#### ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

### ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΥΤΤΑΡΟΥ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

## &

# ΙΔΡΥΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑΣ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

# ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΜΟΡΙΟΥ ΤΗΣ ΒΙΤΕΛΛΟΓΕΝΙΝΗΣ ΚΑΙ ΒΙΤΕΛΛΙΝΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΧΕΡΣΑΙΟ ΚΑΒΟΥΡΙ *ΡΟΤΑΜΟΝ ΡΟΤΑΜΙΟS*.

ΛΟΥΙΖΑ Ε. ΠΑΤΕΡΑΚΗ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 1998 ΗΡΑΚΛΕΙΟ-ΚΡΗΤΗΣ

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Αντί προλόγουἰ	
Περίληψη	ii
Summary	iv
Κεφάλαιο 1	
Εισαγωγή	
1.1 Γενικά	1
1.2 Τόπος σύνθεσης και ρύθμιση της βιτελλογενίνης	3
1.3 Εξέλιξη των βιτελλογενινών	7
1.4 Βιοχημικός χαρακτηρισμός των βιτελλογενινών	8
1.4.1 Σπονδυλωτά	8
1.4.2 Ασπόνδυλα	9
Α. Ασχέλμινθες (Νηματώδη)	9
Β. Δακτυλιοσκώληκες (Πολύχαιτοι)	.10
Γ. Αρθρόποδα	.10
Γ1. Έντομα	.10
Γ2. Καρκινοειδή	.12
1.5. Σκοπός της παρούσης εργασίας	.14

# Κεφάλαιο 2

Υλικά και μέθοδοι	15
2.1. Πειραματόζωα	15
2.2. Προετοιμασία της αιμολέμφου και του εκχυλίσματος των αυγών	15
2.3. Καθαρισμός της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης	16
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης	17
2.5.Υπολογισμός μοριακής μάζας	

2.6. Πειράματα με dimethyl suberimidate	.19
2.7. Ισοηλεκτρικός εστιασμός	20
2.8. Πειράματα πρωτεόλυσης	20
2.9. Υπολογισμός πρωτείνης, υδατανθράκων, λιπιδίων και καροτινοειδών	21
2.10. Ανοσολογία	23
2.11 Επεξεργασία της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης και των υπομονάδων	
τους με γλυκοσιδάσες	.24
2.12. Επαγωγή της βιτελλογένεσης	25
2.13. In vivo πειράματα	.25
2.14. In vitro πειράματα	27
2.15. Αυτοραδιογραφία	.28

# Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα	.29
3.1. Ύπαρξη της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο και της βιτελλίνης στα	
ωοκύτταρα του Potamon potamios	.29
3.2. Καθαρισμός της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης	.31
3.3. Μοριακή μάζα της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης και των υπομονάδων τους	.33
3.4. Χαρακηρισμός των αποπρωτεϊνών της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης	.36
3.5. Ανάλυση των πρωτεολυτικών αποτελεσμάτων	.39
3.6. Λιπιδική και υδατανθρακική σύσταση της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης	.43
3.7. Τα καροτινοειδή της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης	.43
3.8. Επαγωγή της βιτελλογένεσης	.46
3.9. Ιn νίνο πειράματα	.51
3.10. In vitro πειράματα	.56

# Κεφάλαιο 4

Συζήτηση	60
Προοπτικές της παρούσης εργασίας	76
Βιβλιογραφία	77

#### Αντί προλόγου

Από τη θέση αυτή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν για την πραγματοποίηση της διδακτορικής εργασίας μου. Η πρώτη θέση ανήκει στο δάσκαλό μου καθηγητή Μανώλη Στρατάκη. Η βοήθεια και συμπαράστασή του όλα τα χρόνια της μαθητείας μου στο εργαστήριό του ήταν αμέριστες. Οι πάντα επικοδομητικές συζητήσεις για τα προβλήματα που παρουσιάζονταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποτέλεσαν το σημαντικώτερο βοήθημα για την πραγμάτωση της εργασίας μου.

Θέλω ακόμα να ευχαριστήσω τους κ.κ. καθηγητή Β. Μπουριώτη και αναπληρωτή καθηγητή Μ. Κοκκινίδη που αποτέλεσαν, μαζί με τον κ. Στρατάκη, την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, αλλά και μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής. Οι παρατηρήσεις τους σχετικά με τα αποτελέσματα των πειραμάτων μου ήταν πάντοτε χρήσιμες. Επίσης ευχαριστώ τους καθηγητές Δ. Γανωτάκη, Χ. Σαββάκη, Χ. Στουρνάρα και τον αναπληρωτή καθηγητή Γ. Χαλεπάκη, μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την αξιολόγηση της διδακτορικής μου εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης το τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης που με δέχτηκε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμά του και το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας για την οικονομική υποστήριξή του.

Για τη συνεργασία και τη βοήθειά του θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Γ. Φραγκιαδάκη. Οι συζητήσεις μας για την διεξαγωγή, αλλά και τα αποτελέσματα των πειραμάτων ήταν ωφέλιμες.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου, χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξή της η εργασία αυτή δε θα είχε πραγματοποιηθεί.

4

#### Περίληψη

Σκοπός της εργασίας που παρουσιάζεται εδώ, είναι ο βιοχημικός χαρακτηρισμός της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης από το χερσαίο καβούρι *Potamon potamios*, ο προσδιορισμός της μοριακής μορφής της πρόδρομης βιτελλογενίνης και η τροποποίησή της κατά τη μεταφορά της στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα, καθώς επίσης και η ταυτοποίηση του οργάνου σύνθεσης της βιτελλογενίνης.

Οι βιτελλογενίνες είναι πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί σε όλους τους ωότοκους οργανισμούς και αποτελούν την πρόδρομη μορφή των βιτελλινών των αυγών. Έχουν μελετηθεί τόσο στα ωότοκα σπονδυλωτά (πτηνά, αμφίβια, ψάρια), όσο και τα ασπόνδυλα (νηματώδη, σκώληκες, αρθρόποδα). Οι βιτελλογενίνες είναι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες που φέρουν στο μόριό τους λιπίδια, υδατάνθρακες και πολλές φορές χρωστικές (καροτινοειδή). Έχει βρεθεί ότι η σύνθεσή τους είναι εξαρτημένη από ορμονικά συστήματα.

Η μελέτη με ηλεκτροφορητική ανάλυση των πρωτεϊνών της αιμολέμφου, κατά τη διάρκεια του ετήσιου κύκλου των καβουριών Potamon potamios, έδειξε ότι στα θηλυκά καβούρια σε προβιτελλογενικό στάδιο και τα αρσενικά καβούρια δεν γίνεται βιτελλογένεση. Η ανάλυση των εκχυλισμάτων από αυγά ή ωοθήκες έδειξε την ύπαρξη της βιτελλίνης, η οποία ήταν ίδια με τη Βρέθηκε ότι και οι δύο βιτελλογενίνη. πρωτεΐνες είναι λιπο-γλυκοκαροτινοπρωτεΐνες. Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη από τον P. potamios υπήρχαν σε διαφορετικές πολυμερικές καταστάσεις, που αντιπροσωπεύουν μονομερείς, διμερείς και τριμερείς μορφές των δύο πρωτεϊνών. Επικρατέστερη μορφή ήταν η διμερής με μοριακή μάζα 551 kDa για τη βιτελλογενίνη και 510 kDa για τη βιτελλίνη. Παρά τη διαφορά στη μοριακή μάζα, η λιπιδική, καροτενοειδική και υδατανθρακική σύσταση των δύο πρωτεϊνών ήταν ίδια. Σε μετουσιωμένη μορφή οι δύο πρωτεΐνες έδωσαν τρία πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 115, 105 και 85 kDa. Η βιτελλογενίνη από ορισμένα ζώα περιείχε και ένα τέταρτο πολυπεπτίδιο με μοριακή μάζα 181 kDa, το οποίο όμως δεν ανιχνεύθηκε ποτέ στη βιτελλίνη των αυγών. Αυτό το πολυπεπτίδιο της βιτελλογενίνης (181 kDa), καθώς επίσης και τα άλλα τρία κοινά πολυπεπτίδια της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης (85, 105 και 115 kDa) ήταν ανοσοενεργά εναντίον του αντιορού που παρήχθηκε από το πολυπεπτίδιο 85 kDa της βιτελλογενίνης. Όπως έδειξαν τα πειράματα πρωτεόλυσης, τα πολυπεπτίδια 115 και 105 kDa προκύπτουν από το πολυπεπτίδιο 181 kDa με πρωτεολυτική διάσπασή του. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η βιτελλογενίνη συντίθεται σε μία μεγαλομοριακή και μία μικρομοριακή μορφή.

Τα πειράματα που έγιναν σε βιτελλογενικά θηλυκά καβούρια, με χρήση ραδιοσημασμένης μεθειονίνης in vivo, έδειξαν ότι η ραδιενέργεια κατανέμεται πρώτα μεταξύ των πολυπεπτιδίων με μοριακή μάζα 181 και 85 kDa. Η ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση της καθαρής βιτελλογενίνης που απομονώθηκε από την αιμολέμφο θηλυκών καβουριών μετά την αφαίρεση των μίσχων των ματιών, έδειξε στα περισσότερα ζώα την ύπαρξη των δύο πολυπεπτιδίων με μοριακή μάζα 181 και 85 kDa. Τα αποτελέσματα αυτά από τα in vivo πειράματα υποστηρίζουν την άποψη ότι τα πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 115 και 105 kDa της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης προέρχονται από το μεγαλύτερο πολυπεπτίδιο 181 kDa.

Πειράματα in vitro επώασης του ηπατοπαγκρέατος και της ωοθήκης από θηλυκά Potamon potamios με ραδιοσημασμένη μεθειονίνη, έδειξαν ότι τα δύο αυτά όργανα συνθέτουν πέντε πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 224, 181, 115, 105 και 85 kDa, ενώ το ηπατοπάγκρεας εμφανίζεται να εκκρίνει τα πολυπεπτίδια 181, 115, 105 και 85 kDa. Τα πολυπεπτίδια 115, 105 και 85 kDa αποτελούν κύρια συστατικά της βιτελλίνης των αυγών, ενώ το πολυπεπτίδιο 224 kDa βρέθηκε ότι είναι δευτερεύον συστατικό της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης από τα εκχυλίσματα του ηπατοπαγκρέατος και της ωοθήκης, αντίστοιχα.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι το πολυπεπτίδιο 224 kDa είναι η μεγαλομοριακή ενδοκυτταρική μορφή, ενώ το πολυπεπτίδιο 181 kDa η μεγαλομοριακή μεταφορική μορφή, των μορίων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης.

#### Summary

The aim of the work presented here is the biochemical characterization of vitellogenin and vitellin from the land crab *Potamon potamios*, the identification of the molecular form of precursor vitellogenin and its transformation during its transport to developing oocytes, as well as the identification of the organ that synthesizes vitellogenin.

Vitellogenins are proteins that have been found in all egg-laying organisms and are the precursor form of egg vitellin. They have been studied from egg-laying vertebrates (birds, amfibia, fish) and invertebrates (nematodes, annelids, arthropods). Vitellogenins are proteins with large molecular mass and carry in their molecules lipids, carbohydrates and in certain cases carotenoids. Vitellogenin synthesis is regulated on hormonal systems.

Electrophoretic analysis of the hemolymph protein from Potamon potamios during the annual reproduction cycle, revealed that vitellogenesis did not occur in males or in females of a previtellogenic stage. The analysis of ovarian and egg extracts revealed the presence of vitelliin, which was identical to vitellogenin. Both proteins were lipo-glyco-carotenoproteins and were present in three different aggregational states that represented monomeric, dimeric and trimeric forms of the proteins. In both proteins the predominant form was the dimeric, which had a molecular mass of 551 kDa for vitellogenin and 510 kDa for vitellin. In spite of the difference in terms of native molecular mass, the two proteins were similar in their lipid, carotenoid and carbohydrate composition. Under denaturing conditions both proteins consisted of three polypeptides with molecular mass of 115, 105 and 85 kDa. However, vitellogenin of some animals contained a fourth polypeptide with a molecular mass of 181 kDa. This polypeptide was never identified in egg vitellin. The 181 kDa polypeptide of vitellogenin and the other three polypeptides of vitellogenin and vitellin (115, 105 and 85 kDa) were immunoreactive against antiserum prepared from the 85 kDa polypeptide of vitellogenin. Futhermore, proteolytic cleavage experiments confirmed that the 115 and 105 kDa vitellogenin polypeptides were derived from the 181 kDa polypeptide. From this result we concluded that it was possible for vitellogenin to be synthesized as a large and a small polypeptide subunit.

Labeling studies using [<sup>35</sup>S]-methionine on normal vitellogenic animals showed that the radioactivity was first distributed among the 181 and 85 kDa polypeptides. SDS-PAGE analysis of purified hemolymph vitellogenin from eyestalk ablated females revealed, in most animals, two polypeptides with an apparent molecular mass of 181 and 85 kDa, respectively. These results, from the in vivo experiments, corroborated the view that the 115 kDa and 105 kDa vitellogenin and vitellin polypeptides are derived from the heaviest 181 kDa polypeptide.

In addition, it was demonstrated that hepatopancreas and ovaries of female *Potamon potamios* incubated in vitro with [<sup>35</sup>S]-methionine synthesized five polypeptides with apparent molecular mass of 224, 181, 115, 105 and 85 kDa, while the hepatopancreas appeared to secrete the 181, 115, 105 and 85 kDa polypeptides. The major 115, 105 and 85 kDa polypeptides were found to be components of egg vitellin, while the 224 kDa polypeptide was found to be a minor component of vitellogenin and vitellin from hepatopancreas and ovaries extract, respectively.

We infered that the 224 kDa polypeptide was the heavy intracellular form and the 181 kDa polypeptide the heavy transport form of vitellogenin and vitellin molecules.

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

#### **1.1.** Γενικά

Οι βιτελλογενίνες είναι ειδικές πρωτεΐνες που συντίθενται από τους μητρικούς ωότοκους οργανισμούς κατά τη διάρκεια της ωογένεσης. Η σύνθεση αυτή έχει ως σκοπό να εφοδιάσει το αναπτυσσόμενο έμβρυο με τα απαραίτητα, για την επιβίωση και ομαλή ανάπτυξή του, θρεπτικά συστατικά. Ανεξάρτητα από τον τόπο σύνθεσής τους, οι βιτελλογενίνες ανιχνεύονται πάντα στο αίμα του οργανισμού κατά το στάδιο της ωρίμανσης των ωοκυττάρων. Την περίοδο αυτή την αποκαλούμε βιτελλογένεση και γαρακτηρίζεται με ποσοτικές μεταβολές στην πρωτεϊνική σύσταση του αίματος. Οι βιτελλογενίνες πολλές φορές ονομάζονται και πρόδρομες βιτελλίνες γιατί απ' αυτές προκύπτουν οι βιτελλίνες των αυγών. Η μετατροπή αυτή, των βιτελλογενινών σε βιτελλίνες, γίνεται συνήθως με αλλαγή του πρωτεϊνικού μέρους (με επίδραση πρωτεασών) ή της χημικής σύστασης του μη πρωτεϊνικού μέρους του μορίου της βιτελλογενίνης (Dhadialla and Raikhel, 1990, Raikhel and Dhadialla, 1992, Meusy, 1980). Οι βιτελλογενίνες συχνά αναφέρονται και ως γλυκο-λιποπρωτεΐνες γιατί στο μόριό τους φέρουν ομοιοπολικά δεμένους υδατάνθρακες (συνήθως μαννόζη) και μη ομοιοπολικά δεμένα λιπίδια (Wang and Williams, 1980, Wang et al., 1983, Wallace and Bergink, 1974, Wyatt and Pan, 1978, Wallace et al., 1967, Meusy, 1980). Σε πολλά ζώα οι βιτελλογενίνες φέρουν στο μόριό τους γρωστικές, συνήθως καροτινοειδή, είναι δηλαδή γρωμοπρωτεΐνες (Wyatt and Pan, 1978, Wallace et al., 1967). Έχει βρεθεί επίσης, ότι οι βιτελλογενίνες περιέχουν στο μόριό τους διάφορα μέταλλα, συνήθως ασβέστιο (Ca) και ψευδάργυρο (Zn), χωρίς όμως να έγει επιβεβαιωθεί ο ρόλος των μετάλλων αυτών (Montorzi et al., 1994).

Η φυσική μοριακή μάζα των βιτελλογενινών ποικίλει από ομάδα σε ομάδα ζώων και κυμαίνεται περίπου από 200-600 kDa (Wyatt and Pan, 1978, Meusy, 1980, Wang and Williams, 1980). Συνήθως η διαφοροποίηση αυτή της μοριακής μάζας προέρχεται από την τεταρτοταγή δομή της πρωτεΐνης και λιγότερο από το ποσοστό των υδατανθράκων ή λιπιδίων που περιέχει. Οι βιτελλογενίνες περιέχουν 7-20% λιπίδια και 1-14% υδατάνθρακες. Η λιπιδική σύσταση του μορίου των βιτελλογενινών τις εντάσει στην κατηγορία των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) (Komatsu and Ando, 1992, Komatsu et al., 1993). Πολλές φορές όμως, κυρίως στα έντομα, η πυκνότητά τους φτάνει στο ανώτατο όριο για τις HDL, γι' αυτό συχνά αναφέρονται και ως λιποπρωτεΐνες πολύ υψηλής πυκνότητας (VHDL) (Wyatt and Pan, 1978).

Η εμφάνιση και η συγκέντρωση της βιτελλογενίνης στο αίμα ή την αιμολέμφο των ωότοκων οργανισμών είναι δείκτης της ταχύτητας έκκρισής της από τα όργανα που τη συνθέτουν, και πρόσληψής της από τα ωοκύτταρα. Όλοι οι ωότοκοι οργανισμοί συνθέτουν και εκκρίνουν τόση βιτελλογενίνη όση χρειάζεται για την ομαλή ανάπτυξη των ωοκυττάρων. Τα ωοκύτταρα επίσης έχουν αναπτύξει σύστημα που διευκολύνει την απορρόφηση της βιτελλογενίνης και τη μετατροπή της σε βιτελλίνη (Wang et al., 1983, Sharrock, 1984, Dhadialla and Raikhel, 1990). Η μεταφορά της βιτελλογενίνης μέσα στα ωοκύτταρα γίνεται με τη διεργασία της ενδοκύττωσης μέσω υποδοχέα (Opresko and Wiley, 1987, Raikhel and Dhadialla, 1992). Είναι προφανές ότι η συγκέντρωση της βιτελλογενίνης στο αίμα σε μία δεδομένη στιγμή, βρίσκεται σε συνάρτηση με τις δύο αυτές λειτουργίες, δηλαδή τη σύνθεση και έκκρισή της από τα υπεύθυνα για αυτό όργανα και την απορρόφησή της από τα ωοκύτταρα. Τις δύο αυτές λειτουργίες θα αναλύσουμε στην εργασία αυτή, όσον αφορά τη βιτελλογενίνη του *Potamon potamios*. Η ανεύρεση και απομόνωση του υπεύθυνου υποδοχέα για τη μεταφορα της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο στα ωοκύτταρα, είναι ο επόμενος στόχος για την πλήρη ανάλυση της μετατροπής της βιτελλογενίνης σε βιτελλίνη

Η περιοδική σύνθεση της βιτελλογενίνης και η ταύτιση της σύνθεσης της με την ωογένεση είναι μία βιολογική διεργασία που όπως αποδεικνύουν οι έρευνες σε ωότοκα ζώα εξαρτάται από ορισμένες ορμόνες. Στα ωότοκα σπονδυλωτά έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης εξαρτάται αυστηρά από τα οιστρογόνα. Ένεση της ορμόνης αυτής σε θηλυκά άτομα επάγει τη σύνθεση της βιτελλογενίνης από το ήπαρ και έκκρισή της στο αίμα (Bergink et al., 1974, Wang and Williams, 1980). Στα έντομα έχει βρεθεί ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης επάγεται από τη νεανική ορμόνη και σε ορισμένα από την εκδυσόνη (Engelmann, 1984, 1986, Fallon et al., 1974, Postlethwait et al., 1980). Στα καρκινοειδή, που όπως είναι γνωστό ανήκουν στα αρθρόποδα μαζί με τα έντομα, υπάρχουν πολλές ενδείξεις για την παρουσία της νεανικής ορμόνης και της εκδυσόνης. Μέχρι τώρα όμως δεν υπάρχει καμία αναφορά που να αποδεικνύει ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης επάγεται από τις δύο αυτές ορμόνες. Η εύρεση παραγόντων που επάγουν τη βιτελλογένεση, καθώς επίσης του υπεύθυνου οργάνου για τη σύνθεση της βιτελλογενίνης στα καρκινοειδή είναι δύο ακόμα σημεία στα οποία εστιάζεται η παρούσα εργασία. Συντίθεται η βιτελλογενίνη από τις ωοθήκες, όπως αναφέρουν οι αρχικές μελέτες, ή από το ηπατοπάγκρεας που είναι το ανάλογο του ήπατος όργανο των καρκινοειδών; Το μεγαλύτερο μέρος των πειραμάτων της εργασίας αυτής ασχολείται με την εύρεση της χημικής και πεπτιδικής οργάνωσης του μορίου της βιτελλογενίνης από τον P. potamios και των τροποποιήσεων που υφίσταται κατά τη μεταφορά του από την αιμολέμφο στα αναπτυσσόμενα αυγά. Τα αποτελέσματα αναφέρονται στη χημική σύσταση αυτής της γλυκο-λιπο-πρωτεΐνης, καθώς επίσης και στην πεπτιδική σύσταση του πρωτεϊνικού της μέρους. Αυτό μας επιτρέπει να την

συγκρίνουμε με βιτελλογενίνες άλλων καρκινοειδών και γενικά ωότοκων οργανισμών.

#### 1.2. Τόπος σύνθεσης και ρύθμιση της βιτελλογενίνης

βιτελλογενίνη συντίθεται στο ήπαρ υπό τη Στα σπονδυλωτά η ρύθμιση των οιστρογόνων. Από εκεί εκκρίνεται στο αίμα και μεταφέρεται στις ωοθήκες (Bergink et al., 1974, Tata, 1976, Wang and Williams, 1980), όπου η αφομοίωσή της από τα ωοκύτταρα γίνεται με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέα (Opresko and Wiley, 1987, Yusko et al., 1981). Όπως έδειξαν πειράματα με χρήση βιτελλογενίνης αλλά και άλλων πρωτεϊνών του αίματος που είχαν ραδιοσημανθεί, η βιτελλογενίνη εξαφανίζεται γρήγορα από την κυκλοφορία και αφομοιώνεται στις ωοθήκες με ρυθμό που είναι 50 φορές ταχύτερος απ' ότι για τις άλλες πρωτεΐνες του αίματος (όπως η αλβουμίνη) (Wallace and Bergink, 1974). Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι μπορεί να γίνει επαγωγή της σύνθεσης της βιτελλογενίνης και σε αρσενικά άτομα με τη βοήθεια των οιστρογόνων (Green and Tata, 1976, Bergink et al., 1974, Kwon et al., 1993). Έχει βρεθεί ότι στα αρσενικά άτομα Xenopus υπάρχουν χαμηλά επίπεδα υποδοχέων για τα οιστρογόνα και ότι οι μισοί από αυτούς βρίσκονται στους πυρήνες των κυττάρων του ήπατος. Όμως, μετά τη χορήγηση οιστρογόνων το επίπεδο των πυρηνικών υποδοχέων σχεδόν δεκαπλασιάζεται, πιθανόν εξαιτίας νέας σύνθεσης (Wahli et al., 1981). Στα πειράματα επαγωγής της σύνθεσης της βιτελλογενίνης με χρήση estradiol-17β παρατηρήθηκε ένα αποτέλεσμα "μνήμης" όταν δόθηκε δεύτερη δόση ορμόνης, μετά την εξαφάνιση της επαγόμενης βιτελλογενίνης από το αίμα (Bergink et al., 1974). Δηλαδή μετά τη δεύτερη δόση ανιχνεύεται γρηγορότερα σύνθεση της βιτελλογενίνης και η συγκέντρωσή της στο αίμα αυξάνεται με ταχύτερο ρυθμό από ότι μετά την πρώτη δόση. Τα οιστρογόνα δηλαδή έχουν τουλάχιστον τρία διαφορετικά αποτελέσματα στη σύνθεση της βιτελλογενίνης: το αποτέλεσμα "μνήμης", το αποτέλεσμα που κάνει τα κύτταρα που συνθέτουν τη βιτελλογενίνη να δίνουν πλήρη απόκριση μέσα σε 3-4 ώρες από την ενεργοποίηση, και τέλος το αποτέλεσμα της άμεσης απόκρισης στην ενεργοποίηση.

Στα έντομα η σύνθεση της βιτελλογενίνης γίνεται από ανάλογο του ήπατος των σπονδυλωτών όργανο, το λιπαρό σώμα. Από εκεί ελευθερώνεται στην αιμολέμφο και αφομοιώνεται από τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα, με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέα (König and Lanzrein, 1985, Kulakosky and Telfer, 1987, Koller et al., 1989, Raikhel and Dhadialla, 1992, Wang and Darey, 1992). Στα ανώτερα δίπτερα όμως *Drosophila melanogaster* και *Ceratitis capitata* (Bownes and Hames 1978, Rina and Mintzas 1987, 1988) έχει βρεθεί ότι οι βιτελλογενίνες συντίθενται και από τα επιθηλιακά θυλλακοκύτταρα των ωοθηκών και μεταφέρονται άμεσα στα ωοκύτταρα. Στα περισσότερα είδη οι βιτελλίνες αποτελούν το 60-90% του ολικού ποσού των διαλυτών πρωτεϊνών των αυγών. Πολλές από τις πρωτεΐνες της αιμολέμφου των εντόμων ανιχνεύονται στα αυγά, αλλά μόνο η βιτελλογενίνη συγκεντρώνεται 100 φορές από τα επίπεδά της στην αιμολέμφο.

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης της βιτελλογενίνης στα έντομα παίζουν δύο ορμόνες, η νεανική ορμόνη και η 20-υδροξυεκδυσόνη. Σε πολλά είδη που έχουν μελετηθεί και ειδικά στα δίπτερα έχει βρεθεί ότι, ή και οι δύο ορμόνες ή μόνο η 20-υδροξυεκδυσόνη σχετίζονται με τη ρύθμιση των επιπέδων της βιτελλογενίνης. Στα είδη που η έκφραση της βιτελλογενίνης ρυθμίζεται μόνο από την νεανική ορμόνη, η ρύθμιση αυτή δεν αφορά μόνο τη σύνθεση της βιτελλογενίνης, αλλά και άλλες διαδικασίες οι οποίες είναι απαραίτητες για μια κανονική βιτελλογένεση (Engelmann, 1984). Η δράση της νεανικής ορμόνης συνίσταται στην υποκίνηση της σύνθεσης της βιτελλογενίνης, πιθανότατα ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των γονιδίων της βιτελλογενίνης (Engelmann, 1986). Αλλατεκτομή σε θηλυκά Leucophaea maderae ανέστειλε τη σύνθεση της βιτελλογενίνης, όταν όμως στα έντομα αυτά χορηγήθηκε νεανική ορμόνη ή εμφυτεύθηκαν corpora allata παρατηρήθηκε ενεργοποίηση του μηγανισμού σύνθεσης της βιτελλογενίνης (Engelmann, 1969). Στη Locusta migratoria η νεανική ορμόνη επάγει τη σύνθεση της βιτελλογενίνης τόσο in vivo, όσο και σε in vitro καλλιέργειες λιπαρού σώματος (Wyatt, 1987). Σε ορισμένα λεπιδόπτερα όμως, όπως στην Hyalophora cecropia και το Bombyx mori η νεανική ορμόνη δεν παίζει κανένα ρόλο στη σύνθεση της βιτελλογενίνης (Pan, 1977). Στη Phormia regina η νεανική ορμόνη έχει ζωτικό ρόλο στην ωογένεση, αφού κανονίζει την αφομοίωση, αλλά όχι τη σύνθεση, της βιτελλογενίνης (Stoffolano Jr et al., 1992). Τέλος, στη Drosophila melanogaster και το Aedes aegypti υπεύθυνη ορμόνη για τη σύνθεση της βιτελλογενίνης είναι η 20υδροξυεκδυσόνη (Fallon et al. 1974). Πρέπει να αναφερθεί ακόμα ότι έχει γίνει επαγωγή της σύνθεσης της βιτελλογενίνης και σε αρσενικά άτομα με τη βοήθεια της νεανικής ορμόνης και εκδυσόνης (Mundall et al., 1979, Postlethwait et al., 1980).

Στα καρκινοειδή αρχικά πίστευαν ότι η βιτελλογενίνη συντίθεται μόνο στις ωοθήκες. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται από πολλές εργασίες οι οποίες αναφέρουν ότι οι ωοθήκες των Penaeus japonicus (Yano and Chinzei, 1987), Penaeus vannamei (Rankin et al., 1989), Penaeus semisulcatus (Browdy et al 1990), Procambarus sp. (Lui et al., 1974, Lui and O'Connor, 1976), Pachygrapsus crassipes (Lui and O'Connor, 1977), Uca pugilator (Eastman-Reks and Fingerman, 1985) και Callinectes sapidus (Lee and Watson, 1995) ενσωματώνουν στη βιτελλίνη ραδιοσημασμένα αμινοξέα in vitro. Σήμερα υπάρχουν εργασίες που δείχνουν ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης γίνεται και στο ηπατοπάγκρεας. Οι Quackenbush and Keeley (1988) και Quackenbush (1989) αναφέρουν ότι και η ωοθήκη και το ηπατοπάγκρεας των Uca pugilator και Penaeus vannamei ενσωματώνουν ραδιοσημασμένα αμινοξέα σε πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται με το αντίσωμα που έχει παραχθεί εναντίον της βιτελλίνης των αυγών. Επίσης ανοσοιστοχημικές μελέτες στα καβούρια Carcinus maenas και Libinia emarginata έδειξαν ότι το ηπατοπάγκρεας περιέχει ανοσοενεργές πρωτεΐνες για το αντίσωμα της βιτελλίνης, οι οποίες παράγονται από ειδικά κύτταρα, τα οποία ονομάστηκαν βιτελλογενοκύτταρα (Paulus and Laufer, 1987). Στα ισόποδα και τα αμφίποδα (Meusy et al., 1983) έχει αναφερθεί σύνθεση της βιτελλογενίνης και από το λιπώδη ιστό. Επίσης και στο Parapenaeus longirostris (Tom et al., 1987b) ο λιπώδης ιστός δείχνει θετική ανοσοενεργότητα ως προς το αντίσωμα που έχει παραχθεί εναντίον της βιτελλίνης.

Εργασίες που δείχνουν την ανάπτυξη των ωοκυττάρων στα καρκινοειδή χωρίζουν τη βιτελλογενική περίοδο σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται με μία βραδεία ανάπτυξη των ωοκυττάρων και συμπίπτει με την περίοδο που αρχίζει μετά την ωοτοκία και διαρκεί μέχρι την επόμενη βιτελλογενική περίοδο. Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται ως πρωτογενής βιτελλογένεση (Meusy, 1980). Η δεύτερη φάση περιλαμβάνει την περίοδο που τα ωοκύτταρα αναπτύσσονται γρήγορα και τα μητρικά ζώα εμφανίζουν τη βιτελλογενίνη στην αιμολέμφο. Η περίοδος αυτή ονομάζεται δευτερογενής βιτελλογένεση (Meusy, 1980, Dehn et al., 1983, Derelle et al., 1986). Η ανάλυση που έγινε στον Potamon potamios, έδειξε ότι η βιτελλογενίνη συντίθεται κατά την περίοδο της πρωτογενούς φάσεως στις ωοθήκες, ενώ στη δευτερογενή φάση και στο ηπατοπάγκρεας (Pateraki and Stratakis, 1997). Η ύπαρξη καρκινοειδών που η ωοτοκία επαναλαμβάνεται περισσότερες της μιας φοράς το έτος, και η μελέτη της βιτελλογένεσης σε ζώα που δεν αναπτύσσονται σε πειραματικούς σταθμούς, είναι πιθανόν ο λόγος που υπάρχουν ακόμα και σήμερα αντικρουόμενες απόψεις, όσον αφορά τον τόπο σύνθεσης της βιτελλογενίνης.

Στα καρκινοειδή, αντίθετα με τα ωότοκα σπονδυλωτά και τα έντομα που ορμόνες επάγουν τη σύνθεση της βιτελλογενίνης, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη μιας ορμόνης η οποία αναστέλει τη σύνθεση της βιτελλογενίνης. Η ορμόνη αυτή ονομάζεται ορμόνη αναστολής της βιτελλογένεσης (VIH, vitellogenesis inhibiting hormone) ή ορμόνη αναστολής των γονάδων (GIH, gonad inhibiting hormone) και ανήκει στην οικογένεια των νευροπεπτιδιακών ορμονών (Bomirski and Klek, 1974, Quackenbush, 1986). Παράγεται από το σύμπλοκο του Χ-οργάνου και ενός νευροενδοκρινή αδένα (sinus gland), το οποίο βρίσκεται στη βάση των μίσχων των ματιών των ζώων. Η ορμόνη αυτή έχει απομονωθεί από το σύμπλοκο αυτό νευροενδοκρινή αδένα του *Procambarus bouvieri* (Aguilar et al., 1992) και η μοριακή της μάζα είναι 8.3 kDa. In vivo και in vitro πειράματα απέδειξαν το ρόλο της ορμόνης αυτής στο σχηματισμό και την ανάπτυξη των ωοκυττάρων (Lee and Watson, 1995, Quackenbush,1989 και Quackenbush and Keeley, 1988). Η δράση της VIH μπορεί να γίνεται άμεσα στις γονάδες (Eastmann-Reks and Fingerman, 1984 και Quackenbush and Herrnikind, 1981) ή στη δέσμευση της βιτελλογενίνης στον υποδοχέα της στη μεμβράνη των ωοκυττάρων (Jugan and Soyez, 1985). Αφαίρεση των μίσχων των ματιών (και κατά συνέπεια του σύμπλοκου νευροενδοκρινή αδένα) από τα θηλυκά άτομα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της σύνθεσης της βιτελλογενίνης (Quackenbush, 1986, Charniaux-Cotton, 1985). Στα καρκινοειδή δεν έχει αναφερθεί ποτέ επαγωγή της σύνθεσης της βιτελλογενίνης σε αρσενικά άτομα.

Πρέπει ακόμα να σημειωθεί ότι και στα καρκινοειδή έχει πιστοποιηθεί η ύπαρξη της νεανικής ορμόνης (Laufer et al., 1984, Laufer et al., 1987), όμως δεν έχει διερευνηθεί ακόμα ο ρόλος της στη σύνθεση της βιτελλογενίνης.

#### 1.3. Εξέλιξη των βιτελλογενινών.

Οι βιτελλογενίνες είναι πρωτεΐνες που συντίθενται στη διάρκεια της βιτελλογένεσης, που όπως αναφέραμε είναι μια βασική λειτουργία των ωότοκων οργανισμών. Επομένως, όπως ήταν αναμενόμενο, οι βιτελλογενίνες από διαφορετικούς οργανισμούς έχουν μεγάλο βαθμό ομολογίας (Chen et al., 1997, Romans et al., 1995). Εκτός από αυτό υπάρχουν επίσης εργασίες που δείχνουν βαθμό ομολογίας των βιτελλογενινών από διάφορους οργανισμούς και του φιμπρινογόνου (Doolittle and Riley, 1990).

Σύγκριση της αμινοξικής ακολουθίας βιτελλογενινών από σπονδυλωτά (Gallus gallus, Xenopus laevis, Fundulus heteroclitus, Acipenser transmontanus και Ichthyomyzon unicuspus), νηματώδη (Caenorhabdytis elegans) και έντομα (Anthonomous grandis, Bombyx mori, Athalia rosae, Lymantria dispar και Aedes aegypti) έδωσε πέντε περιοχές μέσα στο μόριο των πρωτεϊνών αυτών που η στοίχιση ήταν εύκολη (Chen et al., 1997). Τα κομμάτια των ακολουθιών που είναι προβληματικά στη στοίχιση είναι εκείνα που περιλαμβάνουν ή συνορεύουν με τις περιοχές καταλοίπων σερίνης (polyserine domains) από τις βιτελλογενίνες των εντόμων και οι περιοχές της φωσβιτίνης από τις βιτελλογενίνες των σπονδυλωτών.

Στα σπονδυλωτά η συντήρηση των ακολουθιών της βιτελλογενίνης είναι σχετικά υψηλή εκτός από τις πολυσερινικές περιοχές (φωσβιτίνη) και τις γειτονικές τους. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η φωσβιτίνη είχε γρηγορότερο ρυθμό εξέλιξης από τη λιποβιτελλίνη. Επίσης η μεγάλη διαφοροποίηση που παρατηρείται μεταξύ των πολυσερινικών περιοχών στα έντομα υποδεικνύει ότι η εξέλιξη αυτών των περιοχών είχε επιταχυνθεί επίσης. Η ομολογία των βιτελλογενινών από τα σπονδυλωτά, νηματώδη και έντομα επιβεβαιώνεται και από την ανάλυση των αυστηρά συντηρημένων καταλοίπων. Δηλαδή από τα 25 αυστηρά συντηρημένα κατάλοιπα μεταξύ δέκα ακολουθιών από βιτελλογενίνες, πέντε είναι γλυκίνη, πέντε προλίνη και τέσσερα κυστεΐνη, αμινοξέα που είναι σημαντικά για τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (Chen et al., 1997).

Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι οι βιτελλογενίνες από τα *Caenorhabdytis elegans, Gallus gallus* και *Xenopus laevis* περιέχουν ένα κομμάτι που αποτελείται από 250 αμινοξέα το οποίο είναι ομόλογο με μια επαναλαμβανόμενη περιοχή του παράγοντα von Willebrand, μία πρωτεΐνη των σπονδυλωτών που σχετίζεται με την πήξη του αίματος (Baker, 1988).

## 1.4. Βιοχημικός χαρακτηρισμός των βιτελλογενινών

## 1.4.1. Σπονδυλωτά

Οι πιο καλά μελετημένες βιτελλογενίνες των ωότοκων σπονδυλωτών είναι αυτές από το βάτραχο *Xenopus laevis* και την όρνιθα *Gallus gallus*. Επίσης έχουν μελετηθεί οι βιτελλογενίνες από τα ψάρια και τα ερπετά.

Η βιτελλογενίνη που υπάρχει στο αίμα του X. laevis έχει στη φυσική κατάσταση μοριακή μάζα 440-460 kDa. Όταν μετουσιωθεί παρουσιάζεται υπό τη μορφή δύο ομολόγων πολυπεπτιδίων που έχουν μοριακή μάζα περίπου 200 kDa το καθένα. Στο μόριο είναι προσδεμένα επίσης 12% λιπίδια, 1.5% φωσφόρος και 1% υδατάνθρακες. Η φωσφορυλίωση και η γλυκοζυλίωση ανήκουν στις μεταμεταφραστικές διεργασίες που γίνονται στα κύτταρα που συνθέτουν τη βιτελλογενίνη πρωτεολύεται μέσα στα ωοκύτταρα και δίνει τη λιποβιτελλίνη και τη φωσβιτίνη. Η λιποβιτελλίνη περιέχει 22% λιπίδια και 2% φώσφορο και αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακή μάζα 120 και 31 kDa. Φωσφορυλιωμένη είναι μόνο η μικρή υπομονάδα, σε αντίθεση με τη μεγάλη. Η φωσβιτίνη έχει μοριακή μάζα 35 kDa και το 56% είναι κατάλοιπα σερίνης, ενώ το 10% προσδεμένος φώσφορος (Bergink and Wallace, 1974 και Wallace and Bergink, 1974). Η λιποβιτελλίνη και η φωσβιτίνη μαζί αποτελούν το 90% του πρωτεϊνικού περιεχομένου των ώριμων ωοκυττάρων.

Η βιτελλογενίνη του *Χ. laevis* περιέχει επίσης στο μόριό της ψευδάργυρο και ασβέστιο. Τα άτομα του ψευδαργύρου βρίσκονται στην περιοχή της λιποβιτελλίνης, ενώ το ασβέστιο είναι προσδεμένο στις φωσφορικές ομάδες της φωσβιτίνης (Montorzi et al., 1994 και Montorzi et al., 1995).

Η βιτελλογενίνη από το *G. gallus* σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση αναλύεται σε τρία πεπτίδια, τις βιτελλογενίνες Ι, ΙΙ (η οποία είναι η κυριώτερη) και ΙΙΙ, τα οποία είναι μεταξύ τους ανοσολογικά ξένα (Wang and Williams, 1980, Wang et al., 1983). Οι βιτελλογενίνες Ι, ΙΙ και ΙΙΙ είναι μεγαλομοριακές πρωτεΐνες, με μοριακή μάζα 260, 246 και 210 kDa αντίστοιχα, γλυκοζυλιωμένες και περιέχουν στο μόριό τους φωσφόρο (116, 116 και 44 mol, αντίστοιχα). Η βιτελλογενίνη ΙΙ είναι η αφθονότερη από τις τρεις και από τα πρωτεολυτικά της προϊόντα έχουν ταυτοποιηθεί η αμινοτελική περιοχή, (λιποβιτελλίνη με μοριακή μάζα 120 kDa) και η περιοχή που είναι πλούσια σε φωσφόρο και σερίνες (φωσβιτίνη). Έχουν απομονωθεί δύο φωσβιτίνες, με μοριακή μάζα 34 και 28 kDa (Clark, 1970). Βρέθηκαν επίσης (Yamamura et al., 1995) δύο γλυκοπρωτεΐνες των αυγών, 40 και 42 kDa που αποτελούν πρωτεολυτικά προϊόντα της βιτελλογενίνης ΙΙ και βιτελλογενίνης Ι αντίστοιχα. Η 40 kDa πρωτεΐνη έχει ταυτοποιηθεί ως το καρβοζυτελικό κομμάτι της βιτελλογενίνης ΙΙ, που είναι πλούσιο σε κυστεΐνες.

Στα ψάρια πιο συστηματικά μελετημένες είναι οι βιτελλογενίνες των τελεόστεων. Στη φυσική κατάσταση η μοριακή μάζα των βιτελλογενινών των τελεόστεων είναι γύρω στα 500 kDa. Σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση οι βιτελλογενίνες από τα περισσότερα είδη δίνουν δύο ζώνες με μοριακή μάζα 220 και 130 kDa (Lee et al. 1992). Οι πρωτεΐνες των αυγών που προέρχονται από τη βιτελλογενίνη είναι η λιποβιτελλίνη και η φωσβιτίνη, καθώς επίσης και το β΄-στοιχείο (Jared and Wallace, 1968). Η φωσβιτίνη, που αποτελεί το 3% των ολικών πρωτεϊνών των αυγών είναι φωσφοπρωτεΐνη, πλούσια σε σερίνες με μοριακή μάζα που ποικίλλει [23 kDa στο Hucho perryi (Hiramatsu and Hara, 1996), 43 kDa στο Pseudopleuronectes americaus (Campbell and Idler, 1976)]. Το β΄-στοιχείο μπορεί να υπάρχει ως διμερές ή μονομερές ενός πεπτιδίου με μοριακή μάζα περίπου 15-17 kDa (Hiramatsu and Hara, 1996).

Στην πέστροφα Oncorhynchus mykiss η βιτελλογενίνη (με φυσική μοριακή μάζα 220-240 kDa) διασπάται σε δύο πρωτεΐνες κατά τη μεταφορά της στα αυγά, τις πρωτεΐνες των αυγών 1 και 2. Η πρωτεΐνη των αυγών 1 είναι αντίστοιχη της λιποβιτελλίνης, ενώ η 2 είναι σύμπλεγμα της φωσβιτίνης και του β΄-στοιχείου (Hara and Hirai, 1978).

#### 1.4.2. Ασπόνδυλα

#### Α. Ασχέλμινθες (Νηματώδη)

Στο *Caenorhabditis elegans* υπάρχουν δύο τάξεις πρωτεϊνών των αυγών. Η πρώτη περιλαμβάνει δύο βιτελλογενίνες με μοριακή μάζα περίπου 170 kDa, οι οποίες δεν πρωτεολύονται. Η δεύτερη περιλαμβάνει δύο πρωτεΐνες 115 και 88 kDa που προέρχονται από μία πρόδρομη βιτελλογενίνη με μοριακή μάζα 180 kDa, η οποία όμως δε διατηρείται πολύ σε αυτή τη μορφή.

Η βιτελλογενίνη από το *Caenorhabditis elegans* συντίθεται μόνο στο έντερο των ώριμων ερμαφρόδιτων ατόμων. Από εκεί εκκρίνεται συν-μεταφραστικά στην κοιλότητα του σώματος, όπου η βιτελλογενίνη 180 kDa πρωτεολύεται και τα προϊόντα αυτής της διάσπασης, οι βιτελλίνες, αφομοιώνονται από τις γονάδες (Sharrock 1983, 1984).

# Β. Δακτυλιοσκώληκες (Πολύχαιτοι)

Οι βιτελλίνες των δακτυλιοσκωλήκων έχουν μελετηθεί σε τρία είδη, τα Nereis diversicolor (Bonnier and Baert, 1992), Nereis virens (Fischer and Schmitz, 1981) και Perinereis cultifera (Baert et al., 1984 και Baert and Slomianny, 1987). Η μοριακή μάζα της βιτελλίνης, στη φυσική κατάσταση, είναι και στα τρία είδη σχεδόν η ίδια, 400, 420 και 380 kDa αντίστοιχα. Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση της βιτελλογενίνης από αυτά τα είδη έδωσε για τη Nereis diversicolor επτά πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 140, 128, 110, 94, 22, 18 και 14 kDa, ενώ για την Perinereis cultifera τέσσερα πολυπεπτίδια μοριακής μάζας 98, 22, 20 και 16 kDa. Για τη Nereis virens έχουν ταυτοποιηθεί μόνο δύο πολυπεπτίδια, 13.5 και 20.8 kDa.

Η βιτελλογενίνη παράγεται σε ειδικά κύτταρα (coelomocytes) του κοιλώματος των θηλυκών και είναι διμερής πρωτεΐνη που στη φυσική κατάσταση η μοριακή μάζα της είναι 530 kDa και αποτελείται μόνο από ένα πολυπεπτίδιο (μοριακής μάζας 176 kDa στην *P. cultifera* και 175 kDa στην *N. diversicolor*). Η βιτελλογενίνη αυτή μετά την προσρόφησή της στα ωοκύτταρα μετατρέπεται σταδιακά σε μορφές μικρότερου μοριακού βάρους, μέχρι το τελικό της προϊόν τη βιτελλίνη. Η αφομοίωση της βιτελλογενίνης από τα ωοκύτταρα γίνεται με ενδοκύττωση μέσω υποδοχέα που υπάρχει στην επιφάνεια των ωοκυττάρων (Hafer et al., 1992).

# Γ. Αρθρόποδα

# Γ1. Έντομα

Οι βιτελλογενίνες των περισσοτέρων εντόμων είναι φωσφο-λιπογλυκοπρωτεΐνες που συντίθενται ως ένα ή δύο μεγάλα πρόδρομα πεπτίδια (200-240 kDa). Αυτά τα πρόδρομα πεπτίδια πρωτεολύονται, γλυκοζυλιώνονται και φωσφορυλιώνονται για να μετατραπούν έτσι σε μεγάλης μοριακής μάζας πρωτεΐνες. Η βιτελλογενίνη στη φυσική της κατάσταση έχει μοριακή μάζα 200-600 kDa και αποτελείται από υπομονάδες μεγάλης (140-200 kDa) και μικρής (40-60 kDa) μοριακής μάζας (Wyatt and Pan, 1978, Izumi et al., 1994). Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι στα λεπιδόπτερα *Manduca sexta* (Kawooya and Law, 1983 και Kawooya et al.,1986) και *Hyalophora cecropia* (Telfer and Pan, 1989) έχει βρεθεί μία μικροβιτελλογενίνη (η οποία συντίθεται στο λιπαρό σώμα) με μοριακή μάζα περίπου 31 kDa.

Στα έντομα υπάρχουν τρεις ξεχωριστές ομάδες βιτελλινών (Harnish and White, 1982). Η πρώτη περιλαμβάνει τις τάξεις Εφυμενόπτερα, Ορθόπτερα, Ημίπτερα, Δερμάπτερα, Κολεόπτερα και Λεπιδόπτερα. Οι βιτελλίνες της ομάδας αυτής είναι λιπογλυκοπρωτεΐνες που περιέχουν 1-14% υδατάνθρακες (κατά το μεγαλύτερο ποσοστό μαννόζη) και 7-16% λιπίδια. Η μοριακή μάζα των φυσικών πρωτεϊνών κυμαίνεται από 270-550 kDa (Harnish and Wyatt, 1982, Imboden et al., 1987). Σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες αυτές παρουσιάζουν πολυπεπτίδια σε δύο διακριτές περιοχές. Η μία περιλαμβάνει πολυπεπτίδια μεγάλης μοριακής μάζας (100-180 kDa) και η άλλη πολυπεπτίδια μικρής μοριακής μάζας (43-86 kDa) (Chino et al., 1977, Izumi et al., 1980, Harnish and Wyatt, 1982, Imboden et al., 1987, Wojchowski and Kunkel, 1987, Rosell and Coons, 1991, Hiremath and Eshita, 1992, Heilmann et al., 1993). Συνήθως το μόριο της φυσικής πρωτεΐνης αποτελείται από ένα πολυπεπτίδιο μεγάλης μοριακής μάζας και ένα μικρής. Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις που το μόριο αποτελείται από περισσότερα των δύο πολυπεπτίδια, όπως στο Bombyx mori που το μόριο της φυσικής πρωτεΐνης είναι τετραμερές (Izumi et al., 1980). Οι τιμές που έχουν αναφερθεί για το ισοηλεκτρικό σημείο των βιτελλινών αυτών κυμαίνονται από 5.7 έως 6.9, ενώ οι τιμές για τις αντίστοιχες βιτελλογενίνες είναι από 5 έως 7.2 (Wyatt and Pan, 1978, Chinzei et al., 1981, Pereira and de Bianchi, 1983, Rosell and Coons, 1991)

Στη δεύτερη ομάδα περιλαμβάνονται οι τάξεις Υμενόπτερα και κατώτερα Δίπτερα. Εδώ οι φυσικές βιτελλίνες έχουν μοριακή μάζα που κυμαίνεται μεταξύ 200 και 350 kDa και σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση οι πρωτεΐνες αυτές δίνουν πολυπεπτίδια μόνο μεγάλης μοριακής μάζας (170-190 kDa) (Harnish and Wyatt, 1982). Στην Apis mellifera η βιτελλίνη είναι μονομερής. Για το Aedes aegypti παλαιότερη εργασία (Harnish and Wyatt, 1982) αναφέρει ότι η βιτελλίνη του ανήκει σε αυτήν την κατηγορία και είναι διμερές ενός μόνο πολυπεπτιδίου με μοριακή μάζα 170 kDa. Νεώτερη όμως εργασία (Raikhel and Bose, 1988) αναφέρει ότι η βιτελλίνη αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακή μάζα 200 και 65 KDa.

Τέλος στα ανώτερα Δίπτερα (τρίτη ομάδα) η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δείχνει ότι οι βιτελλίνες αποτελούνται μόνο από μικρής μοριακής

μάζας πολυπεπτίδια (γύρω στα 50 kDa), ενώ η φυσική πρωτεΐνη έχει μοριακή μάζα 200 kDa περίπου (Bownes and Hames, 1977, Harnish and Wyatt, 1982, Fourney et al., 1982).

## Γ2. Καρκινοειδή

Οι βιτελλογενίνες και οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι λιπογλυκο-καροτινοπρωτεΐνες μεγάλης μοριακής μάζας και δε μπορούν να διακριθούν η μία από την άλλη με ανοσολογικές τεχνικές (Wallace et al., 1967, Kerr, 1969, Fyffe and O'Connor, 1974, Meusy, 1980, Derelle et al., 1986). Οι βιτελλογενίνες των καρκινοειδών σε φυσική μορφή έχουν μοριακή μάζα 260-560 kDa και αποτελούνται από δύο ή περισσότερες υπομονάδες που το μέγεθος τους ποικίλλει (Meusy, 1980, Puppione et al., 1986, Komatsu et al., 1993, Chang et al., 1994).

Στα βραχύουρα δεκάποδα υπάρχουν πληροφορίες για αρκετά είδη, όσον αφορά τον αριθμό και το μέγεθος των υπομονάδων της βιτελλογενίνης. Οι βιτελλογενίνες των Callinectes sapidus (Lee and Puppione, 1988) και Cancer antenarius (Puppione et al., 1986) έχουν τρία πεπτίδια με μοριακή μάζα 190, 107 και 78 kDa. Αυτές οι πρωτεΐνες υπάρχουν στην αιμολέμφο των ώριμων θηλυκών που βρίσκονται σε περίοδο βιτελλογένεσης, αλλά και στα αυγά του Cancer antenarius. Στο καβούρι Uca pugilator η βιτελλίνη αποτελείται από δύο υπομονάδες με μοριακή μάζα 103 και 81 kDa (Quackenbush and Keeley, 1988). Η βιτελλογενίνη των Charybdis feriata και Eriocheir japonicus αποτελείται από τρία πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 180, 100 και 80 kDa (Komatsu et al., 1993). Η βιτελλίνη του Carcinus maenas έχει φυσική μοριακή μάζα 500 kDa και αποτελείται από δύο υπομονάδες, 82 και 72 kDa (Andrieux and Frescheville, 1992). Στο καβούρι Emerita asiatica (Tirumalai and Subramoniam, 1992) η βιτελλογενίνη αποτελείται από οκτώ πεπτίδια με μοριακή μάζα στην περιοχή από 38-91 kDa. Στα αυγά από το ίδιο είδος υπάρχουν δύο βιτελλίνες, οι Lv I και Lv II, οι οποίες σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση δίνουν δύο πεπτίδια με μοριακή μάζα 109 και 105 kDa και έξι πεπτίδια στην περιοχή 42-65 kDa, αντίστοιχα.

Στα μακρύουρα δεκάποδα τα αποτελέσματα που υπάρχουν δείχνουν ότι η μετατροπή της βιτελλογενίνης σε βιτελλίνη συνοδεύεται με εξαφάνιση της υπομονάδας με τη μεγαλύτερη μοριακή μάζα (Meusy, 1980). Στο Penaeus monodon (Chang et al., 1994) όταν η βιτελλογενίνη μεταφέρεται στα ωοκύτταρα, η βαριά αλυσίδα (170 kDa) διασπάται μερικά και μετατρέπεται σε βιτελλίνη σε συνδυασμό με την ελαφριά αλυσίδα (82 kDa). Όμως σε προγενέστερες εργασίες (Quinitio et al., 1990, Chen and Chen, 1993) έχει αναφερθεί η ύπαρξη υπομονάδας μεγάλης μοριακής μάζας στη βιτελλίνη από το Penaeus monodon. Η βιτελλογενίνη από το Macrobrachium rosenbergii αποτελείται από δύο πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 95 και 85 kDa (Komatsu et al., 1993), ενώ για τη βιτελλίνη αναφέρονται δύο κύρια πολυπεπτίδια 105 και 92 kDa (Sagi et al., 1995). Η βιτελλογενίνη από το Penaeus chinesis έχει δύο πολυπεπτίδια 191 και 85 kDa (Chang and Jeng, 1995). Οι βιτελλίνες από τα Penaeus semisulcatus και Penaeus vannamei (Tom et al., 1992) έχουν φυσική μοριακή μάζα 283 και 289 kDa, αντίστοιχα. Οι βιτελλίνες αυτές σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση αναλύονται σε δύο πεπτίδια με μοριακή μάζα 86 και 95 kDa για το Penaeus semisulcatus, και 61 και 69 kDa για το Penaeus vannamei. Επίσης η βιτελλίνη από το Parapenaeus longirostris αποτελείται από δύο υπομονάδες μικρής μοριακής μάζας, 45 και 66 kDa (Tom et al., 1987a). Στο Pandalus kessleri αναφέρεται ότι η βιτελλίνη έχει φυσική μοριακή μάζα 560 kDa και δύο υπομονάδες 110 και 81 kDa (Quinitio et al., 1989).

Βιτελλογενίνες και βιτελλίνες έχουν περιγραφεί από πολλά είδη καρκινοειδών, όμως δεν έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στη λιπιδική και υδατανθρακική τους σύσταση. Οι βιτελλογενίνες και οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Τα λιπίδια που περιέχουν είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια, με κυριώτερο τη φωσφατιδυλχολίνη (Komatsu and Ando, 1992, Komatsu et al., 1993, Tirumalai and Subramoniam, 1992, de Chaffoy and Kondo, 1980). Το μεγαλύτερο ποσοστό των υδατανθράκων που περιέχουν οι βιτελλογενίνες και οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι μαννόζη (Zagalsky and Gilchrist, 1976). Χαρακτηριστικό επίσης των βιτελλογενινών και βιτελλινών από τα καρκινοειδών είναι ότι περιέχουν στο μόριό τους καροτινοειδή (Wallace et al., 1967), αλλά δεν έχουν γίνει συστηματικές μελέτες γι' αυτά.

Οι βιτελλογενίνες από τα Charybdis feriata και Eriocheir japonicus περιέχουν 33% και 30% λιπίδια αντίστοιχα (Komatsu et al., 1993). Οι βιτελλίνες από τα ίδια είδη περιέχουν 19.5% και 23% λιπίδια αντίστοιχα (Komatsu and Ando, 1992). Η βιτελλίνη από το Procambarus sp. έχει 35% λιπίδια (Fyffe and O'Connor, 1974). Τέλος η βιτελλίνη από την Artemia salina (de Chaffoy and Kondo, 1980) έχει 8.6% λιπίδια και 3.3% υδατάνθρακες.

#### 1.5. Σκοπός της παρούσης εργασίας

Σκοπός των πειραμάτων που αναφέρονται στην παρούσα εργασία είναι η ταυτοποίηση του οργάνου σύνθεσης της βιτελλογενίνης, η μοριακή μορφή της πρόδρομης βιτελλογενίνης και η τροποποίησή της κατά τη μεταφορά της στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα, καθώς και η χημική σύσταση της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης από το καβούρι του γλυκού νερού *Potamon potamios*.

Το καβούρι P. potamios επιλέχθηκε ως αντιπρόσωπος των καρκινοειδών για τη μελέτη της βιτελλογενίνης, γιατί το καβούρι αυτό είναι ενδημικό των ποταμών της Ελλάδας και η διατήρηση και εκτροφή του στο εργαστήριο δεν παρουσιάζει ιδιαίτερα προβλήματα. Η επιλογή των βιτελλογενινών από τα καρκινοειδή ως αντικείμενο μελέτης έγινε γιατί τα καρκινοειδή είναι συγγενή προς τα έντομα, στα οποία οι βιτελλογενίνες έχουν μελετηθεί επαρκώς, ενώ στα καρκινοειδή έχουν μελετηθεί από μοριακή και βιοχημική άποψη ελάχιστα. Από τις πληροφορίες που έχουμε αναφέρει παραπάνω σχετικά με τις βιτελλογενίνες των καρκινοειδών μπορούμε να δούμε ότι δεν υπάρχει κάποιο μοντέλο για τη μορφή της βιτελλογενίνης στη φυσική της μορφή. Ενώ υπάρχουν πολλές εργασίες για την επαγωγή της σύνθεσης της βιτελλογενίνης στα καρκινοειδή δεν υπάρχουν πληροφορίες για τα βιοχημικά χαρακτηριστικά της επαγώμενης πρωτεΐνης. Επίσης η χημική σύσταση των πρωτεϊνών αυτών δεν είναι συστηματικά μελετημένη. Τέλος ο τόπος σύνθεσης της βιτελλογενίνης είναι ένας τομέας μελέτης που παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, αν λάβουμε υπόψη τις αλληλοσυγκρουόμενες απόψεις που έχουν αναπτυχθεί γι' αυτό το θέμα.

Στην εργασία λοιπόν αυτή δίνεται απάντηση για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του μορίου της βιτελλογενίνης του *P. potamios* και τις βιοχημικές της μεταβολές κατά τη διάρκεια της μετατροπής της σε βιτελλίνη. Επίσης αναφέρονται πειράματα χημικής ανάλυσης που οδηγούν στην πλήρη γνώση της λιπιδικής και υδατανθρακικής σύστασης της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. In vivo και in vitro πειράματα χρησιμοποιούνται για την εύρεση του τόπου σύνθεσης, αλλά και της μορφής με την οποία συντίθεται η βιτελλογενίνη. Τα πειράματα αυτά, σε συνδυασμό με τη μελέτη της μορφής με την οποία παρουσιάζεται η βιτελλογενίνη σε ορισμένες φυσιολογικές καταστάσεις του ζώου, μας οδηγούν στη δημιουργία ενός μοντέλου για τη μοριακή μορφή της βιτελλογενίνης στον *P. potamios*, το οποίο όμως μπορεί να αποτελέσει και μοντέλο για τη μοριακή μορφή της βιτελλογενίνης των καρκινοειδών.

#### 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 2.1. Πειραματόζωα

Τα καβούρια του γλυκού νερού, *Potamon potamios* συλλέχθηκαν κατά τους μήνες Απρίλιο μέχρι Σεπτέμβριο από ποτάμια της Κρήτης. Τα ζώα αυτά διατηρούνται στο εργαστήριο μέσα σε δοχεία με νερό που το ύψος του φτάνει τα 4-5 cm. Το νερό αλλάζεται δύο φορές την εβδομάδα. Τα καβούρια σιτίζονται δύο με τρεις φορές την εβδομάδα με φρούτα, λαχανικά και κρέας.

Στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω χρησιμοποιήθηκαν ζώα με πλάτος κελύφους 5-8 cm (βάρος 30-80 g).

#### 2.2. Προετοιμασία της αιμολέμφου και του εκχυλίσματος των αυγών

Η λήψη της αιμολέμφου έγινε με σύριγγα από τη μεμβράνη των αρθρώσεων των άκρων των ζώων. Η αιμολέμφος φυγοκεντρήθηκε αμέσως μετά τη λήψη σε 5600g για 5 min στους 4°C σε φυγόκεντρο Eppendorf, για να διαχωρισθούν τα κύτταρα από τον ορό. Ο ορός αυτός χρησιμοποιήθηκε αμέσως ή φυλάχθηκε για μικρά διαστήματα στους -20°C. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι στα πειράματα που περιγράφονται παρακάτω ο ορός από τη φυγοκεντρημένη αιμολέμφο αναφέρεται απλώς σαν αιμολέμφος.

Οι ωοθήκες ή τα αυγά αφαιρέθηκαν από τα θηλυκά καβούρια και φυλάχθηκαν στους -20°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν. Για την απομόνωση των πρωτεϊνών, ομογενοποιήθηκαν 1-2 ωοθήκες (βάρος περίπου 0.2 g) ή 10-20 αυγά. Η ομογενοποίηση έγινε με 10 όγκους ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl, ιοντικής ισχύος I =0.05 pH 7.5, που περιείχε 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF (φαινύλ-μεθύλ-σουλφονύλ-φλουορίδιο) και 0.02% αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>). Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε σε 10,000g για 20 min στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το υπερκείμενο μαζεύτηκε και το ίζημα εκχυλίστηκε ξανά με 5 όγκους από το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Τα δύο υπερκείμενα ενώθηκαν και δόθησαν σε μία στήλη χρωματογραφίας μοριακής διήθησης 8x0.6 cm από Biogel P-10, εξισορροπημένη με το ρυθμιστικό διάλυμα ομογενοποίησης. Το καθαρό εκχύλισμα που εκλούστηκε από τη στήλη χρησιμοποιήθηκε αμέσως ή φυλάχθηκε στους -20°C.

#### 2.3. Καθαρισμός της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης

Η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον καθαρισμό της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο των θηλυκών καβουριών, αλλά και της βιτελλίνης από το εκχύλισμα των αυγών, ήταν η υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας KBr (Stratakis et al. 1992, 1993). Για το σκοπό αυτό δύο ml αιμολέμφου ή εκχυλίσματος αυγών αναμίχθηκαν με 0.9 g KBr ώστε η τελική πυκνότητα να είναι 1.28 g/ml και τοποθετήθηκαν σε φυγοκεντρικό σωλήνα τύπου "SW41 Ti ultra clear". Πάνω από το δείγμα επιστοιβαδεύτηκαν 2 ml από καθεμία από τις διαλύσεις KBr με τις εξής πυκνότητες:1.23 g/ml, 1.15 g/ml και 1.063 g/ml. Τέλος, πάνω από τις διαλύσεις αυτές, επιστοιβαδεύτηκαν 5 ml από διάλυση NaCl 0.9% (w/v). Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε ρότορα SW41 Ti φυγοκέντρου Beckman και φυγοκεντρήθηκαν σε 274,000g για 18 ώρες στους 4°C. Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης το περιεχόμενο κάθε σωλήνα μαζεύτηκε σε κλάσματα του 1 ml. Τα κλάσματα αυτά εξετάστηκαν για ύπαρξη πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησής τους στα 280 nm και μελετήθηκαν με μη-αποδιατακτική και αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Η δεύτερη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε είχε μέγεθος 10x0.8 cm. Το υλικό της στήλης ήταν CM Sepharose CL-6B, το οποίο είναι ανταλλάκτης κατιόντων. Η στήλη αφού ενεργοποιήθηκε με πλύσιμο με τρεις όγκους από καθένα από τα 1 Μ HCl και 1 M NaOH και εξισορροπήθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικό νάτριο (CH<sub>3</sub>COONa)που περιείχε 10 mM EDTA (τετραοξική αιθυλενοδιαμίνη), pH 5.8, συνδέθηκε με μονάδα χρωματογραφίας που περιελάμβανε αντλία, φωτόμετρο, συλλέκτη κλασμάτων και καταγραφέα. Η στήλη αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον παραπέρα καθαρισμό της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης από τα κλάσματα της υπερφυγοκέντρησης που τις περιέχουν, αλλά και για τον καθαρισμό τους απ' ευθείας από την αιμολέμφο και το εκχύλισμα των αυγών, αντίστοιχα. Και στις δύο περιπτώσεις, δηλαδή και τα κλάσματα από την υπερφυγοκέντρηση και η αιμολέμφος και το εκχύλισμα των αυγών διαλύθηκαν πάνω από δύο ώρες στο ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης και στη συνέχεια δόθηκαν στη στήλη. Ο συλλέκτης κλασμάτων της στήλης ρυθμίστηκε έτσι ώστε το κάθε κλάσμα να έχει όγκο 4 ml. Οταν το δείγμα πέρασε, η στήλη πλύθηκε με το ρυθμιστικό διάλυμα εξισορρόπησης, οπότε ο καταγραφέας έδειξε την εμφάνιση μιας κορυφής. Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στην κορυφή αυτή εξετάστηκαν για την ύπαρξη ή όχι πρωτεΐνης, μετρώντας την απορρόφηση στα 280 nm. Με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση

πιστοποιήθηκε ότι τα κλάσματα αυτά περιείχαν αιμοκυανίνη και λιποπρωτεΐνη. Για την έκλουση της βιτελλογενίνης ή βιτελλίνης η στήλη πλύθηκε με γραμμική βαθμίδωση NaCl, 0 M έως 1 M, οπότε ο καταγραφέας έδειξε μία δεύτερη κορυφή. Τα κλάσματα που αντιστοιχούσαν στην κορυφή αυτή εξετάστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης για να πιστοποιηθεί ότι περιείχαν πραγματικά βιτελλογενίνη ή βιτελλίνη και να ελεγχθεί η καθαρότητά τους.

# 2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης

Η μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης έγινε σε 4% ή 5% επίπεδες ή κυλινδρικές πηκτές. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε στους 4°C, σε σταθερή τάση 80 V και σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris/Γλυκίνη, pH 8.3. Τα δείγματα για την ηλεκτροφόρηση διαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης και προσθέθηκε σε αυτά λίγη σουκρόζη και λίγη χρωστική (κυανό της βρωμοφαινόλης). Σε μερικά πειράματα τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρησή τους είχαν χρωματισθεί με sudan black, μία χρωστική η οποία προσδένεται στο λιπιδικό κομμάτι μιας πρωτεΐνης (Stratakis and Linzen 1984).

Η ηλεκτροφόρηση παρουσία ουρίας έγινε σε 4% πηκτές πολυακρυλαμίδης που περιείχαν 8 Μ ουρία. Τα δείγματα ετοιμάστηκαν όπως και στη μη-αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, αλλά προσθέθηκε σε αυτά ουρία ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 8 Μ ή 6 Μ ή 4 Μ. Τέλος, η ηλεκτροφόρηση αυτή πραγματοποιήθηκε με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα όπως η μη-αποδιατακτική, σε σταθερή τάση 80 V και σε θερμοκρασία δωματίου.

Η αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση παρουσία δωδεκακυλοθειϊκού νατρίου (SDS-PAGE) έγινε σύμφωνα με το σύστημα Laemmli (1970), σε πηκτές πολυακρυλαμίδης 7.5% ή διαβαθμισμένες 5-15%. Το ρυθμιστικό διάλυμα αποδιατακτικής ηλεκτροφόρησης ήταν το ίδιο όπως στη μη-αποδιατακτική, αλλά περιείχε 0.1% δωδεκακυλοθειϊκό νάτριο (SDS). Τα δείγματα για την αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση κατακρημνίστηκαν με 10% (τελική συγκέντρωση) τριχλωροοξικό οξύ (TCA) και επαναδιαλύθηκαν με 0.1 M NaOH. Σε αυτά προσθέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης σε αναλογία 1:1 και τα δείγματα πριν την ηλεκτροφόρηση θερμάνθηκαν στους 100°C για 3 min. Το ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης αποτελείται από 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 2% (v/v) SDS, 10% (v/v) β-μερκαπτοαιθανόλη, 10% (v/v) γλυκερόλη και 0.01% (w/v) κυανό της βρωμοφαινόλης.

Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι έγιναν τα παρακάτω δοκιμαστικά πειράματα με την καθαρή βιτελλογενίνη ή βιτελλίνη: 1) Μετουσίωση για διαφορετικούς χρόνους. Τα δείγματα έμειναν με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης για 10 min, 30 min, 1 h και 2 h σε ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου και μετά θερμάνθηκαν για 3 min στους 100°C. 2) Επεξεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης που δεν περιείχε β-μερκαπτοαιθανόλη. 3) Επεξεργασία με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης που περιείχε β-μερκαπτοαιθανόλη σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (4% ή 10% ή 15% ή 20%, v/ v). 4) Επεξεργασία με 8 M ουρία, ή 8 M ουρία και 5% β-μερκαπτοαιθανόλη (τελικές συγκεντρώσεις), για δύο ώρες σε ανάδευση στους 4°C. Μετά οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν και ετοιμάστηκαν για αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση, όπως περιγράφεται παραπάνω.

Οι αποδιατακτικές πηκτές μετά την ηλεκτροφόρηση χρωματίστηκαν για δύο ώρες με διάλυση που αποτελείται από 0.2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 σε 47.5% αιθανόλη και 10% οξικό οξύ. Οι μη αποδιατακτικές πηκτές χρωματίστηκαν με την ίδια διάλυση αλλά για πολύ μικρότερο χρόνο (10-15 min). Ο αποχρωματισμός έγινε με διάλυση νερό: αιθανόλη: οξικό οξύ 66: 24:10.

## 2.5. Υπολογισμός μοριακής μάζας

Η μοριακή μάζα της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης υπολογίστηκε με δύο μεθόδους. Η πρώτη ήταν η (pore limit) ηλεκτροφόρηση σε διαβαθμισμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης 5-20% (Anderson et al. 1977), σε σταθερή τάση 80V. Η κινητικότητα της φυσικής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης κατά την ηλεκτροφόρηση συγκρίθηκε με αυτήν πρωτεϊνών γνωστής μοριακής μάζας που χρησιμοποιούνται ως δείκτες: Θυρογλοβουλίνη (669 kDa), Φερριτίνη (440 kDa), Καταλάση (232 kDa), Γαλακτική Δεϋδρογενάση (140 kDa) και Βόια Αλβουμίνη (67 kDa). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν σύμφωνα με τον Felgenhauer (1974).

Η δεύτερη μέθοδος ήταν η χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πηκτή λεπτής στοιβάδας (thin layer gel permeation chromatography) (Stratakis et al. 1993). Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία της λεπτής στοιβάδας ήταν BioGel A-1.5 m, Sephacryl S-300 και Sepharose 4B. Οι πρωτεΐνες δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες με παραπάνω.

Για τον υπολογισμό της μοριακής μάζας της μετουσιωμένης βιτελλογενίνης και βιτελλίνης έγιναν πολλές μετρήσεις σε διαβαθμισμένες αποδιατακτικές πηκτές πολυακρυλαμίδης 5-15%, χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνες δείκτες: 1) Μυοσίνη (205 kDa), β-Γαλακτοσιδάση (116 kDa), Φωσφορυλάση b (97.4 kDa), Βόια Αλβουμίνη (66 kDa), Οβαλβουμίνη (45 kDa) και Καρβονική Ανυδράση (29 kDa), που αποτελούν το δείκτη μοριακού βάρους για αποδιατακτικές πηκτές της εταιρίας Sigma. 2) Φωσφορυλάση b (94 kDa), Βόια Αλβουμίνη (67 kDa), Οβαλβουμίνη (43 kDa), Καρβονική Ανυδράση (30 kDa), Αναστολέας της Τρυψίνης (20.1 kDa) και α-Λακταλβουμίνη (14.4 kDa), από την εταιρία Pharmacia.

#### 2.6. Πειράματα με dimethyl suberimidate

Τα πειράματα αυτά έγιναν σε καθαρή βιτελλίνη και είχαν σκοπό να προσδιορίσουν τις πολυμερικές μορφές της βιτελλίνης. Η πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται από τον Swaney (1983), χρησιμοποιώντας διάλυση dimethyl suberimidate 20 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα 1 Μ τριαιθανολαμίνη/HCl, pH 9.7. Η καθαρή βιτελλίνη αναμείχθηκε με τη διάλυση του suberimidate σε αναλογία ένα μέρος αντιδραστηρίου προς δέκα μέρη πρωτεϊνικής διάλυσης (v/v). Έτσι, 90 μl βιτελλίνης συγκέντρωσης 1.2 mg/ml, μοιράστηκαν σε τρία φιαλίδια eppendorf. Σε κάθε eppendorf προσθέθηκαν 3 μl από τη διάλυση του suberimidate. Η επώαση έγινε για 30 min, 1 h και 2h σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης προστέθηκαν στο αντίστοιχο eppendorf 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης και τα δείγματα θερμάθηκαν για 3 min στους 100°C. Τα δείγματα διαβαθμισμένη (5-15%) ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης.

#### 2.7. Ισοηλεκτρικός εστιασμός

Ο ισοηλεκτρικός εστιασμός της καθαρής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης έγινε στην ειδική συσκευή της εταιρίας Bio-Rad (όπως περιγράφεται στο φυλλάδιο οδηγιών του κατασκευαστή) σε πηκτές πολυακρυλαμίδης 3%, που περιείχαν 0.1% Triton X-100 (τελική συγκέντρωση) και αμφολύτες στην περιοχή pH 3 με 10. Οι πηκτές είχαν πάχος 0.8 mm.

Οι πηκτές εστιάστηκαν σε σταθερή τάση 400 V για 20 min πριν να χρησιμοποιηθούν. Τα δείγματα φορτώθηκαν πάνω σε μικρά κομμάτια από χαρτί διήθησης Whatman στην κάθοδο και εστιάστηκαν για 2 h στους 4°C και σε σταθερή ισχύ 7 W. Η αρχική τάση ήταν 400 V και η τελική 2100 V.

Οι τιμές του pI για τη βιτελλογενίνη και τη βιτελλίνη υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες δείκτες: αναστολέας της τρυψίνης από σόγια (pI 4.55), βλακτογλοβουλίνη A (pI 5.20), βόια καρβονική ανυδράση B (pI 5.85), ανθρώπινη καρβονική ανυδράση B (pI 6.55), μυοσφαιρίνη αλόγου-όξινη ζώνη (pI 6.85), μυοσφαιρίνη αλόγου-βασική ζώνη (pI 7.35), λεκτίνη-όξινη ζώνη (pI 8.15), λεκτίνημεσαία ζώνη (pI 8.45), λεκτίνη-βασική ζώνη (pI 8.65).

#### 2.8. Πειράματα πρωτεόλυσης

Τα πειράματα αυτά εστιάστηκαν σε δύο κατευθύνσεις. Η πρώτη περιλαμβάνει την πρωτεόλυση της φυσικής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης με ένζυμα (τρυψίνη και χυμοτρυψίνη), αλλά και χημικές μεθόδους (βρωμοκυάνιο), ενώ η δεύτερη την ενζυμική διάσπαση (με τρυψίνη) των υπομονάδων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης.

Για την ενζυμική πρωτεόλυση της φυσικής βιτελλογενίνης ή βιτελλίνης, 30 μl πρωτεϊνικής διάλυσης (συγκέντρωσης 6 mg/ml) αναμίχθηκαν με 120 μl ρυθμιστικού διαλύματος 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 και 1 μl διάλυσης (σε 1 mM HCl) τρυψίνης ή χυμοτρυψίνης , συγκέντρωσης 1 mg/ml. Η επώαση έγινε στους 37°C. Σε χρόνους 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2.5 h και 5 h αφαιρέθηκε από τη συνολική διάλυση δείγμα όγκου 25 μl. Σ' αυτό προστέθηκαν 2 μl PMSF και 25 μl ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης και το δείγμα θερμάνθηκε για 5 min στους 100°C. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε διαβαθμισμένη 5-15% αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Για τη διάσπαση με βρωμοκυάνιο (BrCN), 1 mg πρωτεΐνη (βιτελλογενίνη ή βιτελλίνη) κατακρημνίστηκε δύο φορές με τρεις όγκους ακετόνη, για να απομακρυνθούν τα λιπίδια και τα καροτινοειδή. Στο πρωτεϊνικό ίζημα προσθέθηκαν 300 μl από διάλυση που περιείχε 70% μυρμηκικό οξύ (HCOOH), 6% SDS και 0.3 mg BrCN. Η επώαση έγινε για 36 ώρες στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το τέλος της επώασης το δείγμα μοιράστηκε σε δύο φιαλίδια eppendorf. Σε κάθε φιαλίδιο προσθέθηκε 1 ml νερό και οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν με 10% (τελική συγκέντρωση) ΤCA. Οι πρωτεΐνες 5-15% ηλεκτροφορήθηκαν διαβαθμισμένη αποδιατακτική σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Για την πρωτεόλυση των υπομονάδων της, η βιτελλογενίνη (ή βιτελλίνη) ηλεκτροφορήθηκε σε διαβαθμισμένη (5-15%) αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης. Οι ζώνες, που αντιστοιχούν στις υπομονάδες κόπηκαν από την πηκτή και επωάστηκαν με τρυψίνη στα πηγάδια μίας δεύτερης αποδιατακτικής πηκτής (διαβαθμισμένη 5-15%), σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τον Carrey (1989). Κάθε ζώνη (πηκτής) τοποθετήθηκε σε ένα πηγάδι της δεύτερης πηκτής και επιστοιβαδεύτηκε με 30 μl ρυθμιστικού διαλύματος μετουσίωσης που περιείχε 2 μg τρυψίνη. Όταν τα δείγματα βγήκαν από τα πηγάδια και προχώρησαν λίγο μέσα στην πηκτή, η παροχή ρεύματος διακόπηκε για 30 min, ώστε να συντελεστεί η πρωτεόλυση. Μετά η ηλεκτροφόρηση συνεχίστηκε κανονικά, οπότε διαχωρίστηκε και η πρωτεάση από το υπόστρωμα.

28

#### 2.9. Υπολογισμός πρωτεΐνης, υδατανθράκων, λιπιδίων και καροτινοειδών

Η πρωτεϊνική σύσταση της καθαρής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης υπολογίστηκε ποσοτικά με τη μέθοδο του Lowry et al. (1951) χρησιμοποιώντας βόια αλβουμίνη (BSA) για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς.

Ο χαρακτηρισμός των υδατανθράκων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης έγινε με χρωματισμό των πρωτεϊνών αυτών με κονκαναβαλίνη Α που είχε συνδεθεί με ισοθειοκυανιούχο φλουορεσκεΐνη (FITC-Con A) (Furlan et al. 1979). Οι πρωτεΐνες χρωματίστηκαν μετά τη μεταφορά τους, με τη βοήθεια συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος, από την πηκτή πολυακρυλαμίδης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (electroblot).

Τα σάκχαρα της καθαρής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης απομονώθηκαν μετά από υδρόλυση των πρωτεϊνών αυτών με 0.6 N HCl για 14 h στους 120°C. Το pH των δειγμάτων ρυθμίστηκε στο 7 με χρήση αμμωνίας. Τα δείγματα στη συνέχεια πλύθηκαν δύο φορές με εξάνιο και φυγοκεντρήθηκαν. Το υπερκείμενο ξηράθηκε στους 80°C υπό κενό. Το ξηρό αυτό υλικό χρησιμοποιήθηκε για τον ποσοτικό υπολογισμό των υδατανθράκων με τη μέθοδο του αντιδραστηρίου anthrone (Roe 1955).

Τα ολικά λιπίδια εκχυλίστηκαν από την καθαρή βιτελλογενίνη και βιτελλίνη με χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1 (v/v), σύμφωνα με τη μέθοδο των Folch et al. (1957) και μετρήθηκαν ποσοτικά με τη μέθοδο της σουλφοφωσφοβανιλλίνης (Frings et al. 1972). Τα λιπίδια αναπτύχθηκαν σε πλάκες χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας από υλικό silica gel. Για τα ουδέτερα λιπίδια χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκός αιθέρας:διαιθυλαιθέρας:οξικό οξύ 70:30:1 (v/v). Τα ουδέτερα λιπίδια έγιναν ορατά ως κίτρινες κηλίδες όταν η πλάκα τοποθετήθηκε σε ατμόσφαιρα ιωδίου. Στη γραμμή που φορτώθηκε το δείγμα παρατηρήθηκε μία κίτρινη κηλίδα η οποία αντιστοιχεί στα φωσφολιπίδια. Για τον ποσοτικό υπολογισμό των λιπιδίων αυτών, το υλικό της πλάκας που αντιστοιχεί στο κάθε λιπίδιο αφαιρέθηκε από την πλάκα με σπάτουλα, τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα και εκχυλίστηκε με χλωροφόρμιο:μεθανόλη 2:1 (v/v). Ο ποσοτικός υπολογισμός έγινε πάλι με τη μέθοδο της σουλφοφωσφοβανιλλίνης.

Για τα φωσφολιπίδια χρησιμοποιήθηκε σύστημα διαλυτών χλωροφόρμιο:μεθανόλη:αμμωνία 65:30:5 (v/v). Ο χρωματισμός των φωσφολιπιδίων που αναπτύχθηκαν στις πλάκες έγινε με αντιδραστήριο Dragendorf ή κυανό του μολυβδαινίου (molybdenum blue) όπως περιγράφεται από τους Skidmore and Entenmann (1962). Η ταυτοποίησή τους έγινε με σύγκριση με γνωστά φωσφολιπίδια, τα οποία αναπτύχθηκαν συγχρόνως στις πλάκες. Ο ποσοτικός υπολογισμός της κάθε τάξης φωσφολιπιδίων έγινε με τη μέθοδο του φωσφόρου (Lowry and Tinsley 1974). Τα καροτινοειδή από την καθαρή βιτελλογενίνη και βιτελλίνη εκχυλίστηκαν με ακετόνη ως εξής: σε διάλυση των πρωτεϊνών αυτών προστέθηκαν τρεις όγκοι ακετόνη και μετά από ισχυρή ανάδευση (vortex) έγινε φυγοκέντρηση σε 2500g για 10 min. Το ίζημα εκχυλίστηκε άλλες δύο φορές με ακετόνη. Τα τρία ακετονικά εκχυλίσματα ενώθηκαν και πλύθηκαν δύο φορές με πετρελαϊκό αιθέρα. Η φάση του πετρελαϊκού αιθέρα στην οποία περιέχονται τα καροτινοειδή, ξηράθηκε με άζωτο. Το ξηραμένο αυτό εκχύλισμα χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των καροτινοειδών.

Τα ολικά καροτινοειδή υπολογίστηκαν ποσοτικά μετρώντας την απορρόφηση ακετονικής διάλυσής τους σε μήκος κύματος 480 nm ( $E^{1\%}_{1cm}$  =2200). Η ποιοτική ανάλυση των καροτινοειδών έγινε με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας ή με HPLC. Οι πλάκες χρωματογραφίας, οι οποίες ήταν από υλικό silica gel, αναπτύχθηκαν με σύστημα διαλυτών εξάνιο:ακετόνη 70:30 (v/v).

Για την ανάλυση με HPLC χρησιμοποιήθηκε στήλη Hypersil Hewlett Packard 2.1x200 mm, με μέγεθος σωματιδίων 5μm. Στη στήλη αυτή δόθηκε 1 ml από το εκχύλισμα των καροτινοειδών με ρυθμό έκλουσης 0.2 ml/min, όπως περιγράφεται από τους Humbeck et al. (1988). Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν (A) ακετονιτρίλιο:μεθανόλη 75:25 (v/v) και (B) νερό. Ο διαλύτης (A) αναμείχθηκε με 10% διαλύτη (B) στην αρχή της χρωματογραφίας. Στα επόμενα 40 min η συγκέντρωση του διαλύτη (B) μειώθηκε γραμμικά στο 0%. Το ποσοστό αυτό παρέμεινε σταθερό για 20 min. Τέλος, στα υπόλοιπα 10 min της χρωματογραφίας, η συγκέντρωση του διαλύτη (B) αυξήθηκε γραμμικά στο 10%. Η ανίχνευση των καροτινοειδών έγινε στα 445 nm, χρησιμοποιώντας ανιχνευτή Hewlett Packard.

#### 2.10. Ανοσολογία

Παρήχθησαν δύο αντιοροί, ο ένας για την υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης και ο άλλος για την υπομονάδα 181 kDa της επαγόμενης βιτελλογενίνης. Για το σκοπό αυτό η βιτελλογενίνη (φυσική ή επαγόμενη) ηλεκτροφορήθηκε σε διαβαθμισμένη (5-15%) αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης. Οι ζώνες της πηκτής που αντιστοιχούσαν στις δύο υπομονάδες αφαιρέθηκαν και οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από την πηκτή με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου, όπως περιγράφεται από τους Stratakis et al. (1992).

Περίπου 1.0-1.5 mg πρωτεΐνης, που αντιστοιχεί στην υπομονάδα 85 kDa, διαλύθηκε σε 0.5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris/Γλυκίνη, αναμίχθηκε με ίσο όγκο Freund's complete adjuvant και ενέθηκε στη πλάτη κουνελιού (ενήλικο, περίπου 5 Kg). Στο κουνέλι έγιναν συνολικά τέσσερεις ενέσεις από τη διάλυση αυτή (2 ml η καθεμία), ανά διαστήματα δύο εβδομάδων. Μια εβδομάδα μετά τον τελευταίο

εμβολιασμό, έγινε αιμοληψία από το αυτί του κουνελιού. Ο ορός μαζεύτηκε αφού το αίμα παρέμεινε στους 4°C όλη νύχτα. Ο ορός αυτός χρησιμοποιήθηκε χωρίς άλλο καθαρισμό.

Για την παραγωγή του δεύτερου αντιορού, 0.5 ml πρωτεϊνική διάλυση της υπομονάδας 181 kDa, συγκέντρωσης 1 mg/ml, αναμείχθηκε με ίσο όγκο Freund's complete adjuvant. Δέκα ποντίκια (balb/c) εμβολιάστηκαν με 100 μl από αυτή τη διάλυση. Συνολικά τα ποντίκια δέχτηκαν τέσσερεις εμβολιασμούς, έναν κάθε δύο εβδομάδες. Δέκα ημέρες μετά τον τελευταίο εμβολιασμό έγινε αφαίμαξη των ποντικιών από την καρδιά. Το αίμα έμεινε στους 4°C όλη νύχτα. Ο ορός διαχωρίστηκε από το αίμα που είχε πήξει με φυγοκέντρηση (350g για 10 min). Και αυτός ο αντιορός χρησιμοποιήθηκε χωρίς άλλη επεξεργασία.

Η ανάλυση με Western blot έγινε όπως περιγράφεται από τους Stratakis et al. (1992). Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτικές διαβαθμισμένες (5-15%) πηκτές πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Immobilon-NC transfer membrane Millipore, pore size 0.45 μm). Η μεταφορά πραγματοποιήθηκε στους 4°C, σε 13 ώρες και σε ρυθμιστικό διάλυμα 25 mM Tris, 192 mM γλυκίνη, pH 8.3. Η μεμβράνη, μετά το τέλος της μεταφοράς, εμβαπτίστηκε για 2 ώρες σε καθεμία από τις ακόλουθες διαλύσεις: 20 mM Tris-HCl pH 7.4 που περιέχει 2% ζελατίνη, 20 mM Tris-HCl pH 7.4 που περιέχει 1% ζελατίνη και 1/1000 αντιορό για την 85 kDa (ή 1/500 αντιορό για την 181 kDa), 20 mM Tris-HCl pH 7.4 που περιέχει 1% ζελατίνη και αντισώματα εναντίον κουνελιού που είχαν αναπτυχθεί σε αίγα και συνδεθεί με υπεροξειδάση (horseradish peroxidase) (ή αντισώματα εναντίον ποντικιού που είχαν αναπτυχθεί σε κουνέλι και συνδεθεί με υπεροξειδάση). Οι ζώνες εμφανίστηκαν με επώαση της μεμβράνης για 20 min σε 10 ml H<sub>2</sub>O που περιέχει 0.3% 4-chloro-1-napthol και 5 μl από 30% υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

# 2.11. Επεξεργασία της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης και των υπομονάδων τους με γλυκοσιδάσες

Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη επωάστηκαν με τις γλυκοσιδάσες N-glycosidase F (PNGase F), Endoglycosidase H (Endo H) και Endoglycosidase H<sub>f</sub> (Endo H<sub>f</sub>) που είχαν αγορασθεί από τη BioLabs, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστεί. Τριάντα μg βιτελλογενίνης ή βιτελλίνης που είχαν μετουσιωθεί με 0.5% SDS και 1% β-μερκαπτοαιθανόλη (τελικές συγκεντρώσεις) και θερμανθεί για 10 min στους 100°C, επωάστηκαν για 1 ώρα ή 16 ώρες στους 37°C, με τις παρακάτω ποσότητες γλυκοσιδασών: 6000 U (6 μl) PNGase F σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 M φωσφορικό νάτριο pH 7.5 που περιέχει 1% NP-40 (τελική συγκέντρωση), ή 750 U

(1.5 μl) Endo H ή 1500 U (1.5 μl) Endo H $_{\rm f}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.05 M κιτρικό νάτριο, pH 5.5.

Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη ηλεκτροφορήθηκαν σε διαβαθμισμένη (5-15%) αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης και τα κομμάτια της πηκτής που αντιστοιχούσαν στις υπομονάδες τους αφαιρέθηκαν. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από τα κομμάτια της πηκτής (όπως περιγράφεται από τους Allington et al. 1978) και καθεμία επωάστηκε χωριστά με τη γλυκοσιδάση.

## 2.12. Επαγωγή της βιτελλογένεσης

Στα πειράματα επαγωγής της βιτελλογένεσης χρησιμοποιήθηκαν θηλυκά (αλλά και αρσενικά) καβούρια με πλάτος κελύφους 3-6 cm (βάρος 25-52 g). Οι μίσχοι των ματιών αφαιρέθηκαν από τα ζώα αυτά με ψαλίδι και τα τραύματα καυτηριάστηκαν.

Ο έλεγχος για την εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο των ζώων έγινε με αιμοληψία από τα ζώα κάθε δύο ημέρες και εξέταση της αιμολέμφου με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Η βιτελλογενίνη εμφανίστηκε στην αιμολέμφο των θηλυκών καβουριών 15-17 ημέρες μετά την επέμβαση. Ο καθαρισμός της επαγώμενης βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο έγινε με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων σε στήλη από CM Sepharose CL-6B, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω.

#### 2.13. In vivo πειράματα

Ραδιοσημασμένη μεθειονίνη ([<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη, 1458 Ci/ mmol) διαλύθηκε σε ισοτονικό διάλυμα για καβούρια (360 mM NaCl, 6.6 mM KCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 18 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> και 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.5) ώστε η τελική συγκέντρωσή της να είναι 0.5 μCi/ μl. Θηλυκά καβούρια σε περίοδο βιτελλογένεσης δέχθηκαν ένεση με 500 μl από αυτήν τη διάλυση, μέσα στις πρώτες πέντε ημέρες μετά την εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο. Σε χρονικά διαστήματα 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5, 12, 24, 48 και 72 ωρών μετά την ένεση, 50 μl αιμολέμφου αφαιρέθηκαν από τα ζώα, για να μελετηθεί η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου. Τα δείγματα της αιμολέμφου κατακρημνίστηκαν με 10% (τελική συγκέντρωση) TCA και οι πρωτεΐνες εξετάστηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία.

Σε άλλη σειρά πειραμάτων, 40 μl αιμολέμφου αφαιρέθηκαν από τα ζώα σε χρονικά διαστήματα 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5, 12, 24, 31.5 και 49 ωρών από την ένεση, για να μελετηθεί η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου, μετρώντας ραδιενέργεια (CPM: κρούσεις ανά λεπτό) στην αιμολέμφο, στις πρωτεΐνες και στο μη-πρωτεϊνικό κομμάτι της αιμολέμφου. Για τον υπολογισμό των CPM οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν από 20 μl αιμολέμφου με 10% (τελική συγκέντρωση) TCA και το ίζημα αφού πλύθηκε τρεις φορές με νερό επαναδιαλύθηκε με 0.1 M NaOH. Η αιμολέμφος (20 μl), το επαναδιαλυμένο ίζημα και το υπερκείμενο από την κατακρήμνιση φορτώθηκαν σε μικρά χάρτινα (Whatman 3 MM) δισκάκια και ξηράθηκαν με ρεύμα θερμού αέρα. Μετά τα δισκάκια αυτά τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια σπινθιροβολίας που περιείχαν 4 ml διάλυμα σπινθιροβολίας. Η μέτρηση της ραδιενέργειας (CPM) έγινε σε μετρητή υγρής σπινθιροβολίας. Το διάλυμα σπινθιροβολίας αποτελείται από 5 g PPO (2,5-Diphenyl oxazole) και 0.5 g POPOP (1,4-bis[5-phenyl-2-oxazolyl]-benzene) ανά λίτρο τολουενίου.

Μετά την πάροδο τουλαχιστον 48 ωρών από την ένεση με τη ραδιοσημασμένη μεθειονίνη, έγινε αιμοληψία από τα ζώα. Η αιμολέμφος αυτή (περίπου 1 ml) χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της βιτελλογενίνης με χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων, όπως έχει περιγραφεί παραπάνω. Υπολογίστηκε η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας στις κύριες πρωτεΐνες της αιμολέμφου μετρώντας το πηλίκο CPM/ mg πρωτεΐνης για τη βιτελλογενίνη από τη μια, και την αιμοκυανίνη και τη λιποπρωτεΐνη μαζί από την άλλη. Ο υπολογισμός των CPM έγινε όπως περιγράφεται παραπάνω. Ο υπολογισμός του ποσού της πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο των Lowry et al. (1951), χρησιμοποιώντας βόια αλβουμίνη για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης.

Τα ζώα που αναφέρονται παραπάνω απέθεσαν αυγά. Τα αυγά αυτά μαζεύτηκαν και εκχυλίστηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της βιτελλίνης. Υπολογίστηκε η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας (CPM/ mg πρωτεΐνης) για τη βιτελλίνη και την αιμοκυανίνη των αυγών. Οι ραδιοσημασμένες πρωτεΐνες της αιμολέμφου και των αυγών μελετήθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και αυτοραδιογραφία.

Καθαρή βιτελλογενίνη σημασμένη με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη, η οποία παρήχθηκε με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω, διαλύθηκε σε ισοτονικό διάλυμα καβουριού σε συγκέντρωση 2.2 mg/ml και 325,000 CPM/ml. Θηλυκό καβούρι σε περίοδο βιτελλογένεσης έλαβε με ένεση 600 μl από αυτήν τη διάλυση. Σε χρονικά διαστήματα 10 min, 24h, 48h και 72 h μετά την ένεση έγινε αιμοληψία (50 μl) από το ζώο. Τα δείγματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν για μέτρηση της ραδιενέργειας (CPM), όπως περιγράφεται παραπάνω. Το καβούρι μετά από δέκα ημέρες απέθεσε αυγά. Σαράντα από τα αυγά αυτά ομογενοποιήθηκαν σε συνολικό όγκο διαλύματος 3 ml. Το εκχύλισμα αυτό χρησιμοποιήθηκε για τον καθαρισμό της βιτελλίνης με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων σε στήλη από CM-Sepharose CL-6B, όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα κλάσματα εξετάστηκαν με

33

ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης και μέτρηση της ραδιενέργειας (CPM).

### 2.14. In vitro πειράματα

Οι ιστοί (ωοθήκες ή ηπατοπάγκρεας) αποκόπηκαν από θηλυκά καβούρια μεταξύ της πρώτης και πέμπτης ημέρας από την εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο. Οι ιστοί πλύθηκαν με παγωμένο ισοτονικό διάλυμα για καβούρια, το οποίο είχε αποστειρωθεί πριν από τη χρήση. Για την επώαση in vitro οι ωοθήκες χρησιμοποιήθηκαν χωριστά η καθεμία (βάρος 0.08-0.1 g), ενώ το ηπατοπάγκρεας τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια (βάρος 0.6-0.65 g). Οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε ποτηράκια, τα οποία περιείχαν 1.5 ml μέσου επώασης (το οποίο είχε αποστειρωθεί πριν από του μέσου επώασης (το οποίο είχε αποστειρωθεί πριν από τη χρήση). Η σύσταση του μέσου επώασης ήταν 9 ml ισοτονικό διάλυμα για καβούρια, 1 ml διάλυσης αμινοξέων και 0.001% αμπικιλλίνη. Τέλος, σε κάθε ποτηράκι προστέθηκαν 100-130 μCi/ml [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη. Η επώαση έγινε στους 30°C και σε ήπια ανάδευση και είχε διάρκεια 8 ώρες.

Κατά τη διάρκεια της επώασης, σε κάθε ώρα πήραμε 30 μl από το μέσο επώασης. Από αυτά, στα 20 μl προσθέσαμε 2 μl 100% TCA και φυγοκεντρήσαμε σε 10000g για 5 min. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε. Το ίζημα πλύθηκε τρεις φορές με νερό και μετά επαναδιαλύθηκε σε 20 μl 0.1 M NaOH. Το επαναδιαλυμένο ίζημα, το υπερκείμενο και τα 10 μl από το αρχικό δείγμα φορτώθηκαν σε μικρά χάρτινα δισκάκια, όπως περιγράφεται παραπάνω, για τη μέτρηση της ραδιενέργειας (CPM). Παρακολουθήσαμε με αυτόν τον τρόπο την ενσωμάτωση της ραδιενέργειας στις νεοσυντεθιμένες πρωτεΐνες που εκκρίθηκαν από τους ιστούς στο μέσο επώασης.

Μετά το τέλος της επώασης οι ιστοί ξεπλύθηκαν με ισοτονικό διάλυμα για καβούρια και εκχυλίστηκαν αμέσως ή φυλάχθηκαν στους -20°C για μικρό χρονικό διάστημα. Το μέσο επώασης κάθε ιστού φυλάχθηκε χωριστά από τον ιστό.

Η εκχύλιση των ιστών έγινε με ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl pH 8.0, που περιείχε 250 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 1 mM PMSF και 0.1% NaN<sub>3</sub>. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν πάνω σε πάγο με κρύο διάλυμα εκχύλισης. Το ομογενοποίημα φυγοκεντρήθηκε σε 8000g για 20 min στους 4°C. Το υπερκείμενο φυλάχθηκε και το ίζημα ομογενοποιήθηκε ξανά με διάλυμα εκχύλισης και φυγοκεντρήθηκε στις ίδιες συνθήκες. Τα δύο υπερκείμενα ενώθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν ξανά δύο με τρεις φορές σε 8000g για 15 min στους 4°C για να πάρουμε έτσι πιο καθαρό εκχύλισμα.

Οι πρωτεΐνες από τα εκχυλίσματα των ιστών και τα μέσα επώασης κατακρημνίστηκαν με 10% (τελική συγκέντρωση) TCA, επαναδιαλύθηκαν με 0.1 Μ

NaOH και μελετήθηκαν με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, αυτοραδιογραφία και Western blot.

# 2.15. Αυτοραδιογραφία

Οι πηκτές μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης εμβαπτίστηκαν για 30 min σε διάλυση 30% μεθανόλη και 15% οξικό οξύ. Μετά πλύθηκαν για 15 min με απεσταγμένο νερό και τέλος ξηράθηκαν. Οι ξηραμένες πηκτές εκτέθηκαν σε αυτοραδιογραφία σε φίλμ Kodak X-OMAT AR, στους -80°C. Σε μερικές περιπτώσεις οι πηκτές χρωματίστηκαν πριν την έκθεση.

#### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

# 3.1. Ύπαρξη της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο και της βιτελλίνης στα ωοκύτταρα του *Potamon potamios*

Μία πρώτη ανάλυση της αιμολέμφου από θηλυκά (πριν και μετά την ωοτοκία) και αρσενικά καβούρια, καθώς επίσης και του εκχυλίσματος των αυγών με ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (εικόνα 1), έδειξε ότι οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στις θέσεις 115, 105 και 85 kDa υπάρχουν στην αιμολέμφο των θηλυκών πριν την ωοτοκία και στο εκχύλισμα των αυγών. Οι πρωτεΐνες αυτές δεν βρέθηκαν ποτέ στην αιμολέμφο των αρσενικών καβουριών και των θηλυκών μετά την ωοτοκία. Στην αιμολέμφο πολλών θηλυκών καβουριών σε περίοδο βιτελλογένεσης, εμφανίζεται μία ακόμα πρωτεΐνική ζώνη στην περιοχή 181 kDa. Μία τέτοια ζώνη όμως δεν παρατηρήθηκε ποτέ στο εκχύλισμα των αυγών.

Η ύπαρξη της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο των ώριμων θηλυκών εξετάστηκε κατά τη διάρκεια του ετήσιου κύκλου τους, με ανάλυση της αιμολέμφου τους με SDS-PAGE. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο των ζώων αυτών συμπίπτει με την αλλαγή της φωτοπεριόδου, από μικρές σε μεγάλες ημέρες, από το τέλος Μαρτίου μέχρι το τέλος Ιουλίου (δευτερογενής βιτελλογενική περίοδος). Η περίοδος αυτή για τα μεγάλα ώριμα θηλυκά είναι ανεξάρτητη από την έκδυση.

Κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς βιτελλογένεσης, περίπου 50 ημέρες, η ποσότητα της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο αυξάνεται μέχρι το μέγιστο ποσό 10 mg/ml, που αντιστοιχεί στο 25% περίπου των ολικών πρωτεϊνών της αιμολέμφου. Η συγκέντρωση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο παραμένει υψηλή και σχετικά μη μεταβαλλόμενη για 20 ημέρες περίπου. Δέκα ημέρες πριν την ωοτοκία η συγκέντρωση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο μειώνεται δραστικά μέχρι την εξαφάνιση της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο κατά τη διάρκεια της ωοτοκίας. Στην εικόνα 2 παρουσιάζεται η ηλεκτροφορητική εικόνα της αιμολέμφου ώριμου θηλυκού κατά τη διάρκεια του ετήσιου κύκλου του.

Η ύπαρξη της βιτελλίνης στα ωοκύτταρα των ώριμων θηλυκών εξετάστηκε με SDS-PAGE ανάλυση των εκχυλισμάτων από μη βιτελλογενικές και βιτελλογενικές ωοθήκες, καθώς επίσης και από αυγά, αμέσως μετά την απόθεσή τους. Η ανάλυση αυτή έδειξε τις τρεις ζώνες με μοριακή μάζα 85, 105 και 115 kDa, αλλά όχι τη ζώνη 181 kDa που υπάρχει στην αιμολέμφο πολλών θηλυκών σε περίοδο βιτελλογένεσης (εικόνα 1).


Εικόνα 1. SDS-PAGE ανάλυση, σε διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή πολυακρυλαμίδης, των πρωτεϊνών της αιμολέμφου (στήλες 2-4), των ωοθηκών (στήλες 5,6) και των αυγών (στήλη 7) του *P. potamios*. Η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie blue. Στήλη 1: Πρωτεΐνες δείκτες: β-γαλακτοσιδάση (116 kDa), φωσφορυλάση b (97.4 kDa), βόια αλβουμίνη (66 kDa), οβαλβουμίνη (45 kDa), καρβονική ανυδράση (29 kDa). Στήλη 2: Ενήλικο αρσενικό. Στήλη 3: Θηλυκό πριν την ωοτοκία. Στήλη 4: Θηλυκό μετά την ωοτοκία. Στήλη 5: Μη βιτελλογενικές ωοθήκες. Στήλη 6: Βιτελλογενικές ωοθήκες. Στήλη 7: Αυγά. Οι αριθμοί (kDa) δείχνουν τις θέσεις των υπομονάδων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. Ης είναι η αιμοκυανίνη (79 kDa).



Εικόνα 2. SDS-PAGE της αιμολέμφου από ώριμο θηλυκό, κατά τη διάρκεια του ετήσιου κύκλου. Στήλη 1: Προβιτελλογενική. Στήλη 2: Βιτελλογενική (αρχή). Στήλη 3: Βιτελλογενική (δέκα ημέρες μετά την αρχή). Στήλη 4: Βιτελλογενική (τριάντα ημέρες μετά την αρχή). Στήλη 5: Πέντε ημέρες μετά την ωοτοκία. Στήλη 6: Πρωτεΐνες δείκτες με μοριακή μάζα (σε kDa) όπως υποδεικνύεται.

#### 3.2. Καθαρισμός της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης

Η βιτελλογενίνη από την αιμολέμφο και η βιτελλίνη από το εκχύλισμα των αυγών, απομονώθηκαν αρχικά με υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας KBr. Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη (με πυκνότητες 1.20 g/ml και 1.21 g/ml, αντίστοιχα) εμφανίστηκαν σαν κίτρινες-πορτοκαλί ζώνες, ανάμεσα στην κίτρινη ζώνη της λιποπρωτεΐνης (πυκνότητα 1.1 g/ml) και την μπλε-πράσινη ζώνη της αιμοκυανίνης (πυκνότητα 1.25 g/ml). Όμως τα κλάσματα της βιτελλογενίνης ή βιτελλίνης που απομονώθηκαν με τη μέθοδο αυτή, εκτός από βιτελλογενίνη ή βιτελλίνη περιείχαν αξιόλογες ποσότητες λιποπρωτεΐνης και αιμοκυανίνης. Γι' αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν διάφορες χρωματογραφικές μέθοδοι για τον καθαρισμό των δύο πρωτεϊνών. Τελικά ο καθαρισμός της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων σε στήλη από CM Sepharose CL-6B. Η αιμολέμφος διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 Μ οξικό νάτριο που περιείχε 10 mM EDTA, pH 5.8 και δόθηκε στη στήλη. Μετά την έκλουση της στήλης με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα, οι συγκρατούμενες πρωτεΐνες εκλούσθηκαν με γραμμική βαθμίδωση NaCl, 0-1 M, διαλυμένο στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα. Το προφίλ των δύο εκλούσεων φαίνεται στην εικόνα 3. Όπως έδειξε η ανάλυση των κλασμάτων με SDS-PAGE, με τη δεύτερη έκλουση απελευθερώθηκε καθαρή βιτελλογενίνη (εικόνα 3). Το ίδιο αποτέλεσμα πήραμε όταν δώσαμε στη στήλη εκχύλισμα αυγών στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για τον καθαρισμό της βιτελλίνης. Η έκλουση των πρωτεϊνών από τη στήλη έγινε με τις ίδιες ρυθμιστικές διαλύσεις και η βιτελλίνη ήλθε στη θέση της βιτελλογενίνης.



Εικόνα 3. Το προφίλ έκλουσης της αιμολέμφου από βιτελλογενικό θηλυκό *P. potamios* σε στήλη (10 x 0.8 cm) χρωματογραφίας ανταλλαγής κατιόντων από CM Sepharose CL-6B. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.1 M οξικό νάτριο που περιείχε 10 mM EDTA, pH 5.8 και επίσης δόθηκε στη στήλη γραμμική βαθμίδωση NaCl 0-1 M. Η απορρόφηση των κλασμάτων (4 ml) που συλλέχθηκαν μετρήθηκε στα 280 nm. Το ένθετο δείχνει την ανάλυση με SDS-PAGE σε διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή των κλασμάτων από την πρώτη και δεύτερη κορυφή. Η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie blue. Στήλες 1, 2: Τα κλάσματα 4 και 6 από την πρώτη κορυφή, τα οποία περιέχουν λιποπρωτεΐνη (120 kDa) και αιμοκυανίνη (79 kDa). Στήλες 3-5: Τα κλάσματα 18, 19 και 20 από τη δεύτερη κορυφή, τα οποία περιέχουν βιτελλογενίνη. Στήλη 6: Πρωτεΐνες δείκτες: Φωσφορυλάση b (94 kDa), βόια αλβουμίνη (67 kDa), οβαλβουμίνη (43 kDa), καρβονική ανυδράση (30 kDa), αναστολέας της τρυψίνης (20.1 kDa), α-λακταλβουμίνη (14.4 kDa).

# 3.3. Μοριακή μάζα της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης και των υπομονάδων τους

Η μοριακή μάζα των φυσικών πρωτεϊνών υπολογίσθηκε με χρωματογραφία μοριακής διήθησης λεπτής στοιβάδας, χρησιμοποιώντας Biogel A 1.5 M, Sephacryl

S-300 και Sepharose 4B, ως υλικά για τη δημιουργία της λεπτής στοιβάδας, και βρέθηκε να είναι 551±18 kDa για τη βιτελλογενίνη και 510±19 kDa για τη βιτελλίνη. Η (pore limit) ηλεκτροφόρηση σε διαβαθμισμένες 5-20% πηκτές πολυακρυλαμίδης έδειξε ότι η κύρια ζώνη της φυσικής πρωτεΐνης βρίσκεται σε μία θέση που αντιστοιχεί σε μοριακή μάζα 562 kDa για τη βιτελλογενίνη και 501 kDa για τη βιτελλίνη. Επίσης παρατηρήθηκαν δύο ασθενέστερες ζώνες που αντιστοιχούν σε μοριακή μάζα 750 και 355 kDa για τη βιτελλογενίνη, και 734 και 341 kDa για τη βιτελλίνη (εικόνα 4A). Και οι τρεις αυτές ζώνες τόσο της βιτελλογενίνης όσο και της βιτελλίνης δίνουν την ίδια εικόνα σε SDS-PAGE (εικόνα 4B). Αυτό μας επιτρέπει να χαρακτηρίσουμε τις ζώνες αυτές ως μονομερείς ή πολυμερείς σχηματισμούς της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης.

Η καθαρή βιτελλίνη έδωσε, σε SDS-PAGE, τρία πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα  $115\pm5$ ,  $105\pm3$  και  $85\pm2$  kDa. Η καθαρή βιτελλογενίνη έδωσε την ίδια εικόνα (115, 105 και 85 kDa), αν και στην καθαρή βιτελλογενίνη από πολλά ζώα υπήρχε ένα ακόμα πολυπεπτίδιο, μεγάλης μοριακής μάζας, στη θέση  $181\pm5$  kDa.

Τα προϊόντα της επώασης της βιτελλίνης με dimethyl suberimidate ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική διαβαθμισμένη (5-15%) πηκτή πολυακρυλαμίδης. Παρατηρήθηκαν τρεις κύριες καινούργιες πρωτεϊνικές ζώνες με μοριακή μάζα 178, 211 και 230 kDa. Σε μερικές από τις πηκτές παρατηρήθηκαν δύο ακόμα ζώνες με μοριακή μάζα 251 και 266 kDa.

Στην ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, παρουσία ουρίας, η καθαρή βιτελλογενίνη εμφανίζει τέσσερεις ζώνες και η βιτελλίνη τρεις. Και για τις δύο πρωτεΐνες τα πολυπεπτίδια από τα οποία αποτελούνται δεν είναι απαραίτητα ομοιοπολικά συνδεδεμένα μεταξύ τους, αφού δεν απαιτείται β-μερκαπτοαιθανόλη για να τα χωρίσει στην αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση.

Στον ισοηλεκτρικό εστιασμό η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη απλώθηκαν στη βασική πλευρά της διαβάθμισης του pH, σε τιμές που αντιστοιχούν σε pI μεταξύ 7.15 και 8.0 (εικόνα 5).



**Εικόνα 4.** Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης της καθαρής βιτελλογενίνης και βιτελλίνης του *P. potamios* (ο χρωματισμός έγινε με Coomassie blue).

(A) Pore limit ηλεκτροφόρηση σε διαβαθμισμένη 5-20% πηκτή. Στήλη 1: Βιτελλογενίνη. Στήλη 2: Πρωτεΐνες δείκτες: θυρογλοβουλίνη (669 kDa), φερριτίνη (440 kDa), καταλάση (232 kDa), γαλακτική δεϋδρογενάση (140 kDa), βόια αλβουμίνη (67 kDa). Στήλη 3: Βιτελλίνη. Παρατηρούμε την εμφάνιση των τριών ζωνών με μοριακή μάζα 750, 562 και 355 kDa για τη βιτελλογενίνη (1) και 735, 501 και 341 kDa για τη βιτελλίνη (3).

(B) Οι ζώνες που αντιστοιχούν στη βιτελλογενίνη και τη βιτελλίνη από την εικόνα (4A) κόπηκαν από την πηκτή και αναλύθηκαν με SDS-PAGE. Στήλες 1-3: Οι βιτελλογενικές ζώνες 750 kDa, 562 kDa και 355 kDa, αντίστοιχα. Στήλες 5-7: Οι ζώνες της βιτελλίνης 735 kDa, 501 kDa και 341 kDa, αντίστοιχα. Στήλη 4: Πρωτεΐνες δείκτες όπως στην εικόνα 1. Παρατηρούμε την εμφάνιση των τριών κοινών ζωνών που αντιπροσωπεύουν τις υπομονάδες τις βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, με μοριακή μάζα 115, 105 και 85 kDa. Η υπομονάδα 181 kDa της βιτελλογενίνης εμφανίζεται επίσης στο 2.



**Εικόνα 5.** Ισοηλεκτρικός εστιασμός της καθαρής βιτελλίνης. Η ανάλυση έγινε σε 0.8 mm πηκτή πολυακρυλαμίδης που περιείχε αμφολύτες στην περιοχή pH από 3-10. Στήλη 1: Καθαρή βιτελλίνη. Στήλη 2: Πρωτεΐνες δείκτες. Οι τιμές του pH φαίνονται δεξιά.

## 3.4. Χαρακτηρισμός των αποπρωτεϊνών της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης

Η καθαρή βιτελλογενίνη από πολλά βιτελλογενικά θηλυκά Potamon potamios, έδειξε σε αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση μία ζώνη στη θέση 181 kDa. Αυτή η ζώνη δεν έχει ανιχνευθεί στη βιτελλίνη από ώριμα αυγά ή αυγά που έχουν αποτεθεί.

Η ανάλυση με Western blot έδειξε ότι ο αντιορός εναντίον της υπομονάδας 85 kDa της βιτελλογενίνης εμφανίζει ισχυρό σήμα αναγνώρισης για την αιμολέμφο θηλυκού καβουριού σε περίοδο βιτελλογένεσης και το εκχύλισμα των αυγών. Ο αντιορός αναγνωρίζει τις τρεις κοινές υπομονάδες της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης (115, 105 και 85 kDa), καθώς επίσης και την υπομονάδα 181 kDa της βιτελλογενίνης (εικόνα 6). Αντίθετα ο ίδιος αντιορός δεν έδειξε κανένα σήμα αναγνώρισης για την αιμολέμφο αρσενικού καβουριού και θηλυκού μετά την ωστοκία. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαίωσαν ότι η ζώνη 181 kDa ανήκει πραγματικά στη βιτελλογενίνη. Η ηλεκτροφορητική εικόνα (σε αποδιατακτικές πηκτές) των βιτελλογενινών από διαφορετικά ζώα έδειξε ότι η υπομονάδα 181 kDa

Το πολυπεπτίδιο 181 kDa της βιτελλογενίνης επωάστηκε με τρυψίνη και τα παραγώμενα πεπτίδια διαχωρίστηκαν με SDS-PAGE σε διαβαθμισμένη πηκτή (5-15%). Παρατηρήθηκαν δύο πεπτίδια με μοριακή μάζα 115 kDa και 105 kDa, τα οποία αντιστοιχούν σε αυτά της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης (εικόνα 7). Δηλαδή η υπομονάδα 181 kDa της βιτελλογενίνης αποτελεί πρόδρομο πολυπεπτίδιο των πεπτιδίων 105 kDa και 115 kDa.

Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη ηλεκτροφορήθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Επώαση με FITC-Concanavalin A έδειξε ότι τα πεπτίδια 85 , 105 και 115 kDa της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, αλλά και το πολυπεπτίδιο 181 kDa της βιτελλογενίνης, δέσμευσαν τη λεκτίνη, γεγονός που τα χαρακτήρισε ως γλυκοπεπτίδια με μεγάλη περιεκτικότητα σε μαννόζη.

Η φυσική βιτελλογενίνη και βιτελλίνη απογλυκοζυλιώθηκαν με τα ένζυμα PNGase F, Endo H και Endo H<sub>f</sub>. Η ανάλυση των προϊόντων της απογλυκοζυλίωσης με SDS-PAGE έδειξε ότι η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη εμφανίζουν τα ίδια τρία πεπτίδια με μοριακή μάζα  $108\pm2$ ,  $86\pm4$  και  $72\pm3$  kDa, πράγμα που σημαίνει ότι η γλυκοζυλίωση είναι όμοια μεταξύ της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης.



**Εικόνα 6.** Ανάλυση με Western blot της βιτελλίνης (στήλη 1) από τα αυγά και της βιτελλογενίνης (στήλη 2) από την αιμολέμφο θηλυκού *P. potamios*. Ο αντιορός που χρησιμοποιήθηκε είχε παρασκευαστεί εναντίον της υπομονάδας 85 kDa της βιτελλογενίνης. Παρατηρούμε την αναγνώριση των τριών κοινών υπομονάδων (85, 105 και 115 kDa) της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, καθώς και της υπομονάδας 181 kDa της βιτελλογενίνης.



Εικόνα 7. SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) της ζώνης 181 kDa της βιτελλογενίνης μετά από τρυψινόλυση (στήλη 2). Η ζώνη 181 kDa χωρίστηκε με SDS-PAGE, κόπηκε από την πηκτή, τοποθετήθηκε στο πηγάδι άλλης αποδιατακτικής πηκτής και επιστοιβαδεύτηκε με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (30 μl)που περιείχε 2 μg τρυψίνη. Αφού το δείγμα είχε βγει από το πηγάδι, η ηλεκτροφόρηση διακόπηκε για 30 min, και μετά συνεχίστηκε κανονικά μέχρι η χρωστική να φτάσει στο κάτω μέρος της πηκτής. Στήλη 1: Πρωτεΐνες δείκτες, όπως στην εικόνα 1. Οι αριθμοί Ι και ΙΙ δείχνουν τις θέσεις των υπομονάδων 115 kDa και 105 kDa, αντίστοιχα.



**Εικόνα 8.** Επώαση με Endoglycosidase H<sub>f</sub> (Endo H<sub>f</sub>) της καθαρής βιτελλίνης (στήλες 1, 2) και των υπομονάδων της : 85 kDa (στήλες 3, 4), 105 kDa (στήλες 5, 6) και 115 kDa (στήλες 7, 8). Οι υπομονάδες της βιτελλίνης χωρίστηκαν με SDS-PAGE και κόπηκαν από την πηκτή. Οι πρωτεΐνες εκλούστηκαν από την πηκτή και επωάστηκαν χωριστά η καθεμία με Endo H<sub>f</sub>. Τα δείγματα φορτώθηκαν σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης (διαβαθμισμένη 5-15%). Η πηκτή χρωματίστηκε με Coomassie blue. Στήλες 1, 3, 5, 7 : Βιτελλίνη, 85 kDa, 105 kDa και 115 kDa, αντίστοιχα. Στήλες 2, 4, 6, 8: Τα ίδια δείγματα μετά την επώαση με Endo H<sub>f</sub>. Έ: Endo H<sub>f</sub>.

Για να προσδιοριστεί το ποσοστό γλυκοζυλίωσης σε καθένα από τα τρία κοινά πεπτίδια της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, οι τρεις ζώνες που αντιστοιχούσαν σε αυτά κόπηκαν από αποδιατακτική πηκτή , και οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από την πηκτή με ηλεκτροέκλουση. Καθεμία από τις τρεις πρωτεΐνες (115 kDa, 105 kDa και 85 kDa) επωάστηκε χωριστά με Endo H<sub>f</sub>. Μετά από επώαση μίας ώρας οι απογλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες ηλεκτροφορήθηκαν σε διαβαθμισμένη (5-15%) αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8, η υπομονάδα 115 kDa μετατρέπεται σε 108 kDa, η 105 kDa σε 86 kDa και η 85 kDa σε 72 kDa. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι περίπου το 8-15% της μοριακής μάζας κάθε υπομονάδας αποτελείται από υδατάνθρακες.

Πρέπει να αναφερθεί ακόμα ότι έγιναν προσπάθειες απογλυκοζυλίωσης και για το πολυπεπτίδιο 181 kDa της βιτελλογενίνης, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν αξιόλογα, εξαιτίας της αστάθειας του πολυπεπτιδίου αυτού.

### 3.5. Ανάλυση των πρωτεολυτικών αποτελεσμάτων

Στην εικόνα 9 βλέπουμε την ανάλυση με SDS-PAGE των προϊόντων της βιτελλίνης μετά από πρωτεολυτική διάσπαση με τρυψίνη. Παρατηρούμε ότι τα πεπτίδια 105 kDa και 115 kDa εξαφανίζονται στα πρώτα 5 min της επώασης και παρουσιάζεται ένα πεπτίδιο 70 kDa, το οποίο παραμένει ορατό και μετά από επώαση 1 h και μία ομάδα πεπτιδίων (4) μεταξύ 50 και 60 kDa, τα οποία όμως βαθμιαία εξαφανίζονται. Το πεπτίδιο 85 kDa είναι πιο σταθερό, εξαφανίζεται μετά από επώαση 30 min και εμφανίζονται δύο πεπτίδια 48 και 40 kDa, τα οποία παραμένουν ορατά και μετά από επώαση 1 h. Μετά από επώαση 2.5 h τα πεπτίδια 70, 48 και 40 kDa εξαφανίζονται, για να δώσουν τη θέση τους σε πεπτίδια πολύ μικρής μοριακής μάζας. Δηλαδή μετά από επώαση 5 h στην πηκτή φαίνονται μόνο πεπτίδια μοριακής μάζας κάτω από 20 kDa.

Η επώαση με τρυψίνη των κοινών υπομονάδων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης χωριστά (εικόνα 10) έδειξε ότι οι υπομονάδες 105 και 115 kDa διασπώνται με όμοιο τρόπο και δίνουν τρία κύρια πεπτίδια με μοριακή μάζα 75, 63 και 55 kDa. Η υπομονάδα 85 kDa διασπάται σε πέντε πεπτίδια μοριακής μάζας 66, 60, 46, 41 και 33 kDa.

Η εικόνα 11 δείχνει τα προϊόντα της διάσπασης της βιτελλίνης με χυμοτρυψίνη. Στα πρώτα 15 min επώασης παρατηρούμε ότι τα πεπτίδια 105 και 115 kDa σχεδόν εξαφανίζονται, και εμφανίζονται μία ζώνη στα 95 kDa και τρεις ζώνες 58, 60 και 63 kDa. Το πολυπεπτίδιο 85 kDa διασπάται και δίνει δύο καινούργιες ζώνες (78 και 81 kDa), οι οποίες βαθμιαία εξαφανίζονται και εμφανίζονται δύο ζώνες 42 και 32 kDa. Μετά από επώαση 1 h τα πεπτίδια που υπάρχουν στην πηκτή είναι 32, 42, 58, 63 και 78 kDa. Σε χρόνο επώασης 2.5 h ορατά παραμένουν τα μικρής μοριακής μάζας πεπτίδια (32, 42 και 58 kDa), ενώ τέλος μετά από επώαση 5 h υπάρχουν πεπτίδια πολύ μικρής μοριακής μάζας (κάτω από 20 kDa).

Μετά τη διάσπαση της βιτελλίνης με BrCN και εξέταση των προϊόντων με SDS-PAGE, παρατηρούμε τρία πεπτίδια με μοριακή μάζα 85 kDa, 63 kDa και 53 kDa (εικόνα 12).

Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι η διάσπαση της φυσικής βιτελλογενίνης με τρυψίνη, χυμοτρυψίνη και BrCN έδωσε ανάλογα αποτελέσματα με αυτά της βιτελλίνης.



Εικόνα 9. SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) καθαρής βιτελλίνης και των προϊόντων της μετά τη διάσπασή της με τρυψίνη. Η διάσπαση έγινε στους 37°C και η αναλογία πρωτεΐνη:τρυψίνη ήταν 180:1 (w/w). Στήλη 1: καθαρή βιτελλίνη. Στήλες 2-5: βιτελλίνη μετά από επώαση με τρυψίνη για 5, 15, 30 και 60 min αντίστοιχα. Στήλη 6: πρωτεΐνες δείκτες με μοριακή μάζα όπως σημειώνεται στην εικόνα



**Εικόνα 10.** SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) των υπομονάδων της βιτελλίνης μετά από τρυψινόλυση. Οι υπομονάδες της βιτελλίνης (85, 105 και 115 kDa) χωρίστηκαν με SDS-PAGE,

κόπηκαν από την πηκτή, τοποθετήθηκαν στα πηγάδια άλλης αποδιατακτικής πηκτής και επιστοιβαδεύτηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης (30 μl) που περιείχε 2 μg τρυψίνη. Η ηλεκτροφόρηση διακόπηκε για 40 min, όταν τα δείγματα είχαν βγει από τα πηγάδια, και μετα συνεχίστηκε κανονικά. Στήλες 1, 3, 5: οι υπομονάδες 85, 105 και 115 kDa της βιτελλίνης, αντίστοιχα. Στήλες 2, 4, 6: τα ίδια δείγματα μετά την επώαση με τρυψίνη.



Εικόνα 11. SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) καθαρής βιτελλίνης και των προϊόντων της μετά τη διάσπασή της με χυμοτρυψίνη. Η διάσπαση έγινε στους 37°C και η αναλογία πρωτεΐνη:χυμοτρυψίνη ήταν 180:1 (w/w). Στήλη 1: καθαρή βιτελλίνη. Στήλες 2-5: βιτελλίνη μετά από επώαση με χυμοτρυψίνη για 5, 15, 30 και 60 min αντίστοιχα. Στήλη 6: πρωτεΐνες δείκτες με μοριακή μάζα όπως σημειώνεται στην εικόνα.

Τα παραπάνω πρωτεολυτικά πειράματα δείχνουν ότι το πολυπεπτίδιο 85 kDa είναι πιο σταθερό από τα 105 και 115 kDa. Είναι πιθανόν ότι το πεπτίδιο με μοριακή μάζα 85 kDa, το οποίο εμφανίζεται μετά τη διάσπαση της βιτελλίνης ή βιτελλογενίνης με BrCN να είναι ταυτόσημο με το πολυπεπτίδιο 85 kDa της βιτελλίνης και βιτελλογενίνης που εμφανίζεται με SDS και χωρίς πρωτεολυτική διάσπαση.



Εικόνα 12. SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) της καθαρής βιτελλίνης πριν (στήλη 3) και μετά (στήλη 2) την επώαση με BrCN. Η επώαση έγινε στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου για 36 h και η αναλογία πρωτεΐνη:BrCN ήταν 10:3 (w/w). Στήλη 1: πρωτεΐνες δείκτες: Β-γαλακτοσιδάση (116 kDa), φωσφορυλάση b (97.4 kDa), βόια αλβουμίνη (66 kDa), οβαλβουμίνη (45 kDa), καρβονική ανυδράση (29 kDa).

# **3.6.** Λιπιδική και υδατανθρακική σύσταση της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης

Ποσοτικές μετρήσεις των λιπιδίων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες έχουν το ίδιο ποσοστό περίπου ολικών λιπιδίων, 11.54% και 8.8% αντίστοιχα. Η υδατική πυκνότητα υπολογίστηκε ότι είναι 1.20 g/ml για τη βιτελλογενίνη και 1.21 g/ml για τη βιτελλίνη, γεγονός που τις κατατάσσει στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).

Η ποιοτική ανάλυση των λιπιδίων των δύο πρωτεϊνών έδειξε την παρουσία τόσο άπολων λιπιδίων (ακυλγλυκερόλες και στερόλες) όσο και πολικών (φωσφολιπίδια). Μεταξύ της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης δεν υπάρχουν διαφορές στο είδος των λιπιδίων που περιέχουν, αλλά στην κατανομή αυτών στις δύο πρωτεΐνες (πίνακας 1). Περίπου το 52% των ολικών φωσφολιπιδίων είναι φωσφατιδυλχολίνη, ενώ η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, φωσφατιδυλσερίνη, φωσφατιδυλινοσιτόλη και φωσφατιδυλγλυκερόλη υπάρχουν σε μικρότερες ποσότητες.

Το ποσό των υδατανθράκων που περιέχουν οι δύο πρωτεΐνες μετρήθηκε με τη μέθοδο του αντιδραστηρίου anthrone και βρέθηκε να είναι το ίδιο και για τη βιτελλογενίνη και για τη βιτελλίνη (3.8% και 3.9%, αντίστοιχα).

# 3.7. Τα καροτινοειδή της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης

Η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη εκτός από την απορρόφηση που δείχνουν, όπως σχεδόν όλες οι πρωτεΐνες, στην περιοχή των 280 nm, έδειξαν απορρόφηση και στα 429 nm, 456 nm και 485 nm (εικόνα 13). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι πρωτεΐνες αυτές περιέχουν στο μόριό τους καροτινοειδή. Ο ποσοτικός υπολογισμός των καροτινοειδών μετά την εκχύλισή τους από τις απομονωμένες πρωτεΐνες έδειξε ότι τα καροτινοειδή για τη βιτελλογενίνη και βιτελλίνη είναι 8.81% και 8.01%, αντίστοιχα. Τα είδη των καροτινοειδών που περιέχουν οι δύο πρωτεΐνες αναλύθηκαν με TLC και HPLC.

Η ανάλυση πάνω σε πλάκες TLC σε σύστημα διαλυτών εξάνιο:ακετόνη (70:30 v/v) έδειξε την ίδια εικόνα για τα καροτινοειδή και από τις δύο πρωτεΐνες. Παρατηρήθηκαν 8 ζώνες, από τις οποίες τρεις, με  $R_f$  0.12, 0.18 και 0.92, ήταν οι κυριώτερες. Τα καροτινοειδή αυτά, εκχυλίστηκαν από το υλικό της πλάκας με ακετόνη και μετρήθηκαν οι μέγιστες απορροφήσεις τους (σε ακετόνη), από 360-500 nm. Το καροτινοειδές με  $R_f$  0.12 είχε μέγιστη

		Βιτελλογεν	Βιτελλίνη
		ίνη	
	Αποπρωτεΐ	75.9	79.3
νη			
	Απολα	9.4	6.8
Λιπίδια			
	Φωσφολιπί	2.1	2.0
δια			
	Καροτινοει	8.8	8.0
δή			

κες

Πίνακας 1. Η σύνθεση της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο και της βιτελλίνης από τα αυγά του *P. potamios*. Τα δεδομένα εκφράζονται ως % των πρωτεϊνών. Οι τιμές είναι οι μέσοι όροι από πέντε ανεξάρτητες μετρήσεις.

3.9

απορρόφηση στα 422 nm, 446 nm και 473 nm και ταυτοποιήθηκε ως λουτεΐνη. Το καροτινοειδές με  $R_f$  0.18 έδωσε μία συμμετρική κορυφή στα 468 nm, οπότε ταυτοποιήθηκε ως ασταξανθίνη. Τέλος αυτό με  $R_f$  0.92 έδωσε τρεις κορυφές μέγιστης απορρόφησης, στα 423 nm, 451 nm και 478 nm και ταυτοποιήθηκε ως β-καροτίνη.

Ανάλυση των καροτινοειδών με HPLC έδειξε πάλι τρεις κύριες κορυφές σε χρόνους επαναφοράς 5.6, 13.8 και 39.8 min (εικόνα 14). Τα καροτινοειδή που αντιστοιχούν σ' αυτές τις κορυφές αναγνωρίστηκαν ως ασταξανθίνη (και εστέρες της ασταξανθίνης), λουτεΐνη και β-καροτίνη, αντίστοιχα.



**Εικόνα 13.** Το φάσμα απορρόφησης της βιτελλογενίνης (A) και της βιτελλίνης (B). Η απορρόφηση μετρήθηκε σε 1 ml πρωτεϊνικής διάλυσης, από 360 nm- 550 nm



**Εικόνα 14.** Το προφίλ της ανάλυσης με HPLC του εκχυλίσματος των καροτινοειδών. Οι τρεις κορυφές που παρατηρούνται σε χρόνο επαναφοράς (retention time) 5.6 min, 13.8 min, και 39.8 min αντιστοιχούν στην ασταξανθίνη (και εστέρες της ασταξανθίνης), τη λουτεΐνη και τη β-καροτίνη.

### 3.8. Επαγωγή της βιτελλογένεσης

Στα πειράματα επαγωγής της βιτελλογένεσης ελήφθησαν υπόψην πειράματα που έχουν γίνει παλαιότερα σε καρκινοειδή, από τα οποία συνάγεται το αποτέλεσμα ότι ο σύμπλοκος νευροενδοκρινής αδένας (Χ-όργανο-sinus gland) που βρίσκεται στη βάση των μίσχων των ματιών αναστέλει την ανάπτυξη των ωοκυττάρων σε αυγά (Bomirski and Klek, 1974, Anilkumar and Adiyodi, 1980, Anilkumar and Adiyodi, 1985). Αφαίρεση αυτών των αδένων, με σύγχρονη απομάκρυνση των ματιών οδηγεί στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων (Quackenbush and Herrnkind, 1981, Charniaux-Cotton, 1985, Quackenbush, 1986, Fingerman, 1987). Φυσικά τα πειράματα αυτά, είναι συνδεμένα με το στάδιο της ανάπτυξης του ζώου, καθώς επίσης και της χρονικής περιόδου που γίνονται (Anilkumar and Adiyodi, 1980).

Η διεξαγωγή των δικών μας πειραμάτων με αφαίρεση των αδένων, έγινε σε περιόδους που τα ζώα βρίσκονταν στο ενδιάμεσο διάστημα μεταξύ δύο ωοτοκιών, δηλαδή από Νοέμβριο μέχρι Φεβρουάριο του επόμενου έτους. Θηλυκά ώριμα καβούρια *Potamon potamios*, τα οποία είχαν διαφορετικό μέγεθος και πιθανόν ηλικία (ο όρος ηλικία αντιπροσωπεύει το πόσες φορές τα καβούρια είχαν βρεθεί στο στάδιο της ωοτοκίας), υποβλήθηκαν σε αφαίρεση των μίσχων των ματιών που περιέχουν αυτόν το σύμπλοκο νευροενδοκρινή αδένα. Πρέπει να αναφερθεί από την αρχή ότι με την αφαίρεση των μίσχων των ματιών επάγεται εκτός από τη βιτελλογένεση και η έκδυση. Η εξήγηση του φαινομένου αυτού έγινε από τα παλαιότερα πειράματα της Webb (1977), που δείχνουν ότι στο ίδιο σύμπλοκο υπάρχει και ένας άλλος αδένας που παράγει μία ορμόνη, γνωστή ως MIH (molting inhibiting hormone), η οποία ρυθμίζει την έκδυση.

Ο έλεγχος της βιτελλογένεσης έγινε με τακτική αιμοληψία (κάθε δύο ημέρες) από τα ζώα και εξέταση της αιμολέμφου με SDS-PAGE. Ο έλεγχος αυτός σε όλα τα χειρουργημένα ζώα έδειξε ότι η βιτελλογενίνη εμφανίζεται στην αιμολέμφο (δευτερογενής βιτελλογένεση) μετά την παρέλευση 17±3 ημερών από την επέμβαση (εικόνα 15Α). Όμως 4-6 εβδομάδες μετά την επέμβαση, τα ζώα ήρθαν στη διαδικασία της έκδυσης.

Η απομόνωση και ο καθαρισμός της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο αυτών των ζώων έγινε με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων και η βιτελλογενίνη αυτή εξετάστηκε με SDS-PAGE σε διαβαθμισμένη (5-15%) πηκτή πολυακρυλαμίδης (εικόνα 15B). Η επαγώμενη βιτελλογενίνη από τα περισσότερα ζώα (80%) είχε μόνο τις υπομονάδες



Εικόνα 15. SDS-PAGE σε διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή, χρωματισμένη με Coomassie blue.

(A) Αιμολέμφος θηλυκού καβουριού στο οποίο έγινε αφαίρεση των μίσχων των ματιών. Στήλη 1: πρωτεΐνες δείκτες: μυοσίνη (205 kDa), β-γαλακτοσιδάση (116 kDa), φωσφορυλάση b (94 kDa), βόια αλβουμίνη (66 kDa), οβαλβουμίνη (43 kDa) και καρβονική ανυδράση (29 kDa). Στήλη 2: πριν την αφαίρεση. Στήλη 3: 17 ημέρες μετά την αφαίρεση. Στήλη 4: 25 ημέρες μετά την αφαίρεση.

(B) Βιτελλογενίνη (στήλη 2) από την αιμολέμφο θηλυκού καβουριού, στο οποίο έγινε αφαίρεση των μίσχων των ματιών, μετά τον καθαρισμό της με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων σε στήλη από CM Sepharose CL-6B. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 0.1 M οξικό νάτριο που περιείχε 10 mM EDTA, pH 5.8 και η έκλουση της βιτελλογενίνης έγινε με γραμμική βαθμίδωση NaCl 0-1 M. Στήλη 1: πρωτεΐνες δείκτες όπως στο (A).

181 kDa και 85 kDa. Όμως η βιτελλογενίνη από μερικά άλλα εγχειρισμένα ζώα (20%) είχε ως κύριες υπομονάδες τις 181 kDa και 85 kDa, αλλά υπήρχαν και οι 115 kDa και 105 kDa (ως ασθενείς ζώνες). Η βιτελλίνη από τις ωοθήκες των εγχειρισμένων ζώων ήταν η ίδια με τη φυσιολογική βιτελλίνη.

Από τα ζώα στα οποία αφαιρέθηκαν οι μίσχοι των ματιών κανένα δεν απέθεσε αυγά, για το λόγο αυτό όταν τα ζώα απεβίωσαν έγινε εξέταση των ωοθηκών τους. Οι ωοθήκες των περισσότερων ζώων (αυτά που η βιτελλογενίνη τους είχε μόνο τις υπομονάδες 85 kDa και 181 kDa) περιείχαν

πολύ μικρά αυγά τα οποία όμως δεν ήταν κανονικά σχηματισμένα, δηλαδή έμοιαζαν περισσότερο με μια άμορφη μάζα. Άλλα ζώα (αυτά που η βιτελλογενίνη τους είχε και τις τέσσερεις υπομονάδες) είχαν στην εσωτερική κοιλότητα του σώματός τους μεγάλα αυγά, κανονικά σχηματισμένα.

Ο αντιορός για την υπομονάδα 85 kDa της φυσιολογικής βιτελλογενίνης έδωσε έντονο σήμα αναγνώρισης για τις υπομονάδες της επαγώμενης βιτελλογενίνης (εικόνα 16Α). Ο αντιορός που παρήχθηκε, σε ποντίκια, εναντίον της υπομονάδας 181 kDa της επαγώμενης βιτελλογενίνης, έδωσε έντονο σήμα αναγνώρισης για τις υπομονάδες 181, 115 και 105 kDa της φυσιολογικής βιτελλογενίνης (εικόνα 16B). Όμως δεν υπήρξε αναγνώριση της υπομονάδας 85 kDa. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ο αντιορός που παρήχθηκε για την υπομονάδα 85 kDa της επαγώμενης βιτελλογενίνης αντιδρά όπως ο αντιορός για την υπομονάδα 85 kDa της φυσιολογικής βιτελλογενίνης.

Το γεγονός ότι ο αντιορός για την 181 kDa δεν αναγνωρίζει την 85 kDa είναι παράξενο και μπορεί να οφείλεται σε τεχνικούς λόγους (τρόπος παρασκευής του αντιορού) ή στη δομή του πολυπεπτιδίου 181 kDa (οι επίτοποι που σχετίζονται με το πεπτίδιο 85 kDa δεν είναι εκτεθημένοι). Παρόμοιο γεγονός έχει αναφερθεί για τη βιτελλογενίνη της Lymantria dispar, όπου ο αντιορός για τη μικρή υπομονάδα (36 kDa) αναγνωρίζει τη μεγάλη (190 kDa), αλλά όχι το αντίστροφο (Hiremath and Lehtoma, 1997).

Αφαίρεση των μίσχων των ματιών έγινε και σε αρσενικά καβούρια, όμως η ηλεκτροφορητική εικόνα της αιμολέμφου τους παρέμεινε η ίδια όπως και πριν την εγχείρηση. Η ανάλυση με Western blot έδειξε ότι ο αντιορός για την υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης δε δίνει κανένα σήμα αναγνώρισης για την αιμολέμφο αρσενικού καβουριού που έχει υποβληθεί σε αφαίρεση των μίσχων των ματιών (εικόνα 16 A). Τέλος 3 με 4 εβδομάδες μετά την επέμβαση και αυτά τα καβούρια έπαθαν έκδυση και απεβίωσαν.

Η ταυτοποίηση του πολυπεπτιδίου 181 kDa ως πρόδρομου πολυπεπτιδίου των πεπτιδίων 105 kDa και 115 kDa, επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η ηλεκτροφορητική εικόνα (σε SDS-PAGE) της επαγώμενης βιτελλογενίνης, που αποτελείται μόνο τα πολυπεπτίδια 85 kDa και 181 kDa, μετά από δεκάλεπτη επώαση με τρυψίνη, είναι η ίδια με αυτήν της φυσιολογικής βιτελλογενίνης [δηλαδή εμφανίζονται και τα τέσσερα πολυπεπτίδια: 85 kDa, 105 kDa, 115 kDa και 181 kDa (αναλογικά ελαττωμένο)] (εικόνα 17).



Εικόνα 16. Ανάλυση με Western blot.

(A) Χρήση αντιορού εναντίον της υπομονάδας 85 kDa της φυσιολογικής βιτελλογενίνης. Στήλες 1, 2: αιμολέμφος αρσενικού καβουριού πριν και μετά την αφαίρεση των μίσχων των ματιών, αντίστοιχα. Στήλες 3, 4: αιμολέμφος θηλυκού καβουριού πριν και μετά την αφαίρεση των μίσχων των ματιών, αντίστοιχα. Στήλη 5: καθαρή βιτελλίνη. Παρατηρούμε ότι ο αντιορός αναγνωρίζει μόνο τις υπομονάδες 85 και 181 kDa της επαγώμενης βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο του θηλυκού καβουριού.

(B) Χρήση αντιορού εναντίον της υπομονάδας 181 kDa της επαγώμενης βιτελλογενίνης. Στήλη 1: καθαρή βιτελλίνη. Στήλη 2: καθαρή βιτελλογενίνη (φυσιολογική). Παρατηρούμε ότι ο αντιορός αναγνωρίζει μόνο τις υπομονάδες 105 και 115 kDa της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης και την υπομονάδα 181 kDa της βιτελλογενίνης.



**Εικόνα 17.** SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) της επαγώμενης βιτελλογενίνης (που είχε μόνο τις υπομονάδες 85 kDa και 181 kDa) πριν (στήλη 1) και μετά (στήλη 2) από τρυψινόλυση. Τριάντα μg πρωτεΐνης επωάστηκαν με 0.5 μg τρυψίνης στους 37°C,για 10 min και σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM Tris-HCl, pH 8.0. Μετά το τέλος του χρόνου επώασης προστέθησαν 2 μl PMSF και 25 μl ρυθμιστικό διάλυμα μετουσίωσης και το δείγμα θερμάνθηκε στους 100°C. Στήλη 3: Πρωτεΐνες δείκτες με μοριακή μάζα (kDa) όπως σημειώνεται.

#### 3.9. In vivo πειράματα

Τα in vivo πειράματα έγιναν σε θηλυκά καβούρια, τις πρώτες ημέρες της δευτερογενούς βιτελλογένεσης (δηλαδή μεταξύ της πρώτης και πέμπτης ημέρας από την εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο). Στα καβούρια αυτά έγινε ένεση με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη, διαλυμένη σε ισοτονικό διάλυμα για καβούρια. Η ενσωμάτωση της ραδιοσημασμένης μεθειονίνης στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου (οι οποίες είχαν κατακρημνιστεί με TCA) παρουσιάζεται στην εικόνα 18. Ο ρυθμός ενσωμάτωσης της [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης στο σύνολο των πρωτεϊνών της αιμολέμφου ήταν σχεδόν γραμμικός τις 48 πρώτες ώρες από την ένεση (εικόνα 18). Ανάμεσα στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου, οι οποίες αναλύθηκαν με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία, υπήρχαν δύο πεπτίδια με μοριακή μάζα 181 kDa και 85 kDa. Τα πεπτίδια αυτά αρχικά εμφανίστηκαν ως ασθενείς ζώνες για να μετατραπούν σε πολύ έντονες όσο αυξανόταν ο χρόνος από την ένεση (εικόνα 19). Οι υπομονάδες με μοριακή μάζα 115 kDa και 105 kDa ήταν ασθενώς ραδιοσημασμένες. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι οι υπομονάδες 181 kDa και 85 kDa ήταν οι πρώτες που συντέθησαν.

Μετά την παρέλευση τουλάχιστον 48 ωρών από την ένεση, έγινε αιμοληψία και το δείγμα (1 ml αιμολέμφος) υποβλήθηκε σε απομόνωση της βιτελλογενίνης, με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων, και έλεγχο της ραδιενέργειας των κυρίων πρωτεϊνών της αιμολέμφου. Όπως έχουμε δείξει οι κύριες πρωτεΐνες της αιμολέμφου κατά την περίοδο της ωογένεσης είναι η βιτελλογενίνη και η αιμοκυανίνη. Η λιποπρωτεΐνη, η οποία στα κανονικά ζώα είναι δεύτερη σε ποσότητα πρωτεΐνη μετά την αιμοκυανίνη, κατά την περίοδο της ωογένεσης είναι δευτερεύουσα πρωτεΐνη. Στην εικόνα 20 φαίνεται το διάγραμμα μέτρησης του ποσού πρωτεΐνης (mg), της ραδιενέργειας (CPM) και του πηλίκου CPM/mg πρωτεΐνης, για κάθε κλάσμα από τη στήλη ιοντοανταλλαγής. Τα κλάσματα 1-9 περιέχουν αιμοκυανίνη και λιποπρωτεΐνη, ενώ τα 18-21 βιτελλογενίνη. Παρατηρούμε ότι η ενσωμάτωση της ραδιενέργειας στη βιτελλογενίνη ήταν μεγαλύτερη από ότι στην αιμοκυανίνη και τη λιποπρωτεΐνη μαζί, γεγονός που σημαίνει ότι ο ρυθμός σύνθεσης της βιτελλογενίνης κατά την περίοδο της ωογένεσης είναι μεγαλύτερος από αυτόν για τις άλλες πρωτεΐνες της αιμολέμφου. Παρόμοιες μετρήσεις για τις πρωτεΐνες των αυγών που αποθέτουν τα ραδιοσημασμένα θηλυκά ότι καβούρια έδειξαν το πηλίκο CPM/mg πρωτεΐνης για τη βιτελλίνη είναι 20 φορές μεγαλύτερο από αυτό για την αιμοκυανίνη.

57



Εικόνα 18. Διάγραμμα ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου. Θηλυκού καβούρι που βρισκόταν σε περίοδο βιτελλογένεσης δέκτηκε ένεση με 500 μl διάλυση [<sup>35</sup>S]μεθειονίνης, συγκέντρωσης 0.5 μCi/μl. Σε διάστημα 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5, 12, 24, 31.5 και 49 ωρών μετά την ένεση έγινε αιμοληψία από τα καβούρι και μετρήθηκε η ραδιενέργεια (CPM) στην αιμολέμφο, στο μη πρωτε:ινικό κομμάτι και τις πρωτεΐνες της αιμολέμφου. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε 20 μl αιμολέμφου. (- - -) CPM στην αιμολέμφο συνολικά. (\_.\_) CPM στο μη πρωτεϊνικό κομμάτι της αιμολέμφου. (\_\_\_) CPM στις πρωτεΐνες της αιμολέμφου.

Η εξέταση των κλασμάτων που περιείχαν τη βιτελλογενίνη έγινε με SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία. Η χρωματισμένη με Coomassie blue πηκτή (εικόνα 21A) έδειξε την παρουσία και των τεσσάρων ετεροπεπτιδίων στη σύνθεση του μορίου της βιτελλογενίνης. Όμως η αυτοραδιογραφία της ίδιας πηκτής έδειξε ότι οι ενδιάμεσες υπομονάδες (105 και 115 kDa) ήταν ασθενώς ή καθόλου ραδιοσημασμένες (εικόνες 21B και 21C). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι η βιτελλογενίνη εκκρίνεται αρχικά στην αιμολέμφο σε μία πρόδρομη μορφή, η οποία αποτελείται από τα δύο ετεροπεπτίδια με μοριακή μάζα 181 kDa και 85 kDa.



Εικόνα 19. Αυτοραδιογραφία αποδιατακτικής πηκτής πολυακρυλαμίδης στην οποία είχε ηλεκτροφορηθεί αιμολέμφος θηλυκού καβουριού, που είχε δεκτεί ένεση με 500 μl διάλυση [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης, συγκέντρωσης 0.5 μCi/μl. Η αιμολέμφος αφαιρέθηκε από το ζώο σε χρόνους 0.5, 2.5, 4.5, 6.5, 8.5, 12, 24, 48 και 72 ωρών μετά την ένεση και οι πρωτεΐνες κατακρημνίστηκαν με 10% TCA (τελική συγκέντρωση) πριν την ηλεκτροφόρησή τους σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης 7.5%. Οι στήλες της πηκτής αντιστοιχούν στα δείγματα της αιμολέμφου που αφαιρέθηκαν στο χρόνο που υποδεικνύεται. Παρατηρούμε την εμφάνιση των ζωνών με μοριακή μάζα 85 και 181 kDa.

Θηλυκό καβούρι που βρισκόταν σε περίοδο βιτελλογένεσης, δέχτηκε ένεση με σημασμένη (με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη), βιτελλογενίνη (συνολικά 195000 CPM), η οποία είχε παραχθεί από τα παραπάνω πειράματα. Η βιτελλογενίνη αυτή είχε και τις τέσσερεις υπομονάδες (85, 105, 115 και 181 kDa). Με αιμοληψίες (10 μl) που έγιναν 10 min, 24 h, 48 h και 72 h μετά την ένεση και μέτρηση της ραδιενέργειας (CPM) της αιμολέμφου, παρατηρήσαμε ότι η ραδιενέργεια στην αιμολέμφο μειώνεται. Δέκα ημέρες μετά την ένεση το καβούρι απέθεσε αυγά. Σαράντα απ' αυτά τα αυγά (περίπου το 1/8 των συνολικών) ομογενοποιήθηκαν σε συνολικό όγκο διαλύματος 3 ml. Η βιτελλίνη απομονώθηκε με χρωματογραφία ανταλλαγής κατιόντων από 1 ml εκχυλίσματος. Τα κλάσματα που περιείχαν τη βιτελλίνη ενώθηκαν και μέτρηση της ραδιενέργειας έδωσε την τιμή 1362 CPM. Μέτρηση της ραδιενέργειας των κλασμάτων που περιείχαν αιμοκυανίνη έδωσε μηδενική τιμή. Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτική πηκτή πολυακρυλαμίδης έδειξε ότι η βιτελλίνη είχε τις γνωστές τρεις υπομονάδες (85, 105, 115 kDa). Δεν υπήρχε δηλαδή η υπομονάδα 181 kDa.



**Εικόνα 20.** Διάγραμμα μέτρησης του ποσού πρωτεΐνης σε mg (\_\_\_\_), της ραδιενέργειας σε CPM (\_\_\_\_) και του πηλίκου CPM/mg πρωτεΐνης(- - -) στα κλάσματα από στήλη ανταλλαγής κατιόντων CM Sepharose CL-6B. Στη στήλη είχε δοθεί 1 ml αιμολέμφου που αφαιρέθηκε από θηλυκό καβούρι σε περίοδο βιτελλογένεσης 48 ώρες μετά από ένεση με 500 μl διάλυση [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης, συγκέντρωσης 0.5 μCi/μl. Τα κλάσματα 1-9 περιείχαν αιμοκυανίνη και λιποπρωτεΐνη, ενώ τα 18-21 καθαρή βιτελλογενίνη.



**Εικόνα 21.** SDS-PAGE και αυτοραδιογραφία βιτελλογενίνης και βιτελλίνης που είχαν σημανθεί με [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη.

(A) SDS-PAGE (διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) της βιτελλογενίνης (στήλη 1) και της βιτελλίνης (στήλη 2) θηλυκού P. potamios, το οποίο είχε δεκτεί ένεση με 500 μl διάλυση [<sup>35</sup>S]μεθειονίνης, συγκέντρωσης 0.5 μCi/μl.

(**B**) Αυτοραδιογραφία της πηκτής από την εικόνα (21A). Παρατηρούμε την ασθενή εμφάνιση των υπομονάδων 105 και 115 kDa της βιτελλογενίνης (στήλη 1). Στήλη 2: βιτελλίνη.

(C) Αυτοραδιογραφία αποδιατακτικής πηκτής (διαβαθμισμένη 5-15%) στην οποία είχε ηλεκτροφορηθεί βιτελλογενίνη από διαφορετικό θηλυκό P. potamios, που όμως και αυτό είχε δεκτεί ένεση με 500 μl διάλυση [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνης, συγκέντρωσης 0.5 μCi/μl. Παρατηρούμε ότι δεν εμφανίζονται οι υπομονάδες με μοριακή μάζα 105 και 115 kDa.

## 3.10. In vitro πειράματα

Τα πειράματα in vitro σύνθεσης πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας ιστούς (ωοθήκες και ηπατοπάγκρεας) από θηλυκά καβούρια τα οποία βρίσκονταν στις πρώτες ημέρες δευτερογενούς βιτελλογένεσης.

Από τις πρώτες ώρες της επώασης των ιστών παρατηρήθηκε μείωση της ελεύθερης ραδιενέργειας του μέσου επώασης και εμφάνιση ραδιοσημασμένων πρωτεϊνών, όπως φαίνεται στις εικόνες 22A και 22B. Η απορρόφηση δηλαδή της <sup>35</sup>S-μεθειονίνης από τους ιστούς και η ενσωμάτωσή της στις νεοσυντεθιμένες πρωτεΐνες γίνεται γρήγορα τις τέσσερεις πρώτες ώρες της επώασης.

Η εξέταση των νεοσυντεθιμένων πρωτεϊνών που υπήρχαν στο εκχύλισμα έγινε με ηλεκτροφόρηση σε διαβαθμισμένη (5-15%) πηκτή πολυακρυλαμίδης. Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων, συγκρίθηκαν οι εικόνες από το χρωματισμό της πηκτής με Coomassie blue, την αυτοραδιογραφία και το Western blot. Η χρωματισμένη με Coomassie πηκτή έδειξε την παρουσία των τριών υπομονάδων της βιτελλογενίνης, με μοριακή μάζα 85, 105 και 115 kDa, ανάνεσα στις κατακρημνισμένες με TCA πρωτεΐνες του εκχυλίσματος από το ηπατοπάγκρεας (εικόνα 23Α). Όταν η πηκτή αυτή αναλύθηκε με αυτοραδιογραφία, παρατηρήθηκε η εμφάνιση και των τεσσάρων πολυπεπτιδίων (85, 105, 115 και 181 kDa) της βιτελλογενίνης, αλλά και ενός ακόμα πολυπεπτιδίου με μοριακή μάζα 224+4 kDa (εικόνα 24). Η ανάλυση με Western blot, χρησιμοποιώντας τον αντιορό για την υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης, έδειξε ότι στο εκχύλισμα του ηπατοπαγκρέατος υπήρχαν πέντε ανοσοενεργά πολυπεπτίδια στις θέσεις 85, 105, 115, 181 και 224 kDa (εικόνα 25).

Η εξέταση του μέσου επώασης του ηπατοπαγκρέατος με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση και χρωματισμό της πηκτής με Coomassie blue, αλλά και η αυτοραδιογραφία δεν έδωσαν ξεκάθαρα αποτελέσματα για την ύπαρξη ή όχι των ζωνών που αντιστοιχούν στις υπομονάδες της βιτελλογενίνης. Όμως η ανάλυση με Western blot χρησιμοποιώντας τον αντιορό για την υπομονάδα 85kDa της βιτελλογενίνης έδειξε την ύπαρξη των ζωνών 85, 105, 115 και 181 kDa, αλλά όχι της 224 kDa (εικόνα 25).

Οι πρωτεΐνες από το εκχύλισμα της ωοθήκης κατακρημνίστηκαν με TCA και εξετάστηκαν με SDS-PAGE, σε διαβαθμισμένη πηκτή (5-15%), αυτοραδιογραφία και Western blot. Η χρωματισμένη με Coomassie blue πηκτή έδειξε τις τρεις υπομονάδες (85, 105 και 115 kDa) της βιτελλίνης, αλλά και δύο ζώνες στην περιοχή 181 και 224 kDa (εικόνα 23B). Στην

62



Εικόνα 22. Διάγραμμα ενσωμάτωσης της ραδιενέργειας στις νεοσυντεθιμένες πρωτεΐνες που εκκρίθηκαν από τους ιστούς [ηπατοπάγκρεας (A) και ωοθήκη (B)] στο μέσου επώασης κατά τη διάρκεια οκτάωρης επώασης in vitro, σε σχέση με το χρόνο (h). Οι ιστοί αφαιρέθηκαν από θηλυκό καβούρι σε περίοδο βιτελλογένεσης και επωάστηκαν σε μέσο που περιείχε [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη σε συγκέντρωση 130 μCi/ml. Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε 20 μl μέσου επώασης. (\_.\_) CPM του μέσου επώασης (αριστερός άξονας CPM). (- - ) CPM του μη πρωτεϊνικού τμήματος του μέσου επώασης (αριστερός άξονας CPM). (\_\_) CPM των πρωτεϊνών του μέσου επώασης (δεξιός άξονας CPM).

αυτοραδιογραφία (εικόνα 24) και το Western blot (εικόνα 25) εμφανίστηκαν σημασμένες και ανοσολογικά ενεργές και οι πέντε υπομονάδες (85, 105, 115, 181 και 224 kDa), που ανιχνεύθηκαν και στο εκχύλισμα του ηπατοπαγκρέατος.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η βιτελλογενίνη συντίθεται από το ηπατοπάγκρεας, αλλά και από την ωοθήκη. Είναι πιθανόν λοιπόν το πολυπεπτίδιο 181 kDa, το οποίο εκκρίνεται από το ηπατοπάγκρεας στο μέσο επώασης (αλλά, όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, βρέθηκε και στην αιμολέμφο βιτελλογενικών θηλυκών), να αποτελεί την εξωκυτταρική πρόδρομη μορφή της βιτελλογενίνης. Ενώ αντίθετα το πολυπεπτίδιο 224 kDa, το οποίο δεν ανιχνεύθηκε ποτέ ούτε στο μέσο επώασης, αλλά ούτε στην αιμολέμφο των βιτελλογενικών θηλυκών, να αποτελεί την εσωκυτταρική πρόδρομη μορφή της βιτελλογενίνης.



**Εικόνα 23.** SDS-PAGE (σε διαβαθμισμένη 5-15% πηκτή) του εκχυλίσματος ιστών (ηπατοπάγκρεας και ωοθήκη) μετά από 8 ώρες επώαση in vitro.

(A) Στήλη 1: καθαρή βιτελλίνη. Στήλη 2: εκχύλισμα ηπατοπαγκρέατος. Στήλη 3: πρωτεΐνες δείκτες: β-γαλακτοσιδάση (116 kDa), φωσφορυλάση b (94 kDa), βόια αλβουμίνη (66 kDa), οβαλβουμίνη (43 kDa) και καρβονική ανυδράση (29 kDa).

(B) Στήλη 1: πρωτεΐνες δείκτες όπως το (A). Στήλη 2: καθαρή βιτελλίνη. Στήλη 3: εκχύλισμα ωοθήκης.



Εικόνα 24. Αυτοραδιογραφία αποδιατακτικής πηκτής πολυακρυλαμίδης (διαβαθμισμένη 5-15%), στην οποία είχαν ηλεκτροφορηθεί τα εκχυλίσματα ιστών (ηπατοπάγκρεας και ωοθήκη), μετά από 8 ώρες επώαση in vitro σε επωαστικό μέσο που περιείχε [<sup>35</sup>S]-μεθειονίνη σε συγκέντρωση 130 μCi/ml. Στήλη 1: καθαρή βιτελλογενίνη. Στήλη 2: εκχύλισμα ωοθήκης. Στήλη 3: εκχύλισμα ηπατοπαγκρέατος. Παρατηρούμε τις ζώνες 85, 105, 115 και 181 kDa, αλλά και τη νεοεμφανιζόμενη 224 kDa.



65

Εικόνα 25. Western blot ανάλυση, χρησιμοποιώντας τον αντιορό για την υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης, των εκχυλισμάτων των ιστών (ηπατοπάγκρεας και ωοθήκη) και του μέσου επώασης του ηπατοπαγκρέατος, μετά από 8 ώρες επώαση in vitro. Στήλη 1: καθαρή βιτελλογενίνη. Στήλη 2: εκχύλισμα ηπατοπαγκρέατος. Στήλη 3: εκχύλισμα ωοθήκης. Στήλη 4: πρωτεΐνες από το μέσο επώασης του ηπατοπαγκρέατος. Παρατηρούμε ότι ο αντιορός αναγνωρίζει και τη ζώνη 224 kDa (στα εκχυλίσματα του ηπατοπαγκρέατος και της ωοθήκης).

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το χερσαίο καβούρι Potamon potamios αποθέτει τα αυγά του μία μόνο φορά κατά τη διάρκεια του ετήσιου κύκλου του. Η εποχή της αναπαραγωγής του βρέθηκε να εξαρτάται από τη μετάβαση από τις μικρές στις μεγάλες ημέρες, μεταξύ τέλους Μαρτίου και Ιουλίου. Η μετάβαση αυτή έχει περιγραφεί ως "long day onset" (Nelson et al., 1983, 1988, Quackenbush, 1994). Ot Nelson et al. (1983) αναφέρουν ότι στα θηλυκά Homarus americanus η βιτελλογένεση και ωοτοκία μπορεί να καθυστερήσουν αν συμβεί έκδυση ενδιάμεσα στη μετάβαση αυτή. Αν η χρονική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών γεγονότων, δηλαδή της έκδυσης και της μετάβασης από τις μικρές στις μεγάλες ημέρες, είναι μεγάλη τότε δε συμβαίνει ωοτοκία και μπορεί να επακολουθήσει απορρόφηση των ωοθηκών. Στον P. potamios αντίθετα δεν παρατηρήσαμε ποτέ κάτι ανάλογο. Η έκδυση είναι φαινόμενο ανεξάρτητο από την ωοτοκία, δηλαδή το καβούρι P. potamios είναι ανεκδυσικό είδος (Adiyodi and Adiyodi, 1970). Η ποσότητα της βιτελλογενίνης που κυκλοφορεί μέσα στην αιμολέμφο του καβουριού, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων, αυξάνεται δραστικά (10 mg ανά ml αιμολέμφου) και εξαφανίζεται 10 ημέρες πριν την ωοτοκία. Αυτή η φάση της βιτελλογένεσης, που είναι γνωστή ως δευτερογενής βιτελλογένεση (Dehn et al., 1983), έχει διάρκεια 50 ημέρες. Αύξηση της συγκέντρωσης της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων και απότομη μείωσή της πριν την ωοτοκία, έχει αναφερθεί επίσης στον αστακό Homarus americanus (Byard and Aiken, 1984) και τις γαρίδες του γλυκού νερού Macrobrachium rosenbergii (Derelle et al., 1986, Chang and Shih, 1995) каз Macrobrachium nipponense (Okumura et al., 1992).

Από τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα συνάγεται ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης περιορίζεται χρονικά μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοκυττάρων και τη μετατροπή τους σε αυγά. Η ύπαρξη της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο δείχνει επίσης ότι η αιμολέμφος αποτελεί το μέσο της συγκέντρωσης της βιτελλογενίνης. Από εκεί η βιτελλογενίνη προσλαμβάνεται στα αυγά γεγονός που καταδεικνύεται από την εξαφάνισή της από την αιμολέμφο όταν η ωογένεση έχει περατωθεί.

Είναι γνωστό από παλαιότερες μελέτες ότι στη βάση των μίσχων των ματιών των καρκινοειδών υπάρχει το σύμπλοκο του Χ-οργάνου και ενός νευροενδοκρινή αδένα (sinus gland), ο οποίος παράγει την ορμόνη αναστολής της βιτελλογένεσης (VIH), ή ορμόνη αναστολής των γονάδων (GIH) όπως αλλιώς ονομάζεται, και ότι η αφαίρεση των μίσχων των ματιών επάγει πρόωρη ανάπτυξη των γονάδων σε όλα σχεδόν τα καρκινοειδή (Quackenbush and Herrnkind, 1981, Charniaux Cotton, 1985, Quackenbush, 1986, Fingerman, 1987). Οι Quackenbush and Herrnkind (1981) έδειξαν ότι στον αστακό *Panulirus argus* εμφύτευση του σύμπλοκου αυτού αδένα σε ζώα από τα οποία είχαν αφαιρεθεί οι μίσχοι των ματιών κατέστειλε την αναμενόμενη ανάπτυξη των γονάδων. Οπότε συμπέραναν ότι η απουσία της VIH είναι υπεύθυνη για την πρόωρη ανάπτυξη των γονάδων μετά από αφαίρεση των μίσχων των ματιών. Φαίνεται όμως ότι εξαιτίας της απουσίας των μίσχων των ματιών η ωοθήκη δεν έχει την ικανότητα να υποστηρίξει μια κανονική και ισορροπημένη βιτελλογενική διαδικασία (Anilkumar and Adiyodi, 1980), γιατί η ανάπτυξη της δεν είναι φυσιολογική (Anilkumar and Adiyodi, 1985, Webb, 1977, Bomirski and Klek, 1974). Η ανάπτυξη επομένως των ωοκυττάρων και η ωρίμανσή τους σε αυγά με την απόθεση βιτελλινών φαίνεται να είναι προβληματική (Anilkumar and Adiyodi, 1980). Η απορρόφηση της βιτελλογενίνης μέσα στα ωοκύτταρα δεν ερευνήθηκε, είναι όμως πιθανό ότι και η ενδοκύττωση της βιτελλογενίνης στα ωοκύτταρα δεν είναι φυσιολογική.

Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται κατανοητό ότι η αφαίρεση των μίσχων των ματιών στα καρκινοειδή συντείνει στην πρώιμη ωρίμανση των ζώων και την ανάπτυξη των γονάδων στα θηλυκά. Οι γονάδες των θηλυκών αναπτύσσουν τα ωοκύτταρά τους τα οποία όμως δεν είναι φυσιολογικά. Φυσικά ο βαθμός της ανάπτυξης και η απόκλιση από τα φυσιολογικά ωοκύτταρα εξαρτάται από τη χρονική περίοδο κατά την οποία γίνεται η αφαίρεση των μίσχων (Quackenbush and Herrnkind, 1981). Σε όλες τις εργασίες που αναφέραμε παραπάνω, από τις οποίες οι περισσότερες είναι κυτταρολογικές και μορφολογικές, δεν αναφέρεται αν στα ζώα μετά την επέμβαση επάγεται ή όχι η εμφάνιση της βιτελλογενίνης. Υπάρχουν όμως αναφορές για την αρνητική επίδραση του εκχυλίσματος των μίσχων των ματιών στη σύνθεση πρωτεϊνών. Στο καβούρι Uca pugilator, εκχύλισμα των μίσχων των ματιών προκάλεσε αναστολή της σύνθεσης πρωτεϊνών από την ωοθήκη (Eastman-Reks and Fingerman, 1984). Επίσης ο Quackenbush (1989) αναφέρει ότι στο Penaeus το εκχύλισμα των μίσχων των ματιών αναστέλει τη σύνθεση από την vannamei ωοθήκη και το ηπατοπάγκρεας πρωτεϊνών που ήταν ανοσοενεργές εναντίον αντισώματος για τις πρωτεΐνες των αυγών. Στο Uca pugilator, or Quackenbush and Keeley (1988) έδειξαν ότι η συσσώρευση της  $[^{14}C]$ -λευκίνης σε πρωτεΐνες του ηπατοπαγκρέατος και των ωοθηκών ήταν μεγαλύτερη στα ζώα από τα οποία είχαν αφαιρεθεί οι μίσχοι των ματιών, από τα κανονικά, και ότι η συσσώρευση αυτή επηρεάζεται αρνητικά από το εκχύλισμα των μίσχων των ματιών του Penaeus setiferus. Όμοια, στο καβούρι Callinectes sapidus (Lee and Watson, 1995) η συσσώρευση της ραδιοσημασμένης μεθειονίνης στις πρωτεΐνες των ωοθηκών καταστάλθηκε από εκχύλισμα των μίσχων των ματιών. Επίσης οι Jugan and Soyez (1985) αναφέρουν ότι στο Macrobrachium rosenbergii εκχύλισμα των μίσχου των ματιών (από αστακό) εμποδίζει τη δέσμευση της βιτελλίνης στον υποδοχέα της στη

μεμβράνη των ωοκυττάρων. Δηλαδή, από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται πιθανότερο ότι η VIH αναστέλει την σύνθεση της βιτελλογενίνης και την απορρόφησή της από τα ωοκύτταρα άμεσα, παρά αναστέλοντας κάποιο παράγοντα ενεργοποίησης. Επομένως ήταν ενδιαφέρον να εξετάσουμε αν επάγεται σύνθεση της βιτελλογενίνης από θηλυκά καβούρια 2-3 μήνες μετά την ωοτοκία. Με τον τρόπο αυτό θα διαπιστώναμε αν γίνεται νεοσύνθεση της βιτελλογενίνης. Εκτός από αυτό, από τις πληροφορίες που έχουμε από τη βιβλιογραφία (όπως αναφέρονται παραπάνω) ότι η ωρίμανση των ωοκυττάρων δεν είναι φυσιολογική, συμπεράναμε ότι η απορρόφηση της βιτελλογενίνης από τα ωοκύτταρα θα ήταν δυσχερής και επομένως θα είχαμε συσσώρευση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο και κυρίως των πρόδρομων μορφών της.

Η αφαίρεση των μίσχων των ματιών σε θηλυκά καβούρια P. potamios έγινε κατά τους μήνες Νοέμβριο-Ιανουάριο, σε χρονική περίοδο δηλαδή που έπεται της ωοτοκίας και προηγείται της δευτερογενούς βιτελλογένεσης. Όπως έδειξε η ανάλυση με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και Western blot, η βιτελλογενίνη εμφανίζεται στην αιμολέμφο των εγχειρισμένων ζώων 17+3 ημέρες μετά την αφαίρεση των μίσχων των ματιών. Τα στοιχεία αυτά δείχνουν καθαρά ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης και η συσσώρευσή της στην αιμολέμφο επάγονται με την αφαίρεση των μίσχων των ματιών από τα θηλυκά ζώα. Έτσι για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία αποδεικνύεται πειραματικά η βιοχημική σύνθεση της βιτελλογενίνης μετά την αφαίρεση του αδένα που παράγει την ορμόνη VIH. Αν και σκοπός αυτής της εργασίας δεν είναι η μελέτη της βιοσύνθεσης της βιτελλογενίνης σε εξάρτηση με τις ορμόνες, φαίνεται όμως καθαρά ότι η βιοσύνθεση της βιτελλογενίνης στα καρκινοειδή γίνεται διαφορετικά από τα έντομα (Engelmann, 1984, 1986, Quackenbush, 1986). Δηλαδή στα καρκινοειδή σημαντικός ρυθμιστικός παράγοντας είναι η αναστολή του φαινομένου της βιοσύνθεσης της βιτελλογενίνης, ενώ στα έντομα έχουμε επαγωγή της βιοσύνθεσης κάτω από την επίδραση ορισμένων ορμονών. Είναι πραγματικά αξιοπρόσεκτο ότι ο αδένας που αναστέλει τη βιοσύνθεση της βιτελλογενίνης βρίσκεται σε τέτοιο σημείο του σώματος των καρκινοειδών που δέχεται άμεσα τις επιδράσεις του περιβάλλοντος και έτσι μπορεί εύκολα να αφαιρεθεί ή απωλεσθεί. Κάτω από αυτά τα δεδομένα φαίνεται κατανοητή τυχόν εμφάνιση ή όχι της βιτελλογενίνης σε χρόνο μη ελεγχόμενο από τον ετήσιο κύκλο των ζώων, εξαιτίας εμφανούς ή όχι ανωμαλίας στους μίσχους των ματιών.

Τα πειράματά μας κατά τα οποία έγινε αφαίρεση των μίσχων των ματιών από αρσενικά καβούρια *P. potamios* έδειξαν ότι η διαδικασία αυτή δεν επάγει βιτελλογένεση στα αρσενικά ζώα. Το μόνο κοινό στοιχείο με τα θηλυκά καβούρια στην επίδραση της επέμβασης αυτής, ήταν ότι και τα αρσενικά ζώα απεβίωσαν κατά τη διάρκεια ή μετά από έκδυση. Η συνέπεια αυτή δικαιολογείται από το γεγονός ότι στον ίδιο σύμπλοκο νευροενδοκρινή αδένα παράγεται μία ορμόνη που ρυθμίζει την έκδυση, γνωστή ως MIH (molting inhibiting hormone). Επίδραση της αφαίρεσης των μίσχων των ματιών στο φαινόμενο της έκδυσης αναφέρεται και στη βιβλιογραφία (Webb, 1977). Η εξέταση της αιμολέμφου των χειρουργημένων αρσενικών *P. potamios* με ηλεκτροφόρηση και ανοσολογικές μεθόδους δεν έδειξε εμφάνιση βιτελλογενίνης. Επαγωγή της βιτελλογένεσης σε άλλα αρσενικά καρκινοειδή δεν αναφέρεται επίσης στη βιβλιογραφία. Αντίθετα με τα καρκινοειδή όμως, επαγωγή της βιτελλογένεσης σε αρσενικά άτομα έχει γίνει σε έντομα και ωότοκα σπονδυλωτά.

Στην ακρίδα Locusta migratoria, αρσενικά άτομα στο στάδιο της προνύμφης αντιδρούν στην επίδραση με methoprene (ανάλογο της νεανικής ορμόνης) και εμφανίζουν στην αιμολέμφο τους ανοσολογικά ανιχνεύσιμη βιτελλογενίνη. Η παρατήρηση ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης από το λιπαρό σώμα των αρσενικών μπορεί να επαχθεί στις κάμπιες, αλλά όχι στα ενήλικα άτομα, δείχνει ότι τα γονίδια της βιτελλογενίνης στα αρσενικά καταστέλλονται κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης (Dhadialla and Wyatt, 1983). Ανάλογα της νεανικής ορμόνης επάγουν την σύνθεση της βιτελλογενίνης από ενήλικα αρσενικά στις κατσαρίδες Diploptera (Mundall et al., 1979) каз Leucophaea maderae (Don-Wheeler and punctata Engelmann, 1991). Στο Rhodnius prolixus η βιτελλογενίνη υπάρχει φυσιολογικά στην αιμολέμφο των ενήλικων αρσενικών ζώων, σε επίπεδα ανάλογα με αυτά των θηλυκών (Chalaye, 1979). Τέλος στη Drosophila melanogaster η σύνθεση της βιτελλογενίνης από ενήλικα αρσενικά επάγεται με ecdysterone αλλά όχι με methoprene, ενώ στα θηλυκά του ίδιου είδους επάγεται και με τα δύο (Postlethwait et al., 1980). Όμως η θετική αντίδραση σε στεροϊδή επαγωγέα, σε αντίθεση με τη νεανική ορμόνη, δεν έχει σχέση με το φύλο, αφού το ίδιο συμβαίνει και στα θηλυκά και αρσενικά ωότοκα σπονδυλωτά. Το ήπαρ των αρσενικών (αλλά και θηλυκών) ατόμων Xenopus laevis μπορεί να συνθέσει και να εκκρίνει μεγάλη ποσότητα βιτελλογενίνης μετά από επίδραση με οιστρογόνα (Green and Tata, 1976). Εμφάνιση της βιτελλογενίνης έχουμε και στο αίμα του πετεινού Galus galus, μετά τη χορήγηση οιστρογόνων (Bergink et al., 1974).

Πειράματα που έγιναν (Meusy, 1980) σε αρσενικά άτομα του καρκινοειδούς Orchestia gammarella, έδειξαν ότι αφαίρεση των ανδρογόνων αδένων είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή των δευτερευόντων χαρακτηριστικών του φύλου σε θηλυκά και το σταμάτημα της σπερματογένεσης, αλλά οι γονάδες των ζώων αυτών δε μετατράπηκαν σε λειτουργικές ωοθήκες. Επίσης ποτέ δεν εμφανίστηκε στην αιμολέμφο τους βιτελλογενίνη. Όμως, μετά την εμφύτευση στα ζώα αυτά ωοθηκών από φυσιολογικά θηλυκά, η βιτελλογενίνη εμφανίστηκε άφθονη στην αιμολέμφο τους. Από το αποτέλεσμα αυτό και από το συμπέρασμα ότι η VIH δρα άμεσα και όχι αναστέλοντας κάποιο παράγοντα ενεργοποίησης της βιτελλογένεσης, μπορούμε να

συμπεράνουμε ότι στα αρσενικά καρκινοειδή δεν επάγεται η βιτελλογένεση, όχι λόγω αρνητικών ορμονικών επιδράσεων, αλλά εξαιτίας της απουσίας του γονιδίου της βιτελλογενίνης από αυτά.

Οι βιτελλογενίνες στα διάφορα ζώα φαίνεται να κωδικοποιούνται όχι από ένα γονίδιο, αλλά από μία οικογένεια γονιδίων. Στο Xenopus laevis η οικογένεια αυτή αποτελείται από τουλάχιστον τέσσερα γονίδια (Wahli et al., 1979). Όπως αναφέρουν και οι Wahli et al. (1981), φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορετικές βιτελλογενίνες και γι' αυτό απαιτούνται πολλαπλά γονίδια για αυτήν την τάξη πρωτεϊνών, αφού και το κοτόπουλο έχει τουλάχιστον δύο βιτελλογενίνες που είναι πρόδρομοι διακριτών πρωτεϊνών των αυγών. Το νηματώδες C. elegans έχει μία οικογένεια έξι γονιδίων που κωδικοποιούν τη βιτελλογενίνη (Spieth et al., 1985a, 1985b). Επίσης και στα έντομα έχουν αναγνωριστεί πολλαπλά γονίδια που κωδικοποιούν αυτές τις πρωτεΐνες. Στη Drosophila melanogaster κλωνοποιήθηκαν τρία γονίδια που καθένα κωδικοποιεί μία διαφορετική βιτελλογενίνη, από τις τρεις που υπάρχουν (Barnett et al., 1980). Στην Ceratitis capitata (Rina and Savakis, 1991) βρέθηκαν τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν τις βιτελλογενίνες 1 και 2 και είναι οργανωμένα σε ζευγάρια. Τα ζευγάρια αυτά γονιδίων προήλθαν από ένα αρχέγονο ζευγάρι με διπλασιασμό. Επίσης η οικογένεια των γονιδίων της βιτελλογενίνης του Xenopus έχει προέλθει από διπλασιασμό γονιδίων (Wahli et al., 1981).

Εξέταση της εικόνας των εξονίων-ιντρονίων των γονιδίων της βιτελλογενίνης από τα *C. elegans*, *X. laevis* και *G. gallus*, έδειξε ότι παρά το γεγονός ότι είναι αρκετά διαφορετική, συνιστά κοινό πρόγονο. Στο γονίδιο του *C. elegans* υπάρχουν μόνο 4 ιντρόνια, σε αντίθεση με τα 34 των γονιδίων των *X. laevis* και *G. gallus*. Όμως οι διατηρημένες θέσεις των ιντρονίων δείχνουν ότι ήταν παρόντα στο αρχέγονο γονίδιο. Ανακατατάξεις σε συγκεκριμένες περιοχές οδήγησαν σε εξαφάνιση ιντρονίων και συγχώνευση εξονίων στο γονίδιο του *C. elegans*, το οποίο έχει ασυνήθιστα μεγάλα εξόνια. Έτσι πιθανότατα το γονίδιο των σπονδυλωτών, παρά αυτό των νηματωδών, μοιάζει περισσότερο με το αρχέγονο γονίδιο της βιτελλογενίνης (Nardelli et al., 1987).

Στα καρκινοειδή έχουν γίνει δύο εργασίες που αναφέρονται στη μοριακή δομή της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. Πειράματα που έγιναν στο Penaeus semisulcatus ( Khayat et al., 1994a) έδειξαν ότι οι βιτελλογενικές ωοθήκες περιέχουν υψηλά επίπεδα mRNA της βιτελλίνης. Στις προβιτελλογενικές ωοθήκες τα επίπεδα του mRNA της βιτελλίνης είναι χαμηλά, ενώ στους όρχεις δεν υπάρχει καθόλου. Η παρουσία mRNA στο ηπατοπάγκρεας βιτελλογενικών θηλυκών που υβριδοποιείται με cDNA της βιτελλίνης συνιστά ότι η βιτελλίνη από τις ωοθήκες και η βιτελλογενίνη από το ηπατοπάγκρεας είναι προϊόντα ενός γονιδίου (Khayat et al., 1994b). Το μέγεθος του mRNA της βιτελλίνης βιτελλίνης του Penaeus semisulcatus (1.1 kb)

είναι πιο κοντά στο mRNA της βιτελλογενίνης της *Drosophila* (1.5 kb) παρά στο *Xenopus* (5.6 kb) ή το *Caenorhabdytis elegans* (4.8 kb) (Khayat et al., 1994b, Wahli, 1988).

Οι βιτελλογενίνες και οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι πρωτεΐνες με μεγάλη μοριακή μάζα, που φέρουν στο μόριό τους λιπίδια, καροτινοειδή και υδατάνθρακες (Wallace et al., 1967, Fyffe and O'Connor, 1974, Zagalsky, 1985, Puppione et al., 1986, Meusy and Payen, 1988). Τα αποτελέσματα που έγουμε από την υπερφυγοκέντρηση σε βαθμίδωση πυκνότητας KBr και η βιοχημική ανάλυση των λιπιδίων και των υδατανθράκων, υποστηρίζουν αυτό το συμπέρασμα. Οι τιμές της υδατικής πυκνότητας που βρέθηκαν για τη βιτελλογενίνη (1.20 g/ml) και βιτελλίνη (1.21 g/ml) του P. potamios, είναι οι ίδιες με αυτές που έχουν αναφερθεί για τις βιτελλογενίνες και βιτελλίνες από άλλα είδη καρκινοειδών. Στα καβούρια Charybdis feriata και Eriocheir japonica οι τιμές που αναφέροναται για τη βιτελλογενίνη και βιτελλίνη είναι 1.203 g/ml και 1.22 g/ml, αντίστοιχα, ενώ στη γαρίδα Macrobrachium rosenbergii η βιτελλογενίνη έχει πυκνότητα 1.21 g/ml και η βιτελλίνη 1.22 g/ml (Komatsu and Ando, 1992, Komatsu et al., 1993). Στο Callinectes sapidus η βιτελλογενίνη έχει υδατική πυκνότητα 1.16 g/ml (Lee and Puppione, 1988) και στο Cancer antennarius 1.18 g/ml (Spaziani et al., 1986). Δηλαδή οι βιτελλογενίνες και οι βιτελλίνες των καρκινοειδών είναι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).

Στον *P. potamios* το ολικό ποσό λιπιδίων είναι το ίδιο για τη βιτελλογενίνη και βιτελλίνη. Η ανάλυση των λιπιδίων με TLC έδειξε ότι τα λιπίδια είναι πλούσια σε φωσφολιπίδια, όπως και σε άλλα είδη καρκινοειδών (Komatsu et al., 1993, Tirumalai and Subramoniam, 1992) και στα έντομα (Chinzei et al., 1981). Το κυριώτερο φωσφολιπίδιο βρέθηκε να είναι η φωσφατιδυλχολίνη, χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί στις βιτελλογενίνες και βιτελλίνες και από άλλα είδη καρκινοειδών (Komatsu et al., 1993, Komatsu and Ando, 1992, Tirumalai and Subramoniam, 1992).

Η βιτελλογενίνη και βιτελλίνη του *P. potamios* περιέχουν στο μόριό τους καροτινοειδή. Η ύπαρξη καροτινοειδών στο μόριο και των δύο αυτών πρωτεϊνών δείχνει ότι η σύνθεσή τους γίνεται από το ηπατοπάγκρεας, το όργανο στο οποίο συντίθεται επίσης και η αποπρωτεΐνη, και πιθανόν μετά τη γλυκοζυλίωση της αποπρωτεΐνης. Αν και ο ρόλος των καροτινοειδών δεν έχει μελετηθεί επακριβώς, η μεταφορά της βιτελλογενίνης στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα γίνεται με το σύνολο των καροτινοειδών και λιπιδίων που περιέχει στο μόριό της. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μέτρηση του ποσού των καροτινοειδών που περιέχουν η βιτελλογενίνη και βιτελλίνη, που είναι το ίδιο (8.81% και 8.01%, αντίστοιχα). Αντίθετα σε άλλα καρκινοειδή έχει διαπιστωθεί ότι τα καροτινοειδή αποτίθενται μετά τη μεταφορά της βιτελλογενίνης στα ωοκύτταρα, χωρίς να διευκρινίζεται άν συντίθενται στην ωοθήκη ή μεταφέρονται από την αιμολέμφο στα ωοκύτταρα. Η ύπαρξη καροτινοειδών μόνο
στη βιτελλίνη του Penaeus chinensis (Chang and Jeng, 1995) και Penaeus monodon (Chang et al., 1993a, 1994), επιβεβαιώνει αυτή την άποψη. Η ανάλυση με HPLC των καροτινοειδών από τη βιτελλογενίνη και βιτελλίνη του P. potamios έδειξε τρία κύρια καροτινοειδή που αναγνωρίστηκαν ως λουτεΐνη, ασταξανθίνη και β-καροτίνη. Η β-καροτίνη και η ασταξανθίνη έχουν αναφερθεί ως τα κύρια καροτινοειδή της βιτελλίνης από τη γαρίδα Macrobrachium rosenbergii, τα καβούρια Charybdis feriata και Eriocheir japonica και την καραβίδα Ibacus ciliatus (Komatsu and Ando, 1992).

Ανάλυση των υδατανθράκων των δύο πρωτεϊνών έδειξε ότι και η βιτελλογενίνη και η βιτελλίνη από τον *P. potamios* περιέχουν στο μόριό τους επίσης υδατάνθρακες. Το ολικό ποσό των υδατανθράκων είναι το ίδιο και για τις δύο πρωτεΐνες (περίπου 4%) και περιλαμβάνει μεγάλο ποσοστό μαννόζης, όπως και σε άλλα καρκινοειδή που έχουν μελετηθεί (Fyffe and O'Connor, 1974, de Chaffoy and Kondo, 1980). Η ύπαρξη του ίδιου ποσού υδατανθράκων στο μόριο της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, επιβεβαιώνει την άποψη ότι η βιτελλογενίνη κατά τη μεταφορά της από το μητρικό σώμα στα ωοκύτταρα δεν παθαίνει σημαντικές μοριακές τροποποιήσεις. Γλυκοζυλιωμένες μορφές βιτελλογενινών είναι ένα γενικό φαινόμενο που συμβαίνει μετά τη μεταφραστική περίοδο της σύνθεσης της πρωτεΐνης και συναντάται σε όλες σχεδόν τις τάξεις των ωότοκων οργανισμών, όπως στα έντομα (Engelmann, 1979) και τα καρκινοειδή (Meusy and Payen, 1988).

Παρά το γεγονός ότι οι βιτελλογενίνες και βιτελλίνες των καρκινοειδών έχουν μελετηθεί ευρύτατα τα τελευταία χρόνια (Meusy, 1980, Junera and Meusy, 1982, Quinitio et al., 1989, Chang et al., 1993a, Komatsu et al., 1993, Chang and Jeng, 1995), δεν έχει ακόμα προσδιορισθεί η φυσική δομή της αποπρωτεΐνης και ο αριθμός των υπομονάδων που συμμετέχουν στο μόριό της. Οι φυσικές βιτελλογενίνες και βιτελλίνες, από πολλά είδη καρκινοειδών, έχουν μοριακή μάζα που ποικίλλει από 260 έως 560 kDa (Quinitio et al., 1989, Komatsu et al., 1993, Chang et al., 1994, Chang and Jeng, 1995). Η διαφορά στη μοριακή μάζα μεταξύ της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης μπορεί να προέρχεται από το διαφορετικό βαθμό συσσωμάτωσής τους.

Η ανάλυση της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης από τον *P. potamios*, με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, έδειξε ότι και οι δύο πρωτεΐνες αποτελούνται από τα ίδια τρία κύρια πολυπεπτίδια (85, 105 και 115 kDa). Ένα τέταρτο πολυπεπτίδιο με μοριακή μάζα 181 kDa, ανιχνεύθηκε στην αιμολέμφο πολλών βιτελλογενικών θηλυκών *P. potamios* και την καθαρή βιτελλογενίνη από αυτά τα ζώα. Το πολυπεπτίδιο όμως αυτό δεν υπήρχε στο εκχύλισμα των αυγών ή την καθαρή βιτελλίνη. Τα αποτελέσματα που αναφέρονται σε αυτή την εργασία και τα οποία στηρίζονται στην ηλεκτροφόρηση σε διαβαθμισμένη πηκτή πολυακρυλαμίδης, κάτω από φυσικές συνθήκες, και τη χρωματογραφία μοριακής διήθησης σε πηκτή λεπτής στοιβάδας, δείχνουν τη μορφή και το μέγεθος του μορίου που έχουν η βιτελλογενίνη και βιτελλίνη στη φυσική τους κατάσταση. Τόσο η βιτελλογενίνη, όσο και η βιτελλίνη, παρουσιάζονται με πολυμερικές μορφές. Επικρατέστερη μορφή είναι η διμερής, ενώ παρουσιάζεται επίσης η μορφή του μονομερούς και του τριμερούς. Η διμερής μορφή της βιτελλογενίνης έχει μοριακή μάζα 551-562 kDa και της βιτελλίνης 501-510 kDa.

Το πεπτίδιο 181 kDa, αλλά και τα τρία κοινά πεπτίδια της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης είναι ανοσοενεργά όταν εκτεθούν σε αντιβιτελλογενικό αντιορό, που παρασκευάστηκε από την υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης. Αυτό δείχνει ότι αυτά τα πολυπεπτίδια έχουν κοινές περιοχές στη δομή τους και πιθανόν η διαφορά στη μοριακή μάζα να οφείλεται σε προσθήκη πολυπεπτιδίων ή γλυκοζυλίωση. Η απογλυκοζυλίωση των πολυπεπτιδίων 85, 105 και 115 kDa έδειξε ότι η διαφορά στη μοριακή μάζα δεν οφείλεται μόνο στην προσθήκη υδατανθράκων. Τα πεπτίδια αυτά μετά την απογλυκοζυλίωσή τους έχουν μοριακή μάζα 72, 86 και 108 kDa, αντίστοιχα. Πρόκειται δηλαδή για τρία διακριτά πολυπεπτίδια που είναι γλυκοζυλιωμένα σε ποσοστό 8-15%.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι η διαφορά στη φυσική μοριακή μάζα μεταξύ βιτελλογενίνης και βιτελλίνης πιθανόν να οφείλεται στη συμμετοχή στο μόριο της βιτελλογενίνης του πολυπεπτιδίου 181 kDa που παρατηρήθηκε στη βιτελλογενίνη, αλλά όχι τη βιτελλίνη. Αυτό ενισχύεται από το γεγονός ότι το ποσό των λιπιδίων, καροτινοειδών και υδατανθράκων είναι περίπου το ίδιο και για τις δύο πρωτεΐνες. Όταν το πεπτίδιο 181 kDa τρυψινολυθεί δίνει τα πεπτίδια 105 και 115 kDa της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης, και άλλα μικρότερα. Έτσι το πολυπεπτίδιο 181 kDa μπορεί να είναι ένα ενδιάμεσο προϊόν πρωτεολυτικής διάσπασης ενός πρόδρομου πολυπεπτιδίου από το οποίο να προκύπτουν οι 181 kDa και 85 kDa. Μπορεί όμως να είναι και το ίδιο ένα πρόδρομο πολυπεπτίδιο το οποίο δίνει τα πολυπεπτίδια 105 και 115 kDa (που εμφανίζονται στα περισσότερα ζώα σε μεγάλη συγκέντρωση στην αιμολέμφο) διαμέσου δύο ειδικών πρωτεολυτικών διασπάσεων, ενώ το πολυπεπτίδιο 85 kDa να συντίθεται ως ανεξάρτητη υπομονάδα της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. Φαίνεται λοιπόν ότι το πολυπεπτίδιο 181 kDa της βιτελλογενίνης πρωτεολύεται μερικώς στα πολυπεπτίδια 115 kDa και 105 kDa στο ηπατοπάγκρεας. Το υπόλοιπο πρωτεολύεται στην αιμολέμφο ή κατά τη διάρκεια της μεταφοράς του στην ωοθήκη, μετά το φαινόμενο της ενδοκύττωσης. Μια τέτοια μετατροπή της βιτελλογενίνης, από μεγαλύτερη μοριακή μάζα σε μικρότερη της βιτελλίνης, συναντάται επίσης στα έντομα (Postlethwait and Giorgi, 1985), το νηματώδες *Caenorhabdytis elegans* (Sharrock, 1984) και το δακτυλιοσκώληκα *Nereis diversicolor* (Bonnier and Baert, 1992).

Η σύγκριση του αριθμού και του μοριακού μεγέθους των υπομονάδων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης από τον P. potamios με εκείνες από άλλα είδη καρκινοειδών, δείχνει αρκετές ομοιότητες, αλλά και διαφορές. Οι Chang et al. (1994), αναφέρουν δύο πολυπεπτίδια (170 και 82 kDa) για τη βιτελλογενίνη από το Penaeus monodon. Όταν η βιτελλογενίνη απορροφάται από τα ωοκύτταρα το πολυπεπτίδιο 170 kDa διασπάται μερικά και τα παράγωγα της διάσπασης μαζί με το πεπτίδιο 82 kDa συνθέτουν το μόριο της βιτελλίνης. Η βιτελλογενίνη από το Penaeus chinesis περιλαμβάνει δύο πολυπεπτίδια 191 και 85 kDa (Chang and Jeng, 1995). Στα Eriocheir japonica και Charybdis feriata η βιτελλογενίνη αποτελείται από τρία πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 180, 100 και 80 kDa (Komatsu et al., 1993). Η βιτελλογενίνη από τον Callinectes sapidus έχει επίσης τρία πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 190, 107 και 78 kDa (Lee and Puppione, 1988). Αντίθετα, η βιτελλογενίνη από το ηπατοπάγκρεας του Uca pugilator έχει ένα πεπτίδιο με μοριακή μάζα 81 kDa, ενώ το εκχύλισμα των αυγών περιέχει ένα ακόμα πεπτίδιο με μοριακή μάζα 103 kDa (Quackenbush and Keeley, 1988). Η βιτελλογενίνη, αλλά και η βιτελλίνη από το Macrobrachium rosenbergii αποτελείται από δύο πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 97 και 95 kDa (Sagi et al., 1995, Komatsu et al., 1993). Γενικά, οι βιτελλογενίνες των καρκινοειδών που έχουν εξεταστεί μέχρι σήμερα, έχουν ένα μικρό (80-95 kDa) πολυπεπτίδιο το οποίο μεταφέρεται στα αυγά αναλλοίωτο και ένα μεγάλο πολυπεπτίδιο (170-190 kDa), το οποίο είναι μεταβατικό και δίνει μικρότερα πολυπεπτίδια που μεταφέρονται στα αυγά. Η διαφορά δηλαδή που υπάρχει μεταξύ της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης από τον P. potamios και των βιτελλογενινών και βιτελλινών από άλλα καρκινοειδή είναι ότι οι δύο πρωτεΐνες του P. potamios αποτελούνται από τα ίδια πολυπεπτίδια (και σε αριθμό και σε μέγεθος). Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι στο Penaeus monodon, ενώ η βιτελλογενίνη έχει δύο υπομονάδες με μοριακή μάζα 82 kDa και 170 kDa (Chang et al., 1994), η βιτελλίνη αποτελείται από οκτώ (Chang et al., 1993a) ή τέσσερεις (Quinitio et al., 1990, Chen and Chen, 1993) υπομονάδες. Τα πεπτίδια της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης από τον P. potamios δεν είναι συνδεμένα μεταξύ τους με θειϊκές γέφυρες, αφού δεν απαιτείται βμερκαπτοαιθανόλη για να τα χωρίσει. Μη-δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των υπομονάδων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης έχουν αναφερθεί επίσης και στο Penaeus chinesis (Chang and Jeng, 1995), to Penaeus monodon (Chang et al., 1993a, 1994) και το Macrobrachium rosenbergii (Chang et al., 1993b).

Όπως ήδη έχουμε αναφέρει τα πολυπεπτίδια της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης στην αιμολέμφο και τα αυγά αντίστοιχα, είναι τελικές μορφές ενός πρόδρομου πολυπεπτιδίου, το οποίο εμφανίζεται σε διαφορετική συγκέντρωση στην αιμολέμφο των κανονικών ζώων. Για την πειραματική απόδειξη αυτής της άποψης επιλέξαμε μία σειρά πειραμάτων από τα οποία συνάγεται ότι πραγματικά τα δύο αυτά πολυπεπτίδια (105 και 115 kDa) προέργονται από το 181 kDa. Είναι γνωστό από παλαιότερα πειράματα που έχουν γίνει τόσο στα έντομα (Fourney et al., 1982, Della-Cioppa and Engelmann, 1987, Don-Wheeler and Engelmann, 1997), όσο και τα καρκινοειδή (Quackenbush and Keeley, 1988, Shafir et al., 1992a), ότι ένεση ραδιοσημασμένων αμινοξέων συντελεί στην ανίχνευση μικροποσοτήτων νεοσυντεθιμένης βιτελλογενίνης. Το ποσό της νεοσυντεθιμένης βιτελλογενίνης εξαρτάται από το στάδιο της βιτελλογένεσης που βρίσκονται τα ζώα. Ο συνυπολογισμός των δύο αυτών παραγόντων έδωσε τη δυνατότητα σε μικρό χρονικό διάστημα, μετά από την ένεση, να διακρίνουμε πάνω στην πηκτή τη ραδιενεργή βιτελλογενίνη. Η ταυτόχρονη χρήση της χρωστικής Coomassie blue και της αυτοραδιογραφίας επέτρεψε να γίνουν εκτιμήσεις τόσο της συνολικής βιτελλογενίνης, όσο και της νεοσυντεθιμένης, σε σχέση με τη συνολική ποσότητα της βιτελλογενίνης που υπάρχει στην αιμολέμφο.

Η εξέταση της ενσωμάτωσης της ραδιοσημασμένης μεθειονίνης στις πρωτεΐνες δείχνει πραγματικά ότι αυτό γίνεται σε μικρό χρονικό διάστημα (4 h) και βρίσκεται σε συμφωνία με ανάλογα πειράματα που έχουν γίνει στα έντομα (Fourney et al., 1982, Della-Cioppa and Engelmann, 1987, Don-Wheeler and Engelmann, 1997) και τα καρκινοειδή (Quackenbush and Keeley, 1988, Shafir et al., 1992). Η εξέταση της πεπτιδικής σύστασης έγινε σε καθαρή βιτελλογενίνη από την αιμολέμφο με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και αυτοραδιογραφία. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι ενώ στις χρωματισμένες με Coomassie blue πηκτές εμφανίστηκαν και τα τέσσερα πολυπεπτίδια της βιτελλογενίνης (181, 115, 105 και 85 kDa), στις αυτοραδιογραφίες των ίδιων πηκτών ισχυρά ραδιοσημασμένες ήταν μόνο η μεγάλη (181 kDa) και η μικρή (85 kDa) υπομονάδα. Έτσι το αποτέλεσμα των πειραμάτων αυτών, δηλαδή η ισχυρή ραδιοσήμανση των πολυπεπτίδίων 181 kDa και 85 kDa, φαίνεται να υποστηρίζει την υπόθεση ότι τα δύο αυτά πολυπεπτίδια αντιπροσωπεύουν τα πολυπεπτίδια της βιτελλογενίνης που συντίθενται πρώτα.

Τέλος μία ακόμα επιβεβαίωση ότι τα δύο αυτά πολυπεπτίδια (85 και 181 kDa) της βιτελλογενίνης είναι εκείνα που συντίθενται πρώτα έδωσε η απομόνωση και ο καθαρισμός της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο θηλυκών καβουριών από τα οποία είχαν αφαιρεθεί οι μίσχοι των ματιών. Η μελέτη της βιτελλογενίνης αυτής με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση έδειξε ότι η βιτελλογενίνη των περισσοτέρων εγχειρισμένων ζώων είχε μόνο τα δύο πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 85 kDa και 181 kDa. Τα πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 115 και 105 kDa εμφανίστηκαν ασθενώς ή καθόλου. Το γεγονός αυτό, δηλαδή της εμφάνισης της

βιτελλογενίνης από τα χειρουργημένα ζώα σχεδόν αποκλειστικά με τη μορφή των 181 kDa και 85 kDa πολυπεπτιδίων, καθώς επίσης και τα αποτελέσματα παλαιότερων μορφολογικών και κυτταρολογικών μελετών (Bomirski and Klek, 1974, Anilkumar and Adivodi, 1980, Ouackenbush and Herrnkind, 1981, Anilkumar and Adiyodi,1985), από τις οποίες συνάγεται ότι η πρόωρη ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ωοκυττάρων σε αυγά είναι ελλειπής ή μη φυσιολογική, οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η βιτελλογενίνη παρά του ότι συντίθεται στα ζώα αυτά δεν απορροφάται εύκολα από τις ωοθήκες. Σ' αυτό συνηγορεί και το γεγονός ότι στη βιτελλίνη των αυγών δεν παρατηρήθηκε ποτέ το πολυπεπτίδιο 181 kDa. Πιθανόν η αφαίρεση του σύμπλοκου αδένα να επενεργεί στην πρωτεολυτική διάσπαση και προετοιμασία της βιτελλογενίνης για τη μετατροπή της σε βιτελλίνη και στο φαινόμενο της ενδοκύττωσής της μέσω υποδοχέα. Αν αυτά ισχύουν πραγματικά, τότε η βιτελλογενίνη παραμένει στην αιμολέμφο με τη μορφή σύνθεσής της, δηλαδή το μόριό της αποτελείται αποκλειστικά ή σχεδόν αποκλειστικά από τα πολυπεπτίδια 181 kDa και 85 kDa.

Από παλαιότερες εργασίες είναι γνωστό ότι το ηπατοπάγκρεας, ένα όργανο ανάλογο του ήπατος των ανώτερων ζώων, και οι ωοθήκες συνθέτουν βιτελλογενίνη και βιτελλίνη, αντίστοιχα. Στη βιβλιογραφία ως τόπος σύνθεσης της βιτελλογενίνης αναφέρεται πότε το ηπατοπάγκρεας (Paulus and Laufer, 1987), πότε οι ωοθήκες (Lui and O'Connor, 1976, Yano and Chinzei, 1987, Lee and Watson, 1995) και σε ορισμένες δημοσιεύσεις και τα δύο όργανα (Quackenbush and Keeley, 1988, Quackenbush, 1989). Η επικρατούσα άποψη ότι η βιτελλογενίνη των καρκινοειδών συντίθεται στις ωοθήκες, σε αντίθεση με τη βιτελλογενίνη των εντόμων που συντίθεται στο λιπαρό σώμα, έχει μια σειρά υποστηρικτών (Lui et al., 1974, Eastman-Reks and Fingerman, 1985, Rankin et al.,1989). Όμως τα δικά μας πειράματα, καθώς κι εκείνα άλλων ερευνητικών ομάδων, αποδεικνύουν ότι δεν ευσταθεί η άποψη αυτή. Οι υπάρχουσες μέχρι σήμερα απόψεις σχετικά με τη σύνθεση της βιτελλογενίνης στα καρκινοειδή εκφράζονται με τις εργασίες που αναφέρονται παρακάτω.

Οι Lui et al. (1974) και Lui and O'Connor (1976) έδειξαν ότι η ωοθήκη της καραβίδας *Procambarus* έχει την ικανότητα να συνθέτει τόσο το λιπιδικό, όσο και το πρωτεϊνικό κομμάτι της λιποβιτελλίνης. Οι Lee and Watson (1995) αναφέρουν ότι, στο στάδιο της βιτελλογένεσης που εξετάστηκαν, οι ωοθήκες μόνο, και όχι το ηπατοπάγκρεας, του καβουριού *Callinectes sapidus* συνθέτουν τη βιτελλίνη. Στη γαρίδα *Penaeus japonicus* (Yano and Chinzei, 1987), η ωοθήκη, σε in νίτο καλλιέργεια, ενσωματώνει ραδιενέργεια σε μία πρωτεΐνη, η οποία κατακρημνίζεται με τον αντιορό εναντίον της βιτελλίνης και είναι όμοια με τη βιτελλογενίνη. Αντίθετα από τις πρωτεΐνες που συντίθενται από το ηπατοπάγκρεας in νίτο, καμία δεν αναγνωρίστηκε από τον ίδιο αντιορό. Όμοια, οι Rankin et al. (1989), έδειξαν στη γαρίδα Penaeus vannamei ότι, σε αντίθεση με το ηπατοπάγκρεας, η ωοθήκη συνθέτει βιτελλογενικά πολυπεπτίδια. Επίσης σύνθεση της βιτελλίνης από την ωοθήκη έχει αναφερθεί στον αστακό Homarus americanus (Dehn et al., 1983), το καβούρι Uca pugilator (Eastman-Reks and Fingerman, 1985) και τη γαρίδα Penaeus semisulcatus (Browdy et al., 1990).

Οι Sagi et al. (1995) αναφέρουν ότι στη γαρίδα Macrobrachium rosenbergii ενώ γίνεται από τις ωοθήκες, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξής τους, ενσωμάτωση ραδιοσημασμένων αμινοξέων σε πρωτεΐνες, οι υπομονάδες της βιτελλίνης ραδιοσημαίνονται ελάχιστα έως καθόλου (στις συνθήκες που γίνεται το πείραμα). Οπότε συμπεραίνουν την ύπαρξη μιας πηγής για τη βιτελλίνη διαφορετική από την ωοθήκη. Η υπόθεση αυτή, δηλαδή ότι στα δεκάποδα καρκινοειδή η βιτελλογενίνη παράγεται τουλάχιστον κατά ένα μέρος από ιστούς που δεν είναι οι ωοθήκες, υπάρχει για πολύ καιρό. Οι Paulus και Laufer (1987) έδειξαν με ανοσοιστοχημικές τεχνικές την ύπαρξη ειδικών κυττάρων (των βιτελλογενοκυττάρων) στο ηπατοπάγκρεας των καβουριών Libinia emarginata και Carcinus maenas. Τα κύτταρα αυτά είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της βιτελλογενίνης. In vitro μελέτες στο καβούρι Uca pugilator (Quackenbush and Keeley, 1988) έδειξαν ότι το ηπατοπάγκρεας συνθέτει μόνο τη μικρή από τις δύο υπομονάδες της βιτελλογενίνης (103 kDa και 81 kDa), ενώ η ωοθήκη συνθέτει και τις δύο. Στη γαρίδα Penaeus (Quackenbush, 1989) και το ηπατοπάγκρεας και η ωοθήκη έδειξαν ότι vannamei ενσωματώνουν ραδιοσημασμένη λευκίνη σε πρωτεΐνες, οι οποίες ήταν ανοσοενεργές εναντίον αντισώματος της βιτελλίνης. Οι πρωτεΐνες που απομονώθηκαν από τις ωοθήκες περιείχαν ζώνες στα 103, 97, 95, και 76 kDa, ενώ στο ηπατοπάγκρεας βρέθηκαν δύο μόνο ζώνες 102 και 97 kDa. Αυτό σημαίνει ότι και οι δύο αυτοί ιστοί υπηρετούν ως βιοσυνθετικές πηγές για υπομονάδες της βιτελλίνης κατά τη διάρκεια της βιτελλογένεσης. Στο Penaeus semisulcatus (Fainzilber et al., 1992) to ηπατοπάγκρεας εμπλέκεται στη σύνθεση των πρωτεϊνών των αυγών, αλλά η προσφορά του είναι μικρή σε σχέση με την ωοθήκη. Δηλαδή μεταξύ των δύο οργάνων υπάρχει διαφορά μίας τάξης μεγέθους στο ρυθμό σύνθεσης της βιτελλογενίνης.

Τα δικά μας πειράματα και τα αποτελέσματά τους επεξηγούν πλήρως το ρόλο του ηπατοπαγκρέατος και των ωοθηκών στη σύνθεση της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. Οι ωοθήκες κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των ωοκυττάρων συνθέτουν βιτελλίνη, όπως δείχνουν τα in vitro πειράματα με χρήση ραδιοσημασμένης μεθειονίνης. Ανάλογα πειράματα που έχουν γίνει σε άλλα είδη καρκινοειδών από τις τάξεις των βραχύουρων και μακρόουρων επιβεβαιώνουν τη σύνθεση της βιτελλίνης στην ωοθήκη (Lee and Watson, 1995, Eastman-Reks and Fingerman, 1985, Lui et al., 1974, Lui and O'Connor, 1976, Dehn et al., 1983, Yano

78

and Chinzei, 1987, Rankin et al., 1989, Browdy et al., 1990). Η σύνθεση της βιτελλογενίνης στο ηπατοπάγκρεας επιβεβαιώνεται επίσης από μια σειρά ενδείξεων και αποτελεσμάτων από τα in vivo και in vitro πειράματα. Τα in vivo πειράματα με χρήση ραδιοσημασμένης βιτελλογενίνης μας έδειξαν ότι η βιτελλογενίνη όταν βρεθεί στην αιμολέμφο προσροφάται από τα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα. Η χρονικά περιορισμένη συγκέντρωση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο δεν μπορεί να εξηγηθεί με τις παρατηρήσεις των Yano and Chinzei (1987) και Shafir et al. (1992b) που διατύπωσαν την άποψη ότι η βιτελλογενίνη και βιτελλίνη που συντίθεται στις ωοθήκες συγκεντρώνεται στην αιμολέμφο. Η γρήγορη χρονικά εμφάνιση της βιτελλογενίνης στην αιμολέμφο μετά από ένεση ραδιοσημασμένης μεθειονίνης, καθώς επίσης και το γεγονός ότι η συγκέντρωση είναι αρκετά μεγάλη, προϋποθέτουν πρωτεϊνική σύνθεση σε ένα πλησιέστερο λειτουργικά στην αιμολέμφο όργανο, που να είναι επίσης αρκετά μεγάλο ώστε να δικαιολογεί την αυξημένη ποσότητα. Οι θετικές ενδείξεις για τη σύνθεση της βιτελλογενίνης στο ηπατοπάγκρεας (όπως διατυπώνονται από τους Paulus and Laufer, 1987, Quackenbush and Keeley, 1988, Quackenbush, 1989, Fainzilber et al., 1992), καθώς επίσης και οι αρνητικές (όπως διατυπώνονται από τους Yano and Chinzei, 1987, Rankin et al., 1989, Lee and Watson, 1995), εξηγούνται πιθανόν από την περιορισμένη σε χρόνο βιτελλογενική συνθετική ικανότητα των καρκινοειδών. Αυτό όμως με τη σειρά του δείχνει το προτέρημα που έχει το σύστημα της βιτελλογενίνης στη μελέτη της μοριακής επίδρασης των ορμονών στη σύνθεση των πρωτεϊνών.

Στον *P. potamios* το ηπατοπάγκρεας και οι ωοθήκες όταν έχουν αφαιρεθεί από ζώα τα οποία βρίσκονται στο στάδιο της δευτερογενούς βιτελλογένεσης εξακολουθούν να συνθέτουν βιτελλογενίνη in vitro. Δηλαδή το ηπατοπάγκρεας και οι ωοθήκες συνθέτουν όλες και τις ίδιες υπομονάδες της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης (224, 181,115, 105 και 85 kDa) στις in vitro καλλιέργειες, ενώ το ηπατοπάγκρεας εκκρίνει τα πολυπεπτίδια με μοριακή μάζα 181, 115, 105 και 85 kDa. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Quackenbush and Keeley (1988) ότι οι ωοθήκες του καβουριού *Uca pugilator* συνθέτουν και τα δύο πεπτίδια (103 και 81 kDa) της βιτελλίνης, ενώ το ηπατοπάγκρεας συνθέτει μόνο το 81 kDa.

Το πεπτίδιο με μοριακή μάζα 224 kDa, που δείχνει θετική ανοσοενεργότητα εναντίον του αντιορού της βιτελλογενίνης, δεν βρέθηκε ποτέ στη αιμολέμφο ή στο εκχύλισμα αυγών. Επίσης παρουσιάζει μεγάλη αστάθεια όταν βρίσκεται σε διάλυση, όπου διασπάται εύκολα και δίνει τα πολυπεπτίδια 181, 115, 105 kDa και πιθανόν και το 85 kDa. Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι το πολυπεπτίδιο 224 kDa μπορεί να είναι μια κυτταρική πρόδρομη μορφή των πολυπεπτιδίων της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης. Η

79

παρουσία του 181 kDa πολυπεπτιδίου τόσο στο εκχύλισμα όσο και στο μέσο επώασης του ηπατοπαγκρέατος, αλλά και στην αιμολέμφο των ζώων που βρίσκονται σε περίοδο βιτελλογένεσης, είτε φυσιολογικά είτε μετά την επαγωγή της με αφαίρεση των μίσχων των ματιών, δείχνει ότι η πρωτεολυτική διάσπασή της στα πεπτίδια 115 και 105 kDa γίνεται στο ηπατοπάγκρεας, αλλά δε συμβαίνει σε όλα τα μόρια της βιτελλογενίνης. Η απουσία του πολυπεπτιδίου αυτού (181 kDa) από το εκχύλισμα των αυγών δείχνει την ταχεία πρωτεόλυσή του στα πεπτίδια 115 και 105 kDa κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των ωοκυττάρων. Το πεπτίδιο 85 kDa είναι η μόνη από τις υπομονάδες της βιτελλογενίνης και βιτελλίνης που έχει βρεθεί, σε in vivo και in vitro πειράματα, στην αιμολέμφο κανονικών και εγχειρισμένων ζώων, το εκχύλισμα ωοκυττάρων και αυγών, το εκχύλισμα και το μέσο επώασης του ηπατοπαγκρέατος.

Προς το παρόν δεν μπορούμε να ξέρουμε σίγουρα αν η υπομονάδα 85 kDa της βιτελλογενίνης και της βιτελλίνης προέρχεται από το πολυπεπτίδιο 224 kDa. Από τα αποτελέσματα των πρωτεολυτικών διασπάσεων με τρυψίνη και χυμοτρυψίνη ξέρουμε ότι το πολυπεπτίδιο 85 kDa δείχνει μεγαλύτερη σταθερότητα ως προς τα ένζυμα αυτά, από τα άλλα δύο πολυπεπτίδια (115 και 105 kDa). Επίσης η εικόνα των πεπτιδίων που παράγονται από το 85 kDa μετά τη διάσπασή του με τρυψίνη είναι διαφορετική από αυτή των πεπτιδίων 115 και 105 kDa. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι εικόνες της πρωτεολυτικής διάσπασης με τρυψίνη των πεπτιδίων 115 kDa και 105 kDa τα παραπάνω συμπεράσματα αποτελούν ενδείζεις ότι το αντίσωμα εναντίον της υπομονάδας 181 kDa της βιτελλογενίνης δεν αναγνωρίζει την 85 kDa μπορεί να συντίθεται αυτούσιο ή να προέρχεται από ένα διαφορετικό πρόδρομο μόριο. Απάντηση στα ερωτήματα αυτά θα δώσουν πειράματα μοριακής κατεύθυνσης, όπως απομόνωση και in vitro μετάφραση του mRNA της βιτελλογενίνης.

## Προοπτικές της παρούσης εργασίας

Τα πειράματα που αναφέρονται στην εργασία αυτή δείχνουν καθαρά ότι η σύνθεση της βιτελλογενίνης στο ηπατοπάγκρεας διέρχεται από τα ίδια στάδια προβιτελλογενίνης με εκείνα που συναντώνται κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοκυττάρων. Αυτό είναι σημαντικό γιατί επιτρέπει στα μελλοντικά πειράματα να χρησιμοποιούμε, ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα, το ηπατοπάγκρεας ή τις ωοθήκες για τη μελέτη του φαινομένου της επαγωγής της βιτελλογένεσης υπό τη δράση των ορμονών. Τα πειράματα αφαίρεσης των μίσχων των ματιών από τα καβούρια και επαγωγής της βιτελλογένεσης πρέπει να συμπληρωθούν με άλλα πειράματα τα οποία θα στρέφονται προς δύο κατευθύνσεις: η πρώτη θα περιλαμβάνει την προσθήκη των αδένων των μίσχων των ματιών με μικροεγχείρηση σε ζωντανά καβούρια ή επώαση του ηπατοπαγκρέατος και των ωοθηκών με εκχύλισμα των μίσχων των ματιών η δεύτερη θα περιλαμβάνει in vivo και in vitro πειράματα με χρήση ορμονών και μέτρηση της επαγώμενης βιτελλογενίνης. Και οι δύο αυτές κατηγορίες πειραμάτων θα μας επιτρέψουν να μελετήσουμε καλύτερα τη σύνθεση της βιτελλογενίνης και τους μηχανισμούς που διεγείρουν οι ορμόνες αυτές στην πρωτεϊνική σύνθεση.

Ο καθαρισμός και προσδιορισμός του μορίου της βιτελλογενίνης μας δίνει τη δυνατότητα να παρασκευάσουμε ραδιοσημασμένη βιτελλογενίνη που επιβοηθά στα πειράματα για ανεύρεση και προσδιορισμό του υπεύθυνου υποδοχέα για τη μεταφορά της βιτελλογενίνης από την αιμολέμφο των καρκινοειδών στα ωοκύτταρα.

Ο προσδιορισμός της αμινοξικής ακολουθίας της βιτελλογενίνης ή ορισμένων πρωτεολυτικών κλασμάτων της θα μας επιτρέψει να έχουμε μία σαφή εικόνα για την πρωτοταγή της δομή. Η δομή αυτή είναι απαραίτητη αφ' ενός για πειράματα μοριακής κατεύθυνσης και αφ' ετέρου για συγκριτικές μελέτες. Η γνώση δηλαδή μέρους της πρωτοταγούς δομής της βιτελλογενίνης από τον Potamon potamios θα μας επιτρέψει να τη συγκρίνουμε με εκείνες των βιτελλογενινών από άλλα ωότοκα ζώα, καθώς επίσης και με το φιμπρινογόνο για το οποίο υπάρχουν ενδείξεις για ομόλογη δομή με τις βιτελλογενίνες. Τα συγκριτικά αποτελέσματα της πρωτοταγούς δομής θα διευκολύνουν την έρευνα στις κατευθύνσεις της εξελικτικής και μοριακής βιολογίας, της μοριακής φυσιολογίας και της βιοχημείας.

Η ικανότητα της βιτελλογενίνης να φέρει στο μόριό της πολικά και άπολα λιπίδια, υδατάνθρακες που ως γνωστό φέρουν φορτία ή αρκετά υδροξύλια, της παρέχει τη δυνατότητα πρόσδεσης και πιθανόν μεταφοράς ουσιών που έχουν διαφορετική δομή. Αυτό θα είχε τεράστια σημασία στη βιοτεχνολογία και εφαρμοσμένη εντομολογία.

81

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adiyodi, K. G., and R. G. Adiyodi (1970) Endocrine control of reproduction in decapod Crustacea. Biol. Rev., 45: 121-165.

2. Aguilar, M. B., L. S. Quackenbush, D. T. Hunt, J. Shabanowitz, and A. Huberman (1992) Identification, purification and initial characterization of the Vitellogenesis-Inhibiting Hormone from the mexican crayfish *Procambarus buvieri* (Ortmann). Comp. Biochem. Physiol. [B], 102: 491-498.

3. Allington, W. B., A. L. Gordy, G. A. McCulough, D. E. Mitchell, and J. Nelson (1978) Electrophoretic concentration of macromolecules. Anal. Biochem., 85:188-196.

4. Anderson, D. W., A. V. Nichols, T. M. Forte, and F. G. Lindgren (1977) Particle distribution of human serum lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, 493: 55-68.

5. Andrieux, N., and J. de Frescheville (1992) Caractérisation de la vitelline secondaire chez le Crustacé Brachyoure *Carcinus maenas*. C. R. Acad. Sci. Paris, Série III, 314: 227-230.

6. Anilkumar, G., and K. G. Adiyodi (1980) Ovarian growth, induced by eyestalk ablation during the prebreeding season, is not normal in the crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). Int. J. Invert. Reprod., 2: 95-105.

7. Anilkumar, G., and K. G. Adiyodi (1985) The role of eyestalk hormones in vitellogenesis during the prebreeding season in the crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). Biol. Bull., 169: 689-695.

8. Baert, J. L., and M. C. Slomianny (1987) Heterosynthetic origin of the major yolk protein, vitellin, in a nereid, *Perinereis cultrifera* (Polychaete Annelid). Comp. Biochem. Physiol. [B], 88: 1191-1199.

9. Baert, J. L., P. Sautière, and M. Porchet (1984) Purification and characterization of oocyte vitellin from *Perinereis cultrifera* (Polychaete Annelid). Eur. J. Biochem., 142: 527-532.

10. Baker, M. E. (1988) Invertebrate vitellogenin is homologous to human von Willebrand factor. Biochem. J., 256: 1059-1063.

11. Barnett, T., C. Pachl, J. P. Gergen, and P. C. Wensink (1980) The isolation and characterization of *Drosophila* yolk protein genes. Cell, 21: 729-738.

12. Bergink, E. W., R. A. Wallace, J. A. Van de Berg, E. S. Bos, M. Gruber, and G. Ab (1974) Estrogen- induced synthesis of yolk proteins in roosters. Am. Zool., 14: 1177-1193.

13. Bergink, E. W., and R. A. Wallace (1974) Precursor-product relationship between amphibian vitellogenin and the yolk proteins, lipovitellin and phosvitin. J. Biol. Chem., 249: 2897-2903.

14. Bomirski, A., and E. Klek (1974) Action of eyestalks on the ovary in *Rhithropanopeus harrisii* and *Crangon crangon* (Crustacea: Decapoda). Marine Biology, 24: 329-337.

15. Bonnier, P., and J. L. Baert (1992) Vitellogenesis in the sand worm *Nereis diversicolor*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 102: 785-790.

16. Bownes, M., and B. D. Hames (1978) Analysis of the yolk proteins in *Drosophila melanogaster*. FEBS Lett., 96: 327-330.

17. Browdy, C. L., M. Fainzilber, M. Tom, Y. Loya, and E. Lubzens (1990) Vitellin synthesis in relation to oogenesis in in vitro-incubated ovaries of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). J. Exp. Zool., 255: 205-215.

18. Byard, E. H., and D. E. Aiken (1984) The relationship between molting, reproduction, and a hemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. Comp. Biochem. Physiol. [A], 77: 749-757.

19. Campbell, C. M., and D. R. Idler (1976) Hormonal control of vitellogenesis in hypophysectomized winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). Gen. Comp. Endocrinol., 28: 143-150.

20. Carrey, E. A. (1989) Peptide Mapping. In: Protein Structure: A Practical Approach, Ed. 1. T. E. Creighton, ed. IRL PRESS at Oxford University Press, pp. 117-144.

21. de Chaffoy de Courcelles, D., and M. Kondo (1980) Lipovitellin from the Crustacean, *Artemia salina*. J. Biol. Chem., 255: 6727-6733.

22. Chalaye, D. (1979) Etude immunochimique des proteines hemolymphatiques et ovocytaires de *Rhodnius prolixus* (Stal). Canad. J. Zool., 57: 329-336.

23. Chang, C. F., and S. R. Jeng (1995) Isolation and characterization of the female- specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn *Penaeus chinensis*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 112: 257-263.

24. Chang, C. F., F. Y. Lee, and Y. S. Huang (1993a) Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of the prawn, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol.[B], 105: 409-414.

25. Chang, C. F., F. Y. Lee, Y. S. Huang, and T. H. Hong (1994) Purification and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the prawn, *Penaeus monodon*. Invert. Reprod. Dev., 25: 185-192.

26. Chang, C. F., and T. W. Shih (1995) Reproductive cycle of ovarian development and vitellogenin profiles in the freshwater prawns, *Macrobrachium rosenbergii*. Invert. Reprod. Dev., 27: 11-20.

27. Chang, C. F., T. W. Shih, and T. H. Hong (1993b) Purification and characterization of vitellin from the mature ovaries of prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 105: 609-615.

28. Charniaux-Cotton, H. (1985) Vitellogenesis and its control in malacostracan Crustacea. Am. Zool., 25: 197-206.

29. Chen, C. C., and S. N. Chen (1993) Isolation and partial characterization of vitellin from the egg of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 106: 141-146.

30. Chen, J. S., T. W. Sappington, and A. S. Raikhel (1997) Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. J. Mol. Evol., 44: 440-451.

31. Chino, H., M. Yamagata, and S. Sato (1977) Further characterization of lepidopteran vitellogenin from haemolymph and mature eggs. Insect Biochem., 7: 125-131.

32. Chinzei, Y., H. Chino, and G. R. Wyatt (1981) Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. Insect Biochem., 11: 1-7.

33. Clark, R. C. (1970) The isolation and composition of two phosphoproteins from hen's egg. Biochem. J., 118: 537-542.

34. Dehn, P. F., D. E. Aiken, and S. Waddy (1983) Aspects of vitellogenesis in the lobster *Homarus americanus*. Canadian Techn. Rep. Fish. Aquat. Sci., 1161: 1-24.

35. Della-Cioppa, G., and F. Engelmann (1987) The vitellogenin of *Leucophaea maderae*. Synthesis as a large phosphorylated precursor. Insect Biochem., 17: 401-415.

36. Derelle, E., J. Grosclaude, J. J. Meusy, H. Junera, and M. Martin (1986) Elisa titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody. Comp. Biochem. Physiol. [B], 85: 1-4.

37. Dhadialla, T. S., and A. S. Raikhel (1990) Biosynthesis of mosquito vitellogenin. J. Biol. Chem., 265: 9924-9933.

38. Dhadialla, T. S., and G. R. Wyatt (1983) Juvenile hormone-dependent vitellogenin synthesis in *Locusta migratoria* fat body: Inducibility related to sex and stage. Dev. Biol., 96: 436-444.

39. Don-Wheeler, G., and F. Engelmann (1991) The female- and maleproduced vitellogenins of *Leucophaea maderae*. J. Insect Physiol., 37: 869-882.

40. Don-Wheeler, G., and F. Engelmann (1997) The biosynthesis and processing of vitellogenin in the fat bodies of females and males of the cockroach *Leucophaea maderae*. Insect Biochem. Molec. Biol., 27: 901-918.

41. Doolittle, R. F., and M. Riley (1990) The amino-terminal sequence of lobster fibrinogen reveals common ancestry with vitellogenins. Biochem. Biophys. Res. Commun., 167: 16-19.

42. Eastman-Reks, S. B., and M. Fingerman (1984) Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth in vivo and in vitro in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Comp. Biochem. Physiol. [A], 79: 679-684.

43. Eastman-Reks, S. B., and M. Fingerman (1985) In vitro synthesis of vitellin by the ovary of the fiddler crab *Uca pugilator*. J. Exp. Zool., 233: 111-116.

44. Engelmann, F. (1969) Female specific protein: biosynthesis controlled by corpus allatum in *Leucophaea maderae*. Science, 165: 407-409.

45. Engelmann, F. (1979) Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis and role in vitellogenesis. Adv. Insect Physiol., 14: 49-107.

46. Engelmann, F. (1984) Regulation of vitellogenesis in insects: the pleiotropic role of juvenile hormones. In Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertabrate Hormones (Eds Hoffmann J., and M. Porchet) Springer Verlag, pp. 444-453.

47. Engelmann, F. (1986) Endocrine regulated insect vitellogenesis: a synthesis. In advances in Invertebrate Reproduction 4 (Eds Porchet M., J. C. Andries, and A. Dhainaut) Elsevier, Amsterdam, pp. 31-42.

48. Fainzilber, M., M. Tom, S. Shafir, S. W. Applebaum, and E. Lubzens (1992) Is there extraovarian synthesis of vitellogenin in penaeid shrimp? Biol. Bull., 183: 233-241.

49. Fallon, A. M., H. H. Hagedorn, G. R. Wyatt, and H. Laufer (1974) Activation of vitellogenic synthesis in the mosquito *Aedes aegypti* by ecdysone. J. Insect Physiol., 20: 1815-1823.

50. Felgenhauer, K. (1974) Evaluation of molecular size by gel electrophoretic techniques. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 335: 1281-1290.

51. Fingerman, M. (1987) Endocrine mechanisms in crustaceans. J. Crustacean Biol.,7: 1-24.

52. Fischer, A., and K. Schmitz (1981) Preparation, properties and composition of Nereis vitellin, the yolk protein of the annelid, *Nereis virens*. Differentiation, 19: 103-108.

53. Folch, J., M. Lees, and G. H. Stanley (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem., 226: 497-509.

54. Fourney, R. M., G. F. Pratt, D. G. Harnish, G. R. Wyatt, and B. N. White (1982) Structure and synthesis of vitellogenin and vitellin from *Calliphora erythrocephala*. Insect Biochem., 12: 311-321.

55. Frings, C. S., T. W. Fendley, T. M. Dunn, and C. A. Queen (1972) Improved determination of total serum lipids by the sulfophosphovanillin. Clin. Chem., 18: 673-674.

56. Furlan, M., B. A. Perret, and E. A. Beck (1979) Staining of glycoproteins in polyacrylamide and agarose gels with fluorescent lectins. Anal. Biochem., 96: 208-214.

57. Fyffe, W. E., and J. D. O'Connor (1974) Characterization and quantification of a crustacean lipovitellin. Comp. Biochem. Physiol. [B], 47: 851-867.

58. Gemmill, R. M., M. Hamblin, R. L. Glaser, J. V. Racioppi, J. L. Marx, B. N. White, J. M. Calvo, M. F. Wolfner, and H. H. Hagedorn (1986) Isolation of mosquito vitellogenin genes and induction of expression by 20-hydroxyecdysone. Insect Biochem., 16: 761-774.

59. Green, C. D., and J. R. Tata (1976) Direct induction by estradiol on vitellogenin synthesis in organ cultures of male *Xenopus laevis* liver. Cell, 7: 131-139.

60. Hafer, J., A. Fischer, and H. J. Ferenz (1992) Identification of the yolk receptor protein in oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) and comparison with the locust vitellogenin receptor. J. Comp. Physiol. [B], 162: 148-152.

61. Hara, A. and H. Hirai (1978) Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gaidneri*). Comp. Biochem. Physiol. [B], 48: 389-399.

62. Harnish, D. G., and B. N. White (1982) Insect vitellins: Identification, purification, and characterization from eight orders. J. Exp. Zool., 220: 1-10.

63. Heilmann, L. J., P. M. Trewitt, and A. K. Kumaran (1993) Proteolytic processing of the vitellogenin precursor in the boll weevil, *Anthonomus grandis*. Arch. Insect Biochem. Physiol., 23: 125-134.

64. Hiramatsu, N., and A. Hara (1996) Relationship between vitellogenin and its related egg yolk proteins in Sakhalin Taimen (*Hucho perryi*).Comp. Biochem. Physiol. [A], 115: 243-251.

65. Hiremath, S., and S. Eshita (1992) Purification and characterization of vitellogenin from the gypsy moth, *Lymantria dispar*. Insect Biochem. Molec. Biol., 22: 605-611.

66. Hiremath, S., and K. Lehtoma (1997) Complete nucleotide sequence of the vitellogenin mRNA from the gypsy moth: Novel arrangement of the subunit encoding regions. Insect Biochem. Molec. Biol., 27: 27-35.

67. Humbeck, K., S. Romer, and H. Senger (1988) Changes in carotenoid composition and function of the photosynthetic apparatus during light-dependent chloroplast differentiation in mutant C-6D of *Scenedesmus obliquus*. Botanica Acta, 101: 220-228.

68. Imboden, H., R. König, P. Ott, A. Lustig, U. Kämpfer, and B. Lanzrein (1987) Characterization of the native vitellogenin and vitellin of the cockroach,

*Nauphoeta cinerea*, and comparison with other species. Insect Biochem., 17: 353-365.

69. Izumi, S., S. Tomino, and H. Chino (1980) Purification and molecular properties of vitellin from the silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochem., 10: 199-208.

70. Jared, D. W. and R. A. Wallace (1968) Comparative chromatography of the yolk proteins of teleosts. Comp. Biochem. Physiol., 24: 437-443.

71. Jugan, P. and D. Soyez (1985) Démonstration in vitro de l' inhibition de l' endocytose ovocytaire par un extrait de glandes du sinus chez la Crevette *Macrobrachium rosenbergii*. C. R. Acad. Sc. paris 300, Serie III: 705-709.

72. Junera, H. and J. J. Meusy (1982) Vitellogenin and lipovitellins in *Orchestia gammarellus* (Pallas) (Crustacea, Amphipoda); labelling of subunits after in vivo administration of <sup>3</sup>H leucine. Experientia, 38: 252-254.

73. Kawooya, J. K., and J. H. Law (1983) Purification and properties of microvitellogenin of *Manduca sexta*, role of juvenile hormone in appearance and uptake. Biochem. Biophys. Res. Commun., 117: 643-650.

74. Kawooya, J. K., E. O. Osir, and J. H. Law (1986) Physical and chemical properties of microvitellogenin. J. Biol. Chem., 261: 10844-10849.

75. Kerr, M. S. (1969) The hemolymph proteins of the blue crab, *Callinectes sapidus*. II. A lipoprotein serologically identical to oocyte lipovitellin. Dev. Biol., 20: 1-17.

76. Khayat, M., E. Lubzens, A. Tietz, and B. Funkenstein (1994a) Cell-free synthesis of vitellin in the shrimp *Penaeus semisulcatus* (de Haan). Gen. Comp. Endocrin., 93: 205-213.

77. Khayat, M., E. Lubzens, A. Tietz, and B. Funkenstein (1994b) Are vitellin and vitellogenin coded by one gene in the marine shrimp *Penaeus semisulcatus* ? J. Molec. Endocrin., 12: 251-254.

78. Koller, C. N., T. S. Dhadialla, and A. S. Raikhel (1989) Selective endocytosis of vitellogenin by oocytes of the mosquito, *Aedes aegypti* : an in vitro study. Insect Biochem., 19: 693-702.

79. Komatsu, M., and S. Ando (1992) Isolation of crustacean egg yolk lipoproteins by differential density ultracentrifugation. Comp. Biochem. Physiol. [B], 103: 363-368.

80. Komatsu, M., S. Ando, and S. Teshima (1993) Comparison of hemolymph lipoproteins from four species of Crustacea. J. Exp. Zool., 266: 257-265.

81. König, R., and, B. Lanzrein (1985) Binding of vitellogenin to specific receptors in oocyte membrane preparations of the ovoviviparous cockroach *Nauphoeta cinerea*. Insect Biochem., 15: 735-747.

82. Kulakosky, P. C., and W. H. Telfer (1987) Selective endocytosis, in vitro, by ovarian follicles from *Hyalophora cecropia*. Insect Biochem., 17: 845-858.

83. Kwon, H. C., S. Hayashi, and Y. Mugiya (1993) Vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 104: 381-386.

84. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature, 227: 680-685.

85. Laufer, H., D. W. Borst, F. C. Baker, C. Carrasco, M. Sinkus, C. C. Reuter, L. W. Tsai, and D. A. Schooley (1987) Identification of a juvenile hormonelike compound in a crustacean. Science, 235: 202-205.

86. Laufer, H., D. W. Borst, C. Carrasco, F. C. Baker, and D. A. Schooley (1984) The detection of juvenile hormone in Crustacea. Am. Zool., 24: 33A.

87. Lee, C. Y., and R. D. Watson (1995) In vitro study of vitellogenesis in the blue crab (Callinectes sapidus): Site and control of vitellin synthesis. J. Exp. Zool., 271: 364-372.

88. Lee, K. B. H., E. H. Lim, T. J. Lam, and J. L. Ding (1992) Vitellogenin diversity in the Perciformes. J. Exp. Zool., 264: 100-106.

89. Lee, R. F., and D. L. Puppione (1988) Lipoproteins I and II from the hemolymph of the blue crab *Callinectes sapidus*: Lipoprotein II associated with vitellogenesis. J. Exp. Zool., 248: 278-289.

90. Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr, and R. J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275.

91. Lowry, R., and I. J. Tinsley (1974) A simple method for the determination of phospholipids. Lipids, 9: 491-492.

92. Lui, C. W., and J. D. O'Connor (1976) Biosynthesis of lipovitellin by the Crustacean ovary. II. Characterization of and in vitro incorporation of amino acids in to the purified subunits. J. Exp. Zool., 195: 41-52.

93. Lui, C. W., and J. D. O'Connor (1977) Biosynthesis of Crustacean lipovitellin. III. The incorporation of labeled amino acids into the purified lipovitellin of the crab *Pachygrapsus crassipes*. J. Exp. Zool., 199: 105-108.

94. Lui, C. W., B. A. Sage, and J. D. O'Connor (1974) Biosynthesis of lipovitellin by the Crustacean ovary. J. Exp. Zool., 188: 289-296.

95. Meusy, J. J. (1980) Vitellogenin, the extraovarian precursor of the protein yolk in Crustacea: A review. Reprod. Nutr. Dev., 20: 1-21.

96. Meusy, J. J., and G. G. Payen (1988) Female reproduction in malacostracan crustaceans. Zool. Sci., 5: 217-265.

97. Meusy, J. J., H. Junera, P. Cledon, and M. Martin (1983) Vitellogenin in a decapod crustacean *Palaemon serratus*, identification, immunological similarity to vitellin synthesis and role of the eyestalks. Reprod. Nutr. Dev., 23: 625-640.

98. Montorzi, M., K. H. Falchuk, and B. L. Vallee (1994) *Xenopus laevis* vitellogenin is a zinc protein. Biochem. Biophys. Res. Commun., 200: 1407-1413.

99. Montorzi, M., K. H. Falchuk, and B. L. Vallee (1995) Vitellogenin and lipovitellin: Zinc proteins of *Xenopus laevis* oocytes. Biochemistry, 34: 10851-10858.

100. Mundall, E. C., S. S. Tobe, and B. Stay (1979) Induction of vitellogenin and growth of implanted oocytes in male cockroaches. Nature, Lond., 282: 97-98.

101. Nardeli, D., S. Gerber-Huber, F. D. van het Schip, M. Gruber, G. AB, and W. Wahli (1987) Vertebrate and nematode genes coding for yolk proteins are derived from a common ancestor. Biochemistry, 26: 6397-6402.

102. Nelson, K., D. Hedgecock, and W. Borgeson (1983) Photoperiodic and ecdysial control of vitellogenesis in lobsters, *Homarus americanus*. Canadian J. Fish. Aquat. Sci., 40: 940-947.

103. Nelson, K., B. Heyer, E. Johnson, D. Hedgecock, and E. S. Chang (1988) Photoperiod-induced changes in hemolymph vitellogenins in female lobsters (*Homarus americanus*). Comp. Biochem. Physiol. [B], 90: 809-821.

104. Okumura, T., C. H. Han, Y. Suzuki, K. Aida, and I. B. Hanyu (1992) Changes in hemolymph vitellogenin and ecdysteroid levels during the reproductive and nonreproductive molt cycles in the freshwater prawn *Macrobrachium nipponese*. Zool. Sci., 9: 37-45.

105. Opresko, L. K., and H. S. Wiley (1987) Receptor-mediated endocytosis in *Xenopus* oocytes. II. Evidence for two novel mechanisms of hormonal regulation. J. Biol. Chem., 262: 4116-4123.

106. Pan, M. L. (1977) Juvenile hormone and vitellogenin synthesis in the cecropia silkworm. Biol. Bull., 153: 336-345.

107. Pateraki, L. E., and E. Stratakis (1997) Characterization of vitellogenin and vitellin from land crab Potamon potamios: Identification of a precursor polypeptide in the molecule. J. Exp. Zool., 279: 597-608.

108. Paulus, J. E., and H. Laufer (1987) Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda brachyura). Int. J. Invert. Reprod. Develop., 11: 29-44.

109. Pereira, S. D., and A. G. de Bianchi (1983) Vitellogenin and vitellin of *Rhynchosciara americana* : further characterization and time of synthesis. Insect Biochem., 13: 323-332.

110. Postlethwait, J. H., and F. Giorgi (1985) Vitellogenesis in insects. In: Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis. L. W. Browder, ed. Plenum Press, New York, Vol. 1, pp. 85-125.

111. Postlethwait, J. H., M. Bownes, and T. Jowett (1980) Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. Dev. Biol., 79: 379-387.

112. Puppione, D. L., D. F. Jensen, and J. D. O'Connor (1986) Physicochemical study of rock crab lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta, 875: 563-568.

113. Quackenbush, L. S. (1986) Crustacean endocrinology, a review. Canadian J. Fish. Aquat. Sci., 43: 2271-2282.

114. Quackenbush, L. S. (1989) Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei* : In vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. Comp. Biochem. Physiol. [B], 94: 253-261.

115. Quackenbush, L. S. (1994) Lobster reproduction: A review. Crustaceana, 67: 82-94.

116. Quackenbush, L. S., and W. F. Herrnkind (1981) Regulation of molt and gonadal development in the spiny lobster *Panulirus argus* (Crustacea: Palinuridae). Effect of eyestalk ablation. Comp. Biochem. Physiol. [A], 69: 523-527.

117. Quackenbush, L. S., and L. L. Keeley (1988) Regulation of vitellogenesis in the fiddler crab, *Uca pugilator*. Biol. Bull., 175: 321-331.

118. Quinitio, E. T., A. Hara, K. Yamauchi, T. Mizushima, and A. Fuji (1989) Identification and characterization of vitellin in hermaphrodite shrimp, *Pandalus kessleri*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 94: 445-451. 119. Quinitio, E. T., A. Hara, K. Yamauchi, and A. Fuji (1990) Isolation and characterization of vitellin from the ovary of *Penaeus monodon*. Invert. Reprod. Dev., 17: 221-227.

120. Raikhel, A. S., and S. G. Bose (1988) Properties of the mosquito yolk protein: a study using monoclonal antibodies. Insect Biochem., 18: 565-575.

121. Raikhel, A. S., and T. S. Dhadialla (1992) Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. Annu. Rev. Entomol., 37: 217-251.

122. Rankin, S. M., J. Y. Bradfield, and L. L. Keeley (1989) Ovarian protein synthesis in the South American white shrimp, *Penaeus vannamei*, during the reproductive cycle. Invert. Reprod. Dev., 15: 27-33.

123. Rina, M. D., and A. C. Mintzas (1987) Two vitellins-vitellogenins of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* : A comparative biochemical and immunological study. Comp. Biochem. Physiol. [B], 86: 801-808.

124. Rina, M. D., and A. C. Mintzas (1988) Biosynthesis and regulation of two vitellogenins in the fat body and ovaries of *Ceratitis capitata* (Diptera). Roux's Arch. Dev. Biol., 197: 167-174.

125. Rina, M., and C. Savakis (1991) A cluster of vitellogenin genes in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* : Sequence and structural conservation in Dipteran yolk proteins and their genes. Genetics, 127: 769-780.

126. Roe, J. H. (1955) The determination of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. J. Biol. Chem., 212: 335-343.

127. Romans, P., Z. Tu, Z. Ke, and H. H. Hagedorn (1995) Analysis of a vitellogenin gene of the mosquito, *Aedes aegypti* and comparisons to vitellogenins from other organisms. Insect Biochem. Molec. Biol., 25: 939-958.

128. Rosell, R., and L. B. Coons (1991) Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. Insect Biochem., 21: 871-885.

129. Sagi, A., Y. Soroka, E. Snir, O. Chomsky, J. Calderon, and Y. Milner (1995) Ovarian protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii* : Does ovarian vitellin synthesis exist? Invert. Reprod. Dev., 27: 41-47.

130. Shafir, S., M. Ovadia, and M. Tom (1992a) In vivo incorporation of labeled methionine into proteins, vitellogenin, and vitellin in females of the penaeid shrimp *Penaeus semisulcatus* de Haan. Biol. Bull., 183: 242-247.

131. Shafir, S., M. Tom, M. Ovadia, and E. Lubzens (1992b) Protein, vitellogenin, and vitellin levels in the hemolymph and ovaries during ovarian development in *Penaeus semisulcatus* (de Haan). Biol. Bull., 183: 394-400.

132. Sharrock, W. J. (1983) Yolk proteins of *Caenorhabdytis elegans*. Insect Biochem., 13: 273-379.

133. Sharrock, W. J. (1984) Cleavage of two yolk proteins from a precursor in *Caenorhabdytis elegans*. J. Mol. Biol., 174: 419-431.

134. Skidmore, w. D., and C. Entenmann (1962) Two-dimensional thin-layer chromatography of rat liver phosphatides. J. LIpid Res., 3: 471-474.

135. Spaziani, E., R. J. Havel, R. L. Hamilton, D. A. Hardman, J. B. Stoudemire, and R. D. Watson (1986) Properties of serum high-density lipoproteins in the crab, *Cancer antennarius* Stimpson. Comp. Biochem. Physiol. [B], 85: 307-314.

136. Spieth, J., K. Denison, S. Kirtland, J. Cane, and T. Blumenthal (1985a) The *C. elegans* vitellogenin genes: short sequence repeats in the promoter regions and homology to the vertebrate genes. Nucleic Acids Res., 13: 5283-5295.

137. Spieth, J., K. Denison, E. Zucker, and T. Blumenthal (1985b) The nucleotide sequence of a nematode vitellogenin gene. Nucleic Acids Res., 13: 7129-7138.

138. Stoffolano, J. G. Jr, M. F. Li, B. X. Zou, and C. M. Yin (1992) Vitellogenin uptake, not synthesis, is dependent on juvenile hormone in adults of *Phormia regina* (Meigen). J. Insect Physiol., 38: 839-845.

139. Stratakis, E., and B. Linzen (1984) Carbonate dehydratase (carbonic anhydrase) in a spider. Association with the hemolymph lipoprotein. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 365: 1187-1197.

140. Stratakis, E., G. Fragkiadakis, and E. Carpeli-Moustaizi (1992) Isolation and characterization of a non-sex-specific lipoprotein from hemolymph of fresh water crab *Potamon potamios*. Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 373: 665-677.

141. Stratakis, E., G. Fragkiadakis, and I. Tentes (1993) Purification and properties of the fatty acid binding VHDL from the hemolymph of the spider *Eurypelma californicum*. J. Exp. Zool., 267: 483-492.

142. Swaney, J. B. (1983) Reconstitution of apolipoprotein A-I from human high density lipoprotein with bovine brain sphingomyelin. J. Biol. Chem., 258: 1254-1259.

143. Tata, J. R. (1976) The expression of the vitellogenin gene. Cell, 9: 1-14.

144. Telfer, W. H., and M. Pan (1989) Adsorptive endocytosis of vitellogenin, lipophorin, and microvitellogenin during yolk formation in Hyalophora. Arch. Insect Biochem. Physiol., 9: 339-355.

145. Tirumalai, R., and T. Subramoniam (1992) Purification and characterization of vitellogenin and lipovitellins of the sand crab *Emerita asiatica* : Molecular aspects of crab yolk proteins. Molec. Reprod. Dev., 33: 16-26.

146. Tom, M., M. Goren, and M. Ovadia (1987a) Purification and partial characterization of vitellin from the ovaries of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Comp. Biochem. Physiol. [B], 87: 17-23.

147. Tom, M., M. Goren, and M. Ovadia (1987b) Localization of the vitellin and its possible precursors in various organs of *Parapenaeus longirostris* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Int. J. Invert. Reprod. Dev., 12: 1-12.

148. Tom, M., M. Fingerman, T. K. Hayes, V. Johnson, B. Kerner, and E. Lubzens (1992) A comparative study of ovarian proteins from two penaeid shrimps, *Penaeus semisulcatus* de Haan and *Penaeus vannamei* (Boone). Comp. Biochem. Physiol. [B], 102: 483-490.

149. Wahli, W. (1988) Evolution and expression of vitellogenin genes. Trends Genet., 4: 227-232.

150. Wahli, W., I. B. Dawid, G. U. Ryffel, and R. Weber (1981) Vitellogenesis and the vitellogenin gene family. Science, 212: 298-304.

151. Wahli, W., I. B. Dawid, T. Wyler, R. B. Jaggi, R. Weber, and G. U. Ryffel (1979) Vitellogenin in *Xenopus laevis* is encoded in a small family of genes. Cell, 16: 535-549.

152. Wallace, R. A., S. L. Walker, and P. V. Hauschka (1967) Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapods. Biochemistry, 6: 1582-1590.

153. Wallace, R. A., and E. W. Bergink (1974) Amphibian vitellogenin: Properties, hormonal regulation of hepatic synthesis and ovarian uptake, and conversion to yolk proteins. Amer. Zool., 14: 1159-1175.

154. Wang, S. Y., and D. L. Williams (1980) Identification, purification, and characterization of two distinct avian vitellogenins. Biochemistry, 19: 1557-1563.

155. Wang, S. Y., and D. L. Williams (1982) Biosynthesis of the vitellogenins: identification and characterization of nonphosphorylated precursors to avian vitellogenin I and vitellogenin II. J. Biol. Chem., 257: 3837-3846.

156. Wang, S. Y., D. E. Smith, and D. L. Williams (1983) Purification of avian vitellogenin III: Comparison with vitellogenins I and II. Biochemistry, 22: 6206-6212.

157. Wang, Z., and K. G. Davey (1992) Characterization of yolk protein and its receptor on the oocyte membrane in *Rhodnius prolixus*. Insect Biochem. Molec. Biol., 22: 757-767.

158. Webb, H. M. (1977) Eyestalk regulation of molt and vitellogenesis in *Uca pugilator*. Biol. Bull., 153: 630-642.

159. Wojchowski, D. M., and J. G. Kunkel (1987) Purification of two dinstinct oocyte vitellins and identification of their corresponding vitellogenins in fat body and hemolymph of *Blaberus discoidalis*. Insect Biochem., 17: 189-198.

160. Wolin, E. M., H. Laufer, and D. F. Albertini (1973) Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocytes. Dev. Biol., 35: 160-170.

161. Wyatt, G. R., K. E. Cook, H. Firko, and T. S. Dhadialla (1987) Juvenile hormone action on locust fat body. Insect Biochem., 17: 1071-1073.

162. Wyatt, G. R., and M. L. Pan (1978) Insect plasma proteins. Ann. Rev. Biochem., 47: 779-817.

163. Yamamura, J. I., T. Adachi, N. Aoki, H. Nakajima, R. Nakamura, and T. Matsuda (1995) Precursor-product relationship between chicken vitellogenin and the yolk proteins: The 40 kDa yolk plasma glycoprotein is derived from the C-terminal cysteine-rich domain of vitellogenin II. Biochim. Biophys. Acta, 1244: 384-394.

164. Yano, I., and Y. Chinzei (1987) Ovary is the site of vitellogenin synthesis in Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. [B], 86: 213-218.

165. Yusko, S., T. F. Roth, and T. Smith (1981) Receptor-mediated vitellogenin binding to chicken oocytes. Biol. Chem. J., 200: 43-50.

166. Zagalsky, P. F. (1985) A study of the astaxanthin-lipovitellin, ovoverdin, isolated from the ovaries of the lobster, *Homarus gammarus* (L.). Comp. Biochem. Physiol. [B], 80: 589-597.

167. Zagalsky, P. F., and B. M. Gilchrist (1976) Isolation of a blue canthaxanthin-lipovitellin from the yolk platelets of *Branchipus stagnalis* (L.) (Crustacea: Anostraca). Comp. Biochem. Physiol. [B], 55: 195-200.