,P., Raimondi,E., Mazzieri,R., De Carli,L., Mignatti,P., 1992. Assignment of the human urokinase receptor gene (PLAUR) to 19q13. *Cytogenet. Cell Genet.* 60, 197-199.
- Vassalli,J.D., Baccino,D., Belin,D., 1985. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. *J. Cell Biol.* 100, 86-92.
- Vassalli,J.D., Sappino,A.P., Belin,D., 1991. The plasminogen activator/plasmin system. *J. Clin. Invest.* 88, 1067-1072.
- Wahle,E., Keller,W., 1996. The biochemistry of polyadenylation. *Trends Biochem. Sci.* 21, 247-250.
- Wallen,P., 1980. Biochemistry of plasminogen. In: Kline,D.L., Reddy,K.K.N. (Eds.), *Fibrinolysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1-24.
- Wallen,P., Pohl,G., Bergsdorf,N., Ranby,M., Ny,T., Jornvall,H., 1983. Purification and characterization of a melanoma cell plasminogen activator. *Eur. J. Biochem.* 132, 681-686.
- Wilde,C.J., Addey,C.V., Li,P., Fernig,D.G., 1997. Programmed cell death in bovine mammary tissue during lactation and involution. *Exp. Physiol.* 82, 943-953.
- Wilde,C.J., Knight,C.H., 1989. Metabolic adaptations in mammary gland during the declining phase of lactation. *Journal of Dairy Science* 72, 1679-1692.
- Wu,H.L., Chang,B.I., Wu,D.H., Chang,L.C., Gong,C.C., Lou,K.L., Shi,G.Y., 1990. Interaction of plasminogen and fibrin in plasminogen activation. *J. Biol. Chem.* 265, 19658-19664.
- Ye,R.D., Wun,T.C., Sadler,J.E., 1987. cDNA cloning and expression in *Escherichia coli* of a plasminogen activator inhibitor from human placenta. *J. Biol. Chem.* 262, 3718-3725.
- Zachos,T., Politis,I., Gorewit,R.C., Barbano,D.M., 1992. Effect of mastitis on plasminogen activator activity of milk somatic cells. *J. Dairy Res.* 59, 461-467.
- Zeheb,R., Gelehrter,T.D., 1988. Cloning and sequencing of cDNA for the rat plasminogen activator inhibitor-1. *Gene* 73, 459-468.
- Zhang,C., An,J., Strickland,D.K., Yepes,M., 2009. The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am. J. Pathol.* 174, 586-594.
- Zhang,L., Seiffert,D., Fowler,B.J., Jenkins,G.R., Thinner,T.C., Loskutoff,D.J., Parmer,R.J., Miles,L.A., 2002. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. *Thromb. Haemost.* 87, 493-501.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΘΕΟΔΩΡΟΥ

- Όνομα πατρός: Χαράλαμπος
- Όνομα Μητρός: Ευαγγελία
- Ημερομηνία γέννησης: 04/09/1979
- Διεύθυνση κατοικίας: Βιζυηνού 26, 11141 Αθήνα
- Τηλέφωνο: 6936841565

**ΣΠΟΥΔΕΣ**

- 1998-2001  
Bachelor in Biochemistry, King's College, University of London
- 2001-2002  
Master in Molecular Life Sciences, King's College, University of London
- 2005-2009  
Υποψήφιος Διδάκτωρ με θέμα: «Κλωνοποίηση των γονιδίων του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβατο: ο ρόλος τους στο μαστό», Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

**ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ**

- Certificate of Proficiency in English, University of Cambridge
- Πιστοποιητικό Γαλλικής γλώσσας Sorbonne I

**ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ**

1. Allen T., Koustenis A., **Theodorou G.**, Somers D.E., Kay S.A., Whitelam G.C., Devlin P.F. 2006. Arabidopsis FHY3 specifically gates phytochrome signaling to the circadian clock. *Plant Cell* 18:2506-2516
2. **Theodorou G.**, Kominakis A., Rogdakis E., Politis I. 2007. Factors affecting the plasmin-plasminogen system in milk obtained from three Greek dairy sheep breeds with major differences in milk production capacity. *Journal of Dairy Science* 90:3263-3269.
3. **Theodorou G.**, Fragou S., Chronopoulou R., Kominakis A., Rogdakis E., Politis I. 2007. Short communication: study of immune parameters in three Greek

dairy sheep breeds during the periparturient period. *Journal of Dairy Science* 90:5567-5571.

4. **Theodorou G.**, Bizelis I., Rogdakis E., Politis I. 2009. The ovine urokinase plasminogen activator and its receptor cDNAs: molecular cloning, characterization and expression in various tissues. *Gene* 443:158-169
5. **Theodorou G.**, Bizelis I., Rogdakis E., Politis I. 2009. The ovine plasminogen activator inhibitors type 1 and 2 cDNAs: molecular cloning, characterization and expression in various tissues. *Gene* (submitted)

### ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. 22<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Σπάρτη 4-6 Οκτωβρίου, 2006. Μελέτη του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο γάλα τριών ελληνικών φυλών προβάτου. Θεοδώρου Γ., Ρογδάκης Ε., Πολίτης Ι.
2. 22<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Σπάρτη 4-6 Οκτωβρίου, 2006. Μελέτη ανοσολογικών παραμέτρων κατά τη διάρκεια του γαλακτικού κύκλου σε τρεις ελληνικές φυλές προβάτου. Θεοδώρου Γ., Χρονοπούλου Ρ., Ρογδάκης Ε., Πολίτης Ι.
3. Annual Main Meeting of the Society for Experimental Biology, Glasgow, Scotland, 31 Μαρτίου- 4 Απριλίου, 2007. Arabidopsis FHY3 specifically gates phytochrome signalling to the circadian clock. P. Devlin, T. Allen, A. Koustenis, G. Theodorou, D. Somers, S. Kay and G. Whitelam.
4. 23<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Βόλος 3-5 Οκτωβρίου, 2007. Μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο πρόβατο. Θεοδώρου Γ., Χαβελέ Μ., Ρογδάκης Ε., Πολίτης Ι.
5. 24<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Άρτα 15-17 Οκτωβρίου, 2008. Κλωνοποίηση των γονιδίων του συστήματος πλασμίνης – πλασμινογόνου στο πρόβατο. Θεοδώρου Γ., Μπιζέλης Ι., Ρογδάκης Ε., Πολίτης Ι.
6. 24<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Άρτα 15-17 Οκτωβρίου, 2008. Πολυμορφισμός του γονιδίου DRB1 του ΜΣΙΣ στη φυλή προβάτου Άρτας. Σπετσαριάς Σ., Θεοδώρου Γ., Μπιζέλης Ι., Πολίτης Ι., Ρογδάκης Ε.
7. 25<sup>ο</sup> Ετήσιο Επιστημονικό συνέδριο Ελληνικής Ζωοτεχνικής Εταιρίας. Ναύπλιο 7-9 Οκτωβρίου, 2009. Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του συστήματος ενεργοποίησης του πλασμινογόνου στο λιπώδη ιστό του προβάτου. Θεοδώρου Γ., Μπιζέλης Ι., Πολίτης Ι., Ρογδάκης Ε.