



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

Διπλωματική εργασία

**«Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΗΝ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗ:
ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΝΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ»**

Δασταμάνη Μεταξία

Βιοχημικός-Βιοτεχνολόγος

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2013

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής

Νταφόπουλος Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Λιάκος Παναγιώτης, Επίκουρος καθηγητής Ιατρικής Βιοχημείας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών "Βιολογία της Αναπαραγωγής" του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το πειραματικό μέρος εκπονήθηκε στο Εργαστήριο "Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής" του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας υπό την καθοδήγηση της Καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής κας Ασπασίας Τσέζου.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Τσέζου Ασπασία για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, τις πολύτιμες συμβουλές της και τη βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια διεξαγωγής της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Μεσσήνη Ιωάννη, υπεύθυνο καθηγητή του μεταπτυχιακού προγράμματος, που μου προσέφερε την ευκαιρία πραγματοποίησης βιβλιογραφικής και πειραματικής εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γκαρά Αντώνιο, Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παροχή των δειγμάτων τροφοβλαστικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη εργασία.

Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στις διδακτορικές φοιτήτριες Κωστοπούλου Φωτεινή, Παπαθανασίου Ιωάννα και Μουρμούρα Ευανθία για την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση τους τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Κατσιάνη Ελένη. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη τομέα Βιοϊατρικής στο IBET, Γκρέτση Βασιλική για τις χρήσιμες συμβουλές της καθώς και για την πολύτιμη συνεισφορά της στην τέλεση μέρους των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής, τόσο για την βοήθεια και τη συμπαράστασή τους, όσο και για την φιλική τους διάθεση, καθ' όλη τη διάρκεια της παραμονής μου στο εργαστήριο.

Δασταμάνη Μεταξία

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαδραματίζουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εμφύτευση του εμβρύου και στην ανάπτυξη του πλακούντα. Η μετάβαση από τη μονοπύρηνη κυτταροτροφοβλάστη στην πολυπύρηνη συγκυτιοτροφοβλάστη συνοδεύεται μεταξύ άλλων από την παρουσία παραγόντων που σχετίζονται με την απόπτωση. Στη ρύθμιση αυτής της διαδικασίας πιστεύεται ότι εμπλέκεται η αντιπονεκτίνη, μία λιποκίνη που επάγει τη διαφοροποίηση και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του ρόλου της αντιπονεκτίνης στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Για το λόγο αυτό μελετήθηκε η επίδραση της αντιπονεκτίνης στα επίπεδα των Bcl-2 και Bax, δύο αποπτωτικών παραγόντων που πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη διαδικασία της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Συνολικά για το πειραματικό κομμάτι της εργασίας χρησιμοποιήθηκαν πέντε δείγματα τροφοβλαστικού ιστού 11^{ns}-13^{ns} εβδομάδας από γυναίκες με φυσιολογική κύηση. Με τη χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blot) πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων του γονιδίου του Bcl-2 και των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax μετά από επίδραση με αντιπονεκτίνη (c=250ng/ml).

Υπήρξε μία ένδειξη μεταβολής των μεταγραφικών επιπέδων του Bcl-2 (μικρή αύξηση) και των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax (μικρή μείωση). Ωστόσο, χρειάζεται να γίνουν επιπλέον μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων.

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Η τροφοβλάστη	1
1.2 Μονοπάτια διαφοροποίησης και λειτουργίας του τροφοβλαστικού ιστού	2
1.3 Επισκόπηση μηχανισμών και παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων.....	7
1.3.1 Η διαδικασία της απόπτωσης.....	9
1.3.2 Απόπτωση και τροφοβλαστικά κύτταρα	12
1.3.3 Οικογένεια Bcl-2 και διαφοροποίηση τροφοβλάστης	16
1.4 Λιποκίνες.....	17
1.5 Αντιγονεκτίνη	17
1.5.1 Μοριακή δομή και πολυμερισμός της αντιγονεκτίνης.....	18
1.5.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι της αντιγονεκτίνης.....	21
1.6 Αντιγονεκτίνη και αναπαραγωγικό σύστημα.....	24
1.6.1 Σηματοδότηση της αντιγονεκτίνης στον πλακούντα.....	26
1.6.2 Αντιγονεκτίνη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης	27
2. ΣΚΟΠΟΣ.....	29
3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 Δείγματα χοριακών λαχνών	30
3.2 Απομόνωση τροφοβλαστικών κυττάρων	30
3.3 Πρωτόκολλα διατήρησης κυτταροκαλλιέργειας.....	31
3.3.1 Διαχωρισμός κυττάρων (ανακαλλιέργεια)	31
3.3.2 Κατάψυξη & Απόψυξη κυττάρων.....	32
3.3.3 Επίδραση των κυττάρων με αντιγονεκτίνη	33
3.4 Απομόνωση RNA από κύτταρα	33
3.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	34
3.6 RT-PCR: Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του Bcl-2 και του GAPDH.....	36
3.7 Απομόνωση πρωτεϊνών από τροφοβλαστικά κύτταρα.....	41
3.8 Μέθοδος BCA- Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών	42
3.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου	43
3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot	45
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49

4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων του γονιδίου Bcl-2 μετά από επίδραση με αντιπρονεκτίνη.....	49
4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax μετά από επίδραση με αντιπρονεκτίνη.....	49
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η τροφοβλάστη

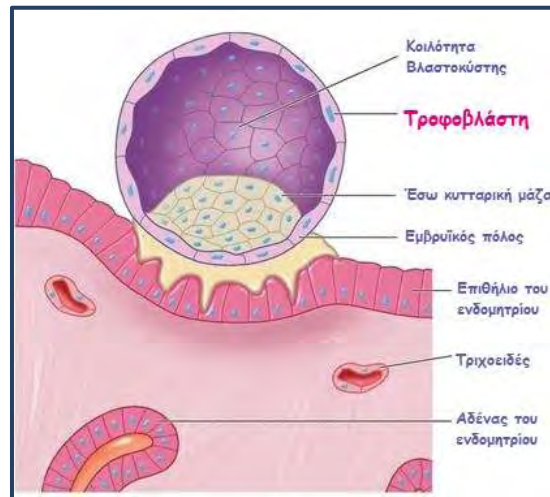
Ο όρος ‘τροφοβλάστη’ εισήχθη το 1989 από τον Ολλανδό εμβρυολόγο A.W.W. Hubrecht, ο οποίος κατά τη μελέτη των πρώτων σταδίων μετά την εμφύτευση σε έμβρυα σκαντζόχοιρου, χρησιμοποίησε αυτόν τον όρο για να περιγράψει τη θρεπτική λειτουργία (‘tropho’:τροφή) των κυττάρων εμβρυϊκής καταγωγής (‘blast’:βλαστής) (1).



Εικόνα 1: A. Ambrosius Arnold Willem Hubrecht (Wikimedia Commons).
B. Απεικόνιση χοριακών λαχνών πλακούντα σκαντζόχοιρου (1).

Στη βλαστοκύστη διακρίνονται δύο τύποι κυττάρων, η έσω κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass, ICM) ή αλλιώς εμβρυοβλάστη και μία περιφερική μονοκυτταρική στιβάδα, το τροφοεκτόδερμα (trophoectoderm, TE) (Εικόνα 2). Τα πολυδύναμα κύτταρα της εμβρυοβλάστης, προορίζονται να σχηματίσουν το έμβρυο, ενώ το τροφοεκτόδερμα σχηματίζει τα πιο διαφοροποιημένα πολωμένα κύτταρα της τροφοβλάστης από τα οποία προκύπτουν οι εξωεμβρυϊκές δομές του πλακούντα (2). Τα κύτταρα της τροφοβλάστης αποτελούν τον πρώτο κυτταρικό τύπο του εμβρύου που παρουσιάζει υψηλή λειτουργία διαφοροποίησης και διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο τόσο στην εμφύτευση της βλαστοκύστης (διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ της μήτρας και των τροφοβλαστικών κυττάρων της βλαστοκύστης) όσο και στη δημιουργία των δομών του πλακούντα (3,4).

Ο πλακούντας είναι ένα μεταβατικό όργανο που έχει πολυάριθμους και κρίσιμους ρόλους στη διατήρηση και προστασία του αναπτυσσόμενου εμβρύου καθ’



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των κυτταρικών τύπων της τροφοβλάστης κατά την προσκόλληση της στο επιθήλιο της μήτρας.

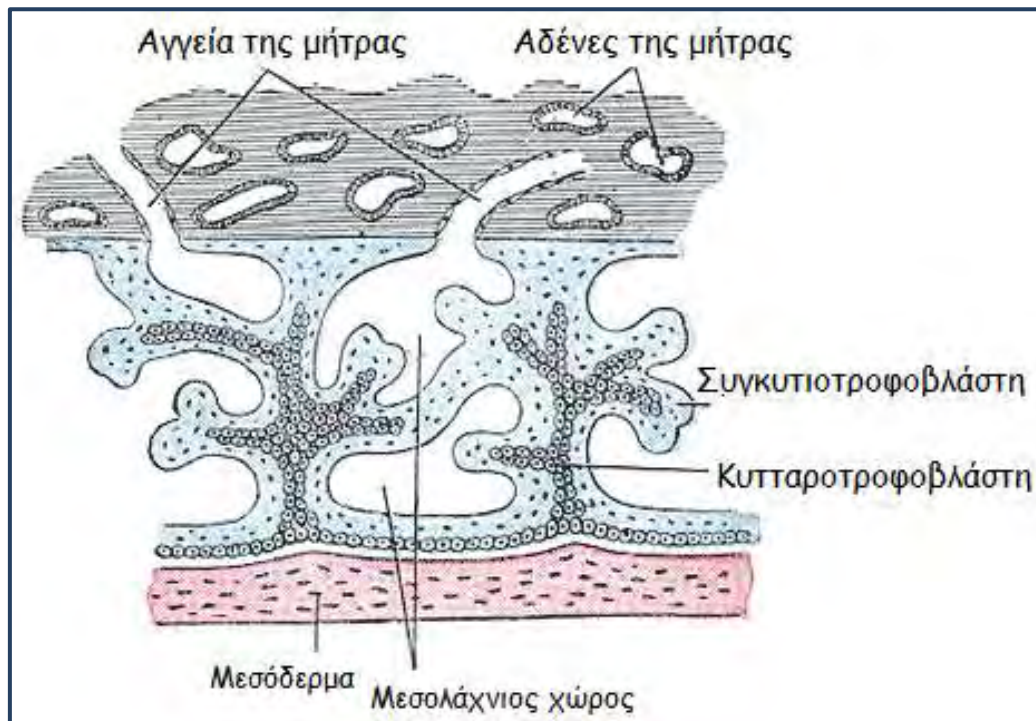
όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (5). Εμπλέκεται στην ανταλλαγή αερίων, θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων μεταξύ της μητέρας και του αναπτυσσόμενου εμβρύου (6). Επιπλέον, ο πλακούντας δρα ως ενδοκρινές όργανο που παράγει ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες και διασφαλίζει την προστασία του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας (7). Συχνά καλείται «ψευδώς κακοήθης» εξαιτίας της διεισδυτικότητας, του ταχύτατου πολλαπλασιασμού και του ανοσολογικού προνομίου που παρουσιάζει.

Η φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα στηρίζεται στη διαφοροποίηση των κυττάρων της τροφοβλάστης που ξεκινάει με την εμφύτευση της βλαστοκύστης και το σχηματισμό των ελεύθερων και σταθερών προσαρτημένων λαχνών. Συνολικά, αναγνωρίζονται τρία στάδια στην ανάπτυξη των λαχνών, οι πρωτογενείς (13η-15η ημέρα κύησης), οι δευτερογενείς (16η-21η ημέρα κύησης) και οι τριτογενείς (22η ημέρα κύησης) λάχνες και η επέκταση του λαχνικού δέντρου συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (8). Διαταραχές της διαδικασίας της διαφοροποίησης και λειτουργίας της τροφοβλάστης έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της κύησης όπως η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης και η προεκλαμψία (9).

1.2 Μονοπάτια διαφοροποίησης και λειτουργίας του τροφοβλαστικού ιστού

Τα ανθρώπινα προγονικά κύτταρα της τροφοβλάστης διαφοροποιούνται βάσει δύο γενικών μονοπατιών σε χοριακές τροφοβλάστες και σε διεισδυτικές εξωλαχνικές τροφοβλάστες. Η διαδικασία της διαφοροποίησης είναι μια δυναμική διαδικασία η οποία μπορεί να μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της κύησης (10).

Στο λαχνικό μονοπάτι, από τα προγονικά κύτταρα της τροφοβλάστης που καλύπτουν τη βλαστοκύστη προκύπτει η κυτταροτροφοβλάστη (cytotrophoblast-CTB), μία ακανόνιστη στοιβάδα ωειδών, μονοπύρηνων κυττάρων που διατηρούν την κυτταρική τους μεμβράνη και παρουσιάζουν έντονη μιτωτική δραστηριότητα (11,12). Αυτά τα πολλαπλασιαζόμενα μονοπύρηννα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα συντήκονται προκειμένου να σχηματιστεί ένα ειδικευμένο πολυπύρηννο συγκύτιο, η συγκυτιοτροφοβλάστη (syncytiotrophoblast, STB) (13). Συγκεκριμένα, μερικά από τα πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα χάνουν την κυτταρική τους μεμβράνη καθώς συνενώνονται και σχηματίζουν ένα συγκύτιο, δηλαδή μία κυτταροπλασματική μάζα με πολυάριθμους διάσπαρτους πυρήνες.



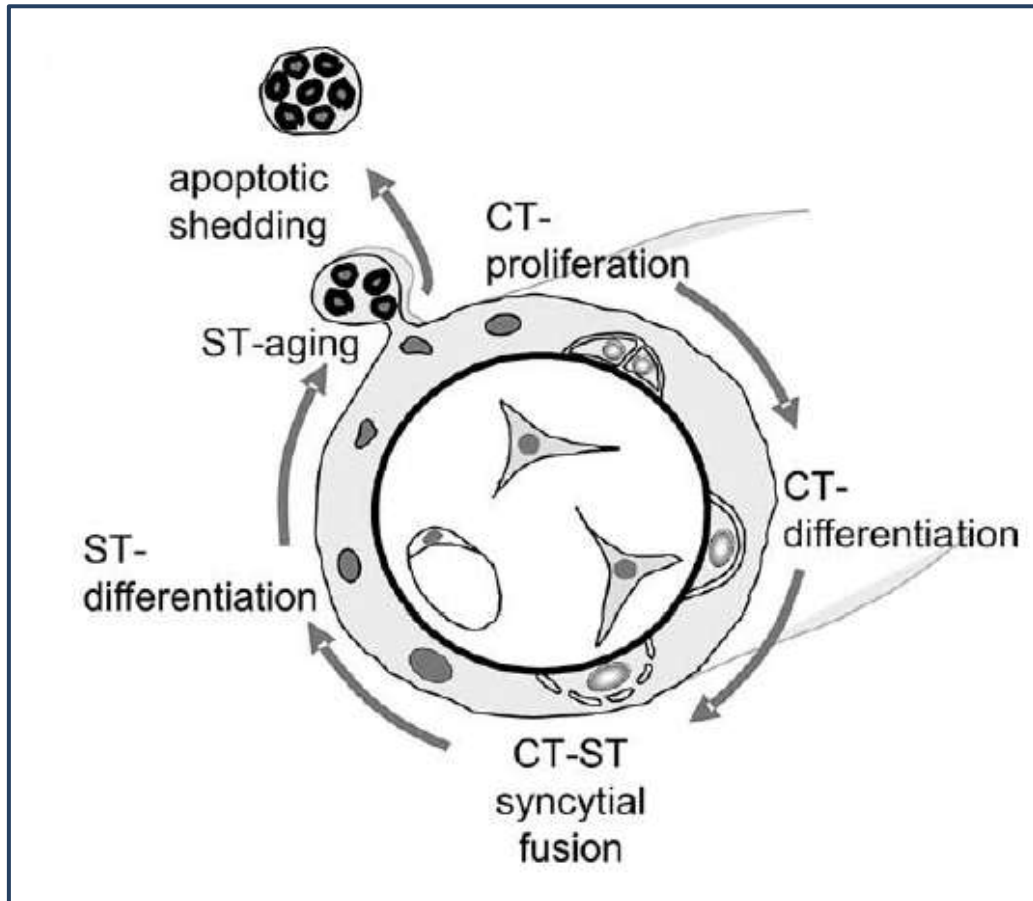
Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Η συγκυτιοτροφοβλάστη καλύπτει τις επιπλέουσες λάχνες, οι οποίες περιβάλλονται από το μητρικό αίμα, σχηματίζοντας το πλακουντιακό λαχνικό δένδρο το οποίο όπως αναφέρθηκε επεκτείνεται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (8). Από τη συγκυτιακή στιβάδα παράγονται διάφορα λυτικά ένζυμα και εκκρίνονται παράγοντες που προκαλούν απόπτωση στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Με απόπτωση αυτών των κυττάρων του στρώματος της μήτρας δημιουργούνται κενά μέσω των οποίων η βλαστοκύστη διεισδύει περαιτέρω στο ενδομήτριο. Τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης (STBs) είναι αυτά που εμπλέκονται πρωταρχικά στην

παραγωγή ορμονών που σχετίζονται με την εγκυμοσύνη όπως η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροφίνη (hCG) και η πλακουντιακή γαλακτογόνος ορμόνη (hPL) (14). Επιπλέον, η συγκυτιοτροφοβλάστη εμπλέκεται στην ανταλλαγή αερίων, θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου (15). Οι απορροφητικές ικανότητες αυτής της στιβάδας μεγιστοποιούνται με την παρουσία μικρολαχνών οι οποίες αυξάνουν σημαντικά την επιφάνεια απορρόφησης (16). Στο μέσο της 2ης εβδομάδας της κύησης αρχίζουν να εμφανίζονται ακανόνιστα κενά (lacunae) στη συγκυτιοτροφοβλάστη τα οποία στη συνέχεια αυξάνονται σε μέγεθος και γεμίζουν με υγρά ιστών και εκκρίσεις της μήτρας. Έπειτα, καθώς η συγκυτιοτροφοβλάστη μεγαλώνει όλο και περισσότερο μέσα στο τοίχωμα της μήτρας και διαβρώνει τα τοιχώματα των αγγείων (τριχοειδή, φλεβίδια), το αίμα που κυκλοφορεί σε αυτά παραδίδεται στα κενά (lacunae) που έχουν δημιουργηθεί μεταξύ των δύο στιβάδων (2). Επιπλέον, σημειώνεται ότι επειδή οι συγκυτιοτροφοβλάστες είναι σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα πρέπει να παρουσιάζουν ως ένα βαθμό ανοσιακή ανοχή. Αυτή η ανοσιακή ανοχή επιτυγχάνεται μέσω της έλλειψης έκφρασης της κλασικής τάξης I των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA class I) (17).

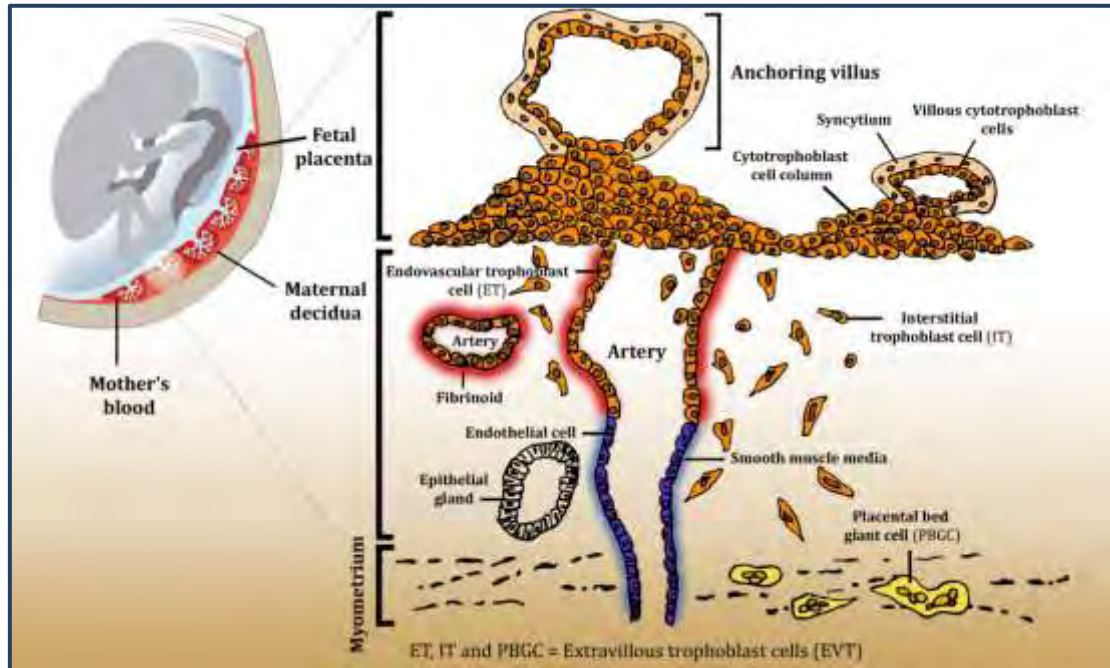
Δεδομένου ότι τα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης δεν πολλαπλασιάζονται η συνεχής ανανέωση τους κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης επιτυγχάνεται μέσω σύντηξης της υποκείμενης κυτταρικής κυτταροτροφοβλαστικής σειράς όπως προαναφέρθηκε και αποβολής των τμημάτων των συγκυτιοτροφοβλαστών (STBs) που έχουν υποστεί γήρανση, στη μητρική κυκλοφορία με τη μορφή των συγκυτιακών κόμβων (18) (Εικόνα 4). Αναλυτικότερα, η διαδικασία της σύντηξης περιλαμβάνει μία συντονισμένη ακολουθία γεγονότων, τα οποία οδηγούν σε έξοδο από τον κυτταρικό κύκλο, αποσύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών και ενσωμάτωση του κυτταροπλάσματος, του πυρήνα και των οργανιδίων σε ένα συγκύτιο. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η διαδικασία της κυτταρικής σύντηξης συμβαίνει αποκλειστικά μεταξύ της κυτταροτροφοβλάστης (CTB) και του διπλανού συγκυτίου και όχι μεταξύ γειτονικών κυτταροτροφοβλαστών (CTBs) (18).

Στο εξωλαχνικό μονοπάτι, οι κυτταροτροφοβλάστες πολλαπλασιάζονται, διαφοροποιούνται προκειμένου να αποκτήσουν διεισδυτικό φαινότυπο και διεισδύουν στο μητρικό φθαρτό και στο μυομήτριο (9,13). Επιπλέον, τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται προκειμένου να σχηματίσουν τις αγκυροβολούσες λάχνες οι οποίες προσκολλώνται στο τοίχωμα της μήτρας (19).



Εικόνα 4 : Απεικόνιση των σταδίων διαφοροποίησης της κυταροτροφολάστης (18).

Από τις κυτταρικές σειρές που σχηματίζουν οι αγκυροβολούσες λάχνες, με αποκόλληση από τις πλακουντιακές λάχνες προκύπτουν οι εξωλαχνικές τροφοβλάστες (extravillous trophoblasts, EVT) οι οποίες μεταναστεύουν στο φθαρτό. Μια υποομάδα από τις εξωλαχνικές τροφοβλάστες, οι ενδιάμεσες τροφοβλάστες (intermediate extravillous trophoblasts, iEVT) προερχόμενες από το τροφοβλαστικό κέλυφος, εισέρχονται πρώτα στο φθαρτό και επακολούθως στο στρώμα του μυομητρίου, αγκυροβολώντας έτσι το έμβρυο στη μητέρα (20). Έτσι, περικλείονται και καταστρέφονται τα λεία μυϊκά κύτταρα της σπειροειδούς αρτηρίας τα οποία αντικαθίστανται από άμορφο ινώδες υλικό. Στη συνέχεια, οι εξωλαχνικές τροφοβλάστες διαφοροποιούνται σε ενδοαγγειακές τροφοβλάστες (endovascular extravillous trophoblasts, enEVTs), οι οποίες εισχωρούν στις σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας και αντικαθιστούν τα μητρικά ενδοθηλιακά κύτταρα (21). Κατ' αυτό τον τρόπο, οι σπειροειδείς αρτηρίες της μήτρας αναδιαμορφώνονται σε χαμηλής αντίστασης, υψηλής χωρητικότητας μητροπλακουντιακές αρτηρίες οι οποίες παρέχουν αυξημένη ροή αίματος προς τον πλακούντα, γεγονός που είναι απαραίτητο για να καλυφθούν οι απαιτήσεις του αναπτυσσόμενου εμβρύου (21).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των τύπων της τροφοβλάστης.

Διάμεσα κύτταρα εξωλαχνικής τροφοβλάστης μετακινούνται στο έσω μυομήτριο, όπου συντήκονται και προκύπτουν τα πλακουντιακά γιγάντια κύτταρα (placental bed giant cells-GC) (22). Αυτά τα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα να μεταναστεύουν και να εισβάλλουν, οπότε ο σχηματισμός τους πιθανόν αναπαριστά έναν μηχανισμό ο οποίος αποτρέπει τη βαθύτερη διείσδυση στο τοίχωμα της μήτρας (22).

Συνοψίζοντας, η στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης εμπλέκεται στην πλακουντιακή μεταφορά θρεπτικών συστατικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου και έχει ενδοκρινικές και προστατευτικές (ανοσιακή ανοχή μητέρας) λειτουργίες. Τα κύτταρα της ενδιάμεσης τροφοβλάστης συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση των μητρικών αρτηριών και τα κύτταρα της διάμεσης τροφοβλάστης εμπλέκονται στη μετανάστευση στο φθαρτό και στο μυομήτριο. Για τη διατήρηση μιας φυσιολογικής εγκυμοσύνης απαιτείται αυστηρός συντονισμός και κατάλληλος έλεγχος της συγκυτιακής σύντηξης μέσα στη στιβάδα των χοριακών λαχνών.

1.3 Επισκόπηση μηχανισμών και παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων

Αν και η διαδικασία της διαφοροποίησης του τροφοβλαστικού ιστού είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη του πλακούντα, δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί οι μηχανισμοί που εμπλέκονται. Ομοίως, δεν είναι γνωστό εάν τα διάφορα σήματα που σχετίζονται με τη διαδικασία ρυθμίζονται προσωρινά ή μπορούν να ενεργοποιηθούν ως απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις και σε περιπτώσεις ανάγκης ανασύστασης του συγκυτίου.

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη και εξωλαχνική τροφοβλάστη ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η σχετική πίεση οξυγόνου στην εμβρυομητρική διεπαφή και από ποικίλες ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες, πρωτεϊνικές κινάσες, ενδοκυτταρικές πρωτεάσες και μεταγραφικούς παράγοντες. Επιπλέον, πρόσφατα έχει προταθεί ότι τα microRNAs (miRNAs) συμμετέχουν σε σημαντικό βαθμό στη πλακουντιακή ανάπτυξη (10).

Υποστηρίζεται ότι μόρια προσκόλλησης όπως οι καδερίνες εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστών. Ανάμεσα σε αυτές, η E-cadherin εντοπίζεται στη μεμβράνη απομονωμένων τροφοβλαστών και εξαφανίζεται μετά τη σύντηξη (23). Επίσης, πρόσφατα, μελέτες υποστήριξαν τον ρόλο των πρώην ιϊκών πρωτεϊνών φακέλου που προέρχονται από τον ενδογενή ρετροϊό (HERVs) στην τροφοβλαστική κυτταρική σύντηξη, εκ των οποίων η συγκυτίνη-1 (syncytin-1) (24) και η συγκυτίνη-2 (syncytin-2) (25) φαίνεται να είναι υψηλής σημαντικότητας. Επιπλέον, το mRNA και η πρωτεΐνη της συγκυτίνης-2 (syncytin-2) εντοπίζονται κυρίως στην περιοχή της συγκυτιοτροφοβλάστης (25).

Επίσης, έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση των κυττάρων BeWo (χοριοκαρκινική κυτταρική σειρά) μπορεί να επαχθεί ισχυρά από cAMP ανάλογα όπως η φορσκολίνη, η οποία είναι ένας ενεργοποιητής της αδενυλικής κυκλάσης (26). Συγκεκριμένα, στα αρχικά στάδια της κυτταρικής σύντηξης παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα cAMP, μέσω ενεργοποίησης της αδενυλικής κυκλάσης και την επακόλουθη ενεργοποίηση της αδενυλικής κινάσης (PKA). Στη συνέχεια, ενεργοποιούνται κάποιοι μεταγραφικοί παράγοντες, όπως ο παράγοντας glial cell missing-1 (GCM-1) και γονίδια στόχοι, όπως της συγκυτίνης, που επάγει τη σύντηξη (27). Ο GCM1 (glial cell missing factor 1), μαζί με την AP-2 (activating enhancer binding protein 2 alpha) και η οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων Sp, ρυθμίζουν τη συγκυτιακή σύντηξη, ενώ ο Hash-2

(human achaete scute homologue 2) αναστέλλει αυτή τη διαδικασία μειώνοντας τη μεταγραφή του γονιδίου (28).

Τα επίπεδα του O_2 αποτελούν ακόμη έναν τρόπο ρύθμισης της διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Το περιβάλλον που χαρακτηρίζει την εμφύτευση της βλαστοκύστης, την πλακουντοποίηση και την αρχική εμβρυϊκή ανάπτυξη μέχρι τη 10^η εβδομάδα της εγκυμοσύνης, χαρακτηρίζεται από σχετικά χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (29). Χαμηλά επίπεδα O_2 επάγουν τον πολλαπλασιασμό της κυτταροτροφοβλάστης και αναστέλλουν τη διαφοροποίηση σε εξωλαχνική τροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Η υποξία δρα τροποποιώντας την έκφραση γονιδίων ή τη σταθερότητα του mRNA (30). Για παράδειγμα, ρυθμίζει την έκφραση τόσο του HIF-1 (hypoxia inducible factor-1), ο οποίος διατηρεί τον πολλαπλασιασμό της κυτταροτροφοβλάστης, και του Hash-2, εμποδίζοντας έτσι τη διαφοροποίηση.

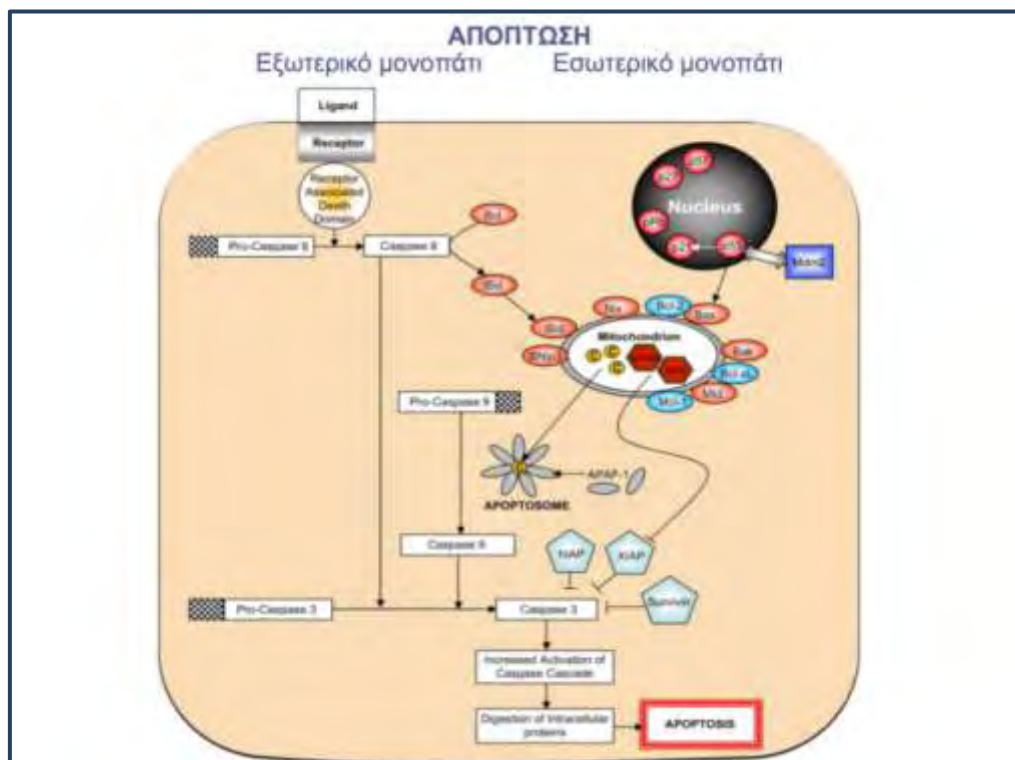
Μεταξύ των αυξητικών παραγόντων που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση, ο ενδοθηλιακός αγγειακός αυξητικός παράγοντας (vascular endothelial growth factor, VEGF), του οποίου η έκφραση έχει αναφερθεί στα κύτταρα του φθαρού και στα κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης και ενδιάμεσης τροφοβλάστης (31), ρυθμίζει τη διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη και σε ενδιάμεση τροφοβλάστη (32). Από την άλλη, ο TGF- β (transforming growth factor-beta), αναστέλλει τη διαφοροποίηση κατά μήκος του διεισδυτικού μονοπατιού (33), ενώ ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor- α , TNF- α) μειώνει τη διαδικασία της σύντηξης (34). Άλλοι παράγοντες που επάγουν τη διαφοροποίηση είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (epidermal growth factor, EGF), ο παράγοντας granulocyte-macrophage stimulating (GM-CSF), τα γλυκοκορτικοειδή, η 17 β -οιστραδιόλη, η χοριακή γοναδοτροφίνη ενώ αρκετοί παράγοντες όπως οι ενδοθηλίνες, και ο ανασταλτικός παράγοντας της λευχαιμίας (leukemia inhibitory factor, LIF) έχει βρεθεί ότι επηρεάζουν αρνητικά τη διαδικασία της σύντηξης (10).

Σημαντικό βήμα για τη διαδικασία της σύντηξης αποτελεί η εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης (PS). Η φωσφατιδυλοσερίνη (PS) είναι το πιο άφθονο φωσfolιπίδιο στην πλασματική μεμβράνη, μαζί με τη φωσφατιδυλαιθανολαμίνη (phosphatidylethanolamine, PE) και διατηρείται σε μία αυστηρά ρυθμιζόμενη ασύμμετρη κατανομή (35). Η εκροή της φωσφατιδυλοσερίνης (PS) που παρατηρείται στη σύντηξη πιθανότατα ρυθμίζεται από μόρια που σχετίζονται με τη μεταφορά των μεμβρανικών φωσfolιπιδίων, τις σκραμπλάσες και τις φλοπάσες. Μάλιστα, οι σκραμπλάσες φαίνεται να είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της εκροής PS κατά την απόπτωση. Ταχέως, μεταφέρουν λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης αμφίδρομα, και

χωρίς ιδιαίτερη εξειδίκευση, ούτως ώστε τα μόρια φωσφατιδυλοσερίνης (PS) να μετακινούνται από το έσω στο έξω φύλλο, και η φωσφατιδυλοχολίνη (PC) μετακινείται προς τα μέσα (36). Σε κύτταρα BeWo έχει βρεθεί ότι η εκροή PS συμβαίνει μέσω δύο μηχανισμών, είτε εξαρτώμενη από το ATP και την ΡΚΑ είτε από την απόπτωση και τις κασπάσες (36).

1.3.1 Η διαδικασία της απόπτωσης

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι μία θεμελιώδης διαδικασία τόσο για την ανάπτυξη όσο και για τη διατήρηση της δομής και της οργάνωσης όλων των πολυκύτταρων οργανισμών. Η διαδικασία της απόπτωσης είναι υπεύθυνη για την εξάλειψη ανεπιθύμητων κυττάρων κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της μεταμόρφωσης και της ανάπτυξης ιστών. Συγκεκριμένα η διαδικασία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση ενός μονοπατιού που οδηγεί στην αυτοκτονία του κυττάρου με μία χαρακτηριστική διαδικασία: το κύτταρο γίνεται πιο συμπυκνός, δημιουργούνται αποπτωτικά κυστίδια, η χρωματίνη συμπυκνώνεται και το DNA κατακερματίζεται (37). Αναλόγως του ερεθίσματος, ο αποπτωτικός μηχανισμός μπορεί να εκκινηθεί είτε από το ενδογενές ή από το εξωγενές μονοπάτι. Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη διαδικασία της απόπτωσης είναι ιδιαίτερα πολύπλοκοι και περιλαμβάνουν έναν καταρράκτη μοριακών γεγονότων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Καταρράκτης βασικών μοριακών γεγονότων της απόπτωσης.

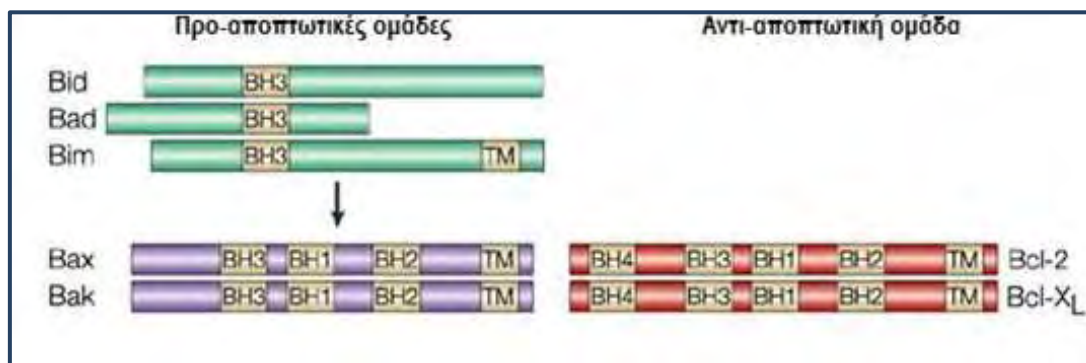
Το εξωγενές μονοπάτι επάγεται μέσω της σύνδεσης μορίων στους υποδοχείς θανάτου που είναι μέλη της υπερ-οικογένειας υποδοχέων του παράγοντα νέκρωσης όγκων (tumor necrosis factor, TNF) και έχουν μία χαρακτηριστική καρβοξυ-τελική περιοχή περίπου 80 αμινοξέων (38). Χαρακτηριστικοί υποδοχείς θανάτου είναι οι Fas (CD95/APO-1), TNF-R1 (CD120a), TRAIL-R1 (death receptor 4) και TRAIL-R2 (death receptor 5/TRICK2) (38). Για τη μετάδοση των αποπτωτικών σημάτων, πρωτεΐνες “προσαρμοστές” όπως οι TRADD (TNF- associated death domain) και FADD (Fas-associated death domain) και άλλες κυτταρικές πρωτεΐνες όπως η προ-κασπάση 8 και η προ-κασπάση 10, προσδένονται στο κυτταροπλασματικό τμήμα των υποδοχέων TNF στις περιοχές θανάτου (DED-death effector domains) και σχηματίζουν ένα σύμπλοκο (DISC-death inducing signaling complex) (39). Μόλις δημιουργηθεί το σύμπλοκο ενεργοποιούνται οι κασπάσες-8 και -10, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν άλλες κασπάσες (καταρράκτης κασπασών). Οι κασπάσες (caspases, πρωτεάσες κυστεΐνης ασπαρτικού οξέος), οι οποίες είναι μία οικογένεια πρωτεασών που έχουν καταλυτικά κατάλοιπα κυστεΐνης και αποκόπτουν τους στόχους μετά από ένα κατάλοιπο ασπαρτικού, αποτελούν τους κύριους τελεστές της απόπτωσης. Στην οικογένεια των κασπασών διακρίνονται δύο κύριες κατηγορίες: οι κασπάσες έναρξης (-2, -8, -9, -10) που εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της απόπτωσης και οι κασπάσες τελεστές (-3, -6, -7) που εμπλέκονται στα τελικά στάδια της απόπτωσης.

Στο εσωτερικό μονοπάτι, το αποπτωτικό σήμα εκκινείται από ή κατευθύνεται προς τα μιτοχόνδρια. Σε καταστάσεις κυτταρικού στρες όπως η καταστροφή του DNA μπορεί να ενεργοποιηθεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι από την p53 (tumor suppressor protein) που ενεργοποιεί μέλη της οικογένειας Bcl-2 που προάγουν την απόπτωση (40). Ωστόσο, τα εσωτερικά και εξωτερικά μονοπάτια δεν είναι απαραίτητα αυτόνομα, επειδή η p53 μπορεί να επάγει την έκφραση υποδοχέων θανάτου και το μιτοχονδριακό μονοπάτι μπορεί να δράσει ενισχύοντας σήματα του εξωτερικού μονοπατιού, προτείνοντας μια διασταυρούμενη επικοινωνία μεταξύ των δύο μονοπατιών (41). Επιπλέον, η κασπάση-8 εκτός από την ενεργοποίηση των κασπασών-τελεστών διασπά την Bid, ένα προ-αποπτωτικό μέλος της οικογένειας Bcl-2, προκαλώντας τη μετακίνησή της στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιώντας το εσωτερικό μονοπάτι. Άλλα προ-αποπτωτικά μέλη της οικογένειας Bcl-2 όπως οι Bax and Bak αυξάνουν τη διαπερατότητα της έξω μιτοχονδριακής μεμβράνης και απελευθερώνεται το κυτόχρωμα c, ένας παράγοντας που επάγει την απόπτωση και άλλοι προ-αποπτωτικοί παράγοντες. Έτσι, το κυτόχρωμα c προσδένει την πρωτεΐνη Araf-1 (apoptotic protease activating factor-1) και μαζί με ATP ή dATP, ακολούθως

στρατολογεί και ενεργοποιεί την “εναρκτήρια” κασπάση-9, σχηματίζοντας ένα σύμπλοκο, το επονομαζόμενο “αποπτώσωμα” (apoptosome). Η δραστική κασπάση-9 ενεργοποιεί τις κασπάσες -3, -6, -7 και αυτό είναι το σημείο στο ποίο το εσωτερικό και το εξωτερικό μονοπάτι συμπίπτουν (42).

Οικογένεια Bcl-2 και απόπτωση

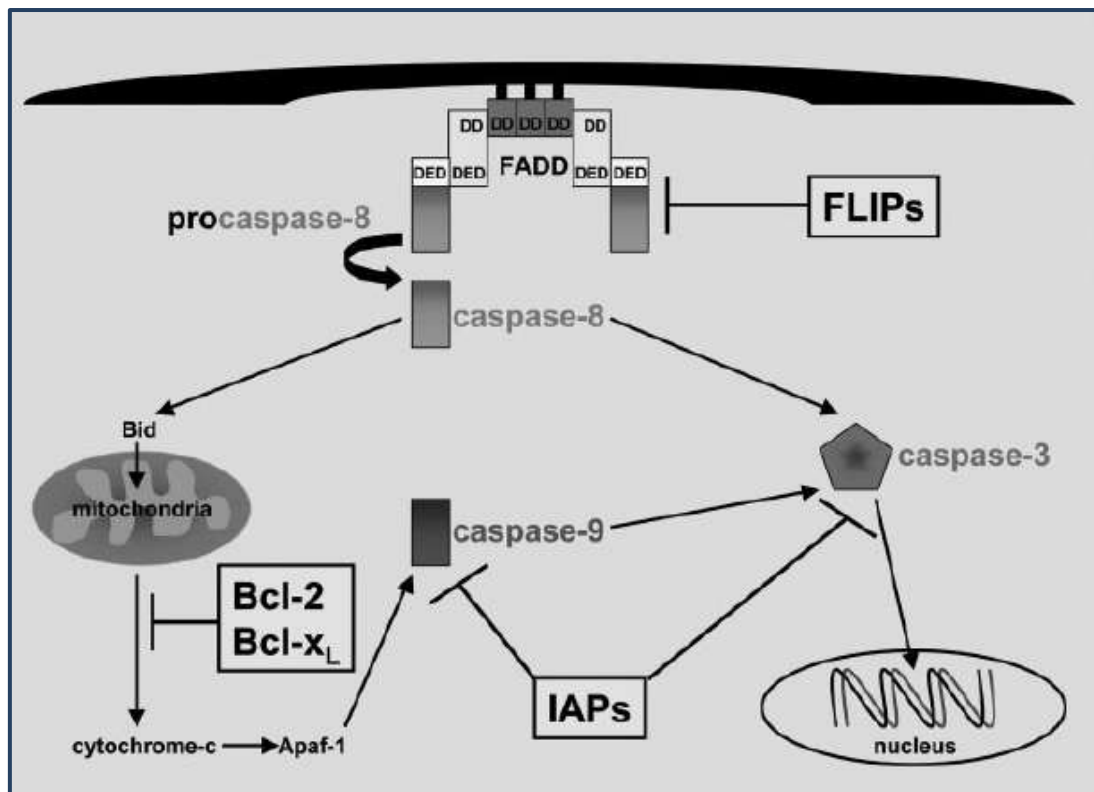
Η οικογένεια πρωτεϊνών Bcl-2, κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του ενδογενούς μονοπατιού της απόπτωσης και μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 15 μέλη της, στα κύτταρα των θηλαστικών. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει αποπτωτικά μέλη που προάγουν την απόπτωση (όπως Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, Hrk) και μέλη που αναστέλλουν την απόπτωση (όπως Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 και Mcl-1) (43). Μέσα στην οικογένεια μπορούν να διακριθούν τρεις λειτουργικές ομάδες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από ποικίλους βαθμούς ομολογίας συγκεκριμένων περιοχών (BH) και τα μέλη τους μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή και ετεροδιμερή. Μέλη της πρώτης ομάδας, όπως οι Bcl-2 και Bcl-xL που αναστέλλουν την απόπτωση, περιλαμβάνουν τέσσερις περιοχές ομολογίας (BH1–BH4), ενώ μέλη της δεύτερης ομάδας όπως οι Bax και Bak που προάγουν την απόπτωση, δεν έχουν μία N-τελική BH4 περιοχή (Εικόνα 7) (44).



Εικόνα 7: Τα μέλη της οικογένειας Bcl-2 (44).

Ενώ οι Bax και Bak αυξάνουν την διαπερατότητα της μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, οι Bcl-2 και Bcl-xL καταστέλλουν την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c και άλλους παράγοντες που προάγουν την απόπτωση από τα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα την αναστολή της περαιτέρω μετάδοσης του αποπτωτικού σήματος (45). Οι πρωτεΐνες που έχουν μόνο την περιοχή BH3 (BH3-only), Bid και Bik, είναι μέλη της τρίτης ομάδας που προάγουν την απόπτωση είτε μέσω ενεργοποίησης μελών της οικογένειας που

επάγουν την απόπτωση, όπως είναι οι Bax και Bak, ή προσδένοντας μέλη της οικογένειας που αναστέλλουν την απόπτωση, προκειμένου να κατασταλεί η λειτουργία τους. Έτσι, συνδυασμοί μεταξύ των μελών της οικογένειας μπορούν να παράγουν διμερή με διαφορετικές επιδράσεις στην απόπτωση και το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τη σχετική αφθονία των παραγόντων που επάγουν και αναστέλλουν την απόπτωση του κυττάρου. Μάλιστα έχει προταθεί ότι η επιδεκτικότητα ενός κυττάρου στην απόπτωση ίσως είναι ανάλογη του λόγου Bcl-2/Bax (37).



Εικόνα 8: Ενδοκυτταρική ρύθμιση του αποπτωτικού καταρράκτη. Αρκετοί αναστολείς αναστέλλουν τον μηχανισμό της απόπτωσης (42).

1.3.2 Απόπτωση και τροφοβλαστικά κύτταρα

Σε τροφοβλαστικά κύτταρα φυσιολογικών κυήσεων έχουν παρατηρηθεί μορφολογικά χαρακτηριστικά τα οποία συνδέονται με τη διαδικασία της απόπτωσης, προτείνοντας ότι η απόπτωση στη χοριακή τροφοβλάστη είναι μία φυσιολογική διαδικασία η οποία συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (46,47). Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η προσκόλληση της βλαστοκύστης στο επιθήλιο της μήτρας, η διείσδυση της εξωλαχνικής τροφοβλάστης, η ανοσιακή ανοχή της μητέρας,

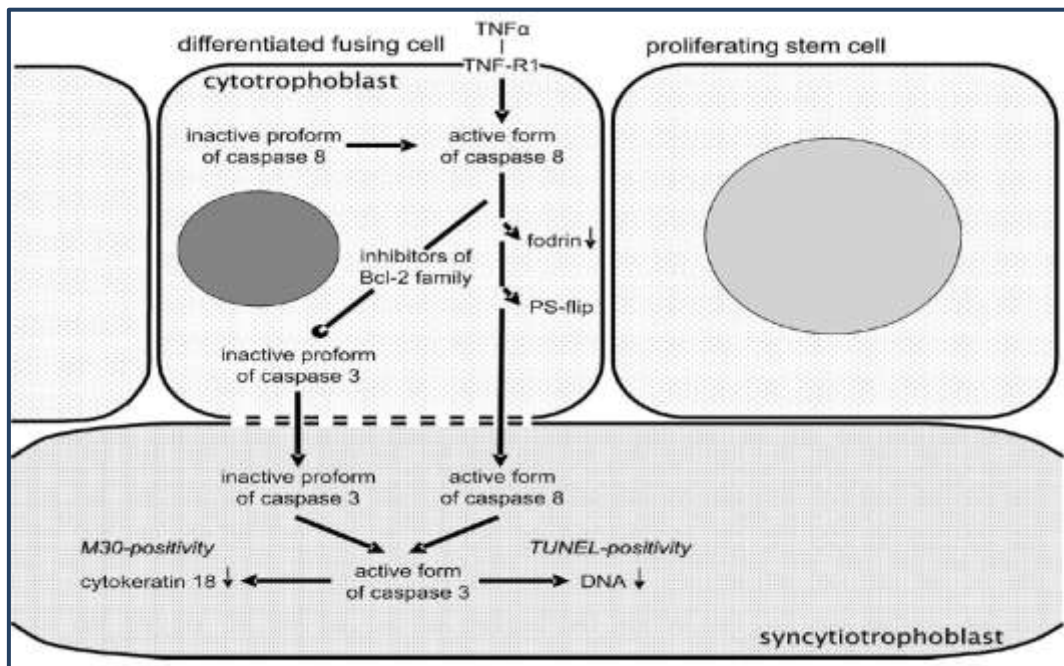
η διαφοροποίηση της τροφοβλάστης και η απελευθέρωση των συγκυτιακών κόμβων στη μητρική κυκλοφορία περιλαμβάνουν αποπτωτικές διαδικασίες.

Επιπλέον, η τελική διαφοροποίηση των επιθηλίων, των μυοβλαστών, των οστεοβλαστών, των ινών του φακού και των σπερματιδίων περιλαμβάνει αποπτωτικούς μηχανισμούς (48-52), προτείνοντας περεταίρω έναν συντηρημένο σύνδεσμο μεταξύ απόπτωσης και τελικής διαφοροποίησης. Για παράδειγμα, η κασπάση-14 δεν έχει βρεθεί να εμπλέκεται σε κλασικά αποπτωτικά μονοπάτια αλλά συμμετέχει στα αρχικά στάδια της διαφοροποίησης τροφοβλαστικών και άλλων κυττάρων (53). Επομένως, ίσως σε συγκεκριμένους ιστούς ειδικά σε εκείνους που σχετίζονται με κυτταρική σύντηξη ή σχηματισμό φραγμού, η τελική διαφοροποίηση και η απόπτωση μοιράζονται κοινά σηματοδοτικά μονοπάτια.

Υποστηρίζεται ότι οι διαδικασίες της απόπτωσης και της διαφοροποίησης στα κύτταρα τροφοβλάστης είναι αλληλοεξαρτώμενες. Αρκετά συστατικά του αποπτωτικού καταρράκτη εκφράζονται διαφορικώς στην κυτταροτροφοβλαστική και στη συγκυτιοτροφοβλαστική στιβάδα και πιθανότατα σχετίζονται με το στάδιο της απόπτωσης που παρατηρείται στα διαφορετικά διαμερίσματα των πλακουντιακών λαχνών. Ωστόσο, η αρχική ενεργοποίηση του αποπτωτικού καταρράκτη φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τη διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, παρά με τον κυτταρικό θάνατο της τροφοβλάστης. Δηλαδή, η απόπτωση δεν σχετίζεται μόνο με την απομάκρυνση των γηρασμένων συγκυτιοτροφοβλαστών, αλλά προάγει τη κυτταροτροφοβλαστική σύντηξη και το σχηματισμό της συγκυτιακής στιβάδας (54). Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι η συγκυτιακή σύντηξη συνδέεται με τα αρχικά στάδια της απόπτωσης στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, ενώ η απελευθέρωση των συγκυτιακών κόμβων από τη συγκυτιοτροφοβλάστη είναι το αποτέλεσμα των τελικών εκτελεστικών σταδίων του καταρράκτη της απόπτωσης στη στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης (54). Ωστόσο δεν είναι πλήρως κατανοητός ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιείται η έναρξη και ρύθμιση του καταρράκτη της απόπτωσης στα τροφοβλαστικά κύτταρα.

Οι κασπάσες-8 και -10 εμφανίζονται ενεργοποιημένες στις διαφοροποιημένες κυτταροτροφοβλάστες που προορίζονται για συγκυτιακή σύντηξη (55). Εν αντιθέσει, οι εκτελεστικές κασπάσες-3, -6 και -7 εκφράζονται στις ανενεργές πρόδρομες μορφές τους στην κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα (18). Η ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης-8 πραγματοποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων προσδέτη υποδοχέα (π.χ. TNF-α και TNF-R1) (55). Αξίζει να σημειωθεί πως η ενεργοποίηση της εναρκτήριας κασπάσης-8, υποστηρίζεται ότι είναι αναγκαία προϋπόθεση για τη σύντηξη των

τροφοβλαστικών κυττάρων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να οπτικοποιηθεί η διαδικασία σύντηξης (56). Η ενεργοποιημένη κασπάση-8, η οποία ενσωματώνεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη μέσω συγκυτιακής σύντηξης, μπορεί να ξεμένει από ανενεργές πρόδρομες μορφές μέσα στο συγκύτιο και έτσι η περαιτέρω αυτοκαταλυσή της να σταματάει. Συγκεκριμένα, σε τροφοβλαστικά κύτταρα πρώτου τριμήνου βρέθηκε ότι το επίπεδο της τροφοβλαστικής διαφοροποίησης επηρεάζει ξεκάθαρα τη δραστηριότητα των κασπασών (57). Στις λιγότερο διαφοροποιημένες (μονοπύρηνες) τροφοβλάστες, οι δραστηριότητες των κασπασών -3, -6, -8, -9 είναι σημαντικά πιο αυξημένες σε σχέση με τις δραστηριότητες πιο διαφοροποιημένων (πολυπύρηνων) κυττάρων (18). Ακολούθως, ειδικοί μηχανισμοί μέσα στη συγκυτιοτροφοβλάστη, ίσως καταστέλλουν τις ενεργοποιημένες κασπάσες αλλά και την ενεργοποίηση των κασπασών που ακολουθούν στον καταρράκτη.



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη της απόπτωσης στις τροφοβλαστικές λάχνες (18).

Γενικά, από τη στιγμή που θα ενεργοποιηθεί η εκτελεστική φάση της απόπτωσης σε ένα κύτταρο, θα οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο μέσα σε 24 ώρες. Ωστόσο, στη χοριακή τροφοβλάστη, οι πυρήνες κυτταροτροφοβλάστης που εισέρχονται στη συγκυτιοτροφοβλάστη παραμένουν “άθικτοι” για κάποιες εβδομάδες (18)!!! Στις κυτταροτροφοβλάστες που προετοιμάζονται για σύντηξη ενώ εκκινείται ο μηχανισμός της απόπτωσης, παράλληλα παράγονται αρκετοί αναστολείς της απόπτωσης (18). Έχουν περιγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις του αναστολέα της

απόπτωσης Bcl-2 στη τροφοβλάστη ενοχοποιώντας τον για την παύση του καταρράκτη της απόπτωσης (18).

Το ενεργό μόριο της κασπάσης 8 μπορεί επίσης να ανασταλεί άμεσα από αναστολείς όπως ο c-Flip (cellular FLICE inhibitory protein). Ο C-Flip υπάρχει στη μορφή δύο εναλλακτικών μορφών (κοντό και μακρύ) και άμεσα προσδένεται στη κασπάση-8 οδηγώντας σε ενεργοποίηση ή καταστολή αυτής της πρωτεΐνης (58). Στην κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα η κασπάση-8 εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τον c-Flip ο οποίος είναι παρόν σε συγκεκριμένες περιοχές και στη συγκυτιοτροφοβλάστη, ίσως σε περιοχές όπου θα συμβεί σύντομα η σύντηξη (59).

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, κατά τη διαδικασία της σύντηξης το κυτταροπλασματικό περιεχόμενο και οι πυρήνες των κυτταροτροφοβλαστών ενσωματώνονται στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Έτσι, η συγκυτιοτροφοβλάστη τροφοδοτείται με όλες τις πρωτεΐνες του μηχανισμού του καταρράκτη της απόπτωσης από την κυτταροτροφοβλάστη. Σε αυτές τις πρωτεΐνες συμπεριλαμβάνονται αντι-αποπτωτικοί παράγοντες και έτσι ο καταρράκτης της απόπτωσης δεν καταλήγει άμεσα στα τελικά στάδια στη συγκυτιοτροφοβλάστη (αποικοδόμηση DNA, σχηματισμός συγκυτιακών κόμβων). Η παύση του καταρράκτη της απόπτωσης άμεσα μετά τη σύντηξη μπορεί να οφείλεται στους ίδιους μηχανισμούς με την κυτταροτροφοβλάστη, δηλαδή στη δραστηριότητα αναστολέων σε μιτοχονδριακό επίπεδο. Ο καταρράκτης της απόπτωσης ενεργοποιείται ξανά μετά από αρκετές εβδομάδες με μηχανισμούς που δεν έχουν γίνει πλήρως κατανοητοί ακόμη (18). Οι πυρήνες που έχουν ενσωματωθεί πρόσφατα στο συγκύτιο είναι μεγάλοι, ωσειδείς, πλούσιοι σε ευχρωματίνη και κατά τη διέλευσή τους από το συγκύτιο γίνονται μικρότεροι και πυκνότεροι. Τελικά, οι εκτελεστικές κασπάσες-3 και -6 ενεργοποιούνται σε συγκεκριμένα σημεία στη συγκυτιοτροφοβλάστη, οδηγώντας στα τελικά στάδια της απόπτωσης (55). Και αυτά τα στάδια είναι πολύ καλά οργανωμένα χωρικά και χρονικά αφού για παράδειγμα παρά την είσοδο της κυτταροτροφοβλάστης σε ένα συγκύτιο, η ενεργοποίηση της κασπάσης-3 και η εξέλιξη της απόπτωσης περιορίζεται σε διακριτές περιοχές που τελικά εξελίσσονται σε συγκυτιακούς κόμβους. Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες οι αποικοδομητικές επιδράσεις (αποικοδόμηση DNA-TUNEL positivity, αποικοδόμηση νηματίων κυτοκερατίνης-epitope formation dM30 reactivity) περιορίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές (56).

1.3.3 Οικογένεια Bcl-2 και διαφοροποίηση τροφοβλάστης

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 ανήκουν σε αυτές τις υποψήφιες πρωτεΐνες οι οποίες μπορεί να εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαδικασίας του καταρράκτη της απόπτωσης στη τροφοβλάστη. Συγκεκριμένα, πρωτεΐνες που καταστέλλουν την απόπτωση, όπως ο Bcl-2 και ο Mcl-1 έχει περιγραφεί ότι εκφράζονται καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (60). Έτσι, αυτοί οι παράγοντες, όπως ήδη επισημάνθηκε, θα μπορούσαν να ευθύνονται για την παρατηρούμενη ελάττωση της δραστηριότητας των κασπασών .

Υπάρχουν λίγες μελέτες όσον αφορά την έκφραση του Bcl-2 σε ανθρώπινα τροφοβλαστικά κύτταρα και η συσχέτιση του με τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστών δεν είναι πλήρως κατανοητή. Έχει βρεθεί ότι το mRNA και η πρωτεΐνη του Bcl-2 εκφράζονται σε φυσιολογικά ανθρώπινα τροφοβλαστικά κύτταρα. Μάλιστα υποστηρίζεται ότι οι συγκυτιοτροφοβλάστες εκφράζουν τον Bcl-2 σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις χοριακές κυτταροτροφοβλάστες κατά την εγκυμοσύνη (54,61,62). Αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι η έκφραση του Bcl-2 και του Mcl-1 στα κύτταρα της συγκυτιοτροφοβλάστης σχετίζεται με την πρόληψη της απόπτωσης της κασπάσης-8 μετά τη συγκυτιακή σύντηξη. Ωστόσο, ο Bcl-2 αποτρέπει την ενεργοποίηση της κασπάσης-9 και της κασπάσης-3 αλλά δεν έχει άμεση επίδραση στην ενεργοποίηση της κασπάσης-8, η οποία συμβαίνει κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης. Επιπλέον, η κασπάση-8 μπορεί να ενεργοποιήσει άμεσα τις εκτελεστικές κασπάσες χωρίς να εμπλακεί το μιτοχονδριακό μονοπάτι (63), το οποίο εξηγεί και γιατί η απόπτωση παρατηρείται σε συγκυτιοτροφοβλάστες που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Bcl-2 και Mcl-1 (64). Επίσης, οι συγκυτιοτροφοβλάστες έχει βρεθεί ότι εκφράζουν τον Bax, προτείνοντας ότι μέλη της οικογένειας Bcl-2 ίσως προάγουν την απόπτωση στη συγκυτιοτροφοβλάστη (65). Μία πρόσφατη μελέτη στην οποία έγινε επαγωγή της διαφοροποίησης σε κύτταρα BeWo με φορσκολίνη έδειξε συσχέτιση της διαδικασίας σύντηξης με αυξημένα επίπεδα Bcl-2 και μειωμένα επίπεδα Bax προτείνοντας ότι η αύξηση του αναλογίας Bcl-2/Bax συμμετέχει στο μηχανισμό ανοχής της τροφοβλάστης στην απόπτωση (66).

Η πρωτεΐνη του Bcl-2 φαίνεται να αυξάνεται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης (60). Ο πολλαπλασιασμός των τροφοβλαστικών κυττάρων μειώνεται στο τέλος της κύησης και ο κυτταρικός θάνατος μέσω απόπτωσης βρίσκεται λιγότερο συχνά στο τέλος της κύησης. Αυτό προτείνει ότι μία υψηλότερη συγκέντρωση της πρωτεΐνης του Bcl-2 στο τέλος της εγκυμοσύνης μπορεί να επιμηκύνει τη ζωή των τροφοβλαστικών

κυττάρων, έτσι ώστε να διατηρείται η πλακουντιακή μάζα παρά το γεγονός ότι η πολλαπλασιαστική δραστηριότητα των τροφοβλαστικών κυττάρων έχει μειωθεί.

1.4 Λιποκίνες

Τις δυο τελευταίες δεκαετίες, ο λιπώδης ιστός έχει αναδειχθεί ως ένας πολύ σημαντικός ενδοκρινής αδένας, ο οποίος εμπλέκεται σε ποικίλες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένων της όρεξης και της ρύθμισης του μεταβολισμού (67). Είναι γνωστό ότι τόσο η περίσσεια λιπώδους μάζας στην παχυσαρκία όσο και η έλλειψη της στην ανορεξία οδηγούν σε δυσλειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος. Στις γυναίκες, η παχυσαρκία σχετίζεται με διαταραχές της εμμήνου ρύσεως και υπογονιμότητα, αποτυχία κυήσεως και επιπλοκές στην εγκυμοσύνη. Εν αντιθέσει, οι υπερβολικά αδύνατες γυναίκες παρουσιάζουν αμηνόρροια, αδυναμία εμφύτευσης του εμβρύου και πτωχή εμβρυϊκή ανάπτυξη (67). Ο λιπώδης ιστός εκκρίνει μία πληθώρα βιοενεργών μορίων που ονομάζονται λιποκίνες ή κυτοκίνες και παρουσιάζουν αυτοκρινικές, παρακρινικές και ενδοκρινικές δράσεις (68).

Ανάμεσα στις πιο σημαντικές λιποκίνες που διαδραματίζουν κύριους ρόλους στο αναπαραγωγικό σύστημα είναι η λεπτίνη, η ρεζιστίνη και η αντιπονεκτίνη (69). Συγκεκριμένα έχει βρεθεί ότι οι λιποκίνες επηρεάζουν το αναπαραγωγικό σύστημα μέσω κεντρικών επιδράσεων στον υποθάλαμο και/ή περιφερικές επιδράσεις στις ωοθήκες, στο ενδομήτριο ή άμεσες στο έμβρυο και στις αναπτυξιακές διαδικασίες του πλακούντα (70-75).

1.5 Αντιπονεκτίνη

Τα τελευταία χρόνια η αντιπονεκτίνη έχει προσελκύσει ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω των πολλαπλών βιολογικών της επιδράσεων. Ταυτοποιήθηκε πριν από δυο δεκαετίες, από τέσσερις ανεξάρτητες επιστημονικές ομάδες ταυτόχρονα, οι οποίες χρησιμοποίησαν διαφορετικές προσεγγίσεις. Έτσι, της έχει αποδοθεί μια σειρά ονομάτων, συμπεριλαμβανομένων των *apM1* (adipose most abundant gene transcript 1), *Acrp30* (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), *AdipoQ*, and *GBP28* (gelatin - binding protein of 28 kDa) (76-79). Τρεις από αυτές τις ομάδες ταυτοποίησαν το γονίδιο που κωδικοποιεί την αντιπονεκτίνη (γνωστό ως *AdipoQ*) αποκλειστικά στο λιπώδη ιστό (76,78,79) και μία την κυκλοφορούσα αντιπονεκτίνη (77).

Η αντιπονεκτίνη είναι το πιο άφθονο εκκρινόμενο μετάγραφο από το λευκό λιπώδη ιστό (76). Στον άνθρωπο, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης στο πλάσμα είναι

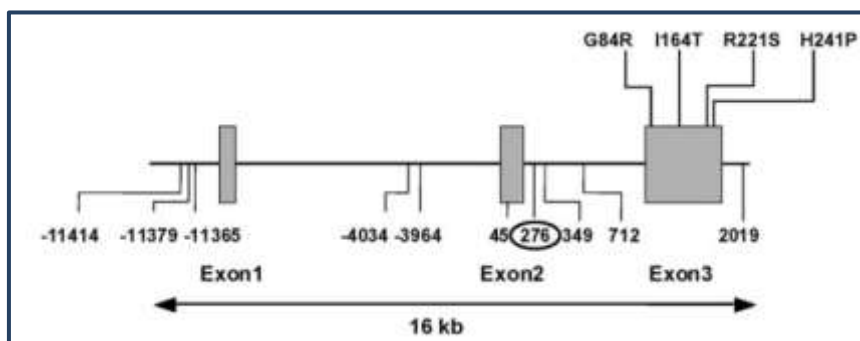
περίπου 1.000 φορές υψηλότερα σε σχέση με τις συγκεντρώσεις άλλων ορμονών, όπως η ινσουλίνη και η λεπτίνη (80). Συγκεκριμένα, η συγκέντρωση της στο πλάσμα κυμαίνεται μεταξύ 5-15 µg/ml και αποτελεί το 0,01% του συνόλου των πρωτεϊνών του πλάσματος (81). Εμφανίζει ημερήσια και παλμική έκφραση με τη μέγιστη τιμή της το πρωί και την ελάχιστη το βράδυ (82). Επιπλέον, οι συγκεντρώσεις της αντιπονεκτίνης στο πλάσμα παρουσιάζουν ξεκάθαρες διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο φύλων, με τα θηλυκά άτομα να εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα αρσενικά (83) (84). Διάφορες μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η τεστοστερόνη είναι υπεύθυνη για αυτή τη σημαντική μείωση της έκφρασης και της έκκρισης της αντιπονεκτίνης από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού των αρσενικών ατόμων (83,84). Στη γυναίκα, κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου τα επίπεδα στο αίμα παραμένουν αμετάβλητα (85).

Σε αντίθεση με τη λεπτίνη, τα επίπεδα της αντιπονεκτίνης συνδέονται αντίστροφα με τη συσσώρευση του σπλαχνικού λίπους (86,87). Επιπλέον, η μείωση του βάρους σε παχύσαρκους ανθρώπους συνοδεύεται από αύξηση της συγκέντρωσης της αντιπονεκτίνης στο πλάσμα, προτείνοντας ότι ο λιπώδης ιστός μπορεί να παρουσιάσει αρνητικό μηχανισμό ρύθμισης της παραγωγής ή/και της έκκρισης της αντιπονεκτίνης (88).

Η αντιπονεκτίνη ασκεί μια πληθώρα ιστο-ειδικών επιδράσεων (89), και είναι γνωστή για το σημαντικό της ρόλο στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης. Χαρακτηρίζεται ως ινσουλινοευαίσθητη ορμόνη (90-92) με φλεγμονώδεις, αγγειογενετικές, αντι-αθηροσκληρωτικές και αντι-πολλαπλασιαστικές ιδιότητες σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους (91). Πρόσφατα έχει συσχετιστεί με τη ρύθμιση πολλών σημαντικών λειτουργιών του αναπαραγωγικού συστήματος (69).

1.5.1 Μοριακή δομή και πολυμερισμός της αντιπονεκτίνης

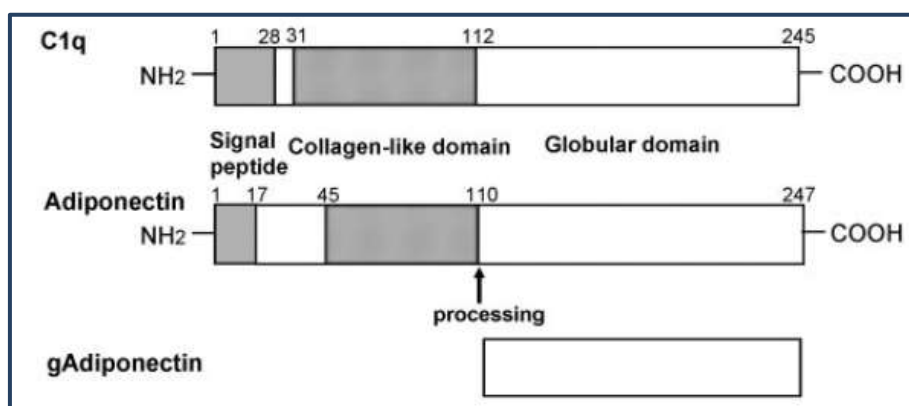
Το γονίδιο της αντιπονεκτίνης, το επονομαζόμενο AdipoQ, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q27.3 (accession: NM 004797.2), μία περιοχή που σχετίζεται με το διαβήτη τύπου II και την παχυσαρκία (78,79). Αποτελείται από τρία εξώνια και δύο ιντρόνια, εκτεινόμενο σε μία περιοχή 16-kb και κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη 244 αμινοξέων, την αντιπονεκτίνη πλήρους μήκους (full-length adiponectin, fADN). Στην *Εικόνα 10* φαίνεται η σχηματική παρουσίαση του γονιδίου καθώς και κάποιες πολυμορφικές θέσεις (93).



Εικόνα 10: Απεικόνιση της γενωμικής δομής και κάποιων πολυμορφικών θέσεων του γονιδίου της αντιπνεκτίνης (93).

Η αντιπνεκτίνη δομικώς παρουσιάζει ομολογία με το κολλαγόνο VIII και X και με τον παράγοντα συμπληρώματος 1q (complement 1q) (94-96). Μέσω ανάλυσης του σφαιρικού τμήματος της αντιπνεκτίνης έχει αποκαλυφθεί σημαντική δομική ομολογία με τον TNF (παράγοντας νέκρωσης όγκων-tumor necrosis factor), προτείνοντας έναν εξελικτικό σύνδεσμο μεταξύ των μελών της οικογένειας του TNF και της αντιπνεκτίνης (97).

Ανάλυση της πρωταρχικής αμινοξικής αλληλουχίας της αποκαλύπτει τέσσερις διακριτές περιοχές: ένα αμινοτελικό πεπτίδιο, μία μεταβλητή περιοχή, μία περιοχή κολλαγόνου και μία σφαιρική καρβοξυτελική περιοχή (98). Η σφαιρική μορφή της αντιπνεκτίνης (global adiponectin, gADN) προκύπτει από πρωτεολυτική αποκοπή της τελικής καρβοξυτελικής περιοχής. Υποστηρίζεται ότι αυτή η αποκοπή πραγματοποιείται από τη λευκοκυτταρική ελαστάση, που εκκρίνεται από ενεργοποιημένα μονοκύτταρα και/ή ουδετερόφιλα (99,100).

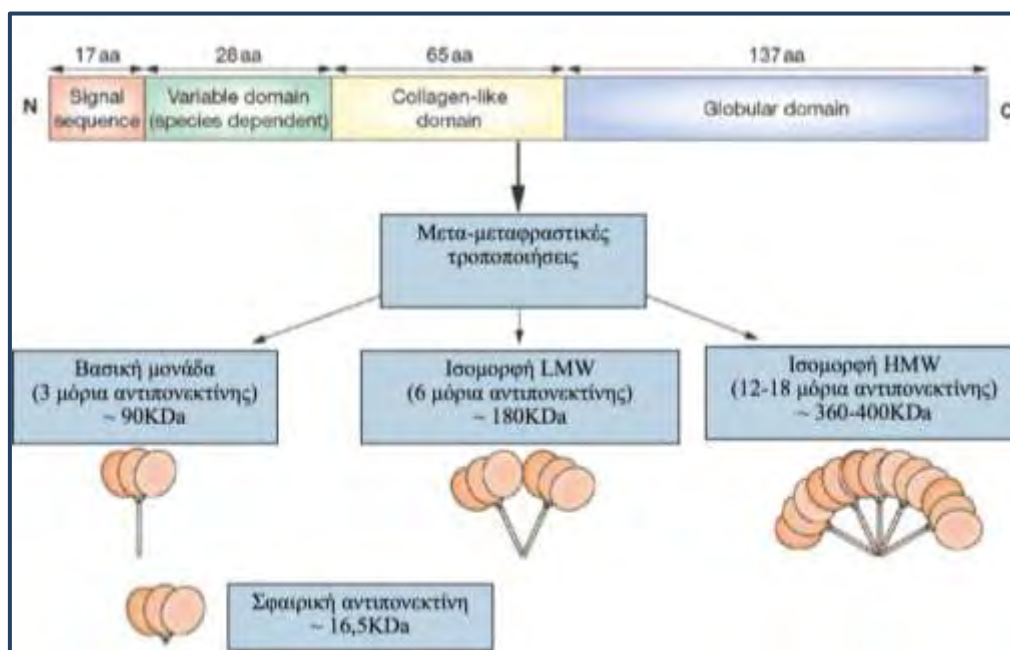


Εικόνα 11: Δομή της αντιπνεκτίνης (93).

Αφ' ότου συντεθεί, υπόκειται σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, υδροξυλίωσης, γλυκοσυλίωσης και δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών,

αποδίδοντας διαφορετικές ισομορφές (101). Οι υπομονάδες της αντιπυνεκτίνης συναρμολογούνται σε τριμερή, τα οποία ονομάζονται χαμηλού μοριακού βάρους σύμπλοκα (LMW), εξαμερή ή ενδιάμεσου μοριακού βάρους (MMW) και μεγάλου μοριακού βάρους (HMW) (Εικόνα 12) (102). Η σφαιρική δομή (globular form, gADN) της αντιπυνεκτίνης σχηματίζει τριμερή. Προβλήματα στις τροποποιήσεις οδηγούν σε σημαντική μείωση των ενδοκυτταρικών επιπέδων της αντιπυνεκτίνης και την επακόλουθη έκκριση της από τον λιπώδη ιστό (103). Γενικά, ο σχηματισμός ολιγομερών της αντιπυνεκτίνης στηρίζεται στο σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών στη θέση Cys-39 (104). Προκαλεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι μία μετάλλαξη στην αντιπυνεκτίνη με αντικατάσταση της Cys από Ser στο κωδικόνιο 39, το οποίο σχημάτιζε ένα τριμερές και στη συνέχεια υποβαλλόταν σε πρωτεολυτική αποκοπή, έδειξε περισσότερη βιοενεργότητα σε σχέση με την αντιπυνεκτίνη άγριου τύπου με μορφή HMW (102).

Η επικρατούσα μορφή στην ανθρώπινη κυκλοφορία είναι η HMW (100) και αποτελεί την ενεργή μορφή της αντιπυνεκτίνης (105). Ο Lodish και οι συνεργάτες του αναφέρουν ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό της σφαιρικής αντιπυνεκτίνης εντοπίζεται στο ανθρώπινο πλάσμα (106). Ωστόσο, δεν έχει διερευνηθεί ακόμη το κατά πόσο είναι παθοφυσιολογικά σημαντικό το κόψιμο της αντιπυνεκτίνης από τη λευκοκυτταρική ελασάση *in vivo*.



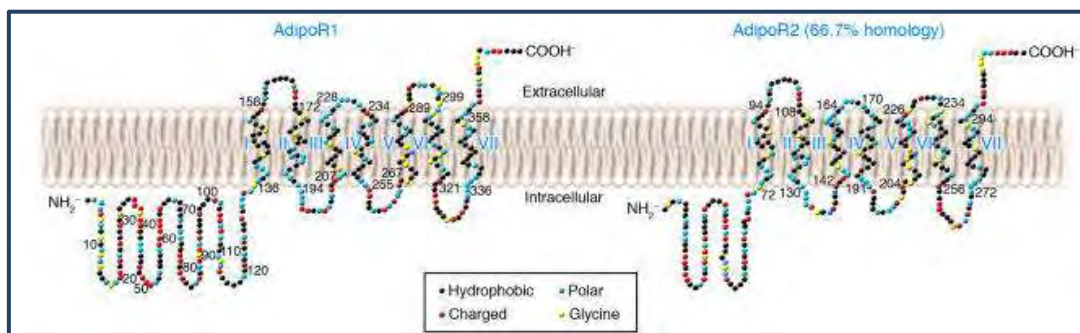
Εικόνα 12: Δομή και ισομορφές αντιπυνεκτίνης (107).

1.5.2 Σηματοδοτικό μονοπάτι της αντιπυονεκτίνης

Οι βιολογικές δράσεις της αντιπυονεκτίνης πραγματοποιούνται μέσω αλληλεπιδράσεων της με ειδικούς μεμβρανικούς υποδοχείς. Μέχρι στιγμής έχουν ταυτοποιηθεί δύο υποδοχείς μέσω των οποίων δρα η αντιπυονεκτίνη, ο υποδοχέας της αντιπυονεκτίνης 1 (AdipoR1) και ο υποδοχέας της αντιπυονεκτίνης 2 (AdipoR2) (90). Και οι δύο υποδοχείς, αποτελούνται από επτά διαμεμβρανικές περιοχές, με το αμινοτελικό τους άκρο να βρίσκεται στο εσωτερικό και το καρβοξυτελικό τους άκρο στο εξωτερικό της επιφάνειας της μεμβράνης (90). Έτσι, αν και εκ πρώτης όψης σχετίζονται με την οικογένεια των υποδοχέων των G πρωτεϊνών (GPCR), στο εξελικτικό δέντρο η ομολογία στην ακολουθία των AdipoR1 και AdipoR2 με μέλη της οικογένειας GPCR είναι χαμηλή, καθώς παρουσιάζουν διαφορετική τοπολογία, δομή και ιδιότητες με όλα τα μέλη της οικογένειας GPCR που έχουν αναφερθεί (90). Θεωρούνται σε μεγαλύτερο βαθμό, μέλη μίας οικογένειας πρωτεϊνών που ονομάζεται PAQR, η οποία εκτός από τους υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης περιλαμβάνει τους διαμεμβρανικούς υποδοχείς μέσω των οποίων έχει προταθεί ότι διαμεσολαβούνται οι μη-γενωμικές δράσεις των προγεσταγόνων (108). Πρόσφατα περιγράφηκε ένας επιπρόσθετος υποδοχέας για την αντιπυονεκτίνη, η T-καδερίνη (T-cadherin), για τον οποίο μέχρι στιγμής δεν έχει ταυτοποιηθεί κάποιο σηματοδοτικό μονοπάτι. Πρόκειται για μια αγκυροβολημένη εξωκυττάρια πρωτεΐνη γλυκοφωσφατιδυλοϊνοσιτόλης η οποία δεν έχει ενδοκυτταρική περιοχή και απουσιάζει από το ήπαρ (κύριος ιστός δράσης της αντιπυονεκτίνης) (109).

Στον άνθρωπο ο AdipoR1 εντοπίζεται στη θέση 1p36.13-q41, ενώ ο AdipoR2 εντοπίζεται στη θέση 12p13.31. Οι πρωτεΐνες των AdipoR1 και AdipoR2 έχουν μήκος 375 και 386 αμινοξικών καταλοίπων, αντίστοιχα και είναι σε θέση να σχηματίζουν τόσο όμο- όσο και έτερο- πολυμερή (90). Οι ανθρώπινοι υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 έχουν 96.8% και 95.2% ομοιότητα με τους υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 ποντικού, αντίστοιχα. Οι πρωτεΐνες των AdipoR1 και AdipoR2 είναι συντηρημένες από τη ζύμη στον άνθρωπο, ειδικά στις περιοχές που εκτείνονται στη μεμβράνη. Συγκεκριμένα, υπάρχουν γονιδιακά προϊόντα στους *Saccharomyces cerevisiae* (accession number Z74744), στον *Caenorhabditis elegans* (accession number NM068597) και στη *Drosophila* (accession number BT001487) που έδειξαν σημαντική ομολογία με τον AdipoR1 (η ανθρώπινη πρωτεΐνη και αυτές οι πρωτεΐνες έχουν 29%, 56% and 60% ομολογία, αντίστοιχα) (90). Αξίζει να σημειωθεί ότι η ομόλογη περιοχή με τη ζύμη, κατέχει πρωταρχικό ρόλο σε μεταβολικά μονοπάτια που ρυθμίζουν το μεταβολισμό των λιπιδίων όπως την οξειδωση των λιπαρών

οξέων. Οι AdipoR1 και AdipoR2 δομικώς είναι υψηλά σχετιζόμενοι - οι AdipoR1 και AdipoR2 ποντικού έχουν 66.7% ομολογία (90).



Εικόνα 13: Υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης (110).

Υπάρχουν διαφορές στη προτίμηση των διαφόρων ισομορφών της αντιπυονεκτίνης στους υποδοχείς όπως και διαφορές στην κατανομή των δύο υποδοχέων στους ιστούς. Πράγματι, ο AdipoR1 εκφράζεται ευρέως και παρουσιάζει υψηλή συγγένεια για τη σφαιρική αντιπυονεκτίνη (gADN), ενώ ο AdipoR2 εκφράζεται κατά κύριο λόγο στο ήπαρ και έχει υψηλότερη συγγένεια για την αντιπυονεκτίνη πλήρους μήκους (fADN) (90). Έτσι, η gADN προσδένεται πιο ισχυρά σε σχέση με τη fADN σε μυοκύτταρα και μεμβράνες σκελετικών μυών, αλλά αυτό το πρότυπο είναι αντεστραμμένο σε ηπατοκύτταρα και ηπατικές μεμβράνες (111). Όσον αφορά την Τ-καδερίνη προσδένει εξαμερείς και ΗΜW μορφές της αντιπυονεκτίνης αλλά όχι τριμερείς ή σφαιρικές μορφές (112). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται περιοχές του σώματος στις οποίες εκφράζονται οι δύο υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης (90,108).

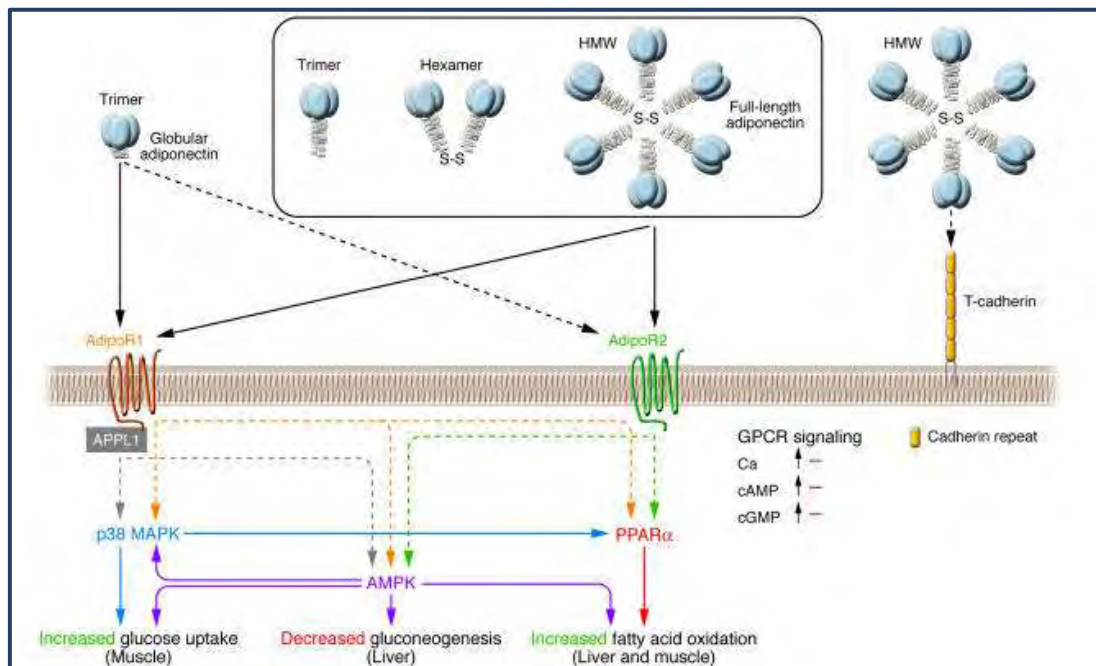
AdipoR1	AdipoR2
<p>Ευρεία έκφραση</p> <p>Υψηλή έκφραση σε: σκελετικούς μύες</p> <p>Ενδιάμεση έκφραση σε: πλακούντα, εγκέφαλο, καρδιά, σπλήνα, νεφρό, ήπαρ, πνεύμονα, λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος</p> <p>Ασθενή έκφραση: θήμο αδένα, παχύ έντερο, λεπτό έντερο</p>	<p>Υψηλή έκφραση σε: σκελετικούς μύες, ήπαρ, πλακούντα</p> <p>Ασθενή έκφραση σε: εγκέφαλο, καρδιά, παχύ έντερο, σπλήνα, νεφρό, θύμο αδένα, λεπτό έντερο, λευκοκύτταρα περιφερικού αίματος, πνεύμονα.</p>

Πίνακας 1:Κατανομή των υποδοχέων αντιπυονεκτίνης στους ιστούς.

Η σηματοδότηση μέσω των AdipoR περιλαμβάνει την APPL1, μια πρωτεΐνη “ρυθμιστής/προσαρμογέας” (Adaptor Protein Containing Pleckstrin Homology Domain, Phosphotyrosine Binding Domain and Leucine Zipper Motif 1) η οποία μεσολαβεί στις

διαδικασίες έναρξης του σηματοδοτικού μονοπατιού της αντιπνεκτίνης (113). Νέα στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει και μία δεύτερη πρωτεΐνη “ρυθμιστής/προσαρμογέας”, η APPL2, η οποία σχηματίζει ετεροδιμερή με την APPL1 μπλοκάροντας τη δράση της και συνεπώς το σηματοδοτικό μονοπάτι της αντιπνεκτίνης (114).

Το πιο κοινό σηματοδοτικό μονοπάτι μέσω του οποίου δρα η αντιπνεκτίνη στους ιστούς στόχους συμπεριλαμβάνει την AMP πρωτεϊνική κινάση (AMPK), η οποία λειτουργεί ως κλειδί ρυθμιστής στην ενεργειακή ισορροπία (115). Συγκεκριμένα, η AMPK ενεργοποιείται όταν ο κυτταρικός λόγος ATP/AMP είναι μειωμένος. Τότε αυτή η κινάση: (i) ενεργοποιεί καταβολικά μονοπάτια όπως η γλυκόλυση και η οξειδωση των λιπαρών οξέων και (ii) καταστέλλει αναβολικά μονοπάτια, όπως η λιπογένεση και η σύνθεση χοληστερόλης (116). Η πρόσδεση της αντιπνεκτίνης στους υποδοχείς της, AdipoR, επίσης ενεργοποιεί στόχους όπως την πρωτεϊνική κινάση A (PKA), την κινάση της 3-φωσφοϊνοσιτόλης (PI3K), την p38/p42/p44 MAPK, τον PPAR-α (peroxisome proliferator activated receptor-α) και το μονοπάτι των JUN κινασών (93).



Εικόνα 14: Μοριακοί μηχανισμοί δράσης της αντιπνεκτίνης (110).

Η μικρότερη gADN έχει ισχυρή βιολογική δραστικότητα, η οποία σε μερικούς ιστούς έχει ίδιο ρόλο με αυτό της fADN (117,118). Σε άλλους ιστούς όμως, η gADN και η fADN μπορεί να έχουν διαφορετικές και μερικές φορές αντίθετες βιολογικές επιδράσεις όπως στην περίπτωση του πλακούντα (119,120). Η φυσιολογική σημασία

της gADN δεν είναι ακόμη ξεκάθαρη δεδομένου ότι σχεδόν όλη η κυκλοφορούσα αντιπυονεκτίνη υπάρχει ως fADN (106) ενώ η gADN είναι παρούσα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στο πλάσμα (106,121). Ωστόσο, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, η gADN μπορεί να απελευθερώνεται από τοπικά ενεργές πρωτεΐνες και έτσι να παρουσιάζει τοπικές παρακρινικές επιδράσεις (99).

1.6 Αντιπυονεκτίνη και αναπαραγωγικό σύστημα

Η ταυτοποίηση των AdipoR1 και AdipoR2 σε διαφορετικούς ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος (122) και ο παρατηρούμενος φυλετικός διμορφισμός στα επίπεδα της κυκλοφορούσας αντιπυονεκτίνης (104,123) ήταν οι πρώτες ενδείξεις που συνέδεσαν την αντιπυονεκτίνη με τις αναπαραγωγικές λειτουργίες. Επίσης, πρόσφατα ευρήματα δείχνουν ότι η αντιπυονεκτίνη παράγεται από διαφορετικούς ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος προτείνουν πως ίσως αυτή η αντιπυονεκτίνη έχει ρόλο κλειδί στην αναπαραγωγή. Απ' ότι φαίνεται παίζει ρόλο στις αναπαραγωγικές διαδικασίες, επιδρώντας σε υποθάλαμο, ωθήκη, ενδομήτριο και πλακούντα και ρυθμίζοντας όχι μόνο την αναπαραγωγική ικανότητα της γυναίκας, αλλά και την πορεία της εγκυμοσύνης από την εμφύτευση μέχρι και τον τοκετό (67).

Η αντιπυονεκτίνη αυξάνει με την ηλικία της κύησης, φθάνοντας σε επίπεδα είκοσι φορές υψηλότερα στο τέλος της κύησης σε σχέση με την 24η εβδομάδα (67). Μια πρόσφατη μελέτη υποστηρίζει ότι η συγκέντρωση της αντιπυονεκτίνης στο αίμα της μητέρας ίσως παίζει ρόλο στην ανάπτυξη του πλακούντα, καθώς το πάχος του τελευταίου έχει σχετιστεί θετικά με τα επίπεδα της ορμόνης (124). Επίσης, παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα της συγκέντρωσης της αντιπυονεκτίνης σε μερικές παθολογικές καταστάσεις του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος όπως ο σακχαρώδης διαβήτης κύησης (Gestational Diabetes Mellitus), το σύνδρομο πολυκυστικών ωθηκών (PCOS), η ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR), η προεκλαμψία και η ενδομητρίωση (67).

Στην περίπτωση της προεκλαμψίας, τα δεδομένα που τη συσχετίζουν με τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης είναι αμφιλεγόμενα. Ωστόσο, υπάρχουν μελέτες που έχουν αποκαλύψει μειωμένες συγκεντρώσεις σε γυναίκες με προεκλαμψία (125). Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι η υποαντιπυονεκτιναιμία και η προεκλαμψία συνδέονται μόνο όταν συνυπάρχει παχυσαρκία και διαβήτης κύησης (126). Όμως υπάρχουν και μελέτες που υποστηρίζουν ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών γυναικών και γυναικών με προεκλαμψία ή ότι παρατηρείται σημαντική αύξηση των επιπέδων της αντιπυονεκτίνης και όχι μείωση (67). Οι λόγοι για αυτά τα

διαφορετικά συμπεράσματα δεν έχουν αποσαφηνιστεί. Ίσως να οφείλονται σε διαφορές στον ορισμό της προεκλαμψίας, το μέσο βάρος σώματος (BMI), το κάπνισμα ή να υπάρχει κάποια γενετική βάση. Πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες προκειμένου να καθοριστεί εάν όντως υπάρχει μεταβολή της συγκέντρωσης της αντιπνεκτίνης στο πρώτο τρίμηνο και εάν σχετίζεται με την προεκλαμψία.

Δεδομένου της σημαντικότητας της γλυκόζης και της ινσουλίνης στην εμβρυϊκή ανάπτυξη και τον κυρίαρχο ρόλο της αντιπνεκτίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης, είναι λογική η υπόθεση ότι η αντιπνεκτίνη έχει ρυθμιστικό ρόλο στην ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR) (127). Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα έμβρυα με ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης πραγματοποιούν μεταβολικές προσαρμογές οι οποίες θα τους ωφελήσουν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, έμβρυα με ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης, αλλάζουν το “πρότυπο” της αντιπνεκτίνης προς την ισομορφή HMW, η οποία ειδικά σχετίζεται με την ευαισθησία στην ινσουλίνη, και έτσι ευαισθητοποιεί το σώμα στην ινσουλίνη και το προετοιμάζει για τη νεογνική ανάπτυξη (67).

Τόσο ο AdipoR1 όσο και ο AdipoR2 εκφράζονται στο ανθρώπινο ενδομήτριο και στον πλακούντα (73,128,129). Ο υποδοχέας T-cadherin δεν εκφράζεται στην ανθρώπινη τροφοβλάστη (129). Η αντιπνεκτίνη παράγεται μόνο από τα ενδομητριάκια κύτταρα στην εμβρυομητρική διεπαφή και είχε προταθεί ότι και ο ανθρώπινος πλακούντας εκκρίνει άφθονα την αντιπνεκτίνη (130). Ωστόσο, πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιώντας ευαίσθητες τεχνικές προτείνουν ότι είναι απίθανο η αντιπνεκτίνη να παράγεται στον πλακούντα και υποθέτουν ότι πιθανή <μόλυνση> με αντιπνεκτίνη από τη μητρική κυκλοφορία ή από τον εμβρυϊκό βίο ορό που χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες, ίσως θα μπορούσε να εξηγεί τα προηγούμενα θετικά αποτελέσματα (131,132).

Το βάρος γέννησης του νεογνού σχετίζεται με το δείκτη μάζας σώματος (BMI-Body Mass Index) της μητέρας πριν την έναρξη της εγκυμοσύνης. Βρέθηκε ότι οι απόγονοι των γυναικών με φυσιολογικό BMI έχουν λιγότερο σωματικό λίπος και λιπώδη μάζα και καλύτερη ελεύθερη λίπους μάζα σε σχέση με απόγονους γυναικών οι οποίες ήταν υπέρβαρες/παχύσαρκες (133). Ο πλακούντας δεν είναι ένας απλός αγωγός των θρεπτικών συστατικών καθώς όλο και περισσότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο πλακούντας δρα ως ένας «αισθητήρας θρεπτικών συστατικών» συνδυάζοντας σήματα από μητέρα και έμβρυο έτσι ώστε να ισορροπήσει τις απαιτήσεις του εμβρύου με την παροχή μητρικών υποστρωμάτων ρυθμίζοντας την πλακουντιακή ανάπτυξη και ρύθμιση (134). Αρκετές μελέτες υποστηρίζουν τα

επίπεδα του ορού της μητρικής αντιπυονεκτίνης συσχετίζονται αρνητικά με το βάρος γέννησης τόσο σε υγιείς γυναίκες με ποικίλα BMI στα πρώιμα στάδια της κύησης (135,136), όσο και σε γυναίκες με σακχαρώδη διαβήτη κύησης (GDM). Βάση αυτών των κλινικών παρατηρήσεων, είναι αρκετά πιθανό η μητρική αντιπυονεκτίνη να έχει αιτιολογικό ρόλο στην ενδομήτρια ανάπτυξη του εμβρύου ρυθμίζοντας την πλακουντιακή μεταφορά θρεπτικών συστατικών (137).

1.6.1 Σηματοδότηση της αντιπυονεκτίνης στον πλακούντα

Σε αντίθεση με το σκελετικό μυ και το ήπαρ, η σηματοδότηση της αντιπυονεκτίνης στον πλακούντα είναι σχετικά άγνωστη. Έχει βρεθεί ότι οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στη τροφοβλάστη του πλακούντα σε επίπεδο mRNA (128) αλλά μόνο η πρωτεΐνη AdipoR2 έχει αναφερθεί σε πλασματικές μεμβράνες ποντικού (138) και ανθρώπου (139).

Πρόσφατα μελετήθηκαν οι διαφορετικές επιδράσεις των gADN και fADN σε καλλιέργεια πρωτογενών τροφοβλαστικών κυττάρων ανθρώπου (PHTs) (120). Η αντιπυονεκτίνη εμπλέκεται στη ρύθμιση της παραγωγής της λεπτίνης και της χοριακής γοναδοτροφίνης οι οποίες θεωρούνται οι βασικότερες ορμόνες του πλακούντα (140). Επίσης, οι McDonald και Wolfe υποστηρίζουν ότι η gADN ελαττώνει την έκφραση mRNA και/ή την παραγωγή πλακουντιακού γαλακτογόνου, χοριακής γοναδοτροπίνης και προγεστερόνης σε τροφοβλαστικά κύτταρα (131).

Ενώ ο ρόλος της αντιπυονεκτίνης στη ρύθμιση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη στο σκελετικό μυ και στο ήπαρ είναι καλά μελετημένη, οι παράγοντες που ρυθμίζουν την ευαισθησία της ινσουλίνης στον πλακούντα είναι άγνωστοι μέχρι στιγμής. Πρόσφατα ευρήματα προτείνουν μοναδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αντιπυονεκτίνης και σηματοδότησης της ινσουλίνης στον πλακούντα (141). Απουσία φυσιολογικών συγκεντρώσεων της ινσουλίνης, η gADN ρυθμίζει το τροφοβλαστικό Σύστημα A (System A) που μεσολαβεί στη μεταφορά αμινοξέων, ενώ η fADN δεν έχει κάποια επίδραση (120). Οι μηχανισμοί που υπογραμμίζουν την επίδραση της fADN στην ινσουλινοεξαρτώμενη μεταφορά αμινοξέων ίσως περιλαμβάνουν τη σηματοδότηση μέσω του mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin 1). Η σηματοδότηση μέσω του mTORC1 ίσως παρέχει ένα σύνδεσμο μεταξύ της σηματοδότησης της fADN και της μεταφοράς θρεπτικών συστατικών. Ωστόσο, υπάρχουν αποδείξεις ότι ο PPARα επηρεάζει επίσης τον μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων. Ως εκ τούτου, η από την fADN διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση του PPARα στον πλακούντα οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων κεραμιδίου, γεγονός που επηρεάζει (εξασθενίζει) τη

σηματοδότηση ινσουλίνης και καταστέλλει την μεταφορά των αμινοξέων (141). Έτσι συνοψίζοντας, για την από την fADN διαμεσολαβούμενη <απόσβεση> της ρυθμιζόμενης μεταφοράς αμινοξέων από την ινσουλίνη στις πλακουντιακές τροφοβλάστες έχει προταθεί έχει προταθεί το ακόλουθο μοντέλο (142): η ινσουλίνη σηματοδοτεί μέσω των υποδοχέων της και ενεργοποιεί τις IRS-1 και Akt, γεγονός που καταλήγει στην αύξηση της δραστηριότητας του Συστήματος μεταφοράς αμινοξέων A, που διαμεσολαβείται μέσω της σηματοδότησης mTORC1 και άλλων μηχανισμών. Η fADN σηματοδοτεί μέσω του AdipoR2 και των APPL1/2 και ενεργοποιεί τους p38, MAPK και PPARα. Είναι πολύ πιθανόν η ενεργοποίηση του PPARα να οδηγεί στη μεταγραφή γονιδίων που ευνοούν τη βιοσύνθεση του κεραμιδίου (141). Αλλαγές στο μεταβολισμό των σφιγγολιπιδίων ίσως προάγουν την από το κεραμίδιο εξαρτώμενη καταστολή της σηματοδότησης IRS-1 και τις επακόλουθες επιδράσεις στη δραστηριότητα της μεταφοράς των αμινοξέων (141).

Τέλος, όσον αφορά τη φλεγμονώδη δράση της αντιπυονεκτίνης, χορήγηση gADN σε πρωτογενείς τροφοβλάστες οδηγεί αύξησε την έκκριση των IL-6 και TNF-α, ενώ χορήγηση fADN αύξησε τον TNF-α αλλά ελάττωσε την παραγωγή IL-6. Επίσης η gADN εμπλέκεται στην παραγωγή των IL-1β και IL-8. Οι επιδράσεις της gADN στην έκκριση κυτοκινών επιβεβαιώνονται και από ευρήματα άλλων υποδηλώνοντας μια προ-φλεγμονώδη δράση της gADN (143). Η συσχέτιση της αντιπυονεκτίνης με την παραγωγή των ιντερλευκινών είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς έχει φανεί ότι κατέχουν ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην πορεία της εγκυμοσύνης.

1.6.2 Αντιπυονεκτίνη και διαφοροποίηση της τροφοβλάστης

Η ικανότητα της αντιπυονεκτίνης να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιβίωση έχει αναφερθεί σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους και η τελική απόκριση εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο. Στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης έχουν εμπλακεί αρκετές πρωτεϊνικές κινάσες, όπως οι MAPK και AKT/PKB και διαφορετικές επιδράσεις των ισομορφών της αντιπυονεκτίνης (67). Για παράδειγμα, στα αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα η αντιπυονεκτίνη προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ σε αρκετές καρκινικές σειρές (μαστού, προστάτη) έχει φανεί ότι τον μειώνει (67). Επίσης, διεγερτικές ή ανασταλτικές επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης στην κυτταρική επιβίωση και/ή απόπτωση έχουν βρεθεί σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους (67). Όσον αφορά τις πλακουντιακές κυτταρικές σειρές έχει βρεθεί ότι η αντιπυονεκτίνη σε συνεργιστική δράση με τη λεπτίνη καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων (129).

Έχει αναφερθεί ότι η αντιπυονεκτίνη προάγει την σύντηξη σε κύτταρα BeWo και σε τροφοβλαστικές λάχνες απομονωμένες από τον πλακούντα στην αρχή του πρώτου τριμήνου κύησης, αλλά καταστέλλει τη σύντηξη σε τροφοβλαστικές λάχνες απομονωμένες από πλακούντα μεγαλύτερης ηλικίας κύησης (131,140). Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η αντιπυονεκτίνη εμπλέκεται στην αύξηση δεικτών σύντηξης όπως είναι η συγκυτίνη-2 (syncytin-2) και στη μείωση της εντόπισης της E-cadherin στην επιφάνεια των τροφοβλαστικών μεμβρανών (140).

Η αντιπυονεκτίνη λειτουργεί ως ρυθμιστής της λεπτίνης και της χοριακής γοναδοτροφίνης, οι οποίες είναι απαραίτητες πλακουντιακές ορμόνες. Επιπλέον, πρόσφατα βρέθηκε ότι η έκφραση της λεπτίνης επάγεται από τη χοριακή γοναδοτροφίνη (131) και αντιστρόφως η λεπτίνη αυξάνει την παραγωγή χοριακής γοναδοτροφίνης σε τροφοβλαστικά και σε κύτταρα λιπώδη ιστού (144). Η αντιπυονεκτίνη μέσω άμεσων ή έμμεσων επιδράσεων θα μπορούσε να ενισχύει αυτή τη σχέση μεταξύ της χοριακής γοναδοτροφίνης και λεπτίνης (140).

Οι βιολογικές επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης διαμεσολαβούνται από τους υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 επάγοντας την ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών, κυρίως της AMPK, αλλά και της PKA στην τροφοβλάστη (144). Η αύξηση της παραγωγής ενδοκυτταρικού cAMP από το μονοπάτι PKA περιγράφεται ευρέως ως το κύριο σήμα που συμμετέχει στη τροφοβλαστική διαφοροποίηση (145). Δεδομένου ότι η αντιπυονεκτίνη προκαλεί την αύξηση του ενδοκυτταρικού cAMP σε κυτταρικές σειρές BeWo και η αύξηση του cAMP συνδέεται με τη διαφοροποίηση προτείνεται μία σχέση της αντιπυονεκτίνης με τη διαφοροποίηση (140). Μάλιστα, πρόσφατα βρέθηκε ότι η αντιπυονεκτίνη εμπλέκεται στη διαδικασία διαφοροποίησης και σύντηξης των μυϊκών κυττάρων μέσω του μονοπατιού AMPK (145). Επίσης, βρέθηκε ότι η έκφραση του mRNA των AdipoR1 και AdipoR2 αυξάνονται από τη φορσκολίνη, προτείνοντας έναν cAMP εξαρτώμενο μηχανισμό. Αυτή η επαγωγή των υποδοχέων AdipoR θα μπορούσε να διατηρεί μία υψηλή ευαισθησία των τροφοβλαστικών κυττάρων στην αντιπυονεκτίνη και έτσι να προάγει τις θετικές επιδράσεις της στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων (128).

Έχει προταθεί ότι η αντιπυονεκτίνη, αυτή η ορμόνη με τις πλειοτροπικές δράσεις, θα μπορούσε να συμμετέχει στη ρύθμιση παραγόντων που ενέχονται στο αποπτωτικό μονοπάτι κατά τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων (140).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η διερεύνηση συσχέτισης της αντιγονεκτίνης με τα επίπεδα των Bcl-2 και Bax και κατ' επέκταση η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο αυτή η ορμόνη εμπλέκεται στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Επομένως, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος της αντιγονεκτίνης στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων ακολούθησαν τα εξής:

- ✓ Απομόνωση και καλλιέργεια κυττάρων από χοριακές λάχνες πρώτου τριμήνου κύησης.
- ✓ Επαγωγή με την ορμόνη αντιγονεκτίνη.
- ✓ Απομόνωση mRNA και πρωτεϊνών από τροφοβλαστικά κύτταρα 24 και 48 ώρες μετά από επίδραση με αντιγονεκτίνη.
- ✓ Χρήση της μεθόδου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blot) για τον έλεγχο των επιπέδων mRNA του Bcl-2 και των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax.

3. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δείγματα χοριακών λαχνών

Στην παρούσα εργασία συλλέχθηκαν δείγματα χοριακών λαχνών, προερχόμενα από γυναίκες με φυσιολογική κύηση, οι οποίες υπεβλήθησαν σε λήψη χοριακών λαχνών στη Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά, χρησιμοποιήθηκαν πέντε δείγματα τροφοβλαστικού ιστού 11^{ns} με 13^{ns} εβδομάδας κύησης προερχόμενα από γυναίκες ηλικίας 32-35 ετών.

3.2 Απομόνωση τροφοβλαστικών κυττάρων

Πρώτο στάδιο της απομόνωσης των τροφοβλαστικών κυττάρων αποτελεί ο καθαρισμός του δείγματος. Η ύπαρξη πηγμάτων (ερυθρών αιμοσφαιρίων) δεν αποτελεί ευνοϊκό παράγοντα για τη μετέπειτα καλλιέργεια των κυττάρων γιατί προσκολλώνται στη φλάσκα εμποδίζοντας την καλλιέργεια. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται χημική και μηχανική διάσπαση του ιστού προκειμένου να απομονωθούν τα κύτταρα τροφοβλάστης. Όλες οι διαδικασίες γίνονται μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων.

Καθαρισμός

- Προσθήκη του δείγματος σε τρυβλία petri (ο αριθμός των τρυβλίων εξαρτάται από το πόσο αιματηρό είναι το δείγμα)
- Προσθήκη περίπου 3ml PBS (Phosphate Buffered Saline)
- Αφαίρεση των λαχνών σε συνδυασμό με PBS με τη βοήθεια πουάρ και τοποθέτηση τους σε πλαστικό σωληνάριο (falcon) των 15 ml (σε περίπτωση που υπάρχει μεγάλη ποσότητα πηγμάτων κολλημένων με τις λάχνες χρησιμοποιούνται δύο βελόνες για αποκόλληση)
- Επώαση των λαχνών με περίπου 3-4ml PBS σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να καθιζάνουν στον πάτο του falcon
- Αφαίρεση υπερκειμένου

Διάσπαση ιστού:

- Προσθήκη περίπου 1-2ml κολλαγενάσης και 1-2ml θρυψίνης (ανάλογα με την ποσότητα του ιζήματος-μεγαλύτερη ποσότητα ιζήματος συνεπάγεται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων) και ανάδευση

- Επώαση για μια ώρα στον κλίβανο με ανακίνηση του σωληναρίου κάθε 15 λεπτά
- Προσθήκη θρεπτικού υλικού DMEM/F-12 (5-10ml) προκειμένου να μπλοκαριστεί η δράση των ενζύμων (DMEM/F-12: 10% ορό εμβρύου βοός-FBS, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-P/S, 5% L-γλουταμίνη)
- Φυγοκέντρηση στις 1.700rpm για 7 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 1ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12
- Αναρρόφηση του δείγματος περίπου είκοσι φορές με τη βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης (κατά τη διάρκεια της διαδικασίας μπορεί να εμφανιστεί άσπρος αφρός, ως ένδειξη διάσπασης πρωτεϊνών-δεν είναι επιθυμητό σε μεγάλη ποσότητα αλλά προτιμάται έναντι της μη διάσπασης ιστού)
- Φυγοκέντρηση στις 800rpm για 10 λεπτά
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού DMEM/F-12, ανακάτεμα και μεταφορά σε φλάσκα 25cm²
- Παρατήρηση των νηματοειδών κυλινδρικών κυττάρων που επιπλέουν στο θρεπτικό μέσο κυττάρων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss)
- Τοποθέτηση στο επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments -37°C, 5% CO₂) προκειμένου να προσκολληθούν στην επιφάνεια της φλάσκας

3.3 Πρωτόκολλα διατήρησης κυτταροκαλλιέργειας

Τα κύτταρα διατηρούνται σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments) με σταθερή θερμοκρασία στους 37°C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και 5% CO₂. Κάθε δύο με τρεις ημέρες πραγματοποιείται έλεγχος της πορείας των κυττάρων σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss) καθώς και του χρώματος του θρεπτικού μέσου (ένδειξη αλλαγής pH). Όταν χρειάζεται πραγματοποιείται αλλαγή θρεπτικού υλικού και όταν τα κύτταρα καλύψουν το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας ακολουθεί ανακαλλιέργεια ή κατάψυξη των κυττάρων. Το θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε είναι το Dulbecco's modified Eagle's medium / Ham's F-12 (DMEM/F-12: 10% ορό εμβρύου βοός-FBS, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-P/S, 5% L-γλουταμίνη). Όλες οι διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων.

3.3.1 Διαχωρισμός κυττάρων (ανακαλλιέργεια)

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τη φλάσκα
- Ξέπλυμα με 5ml PBS (Phosphate Buffered Saline)

- Προσθήκη 1ml θρυψίνης και τοποθέτηση στον κλίβανο για περίπου 3-5 λεπτά προκειμένου να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας
- Έλεγχος στο μικροσκόπιο εάν ξεκόλλησαν τα κύτταρα
- Προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού προκειμένου να σταματήσει η δράση της θρυψίνης και μεταφορά σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση στις 1.800-2.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 5ml PBS και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 1.800-2.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού, μεταφορά σε φλάσκες 25cm² και συμπλήρωση με 2,5ml θρεπτικού υλικού σε καθεμία
- Τοποθέτηση φλασκών στον κλίβανο

3.3.2 Κατάψυξη & Απόψυξη κυττάρων

Κατάψυξη κυττάρων

Η κατάψυξη κυττάρων περιλαμβάνει τα ίδια στάδια με την ανακαλλιέργεια μέχρι και τη δεύτερη φυγοκέντρηση. Η διαδικασία που ακολουθεί έχει ως εξής:

- Αφαίρεση του υπερκείμενου
- Προσθήκη διαλύματος που περιέχει 60% θρεπτικό υλικό-σκέτο, 30% FBS (Fetal bovine serum) και 10% DMSO (dimethyl sulfoxide) (2ml/κρυοφιαλίδιο)
- Τοποθέτηση στα κρυοφιαλίδια και μεταφορά τους στους -20°C μέχρι να παγώσουν (30 λεπτά-2 ώρες)
- Μεταφορά τους -80°C για 24 ώρες με 7 ημέρες
- Αποθήκευση στους -150°C

Απόψυξη κυττάρων

- Μεταφορά από τους -150°C σε υδατόλουτρο (37°C) για λίγα δευτερόλεπτα (κατά τη διάρκεια της μεταφοράς συνίσταται η τοποθέτηση σε πάγο)
- Τοποθέτηση του περιεχομένου του φιαλιδίου σε πλαστικό σωληνάριο το οποίο περιέχει 2 ml θρεπτικού υλικού
- Φυγοκέντρηση στις 1.800-2.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 5ml PBS και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 1.800-2.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 5ml θρεπτικού υλικού, μεταφορά σε φλάσκες 25cm² και συμπλήρωση με 2,5ml θρεπτικού υλικού σε καθεμία

- Τοποθέτηση φιασκών στον κλίβανο

3.3.3 Επίδραση των κυττάρων με αντιπυονεκτίνη

Μεταφορά των κυττάρων σε “6-wells”

Αποκόλληση κυττάρων όπως και στη διαδικασία της ανακαλλιέργειας αλλά στο τελευταίο στάδιο τα κύτταρα μεταφέρονται σε 6 well (πηγαδάκια) με 2ml θρεπτικού υλικού. Συγκεκριμένα στα 4 πηγαδάκια τοποθετήθηκαν κύτταρα και στα δύο μόνο θρεπτικό υλικό (αρνητικός μάρτυρας). Αφού προσκολλήθηκαν τα κύτταρα και κατέλαβαν το μεγαλύτερο ποσοστό της επιφάνειας του κάθε well (>60%) ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1^ο Βήμα: στέρηση θρεπτικών συστατικών από τα κύτταρα - “Starvation”

- Απομάκρυνση πλήρους θρεπτικού υλικού
- Προσθήκη 2ml/πηγαδάκι σκέτου θρεπτικού υλικού με αντιβιοτικό (χωρίς FBS)
- Τοποθέτηση στον κλίβανο για 24 ώρες

2^ο Βήμα: προσθήκη της αντιπυονεκτίνης

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 2ml θρεπτικού υλικού στα δείγματα που δεν επιθυμείται επίδραση (δείγματα ελέγχου-control)
- Σύνθεση μίγματος θρεπτικού και αντιπυονεκτίνης με συγκέντρωση 250ng/ml (5μl/2ml θρεπτικού)
- Προσθήκη 1ml από το μίγμα σε κάθε πηγαδάκι και συμπλήρωση με 1ml πλήρες θρεπτικού υλικού
- Τοποθέτηση στον κλίβανο

3^ο Βήμα: 24 ώρες και 48 ώρες μετά από την επίδραση

Απομόνωση RNA (24 ώρες) και πρωτεϊνών (24 και 48 ώρες) από τα κύτταρα.

3.4 Απομόνωση RNA από κύτταρα

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού
- Ξέπλυμα με 5ml PBS
- Προσθήκη 500μl Trizol σε κάθε πηγαδάκι
- Μεταφορά των κυττάρων με το Trizol σε eppendorf των 2ml

- Αποθήκευση του RNA στους -80°C μέχρι το επόμενο βήμα
- Επώαση για 5 λεπτά στους $15-30^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο
- Προσθήκη 0,2ml χλωροφόρμιου για κάθε 1ml Trizol (100μl/δείγμα)
- Καλή ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα
- Επώαση για 2-3 λεπτά στους $15-30^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C
- Μεταφορά υπερκείμενου σε eppendorf 2ml
- Προσθήκη 0,5ml ισοπροπυλικής αλκοόλης για κάθε 1ml Trizol (250μl/δείγμα)
- Επώαση για 10 λεπτά στους $15-30^{\circ}\text{C}$ σε υδατόλουτρο
- Φυγοκέντρηση στις 12.000rpm για 10 λεπτά στους $2-8^{\circ}\text{C}$
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξέπλυμα του RNA με 1ml 70% αιθανόλης
- Ανάδευση σε Vortex
- Φυγοκέντρηση στις 10.000rpm για 10 λεπτά στους $2-8^{\circ}\text{C}$
- Απομάκρυνση υπερκείμενου και στέγνωμα RNA σε θερμοκρασία δωματίου στον απαγωγό για λίγη ώρα
- Διάλυση του RNA σε RNase-free water (περίπου 30μl)
- Επώαση για 10 λεπτά στους 55°C σε υδατόλουτρο
- Αποθήκευση του RNA στους -80°C
- Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης 2% για έλεγχο της ποσότητας RNA

3.5 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Τα δείγματα RNA που απομονώθηκαν μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) *in vitro* με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (reverse transcription, RT).

Για τη σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε 1μg RNA κάθε δείγματος ενώ ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20μl. Αρχικά το RNA διαλύθηκε σε δις απεσταγμένο νερό (ddH₂O) και προστέθηκε 1μl τυχαίων εκκινητών (random primers). Το μείγμα θερμάνθηκε στους 65°C για 5 λεπτά, ώστε να γίνει αποδιάταξη των δευτεροταγών δομών των μορίων RNA. Ακολούθησε προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων στις εξής ποσότητες: ρυθμιστικό διάλυμα 5x: 4μl, δεοξυριβονουκλεοτίδια (500μg/ml): 2μl M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase, 200U/μl, Invitrogen): 1μl. Το διάλυμα αντίδρασης ακολούθησε το παρακάτω πρόγραμμα αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR):

- 37°C, 60 λεπτά
- 65°C, 10 λεπτά
- τελική θερμοκρασία: 4°C

Για την αποφυγή ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων πραγματοποιείται ενίσχυση αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων τα οποία εκφράζονται πάντοτε στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφο “αναφοράς”). Στην συγκεκριμένη περίπτωση, ως μετάγραφο αναφοράς χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου GAPDH (δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Το cDNA κάθε δείγματος ενισχύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του GAPDH cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο GAPDH ήταν:

GAPDH F: 5' – GAGTCAACGGATTTGGTCGT – 3'

GAPDH R: 5' – GACAAGCTTCCCGTTCTCAG – 3'

Το διάλυμα αντίδρασης (mix) για την ανίχνευση του γονιδίου GAPDH περιείχε:

- | | |
|--------------------------------|--------|
| ○ cDNA: | 2μl |
| ○ Biorline MyTaq HS Mix 2x: | 12,5μl |
| ○ Εκκινητής GAPDH F (50p/mol): | 1μl |
| ○ Εκκινητής GAPDH R (50p/mol): | 1μl |
| ○ Δις απεσταγμένο νερό: | 8,5μl |

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA του γονιδίου ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 5 λεπτά
- 35 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 94°C για 10 λεπτά
 - υβριδοποίηση των εκκινητών στους 60°C για 1 λεπτό
 - επιμήκυνση στους 72°C για 30 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ο έλεγχος παρουσίας ή όχι του τμήματος που ενισχύθηκε πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη 3% με μάρτυρα προτύπων μοριακών βαρών 100bp (Gibco).

3.6 RT-PCR: Ανίχνευση των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του Bcl-2 και του GAPDH

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time Polymerase Chain Reaction), είναι μια τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA - στόχου. Το χαρακτηριστικό της είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά το τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού, σε πραγματικό χρόνο (real time). Τα στάδια της αντίδρασης διεξάγονται από τη συσκευή της Real-Time PCR (thermal cycler/detector) και τα ποσοτικά αποτελέσματα προωθούνται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Για την ανίχνευση των πολλαπλασιαζόμενων προϊόντων της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία SYBR Green I. Η SYBR Green I έχει την ικανότητα να συνδέεται σε δίκλινα μόρια DNA, ενισχύοντας τον φθορισμό της και επιτρέποντας στο σύστημα καταγραφής την ανίχνευση των επιθυμητών προϊόντων. Η μέγιστη απορρόφηση της ουσίας είναι στα 497nm. Η SYBR Green I προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο. Μπορεί να συνδεθεί σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA αλλά μόνο σε μια συγκεκριμένη περιοχή κάθε φορά, αυξάνοντας την ευαισθησία της μεθόδου. Επίσης, ο υπολογισμός του φθορισμού σε αυξανόμενες θερμοκρασίες μειώνει την ανίχνευση μη ειδικών προϊόντων. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα, ενώ κατά το στάδιο επιμήκυνσης αυξανόμενα ποσά χρωστικής προσδένονται στο σχηματιζόμενο δίκλινο μόριο DNA με αποτέλεσμα την αύξηση στην ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος. Το σήμα αυτό μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης (denaturation). Συνεπώς, η ανίχνευση του σήματος στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου είναι εκείνη που καταγράφει το αυξανόμενο ποσό του DNA. Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ειδικότητα καθορίζεται αποκλειστικά από τους εκκινητές. Αφού η παρουσία οποιουδήποτε δίκλινου μορίου DNA εκπέμπει φθορισμό, η μέθοδος δεν είναι πιο ειδική από τη συμβατική RT-PCR. Ωστόσο η ειδικότητα των προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί δημιουργώντας την καμπύλη τήξης ή αποδιάταξης (melting curve ή dissociation curve) του προϊόντος. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας το φθορισμό που λαμβάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως (T_m) του

πολλαπλασιαζόμενου μορίου (amplicon). Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση, είναι δυνατό να ταυτοποιηθεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

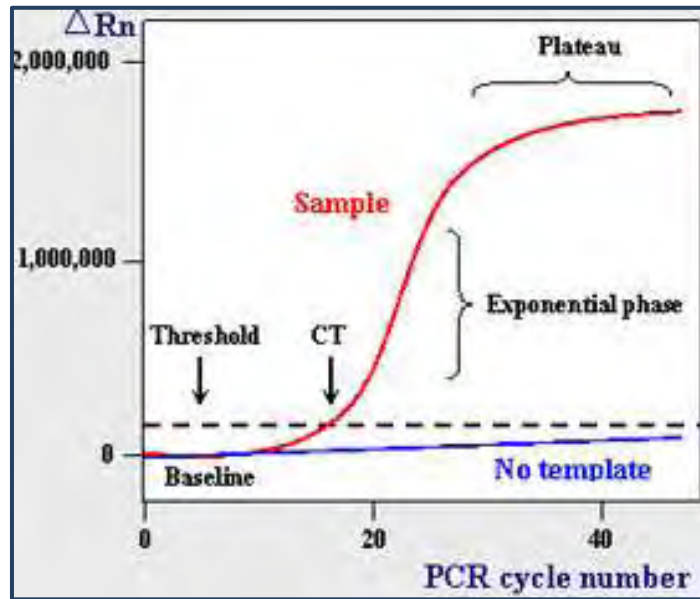
Σχεδιασμός πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA και εκκινήτων

Το βέλτιστο μήκος του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος DNA (μορίου-στόχου) για τη Real-Time PCR είναι μικρότερο από 100 ζεύγη βάσεων (bp). Τα μικρότερα μόρια πολλαπλασιάζονται με μεγαλύτερη απόδοση και είναι πιο ανθεκτικά στις συνθήκες αντίδρασης. Οι ειδικοί εκκινήτες πρέπει να προσδένονται στην ένωση δύο εξωνίων προκειμένου να αποφεύγονται ψευδώς θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τον πολλαπλασιασμό του γενωμικού DNA που έχει επιμολύνει το δείγμα. Ο σχεδιασμός τους βασίζεται στην εκτιμώμενη θερμοκρασία τήξης τους (T_m), στην προτίμηση για πολλαπλασιαζόμενα τμήματα DNA μικρού μεγέθους καθώς και στη θέση πρόσδεσης των εκκινήτων. Το βέλτιστο μήκος τους είναι περίπου 15-20 βάσεις και η περιεκτικότητά τους σε βάσεις γουανίνης/κυτοσίνης (G/C) θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 20-70%. Η θερμοκρασία τήξης τους δε θα πρέπει να διαφέρει περισσότερο από 1-2°C, με ελάχιστη και μέγιστη τους 58°C και 60°C, αντίστοιχα. Η παρουσία τους σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προάγει τη λανθασμένη πρόσδεσή τους και τη συσσώρευση μη ειδικού προϊόντος. Αντίθετα η χαμηλή συγκέντρωσή τους σπάνια αποτελεί πρόβλημα για τη Real-Time PCR, διότι τα αντίγραφα του μορίου στόχου έχουν συνήθως υπολογιστεί πριν εξαντληθεί η ποσότητα των εκκινήτων.

Ποσοτικοποίηση

Στο διάγραμμα της *Εικόνας 15* φαίνεται μια αντιπροσωπευτική γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) στην οποία φαίνονται οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται κατά την ποσοτικοποίηση. Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι το γράφημα του σήματος φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο.

Στους αρχικούς κύκλους της PCR παρατηρείται μια μικρή αλλαγή στο σήμα φθορισμού. Αυτή η φάση αντιστοιχεί στο αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού (baseline) του γραφήματος. Οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο είναι το αρχικό ποσό του μορίου – στόχου (template) κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των



Εικόνα 15: Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού (amplification plot) που προκύπτει κατά τη Real-Time PCR.

κύκλων που απαιτούνται προκειμένου να φτάσει η αντίδραση στο σημείο εκείνο που το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού (146). Αυτό το σημείο ορίζεται ως Ct (threshold cycle) και εντοπίζεται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού (plateau). Το ΔRn (delta Rn) είναι το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται στη συγκεκριμένη αντίδραση PCR. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού της χρωστικής διαιρούμενη από την ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού μιας χρωστικής αναφοράς αποτελεί το Rn (normalized reporter). Αυτή η χρωστική αναφοράς (passive reference dye) είναι απαραίτητη για τη διόρθωση διακυμάνσεων που αφορούν αλλαγές στη συγκέντρωση ή τον όγκο και συμπεριλαμβάνεται σε όλα τα SDS kits της αντίδρασης PCR.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στη Real-Time PCR μπορεί να είναι είτε απόλυτη, είτε σχετική. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση γίνεται όταν είναι αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του RNA στόχου και πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης (absolute standard curve). Αυτό προϋποθέτει τη συμβολή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με πρότυπη καμπύλη ή με τη συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT

method). Και οι δύο μέθοδοι δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα. Όσον αφορά την πρότυπη καμπύλη, η ποσότητα του μορίου – στόχου εκφράζεται σε σχέση με ένα δείγμα που λέγεται ρυθμιστής (calibrator). Η ζητούμενη ποσότητα καθορίζεται από την πρότυπη καμπύλη και διαιρείται από την ποσότητα του ρυθμιστή. Έτσι ο ρυθμιστής αποτελεί το 1x δείγμα και όλες οι άλλες ποσότητες εκφράζονται ως n-φορές σε σχέση με αυτόν. Επειδή ακριβώς η ποσότητα του δείγματος διαιρείται με την ποσότητα του ρυθμιστή, η γνώση της απόλυτης τιμής των πρότυπων δειγμάτων (standards) που θα δημιουργήσουν την καμπύλη δεν είναι αναγκαία. Στην περίπτωση κατά την οποία η ποσότητα του δείγματός μας κανονικοποιείται ως προς ένα εσωτερικό μάρτυρα (endogenous control), οι πρότυπες καμπύλες δημιουργούνται τόσο για το μόριο στόχο, όσο και για τον εσωτερικό μάρτυρα. Για κάθε δείγμα το ποσό του στόχου και του εσωτερικού μάρτυρα καθορίζεται από την κατάλληλη πρότυπη καμπύλη και από το λόγο τους προκύπτει η κανονικοποιημένη τιμή του μορίου – στόχου (normalized target value). Κάθε κανονικοποιημένη τιμή στη συνέχεια διαιρείται από την κανονικοποιημένη τιμή του ρυθμιστή (calibrator) και έτσι προκύπτει το σχετικό επίπεδο έκφρασης ως προς αυτόν που, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί το 1x δείγμα.

Η δεύτερη μέθοδος, η συγκριτική CT μέθοδος (comparative CT method), είναι παρόμοια με τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης αλλά βασίζεται σε αριθμητικούς τύπους για να επιτύχει το ίδιο αποτέλεσμα σχετικής ποσοτικοποίησης. Το ποσό του μορίου – στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο – ρυθμιστή (calibrator) δίνεται από τη σχέση $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Το πλεονέκτημα της συγκριτικής CT μεθόδου είναι ότι δεν υπάρχει ανάγκη δημιουργίας πρότυπης καμπύλης και αποφεύγονται τα λάθη κατά την αραίωση των δειγμάτων για τη δημιουργία της. Επίσης επιτρέπει να παραμείνουν αχρησιμοποίητα αρκετά πηγαδάκια (wells) εξοικονομώντας χώρο για μελέτη μεγαλύτερου αριθμού δειγμάτων.

Στην παρούσα εργασία η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε με τη συγκριτική CT μέθοδο (comparative CT method).

Κανονικοποίηση

Κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι δυνατό να προκύψουν σφάλματα που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού του υλικού DNA ή RNA μεταξύ των δειγμάτων. Η διόρθωση αυτής της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού μάρτυρα (endogenous control) ως προς τον οποίο, όπως αναφέρθηκε

και παραπάνω, θα κανονικοποιηθεί στη συνέχεια το δείγμα. Ο ιδανικός εσωτερικός μάρτυρας θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφόρων ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και θα πρέπει να παραμένει ανεπηρέαστος από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης θα πρέπει να εκφράζεται αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι η β-ακτίνη και η δεϋδρογενάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH). Εκφράζεται σε μέτρια επίπεδα στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και κωδικοποιεί για ένα ένζυμο που καταλύει το έκτο βήμα της γλυκόλυσης για την παραγωγή ενέργειας.

Βελτιστοποίηση της πειραματικής διαδικασίας

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση two-step RT-PCR. Αυτό σημαίνει ότι προηγήθηκε σε ξεχωριστό στάδιο η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και στη συνέχεια το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση της Real-Time PCR. Για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το σφάλμα που προκύπτει από διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης RT, όλα τα δείγματα cDNA παρασκευάστηκαν μαζί χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια και τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια συσκευή PCR. Στην ίδια αντίδραση τα ίδια δείγματα ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας και εκκινητές που ανίχνευαν τον εσωτερικό μάρτυρα GAPDH. Ταυτόχρονα πραγματοποιήθηκαν δύο είδη αντιδράσεων control: Αντιδράσεις με όλα τα συστατικά εκτός του cDNA και αντιδράσεις με όλα τα συστατικά στα οποία αντί του cDNA προστίθεται το προϊόν της αντίδρασης control της αντίστροφης μεταγραφής και για τα δύο είδη εκκινητών (του εκάστοτε γονιδίου και της GAPDH).

Για κάθε δείγμα, το μηχάνημα της RT-PCR μας δίνει μια τιμή Ct, καθώς και τις γραφικές παραστάσεις πολλαπλασιασμού (amplification plot) και τις καμπύλες τήξης ή αποδιάταξης (melting curve or dissociation curve) των προϊόντων και σύμφωνα με τα παραπάνω υπολογίζεται για κάθε δείγμα το $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Το σύνολο των τιμών επεξεργάζεται στη συνέχεια με στατιστικό πρόγραμμα για τον προσδιορισμό της έκφρασης του εκάστοτε γονιδίου στους διαφορετικούς πληθυσμούς μελέτης. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται μετά από σύγκριση των μεταγράφων του υπό μελέτη γονιδίου μ' αυτά ενός γονιδίου αναφοράς. Για να ληφθεί μια στρογγυλοποιημένη τιμή για κάθε δείγμα, διαιρείται η συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου που μας ενδιαφέρει προς τη συγκέντρωση των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς. Ο λόγος που προκύπτει είναι ο αριθμός των μεταγράφων του γονιδίου προς μελέτη ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

Πειραματική διαδικασία

Κάθε δείγμα ελέγχθηκε τόσο για το υπό μελέτη γονίδιο όσο και για το γονίδιο αναφοράς. Συνεπώς, κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκε εις διπλούν και στο ένα από τα δύο προστέθηκε το διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο Bcl-2 ενώ στο άλλο το διάλυμα αντίδρασης για το γονίδιο GAPDH.

Αρχικά πραγματοποιείται αραίωση του cDNA 1:10 με προσθήκη ddH₂O. Στη συνέχεια ακολουθεί κατασκευή των διαλυμάτων αντίδρασης (mix), για το GAPDH και για το γονίδιο Bcl-2. Καθένα από τα παραπάνω διαλύματα (mix) περιέχει 5μl SYBR Green, 0.1μl της χρωστικής Rox, 1 μl από τους εκάστοτε εκκινητές και 0.9μl ddH₂O. Σε αυτά προστίθενται στο τέλος 2μl από το αραιωμένο cDNA κάθε δείγματος. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση του γονιδίου Bcl-2 ήταν:

Bcl-2 F: 5' – GTG GGA TGC GGG AGA TGT GG – 3'

Bcl-2 R: 5' – ACA GGT GGC ACC GGG CTG AA – 3'

Οι συνθήκες PCR που εφαρμόστηκαν για την ενίσχυση του mRNA των γονιδίων ήταν οι εξής:

- αρχική αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά
- 45 κύκλοι στους οποίους πραγματοποιείται ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου σε τρία στάδια:
 - αποδιάταξη στους 95°C για 30 δευτερόλεπτα
 - υβριδοποίηση-σύνδεση των εκκινητών στους 54°C για 20 δευτερόλεπτα
 - επιμήκυνση στους 72°C για 20 δευτερόλεπτα
- τελική επιμήκυνση στους 72°C για 2 λεπτά

3.7 Απομόνωση πρωτεϊνών από τροφοβλαστικά κύτταρα

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από τα πηγαδάκια
- Ξέπλυμα με 2ml PBS
- Προσθήκη 500μl θρυψίνης και τοποθέτηση στον κλίβανο για 3-5 λεπτά
- Προσθήκη 2ml πλήρες θρεπτικού υλικού σε κάθε πηγαδάκι
- Μεταφορά σε falcon 15ml
- Φυγοκέντρηση στις 1.800-2.000rpm για 5 λεπτά
- Αφαίρεση υπερκείμενου, προσθήκη 5ml PBS και ανάδευση
- Φυγοκέντρηση στις 1800-2000rpm για 5 λεπτά

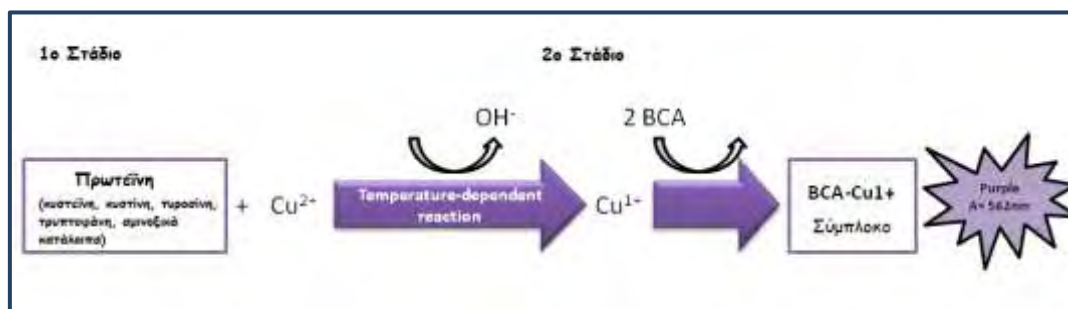
- Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 6μl αναστολέων πρωτεασών (Protease inhibitors, PIs) και 60ml διάλυμα λύσης (RIPA buffer: Triton X-100 1%, Sodium Deoxycholate 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 mM, Tris 10 mM, EDTA 1 mM)
- Τοποθέτηση στον πάγο για 30 λεπτά αναδεύοντας σε vortex κάθε 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση 12.000rpm στους -4°C
- Μεταφορά υπερκειμένου σε eppendorf
- Αποθήκευση στους -80°C

3.8 Μέθοδος BCA- Υπολογισμός ποσότητας πρωτεϊνών

Αρχή της μεθόδου

Λόγω της παρουσίας του SDS (Sodium dodecyl sulfate) στο πρωτεϊνικό εκχύλισμα, η μέτρηση της ποσότητας των πρωτεϊνών έγινε με τη βιοχημική μέθοδο BCA (Bicinchromic acid). Συγκεκριμένα η μέθοδος BCA βασίζεται σε δύο αντιδράσεις (Εικόνα 16). Αρχικά οι πρωτεΐνες (πεπτιδικοί δεσμοί) «μειώνουν» τα ιόντα Cu^{2+} από το θειϊκό χαλκό σε Cu^+ (εξάρτηση από τη θερμοκρασία της αντίδρασης). Το ποσό των ιόντων Cu^{2+} που μειώνεται είναι ανάλογο της ποσότητας των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο διάλυμα. Στη συνέχεια, δύο μόρια BCA (Bicinchromic acid) σχηματίζουν σύμπλοκο με ένα ιόν Cu^+ , σχηματίζοντας ένα μοβ-έγχρωμο προϊόν. Αυτό το σύμπλοκο εμφανίζει μια ισχυρή απορρόφηση στα 562nm [σχεδόν γραμμική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε μία ευρεία περιοχή (Standard Protocol-20-2000μg/mL)].

Συνοψίζοντας, η συγκέντρωση της ολικής πρωτεΐνης εμφανίζεται ως αλλαγή χρώματος στο διάλυμα από πράσινο (1^ο στάδιο) σε μοβ (2^ο στάδιο), σε αναλογία με τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών, το οποίο μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας χρωματομετρικές τεχνικές.



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων της μεθόδου BCA.

Πειραματική διαδικασία

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη χρήση του «BCA Protein Assay Kit» της εταιρίας Pierce. Αναλυτικά τα στάδια της διαδικασίας έχουν ως εξής:

- Ανάμιξη αντιδραστηρίου A και B του BCA kit σε αναλογία 1:50.
- Προσθήκη 500μl από το μίγμα των αντιδραστηρίων A,B και 5μl από το κάθε δείγμα σε erpendorf (σε ένα erpendorf αντί για δείγμα προστέθηκε διάλυμα λύσης-RIPA buffer προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ως μάρτυρας)
- Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά
- Ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου
- Φωτομέτρηση στα 562nm έναντι του μάρτυρα (RIPA buffer)

[Σημειώνεται ότι για τη μέτρηση χρησιμοποιήθηκε η συσκευή SmartSpec Plus Spectrophotometer της BIO RAD, η οποία είχε ρυθμιστεί (πρότυπη καμπύλη-BSA) και παρείχε την τιμή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών αυτόματα].

3.9 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου

Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου ή SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των πρωτεϊνών με βάση την ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των πρωτεϊνών εξαρτάται κυρίως από το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών, τη δευτεροταγή δομή τους καθώς και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μπορεί να υφίστανται.

Κάθε πρωτεΐνη έχει διαφορετική πρωτοταγή δομή και συνεπώς διαφορετικό μοριακό βάρος και ισοηλεκτρικό σημείο. Υπό αυτές τις συνθήκες, πρωτεΐνες με παρόμοιο μοριακό βάρος θα εμφάνιζαν διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα λόγω διαφορετικής αναλογίας μάζας προς φορτίο. Κάτι τέτοιο θα καθιστούσε αδύνατο το μεταξύ τους διαχωρισμό με τη συγκεκριμένη τεχνική. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ως ανιονικός αποδιατακτικός παράγοντας. Η χρήση του συγκεκριμένου παράγοντα έχει διπλό ρόλο. Αφενός συμβάλλει στην αποδιάταξη των πρωτεϊνικών αλυσίδων και αφετέρου προσδίδει σε κάθε πρωτεΐνη ενιαίο αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, ανάλογο του μοριακού της βάρους. Κατά προσέγγιση, 1,4 gr SDS προσδένονται ανά 1 gr πρωτεΐνης (ένα μόριο SDS ανά 2 αμινοξέα στις κύριες αλυσίδες). Η επιπλέον χρήση αναγωγικών

παραγόντων όπως είναι το DTT (DiThioThreitol) ή η β-μερκαπτοαιθανόλη, έχει ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των δισουλφιδικών δεσμών των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται με τη θέρμανση των πρωτεϊνικών δειγμάτων για 5 min στους 95°C, παρουσία των παραπάνω αποδιατακτικών παραγόντων.

Έτσι, ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών μέσω του πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου πραγματοποιείται με βάση μόνο το μοριακό τους μέγεθος. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου προτιμούνται για την ηλεκτροφόρηση, καθώς αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και κατασκευάζονται εύκολα. Το ακρυλαμίδιο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα συγκεντρώσεων από 3% μέχρι 30%. Το πήκτωμα σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου και μορίων NN-μεθυλεν-bis-ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στη δημιουργία αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Η αναλογία ακρυλαμιδίου:bis-ακρυλαμιδίου καθορίζει το μέγεθος των σχηματιζόμενων πόρων του πηκτώματος. Η κατάλυση της αντίδρασης του πολυμερισμού πραγματοποιείται με τη βοήθεια μίας βάσης, της NNN'N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης (TEMED), καθώς και με τη βοήθεια ελευθέρων ριζών οι οποίες δημιουργούνται χημικά με υπερθειικά ιόντα ($S_2O_3^{2-}$), παρουσία ενός δευτέρου καταλύτη, του Ammonium Persulphate (APS).

Συνοψίζοντας, η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων, κάτω από τις συνθήκες που περιγράφηκαν, είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους. Οι μικρές σε μέγεθος πολυπεπτιδικές αλυσίδες μετακινούνται εύκολα διά μέσου των πόρων του πηκτώματος ενώ οι μεγαλύτερες μένουν στην κορυφή, κοντά στο σημείο εκκίνησης. Πολυπεπτιδικές αλυσίδες ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται ενδιάμεσα στο πήκτωμα με διαφορετικές ταχύτητες.

Πειραματική διαδικασία

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 20μg. Η διαδικασία της αποδιάταξης έχει ως εξής: α) δημιουργία διαλύματος αποδιάταξης με χμl πρωτεϊνικού εκχυλίσματος, 5μl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (6x) και γμl ddH₂O (τόσο ώστε ο τελικός όγκος να είναι 20μl), β) επώαση στους 95°C σε συσκευή PCR για 5-10 λεπτά.

- Συναρμολόγηση συσκευής (Xcell Surelock-Invitrogen)
- Προετοιμασία πηκτώματος διαχωρισμού (separating gel(12% acrylamide) με 12% ακρυλαμιδίου και φόρτωση αυτού στη συσκευή καλύπτοντας περίπου τα 3:4

αυτής (σημειώνεται ότι το ποσοστό του ακρυλαμιδίου εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος της πρωτεΐνης που θέλουμε να ανιχνεύσουμε)

- Αφού πήξει το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel) γίνεται προετοιμασία του πηκτώματος πακεταρίσματος (stacking gel-3.9% acrylamide) και τοποθετείται πάνω από το πρώτο
- Αφού πήξει το πήκτωμα διαχωρισμού (stacking gel), η συσκευή τοποθετείται μέσα στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης που περιέχει Running Buffer (1x)
- Φόρτωση των δειγμάτων και μάρτυρα γνωστών μοριακών βαρών (Precision Plus Protein Dual Color, Bio-Rad)
- Κλείσιμο συσκευής και εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου τάσης 200V για 30-40 λεπτά

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αντιδραστήρια/διαλύματα και οι σχετικές ποσότητες αυτών για τη δημιουργία της πηκτής.

Stock solution	Separating gel (12% acrylamide)	Stacking gel (3.9% acrylamide)
30% acrylamide/0.8% bisacrylamide	6.00ml	0.65ml
4× Tris·Cl/SDS, pH 8.8	3.75ml	-
4× Tris·Cl/SDS, pH 6.8	-	1.25ml
H ₂ O	5.25ml	3.05ml
10% (w/v) ammonium persulfate	0.05ml	25μl
TEMED	0.01ml	5μl

Πίνακας 2: Υλικά και ποσότητες που απαιτούνται για την παραγωγή πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

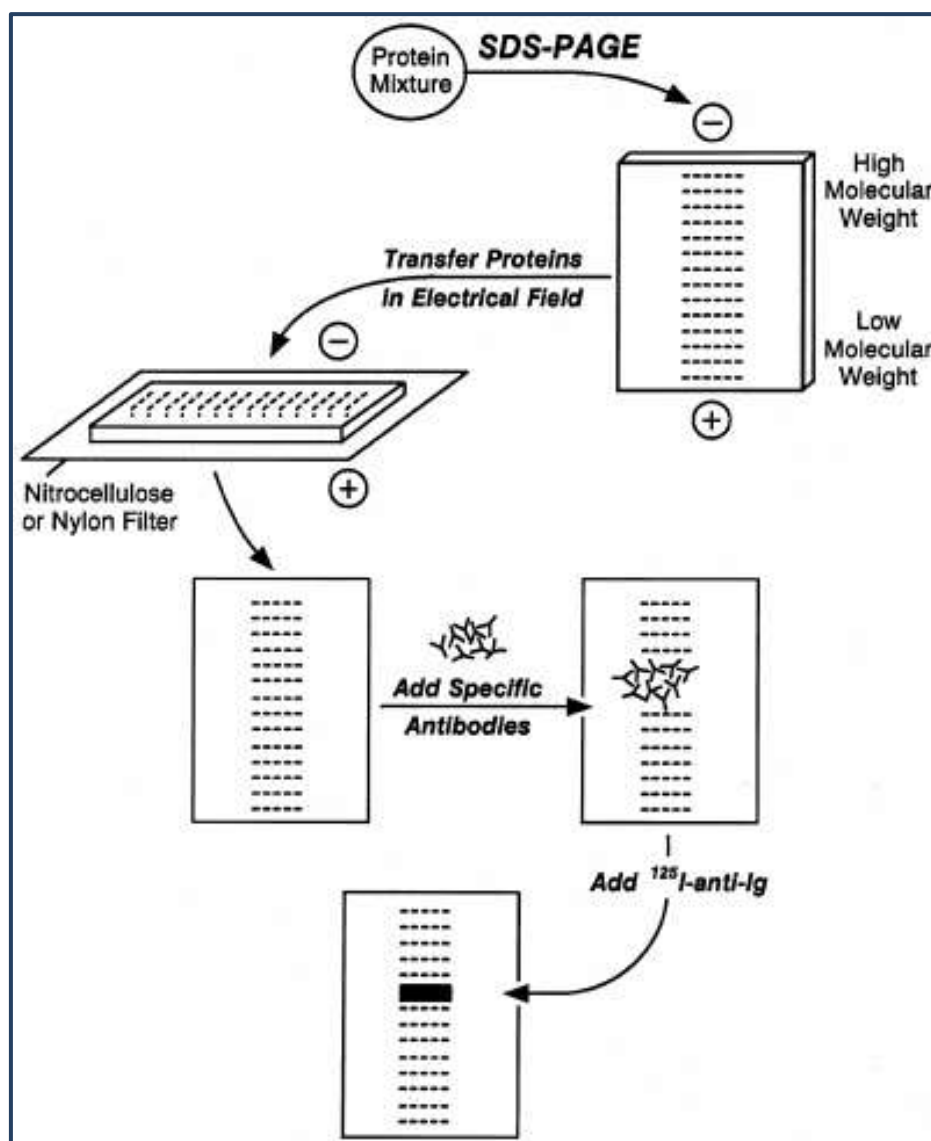
**Σημειώνεται ότι οι παραπάνω ποσότητες αντιστοιχούν στην παρασκευή τριών gel.*

3.10 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών – Western Blot

Αρχή της μεθόδου

Το πρώτο βήμα στην τεχνική Western Blot είναι ο διαχωρισμός των μακρομορίων χρησιμοποιώντας ένα πήκτωμα ηλεκτροφόρησης. Μετά την ηλεκτροφόρηση, τα διαχωρισμένα μόρια μεταφέρονται/στυπώνονται σε μία μεμβράνη, η οποία συνήθως είναι μία μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή μία μεμβράνη διφθοριούχου πολυβινυλιδένιου (PVDF). Στη συνέχεια, η μεμβράνη μπλοκάρεται για να αποφευχθεί κάθε μη ειδική σύνδεση αντισωμάτων στην επιφάνεια της μεμβράνης. Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης-αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στις μεμβράνες, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευτεί και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του πρώτου αντισώματος. Το

δευτερογενές αντίσωμα είναι ομοιοπολικά συζευγμένο με κάποιο ένζυμο, το οποίο παρουσία κατάλληλου υποστρώματος συμβάλλει στην εμφάνιση του σήματος. Συγκεκριμένα, η εμφάνιση του σήματος γίνεται μέσω της μεθόδου της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας (Enhanced ChemiLuminescence, ECL). Σε αυτή την περίπτωση, το δευτερογενές αντίσωμα είναι συζευγμένο με το ένζυμο της αλκαλικής υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase), το οποίο παρουσία του υποστρώματος υπεροξειδίου προκαλεί την οξείδωση της λουμινόλης και την επακόλουθη εκπομπή ακτινοβολίας. Η εκπεμπόμενη ακτινοβολία ανιχνεύεται από την αμαύρωση που προκαλεί η πρόσπτωσή της σε φιλμ.



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της διαδικασίας ανάλυσης-ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

Πειραματική διαδικασία

- Πραγματοποίηση ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου
- Ξέπλυμα της πηκτής με διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για περίπου 15 λεπτά
Transfer Buffer: (3.03gr tris, 14.4gr glycine, 200ml methanol, water to 1L, pH 8.3)
- Προσθήκη μεμβράνης και διηθητικών χαρτιών σε διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer) για 15-30 λεπτά
- Συναρμολόγηση σάντουιτς:
 - Διηθητικό χαρτί (2 κομμάτια) στο κάτω μέρος
 - Μεμβράνη PVDF (polyvinylidene difluoride) (χωρίς φυσαλίδες αέρα)
 - Πηκτή πολυακρυλαμιδίου
 - Διηθητικό χαρτί (2 κομμάτια)
- Μεταφορά στο semi-dry transfer cell της Bio-Rad και ρύθμιση στα 15Volt για 25 λεπτά
- Πλύσιμο της μεμβράνης PVDF με ddH₂O και βαφή με τη χρωστική Ponceau για 5 λεπτά προκειμένου να ελεγχθεί η ύπαρξη πολυπεπτιδικών αλυσίδων και η ισοφόρτωση των δειγμάτων.
- Ξέπλυμα της μεμβράνης με λίγο ddH₂O προκειμένου να αφαιρεθεί η χρώση
- Επώαση της μεμβράνης με διάλυμα 5% γάλατος σε διάλυμα PBS-T (PBS, 0,1% Tween), για 1 ώρα προκειμένου να καλυφθούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης
- Επώαση της μεμβράνης με το πρωτογενές αντίσωμα, στους -4°C σε περιστρεφόμενο τροχό, για όλη τη νύχτα (το αντίσωμα διαλύεται σε διάλυμα 5% γάλατος σε PBS-T)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης μετά από 24 ώρες, 3 φορές για 10 λεπτά με PBS-T
- Επώαση της μεμβράνης με το δευτερογενές αντίσωμα (συνδεδεμένο με μόρια ενζύμου υπεροξειδάσης) για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (το αντίσωμα διαλύεται σε διάλυμα 5% γάλατος σε PBS-T)
- Ξέπλυμα της μεμβράνης 3 φορές για 10 λεπτά, με PBS-T.
- Ενεργοποίηση της μεμβράνης με χημειοφωταύγεια σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate της PIERCE:
 - Ανάμιξη διαλυμάτων Peroxidase Solution & Luminol/Enhancer Solution σε ίσους όγκους (1:1)
 - Επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα αυτό για 4-5 λεπτά και μεταφορά επάνω σε φωτογραφικό φιλμ μέσα σε ειδική κασέτα
 - Εμφάνιση του φιλμ μετά από 15-25 λεπτά

- ο Μεταφορά του φιλμ σε διάλυμα developer μέχρι να εμφανιστούν οι μπάντες των πρωτεϊνών, ξέπλυμα του φιλμ σε διάλυμα fixer και έπειτα σε απεσταγμένο νερό

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής: α) *πρώτα αντισώματα*: rabbit polyclonal anti- β -actin (1:1.000), rabbit polyclonal anti-bax (1:50) (Santa Cruz Biotechnology) β) *δεύτερο αντίσωμα*: HRP anti-rabbit (1:10.000) (Santa Cruz Biotechnology).

Επεξεργασία αποτελεσμάτων

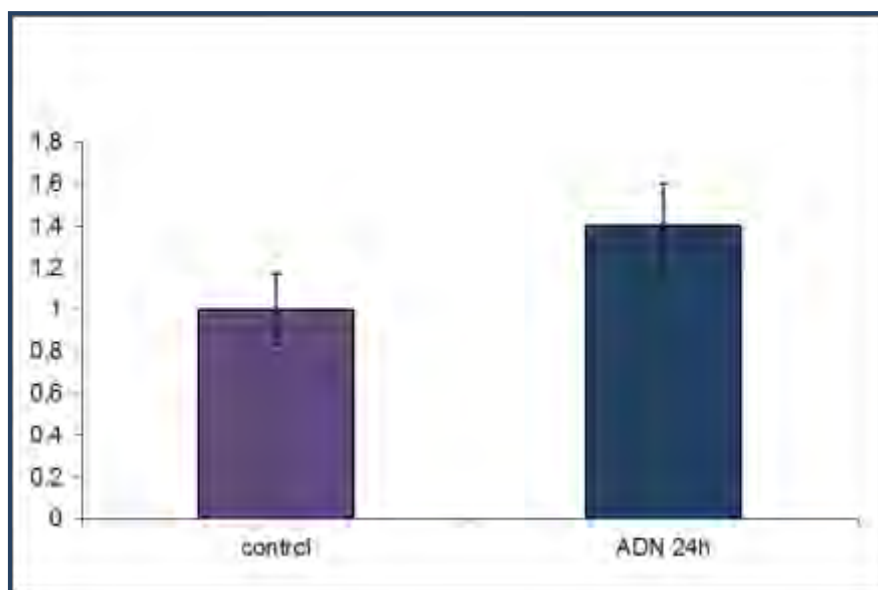
Η σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Scion Image (NIH Scion Image Analysis of western blots). Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μια διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία συγκρίνει τη σχετική ένταση διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα του φιλμ.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων του γονιδίου Bcl-2 μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη

Για την εξακρίβωση του ρόλου της αντιπυονεκτίνης στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε επίδραση με αντιπυονεκτίνη συγκέντρωσης 250ng/ml για 24 ώρες σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων πρώτου τριμήνου κύησης. Στη συνέχεια, έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων του γονιδίου του Bcl-2 με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

Με τη μέθοδο της (μερικής) ποσοτικοποίησης $\Delta\Delta C_t$ προέκυψαν τιμές για κάθε δείγμα οι οποίες αναπαριστώνται στο γράφημα της *Εικόνας 18*. Παρατηρήθηκε μία μικρή αύξηση των επιπέδων του mRNA του Bcl-2 στις 24 ώρες μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη σε σχέση με δείγμα ελέγχου τροφοβλαστικών κυττάρων στο οποίο δεν έγινε επίδραση με αντιπυονεκτίνη.



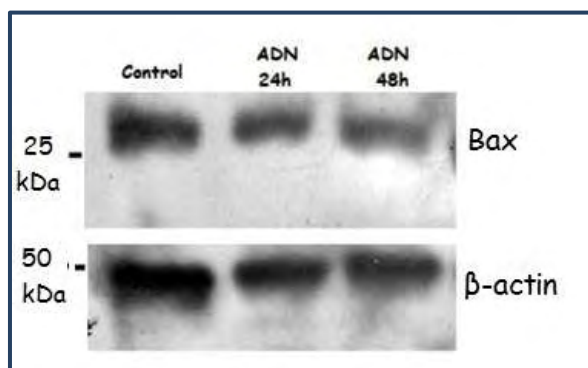
Εικόνα 18: Σχετική έκφραση mRNA Bcl-2 μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη (250ng/ml) στις 24 ώρες σε σχέση με δείγμα ελέγχου στο οποίο δεν έγινε κάποια επίδραση.

4.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη

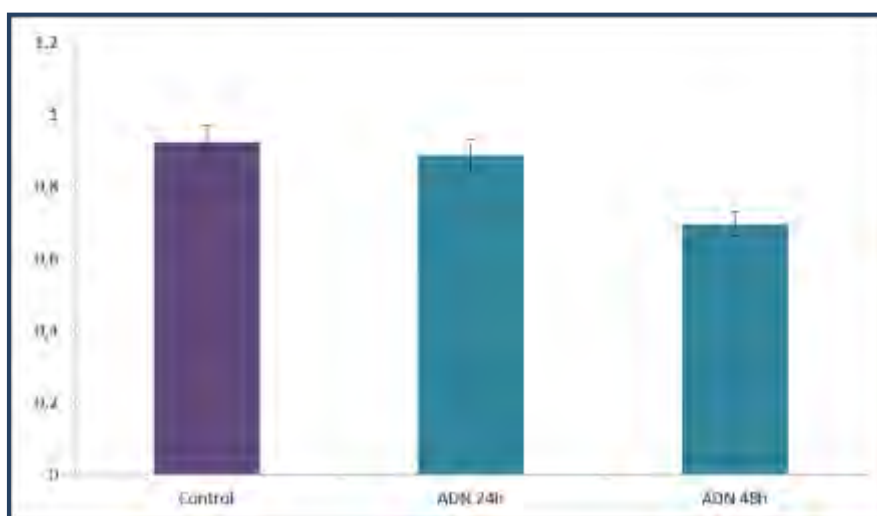
Για την εξακρίβωση του ρόλου της αντιπυονεκτίνης στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε επίδραση με αντιπυονεκτίνη

συγκέντρωσης 250ng/ml για 24 και 48 ώρες σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων πρώτου τριμήνου κύησης. Στη συνέχεια, έγινε προσδιορισμός των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (Western Blot).

Όπως παρατηρούμε την *Εικόνα 19* δεν φαίνεται να υπάρχει ουσιαστική διαφορά μεταξύ του δείγματος ελέγχου και των δειγμάτων στα οποία έγινε επίδραση με αντιπυονεκτίνη στις 24 και 48 ώρες αντίστοιχα. Μετά από σχετική ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων με τη βοήθεια του προγράμματος Scion Image προέκυψε το γράφημα της *Εικόνας 20*. Φαίνεται να υπάρχει μία μικρή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax στις 24 και 48 ώρες μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη σε σχέση με δείγμα ελέγχου τροφοβλαστικών κυττάρων στο οποίο δεν έγινε επίδραση με αντιπυονεκτίνη.



Εικόνα 19: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι του Bax και της β -actin σε δείγματα τροφοβλαστικών κυττάρων.



Εικόνα 20: Σχετική έκφραση της πρωτεΐνης Bcl-2 μετά από επίδραση με αντιπυονεκτίνη (250ng/ml) στις 24 και 48 ώρες σε σχέση με δείγμα ελέγχου στο οποίο δεν έγινε κάποια επίδραση.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο πλακούντας είναι ένα μεταβατικό όργανο που έχει πολυάριθμους και κρίσιμους ρόλους στη διατήρηση και προστασία του αναπτυσσόμενου εμβρύου καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (5). Διαταραχές της διαδικασίας της διαφοροποίησης και λειτουργίας της τροφοβλάστης, από την οποία προκύπτουν οι δομές του πλακούντα, έχουν συσχετιστεί με διαταραχές της κύησης (9).

Τα ανθρώπινα προγονικά κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης διαφοροποιούνται βάσει δύο γενικών μονοπατιών σε χοριακές τροφοβλάστες και σε διεισδυτικές εξωλαχνικές τροφοβλάστες. Η σύντηξη της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη (χοριακό λαχνικό μονοπάτι) είναι μία δυναμική διαδικασία η οποία συμβαίνει καθ' όλη τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και ελέγχεται αυστηρά (10). Η διαδικασία της διαφοροποίησης και σύντηξης των τροφοβλαστικών κυττάρων θεωρείται μία «τροποποιημένη μορφή» της απόπτωσης και περιλαμβάνει τη συμμετοχή μορίων που εμπλέκονται στον καταρράκτη της απόπτωσης, όπως είναι η οικογένεια των κασπασών και η οικογένεια του Bcl-2 (18).

Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε ρυθμίζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η σχετική πίεση οξυγόνου στην εμβρυομητρική διεπαφή και από ποικίλες ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, μεμβρανικές πρωτεΐνες, πρωτεϊνικές κινάσες, ενδοκυτταρικές πρωτεάσες και μεταγραφικούς παράγοντες (10). Ανάμεσα στις ορμόνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της διαφοροποίησης του τροφοβλαστικού ιστού συμπεριλαμβάνεται και η σημαντική οικογένεια των λιποκινών η οποία θα μπορούσε να εμπλέκεται στη ρύθμιση της διαφοροποιημένης μορφής απόπτωσης που πραγματοποιείται στον τροφοβλαστικό ιστό (18,69). Μία από αυτές, η αντιπυονεκτίνη παρουσιάζει αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες σε τροφοβλαστικά κύτταρα (129) και έχει φανεί ότι προάγει τη σύντηξη στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Επίσης, λειτουργεί ως ρυθμιστής της παραγωγής λεπτίνης και χοριακής γοναδοτροφίνης, δύο σημαντικές πλακουντιακές ορμόνες (140). Επιπλέον, η αύξηση της ενδοκυττάριας παραγωγής cAMP από το μονοπάτι PKA περιγράφεται ευρέως ως το κύριο σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης (144) και έχει βρεθεί ότι η αντιπυονεκτίνη επάγει τη διαφοροποίηση και τη σύντηξη των μυϊκών κυττάρων μέσω του μονοπατιού AMPK (145). Τέλος, το γεγονός ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση αποπτωτικών μονοπατιών, καθιστά πιθανή την εμπλοκή της στη ρύθμιση

του αποπτωτικού καταρράκτη που εμπλέκεται στη διαφοροποίηση του τροφοβλαστικού ιστού.

Έχει βρεθεί ότι οι συγκυτιοτροφοβλάστες εκφράζουν τον Bcl-2 σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με τις χοριακές κυτταροτροφοβλάστες κατά την εγκυμοσύνη (54,61,62) ενώ το αντίστροφο ισχύει για τον Bax (65). Συγκεκριμένα έχει προταθεί ότι η αύξηση του αναλογίας Bcl-2/Bax συμμετέχει στο μηχανισμό ανοχής της τροφοβλάστης στην απόπτωση. Στην παρούσα μελέτη, μετά από επίδραση της αντιπυονεκτίνης που προάγει τη διαφοροποίηση σε τροφοβλαστικά κύτταρα, υπήρξε μία ένδειξη μεταβολής της έκφρασης των Bcl-2 και Bax. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μικρή αύξηση των mRNA μεταγραφικών επιπέδων του Bcl-2 και μικρή μείωση των πρωτεϊνικών επιπέδων του Bax. Ωστόσο, χρειάζεται να γίνουν επιπλέον μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων για στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η αντιπυονεκτίνη συμμετέχει στη ρύθμιση της διαφοροποίησης της τροφοβλάστης μέσω αυτών των παραγόντων.

Τέλος, θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί εάν η αντιπυονεκτίνη σχετίζεται με άλλους παράγοντες που ενέχονται στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων όπως η κασπάση-8, η κασπάση-14 και άλλα μέλη της οικογένειας Bcl-2.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hubrecht AAW. Studies in mammalian embryology. I. The placentation of *Erinaceus europaeus*, with remarks on the phylogeny of the placenta. *Q J Microsc Sci.* 1989; 30:283e404.
2. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R (Eds). *Pathology of the Human Placenta, 5th edn.*: New York: Springer. 2006; ISBN 9780387267425.
3. Hess AP, Hamilton AE, Talbi S, Dosiou C, Nyegard M, Nayak N, Genbecev-Krtolica O, Mavrogianis P, Ferrer K, Kruessel J, Fazleabas AT, et al. Decidual stromal cell response to paracrine signals from the trophoblast: amplification of immune. *Biol Reprod.* 2007; 76(1):102-17.
4. Khorram, O. Nitric oxide and its role in blastocyst implantation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002; 3(2):145-149.
5. Kay HH, Nelson DM, Wang Y (Eds). *From Development to Disease: The Placenta* 1st edn. Oxford: John Wiley & Sons. 2011; ISBN 9781444393927.
6. Cross, JC. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 857,23–32.
7. Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta 23 (Suppl.A).* 2002; S119–S129.
8. Castellucci M, Kosanke G, Verdenelli F, Huppertz B, Kaufmann P. Villous sprouting: fundamental mechanisms of human placental development. *Hum Reprod Update.* 2000; 16(5):485-494.
9. Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol.* 2007; 5:6.
10. Ji L, Brkić J, Liu M, Fu G, Peng C, Wang YL. Placental trophoblast cell differentiation: Physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol Aspects Med.* 2013; 34(5):981-1023.
11. Bokoch, GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood.* 1995; 86(5):1649-60.

12. Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ. Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. *J Clin Invest.* 1999; 103(2):1641-1650.
13. Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol.* 2000; 23(2):217-237.
14. Graham CH, Lala PK. Mechanisms of placental invasion of the uterus and their control. *Biochem Cell Biol.* 1992; 70(10-11):867-74.
15. Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod.* 2003; 69(1):1-7.
16. Teasdale F, Jean-Jacques G. Morphometric evaluation of the microvillous surface enlargement factor in the human placenta from mid-gestation to term. *Placenta.* 1985; 6(5):375-81.
17. Nakamura, O. Children's immunology, what can we learn from animal studies (1): decidual cells induce specific immune system of feto-maternal interface. *J Toxicol Sci.* 2009; 34 Suppl 2:SP331-9.
18. Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom J. Apoptosis and its role in the trophoblast. *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195(1):29-39.
19. Knofler, M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol.* 2010; 54(2-3):269-80.
20. Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA. The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. *Am J Obstet Gynecol.* 2002; 187(5):1416-1423.
21. Lyall, F. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet. Gynaecol.* 2006; 46 (4), 266–273.
22. Moffet-King, A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(9):656-663.
23. Getsios S, Chen GT, MacCalman CD. Regulation of beta-catenin mRNA and protein levels in human villous cytotrophoblasts undergoing aggregation and

- fusion in vitro: correlation with E-cadherin expression. *J Reprod Fertil.* 2000; 119(1):59-68.
24. Chang C, Chen PT, Chang GD, Huang CJ, Chen H. Functional characterization of the placental fusogenic membrane protein syncytin. *Biol Reprod.* 2004; 71(6):1956-1962.
 25. Chen CP, Chen LF, Yang SR, Chen CY, Ko CC, Chang GD, Chen H. Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biol Reprod.* 2008; 79(5):815-823.
 26. Strauss JF, Kido S, Sayegh R, Sakuragi N, Gafvels ME. The cAMP signalling system and human trophoblast function. *Placenta.* 1992; 13(5):389-403.
 27. Baczyk D, Drewlo S, Proctor L, Dunk C, Lye S, Kingdom J. Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death Differ.* 2009; 16(5):719-27.
 28. Baczyk D, Satkunarathnam A, Nait-Oumesmar B, Huppertz B, Cross JC, Kingdom JC. Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta.* 2004; 25(6):553-9.
 29. Lash GE, Postovit LM, Matthews NE, Chung EY, Canning MT, Pross H, Adams MA, Graham CH. Oxygen as a regulator of cellular phenotypes in pregnancy and cancer. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002; 80(2):103-9.
 30. Paulding WR, Czyzyk-Krzeska MF. Hypoxia-induced regulation of mRNA stability. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 475:111-120.
 31. Dunk C, Shams M, Nijjar S, Rhaman M, Qiu Y, Bussolati B, Ahmed A. Angiopoietin-1 and angiopoietin-2 activate trophoblast Tie-2 to promote growth and migration during placental development. *Am J Pathol.* 2000; 156(6):2185-99.
 32. Fukushima K, Miyamoto S, Tsukimori K, Kobayashi H, Seki H, Takeda S, Kensuke E, Ohtani K, Shibuya M, Nakano H. Tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor induce endothelialIntiation and apoptosis in a human extravillous trophoblastcell line. *Biol Reprod.* 2005; 73:172-179. *Biol Reprod.* 2005; 73(1):172-9.

33. Caniggia I, Taylor CV, Ritchie JW, Lye SJ, Letarte M. Endoglin regulates trophoblast differentiation along the invasive pathway in human placental villous explants. *Endocrinology*. 1997; 138(11):4977-88.
34. Leisser C, Saleh L, Haider S, Husslein H, Sonderegger S, Knofler M. Tumor necrosis factor-alpha impairs chorionic gonadotrophin beta-subunit expression and cell fusion of human villous. *Mol Hum Reprod*. 2006; 12(10):601-9.
35. Daleke DL. Phospholipid flippases. *J Biol Chem*. 2007; 282(2):821-5.
36. Rote NS, Wei BR, Xua C, Luo L. Caspase 8 and Human Villous Cytotrophoblast Differentiation. *Placenta*. 2010; 31(2):89-96.
37. Lewin B. *Genes VIII*. : Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. 2004; ISBN: 960-88412-0-8.
38. Aggarwal, BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003 ;3(9):745-56.
39. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J*. 1995; 14(22):5579-88.
40. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995; 80(2):293-9.
41. Sprick MR, Walczak H. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1644(2-3):125-32.
42. Straszewski-Chavez L, Abrahams V, Mor G. The role of apoptosis in the regulation of trophoblast survival and differentiation during pregnancy. *Endocr Rev*. 2005; 26(7):877-97.
43. Νομικός Α, Μυλωνά Ε, Νακοπούλου Λ. Απόπτωση, καρκίνος και νέες στοχευμένες θεραπείες. *Αρχεία Παθολογικής Ανατομικής*. 2006; 20(1-3):4-13.
44. Jesenberger V, Jentsch S. Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 3(2):112-21.

45. Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(25):14681-6.
46. Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13–41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta*. 1999; 20(5-6):407-22.
47. Smith SC, Leung TN, To KF, Baker PN. Apoptosis is a rare event in first-trimester placental tissue. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183(3):697-9.
48. Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC. A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol*. 1998; 140(1):153-8.
49. Gandarillas A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol*. 2000 ; 35(1):53-62.
50. Fernando P, Kelly JF, Balazsi K, Slack RS, Megeney LA. Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(17):11025-30.
51. Arama E, Agapite J, Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in *Drosophila*. *Dev Cell*. 2003; 4(5):687-97.
52. Mogi M, Togari A. Activation of caspases is required for osteoblastic differentiation. *J Biol Chem*. 2003; 278(48):47477-82.
53. White L, Dharmarajan A, Charles A. Caspase-14: a new player in cytotrophoblast differentiation. *Reprod Biomed Online*. 2007; 14(3):300-7.
54. Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol*. 1998; 110(5):495-508.
55. Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous

- cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest.* 1999; 79(12):1687-702.
56. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ.* 2004; 11(1):90-8.
57. Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatr Res.* 2002; 52(3):411-5.
58. Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2002; 21(14):3704-14.
59. Ka H, Hunt JS. FLICE-inhibitory protein: expression in early and late gestation human placentas. *Placenta.* 2006; 27(6-7):626-34.
60. Sakuragi N, Matsuo H, Coukos G, Furth EE, Bronner MP, VanArsdale CM, Krajewsky S, Reed JC, Strauss JF. Differentiation-dependent expression of the BCL-2 proto-oncogene in the human trophoblast lineage. *J Soc Gynecol Investig.* 1994; 1(2):164-72.
61. Kim CJ, Choe YJ, Yoon BH, Kim CW, Chi JG. Patterns of bcl-2 expression in placenta. *Pathol Res Pract.* 1995; 191(12):1239-44.
62. Danihel L, Gomolcak P, Korbel M, Pruzinec J, Vojtassak J, Janik P, Babal P. Expression of proliferation and apoptotic markers in human placenta during pregnancy. *Acta Histochem.* 2002; 104(4):335-8.
63. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med.* 1998; 187(4):587-600.
64. Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(1):57-65.

65. De Falco M, De Luca L, Acanfora F, Cavallotti I, Cottone G, Laforgia V, De Luca B, Baldi A, De Luca A. Alteration of the Bcl-2:Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds. *Histochem J.* 2001; 33(7):421-5.
66. Wei BR, Xu C, Rote N. Increased resistance to apoptosis during differentiation and syncytialization of BeWo choriocarcinoma cells. *Adv Biosci Biotechnol.* 2012; 3, 805-813.
67. Santos E, Pecquery R, de Mazancourt P, Dieudonné MN. Adiponectin and Reproduction. *Vitam Horm.* 2012; 90:187-209.
68. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology.* 2007; 132(6):2169-80.
69. Ippolito S, Tersigni C, Scambia G, Simone N. Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy. *Biofactors.* 2012; 38(1):14-23.
70. Campos DB, Palin MF, Bordignon V, Murphy PD. The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes (Lond).* 2008; 32(2):223-31.
71. Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ. Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. *Endocr Relat Cancer.* 2007; 14(3):713-20.
72. Hoggard N, Haggarty P, Thomas L, Lea RG (2001). Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role? *Biochem Soc Trans.* 2001; 29(Pt 2):57-63.
73. Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y. Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology.* 2006; 147(7):3203-10.
74. Alfer J, Muller-Schottle F, Classen-Linke I, von Rango U, Happel L, Beier-Hellwig K, Rath W, Beier HM. The endometrium as a novel target for leptin: differences in fertility and subfertility. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(7):595-601.

75. Gonzalez RR, Simon C, Caballero-Campo P, Norman R, Chardonnens D, Devoto L, Bischof P. Leptin and reproduction. *Hum Reprod Update*. 2000; 6(3):290-300.
76. Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose most abundant gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 221(2):286-9.
77. Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem*. 1996; 120(4):803-12.
78. Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem*. 1996; 271(18):10697-703.
79. Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*. 1995; 270(45):26746-9.
80. Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin—its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res*. 2002; 4(9):469-74.
81. Kern PA, Di Gregorio GB, Lu T, Rassouli N, Ranganathan G. Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes*. 2003; 52(7):1779-85.
82. Gavrilu A, Peng CK, Chan JL, Mietus JE, Goldberger AL. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(6):2838-43.
83. Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Klebanov S, Iyengar P, Jimenez-Chillaron JC, Patti ME, Klein SL, Weinstein RS, Scherer PE. Sexual differentiation, pregnancy, calorie restriction, and aging affect the adipocyte-specific secretory protein adiponectin. *Diabetes*. 2003; 52(2):268-76.
84. Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, Matsuda M, Kondo H, Furuyama N, Kihara S, Nakamura T, Tochino Y,

- Funahashi T, Matsuzawa Y. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*. 2002; 51(9):2734-41.
85. Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE. Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2009; 92(4):1389-94.
86. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, Hotta K, Shimomura I, Nakamura T, Miyaoka K, Kuriyama H, Nishida M, Yamashita S, Okubo K, Matsubara K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257(1):79-83.
87. Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, Hotta K, Matsuzawa Y, Pratley RE, Tataranni PA. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: Close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(5):1930-5.
88. Yang WS, Lee WJ, Funahashi T, Tanaka S, Matsuzawa Y, Chao CL, Chen CL, Tai TY, Chuang LM. Weight reduction increases plasma levels of an adipose-derived anti-inflammatory protein, adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86(8):3815-9.
89. Wang Y, Lam KS, Yau MH, Xu A. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem J*. 2008; 409(3):623-33.
90. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Tsuchida A, Yokomizo T, Kita S, Sugiyama T, Miyagishi M, Hara K, Tsunoda M, Murakami K, Ohteki T, Uchida S, Takekawa S, Waki H, Tsuno NH, Shibata Y, Terauchi Y, Froguel P, Tobe K, Koyasu S, Taira K, Kitamura T, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2004 ;431(7012):1123.
91. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6(10):772-83.
92. Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res*. 2005; 46(7):1369-79.

93. Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine Reviews*. 2005; 26(3):439-51.
94. Crouch E, Persson A, Chang D, Heuser J. Molecular structure of pulmonary surfactant protein D (SP-D). *J Biol Chem*. 1994; 269(25):17311-9.
95. McCormack FX, Pattanajitvilai S, Stewart J, Possmayer F, Inchley K, Voelker DR. The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J Biol Chem*. 1997; 272(44):27971-9.
96. Wong GW, Wang J, Hug C, Tsao TS, Lodish HF. A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(28):10302-7.
97. Berg AH, Combs TP, Scherer PE. Acrp30/ adiponectin: an adipocytokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13(2):84-9.
98. Heiker JT, Kosel D, Beck-Sickinger AG. Molecular mechanisms of signal transduction via adiponectin and adiponectin receptors. *Biol Chem*. 2010; 391(9):1005-18.
99. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Kita S, Ito Y, Hada Y, Uchida S, Tsuchida A, Takekawa S, Kadowaki T. Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*. 2005; 146(2):790-6.
100. Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T. Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 356(2):487-93.
101. Wang Y, Xu A, Knight C, Xu LY, Cooper GJ. Hydroxylation and glycosylation of the four conserved lysine residues in the collagenous domain of adiponectin. Potential role in the modulation of its insulin-sensitizing activity. *J Biol Chem*. 2002; 277(22):19521-9.
102. Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J*. 2009; 425(1):41-52.

- 103.** Wang H, Qiang L, Farmer SR. Identification of a domain within peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulating expression of a group of genes containing fibroblast growth factor 21 that are selectively repressed by SIRT1 in adipocytes. *Mol Cell Biol.* 2008; 28(1):188-200.
- 104.** Pajvani UB, Du X, Combs TP, Berg AH, Rajala MW, Schulthess T, Engel J, Brownlee M, Scherer PE. Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem.* 2003; 278(11):9073-85.
- 105.** Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res.* 2004; 94(4):e27-31.
- 106.** Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(4):2005-10.
- 107.** Goldstein BJ, Scalia RG, Ma XL. Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2009; 6(1):27-35.
- 108.** Tang YT, Hu T, Arterburn M, Boyle B, Bright JM, Emtage PC, Funk WD. PAQR proteins: a novel membrane receptor family defined by an ancient 7-transmembrane pass motif. *J Mol Evol.* 2005; 61(3):372-80.
- 109.** Wheelock MJ, Johnson KR. Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003; 19:207-35.
- 110.** Kadowaki T, Yamauchi T, Kubota N, Hara K, Ueki K, Tobe K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2006; 116(7):1784-92.
- 111.** Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med.* 2002; 8(11):1288-95.

- 112.** Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(28):10308-13.
- 113.** Deepa SS, Dong LQ. APPL1: Role in adiponectin signaling and beyond. *American Journal of Physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; 296(1):E22-36.
- 114.** Wang C, Xin X, Xiang R, Ramos FJ, Liu M, Lee HJ, Chen H, Mao X, Kikani CK, Liu F, Dong LQ. Yin-Yang Regulation of Adiponectin Signaling by APPL. *J Biol Chem.* 2009; 284(46):31608-15.
- 115.** Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005; 1(1):15-25.
- 116.** Foretz M, Taleux N, Guigas B, Horman S, Beauloye C, Andreelli F, Bertrand L, Viollet B. Regulation of energy metabolism by AMPK: A novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases. *Med Sci (Paris).* 2006; 22(4):381-8.
- 117.** Palanivel R, Fang X, Park M, Eguchi M, Pallan S, De Girolamo S, Liu Y, Wang Y, Xu A, Sweeney G. Globular and full-length forms of adiponectin mediate specific changes in glucose and fatty acid uptake and metabolism in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2007; 75(1):148-57.
- 118.** Schmid PM, Resch M, Steege A, Fredersdorf-Hahn S, Stoelcker B, Birner C, Schach C, Buechler C, Riegger GA, Luchner A, Endemann DH. Globular and full-length adiponectin induce NO-dependent vasodilation in resistance arteries of Zucker lean but not Zucker diabetic fatty rats. *Am J Hypertens.* 2011; 24(3):270-7.
- 119.** Bobbert P, Antoniak S, Schultheiss HP, Rauch U. Globular adiponectin but not full-length adiponectin induces increased procoagulability in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2008; 44(2):388-94.
- 120.** Jones HN, Jansson T, Powell TL. Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino Acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes.* 2010; 59(5):1161-70.

121. Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, Hara K, Hada Y, Vasseur F, Froguel P, Kimura S, Nagai R, Kadowaki T. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem.* 2003; 278(41):40352-63.
122. Lord E, Ledoux S, Murphy BD, Beaudry D, Palin MF. Expression of adiponectin and its receptors in swine. *J Anim Sci.* 2005; 83(3):565-78.
123. Peake PW, Kriketos AD, Campbell LV, Shen Y, Charlesworth JA. The metabolism of isoforms of human adiponectin: Studies in human subjects and in experimental animals. *Eur J Endocrinol.* 2005; 153(3):409-17.
124. Bombardieri DA, Wielgos M, Horosz E, Bartkowiak R, Kosinski P, Bochenska K. Placental first trimester's measurements in relation to maternal plasma adiponectin, leptin and insulin concentrations. *Neuro Endocrinol Lett.* 2010; 31(4):573-6.
125. Cortelazzi D, Corbetta S, Ronzoni S, Pelle F, Marconi A, Cozzi V, Cetin I, Cortelazzi R, Beck-Peccoz P, Spada A. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007; 66(3):447-53. 2007.
126. Thyfault JP, Hedberg EM, Anchan RM, Thorne OP, Isler CM, Newton ER, Dohm GL, deVente JE. Gestational diabetes is associated with depressed adiponectin levels. *J Soc Gynecol Investig.* 2005; 12(1):41-5.
127. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci.* 2009; 16(10):921-37.
128. Caminos JE, Nogueiras R, Gallego R, Bravo S, Tovar S, García-Caballero T, Casanueva FF, Diéguez C. Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(7):4276-86.
129. Benaitreau D, Dieudonne MN, Dos Santos E, Leneuve MC, Mazancourt P, Pecquery R. Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biol Reprod.* 2009; 80(6):1107-14.

130. Lappas M, Yee K, Permezel M, Rice GE. Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus complicated pregnancies. *J Endocrinol.* 2005; 186(3):457-65.
131. McDonald EA, Wolfe MW. Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology.* 2009; 150(9):4358-65.
132. Wang Y, Lu G, Wong WP, Vliegenthart JF, Gerwig GJ, Lam KS, Cooper GJ, Xu A. Proteomic and functional characterization of endogenous adiponectin purified from fetal bovine serum. *Proteomics.* 2004; 4(12):3933-42.
133. Hull HR, Dinger MK, Knehans AW, Thompson DM, Fields DA. Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 198(4):416.e1-6.
134. Gaccioli F, Lager S, Powell TL, Jansson T. Placental transport in response to altered maternal nutrition. *J Dev Origins Health Dis.* 2012; pp101-115.
135. Jansson N, Nilsfelt A, Gellerstedt M, Wennergren M, Rossander-Hulthén L, Powell TL, Jansson T. Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(6):1743-9.
136. Lowe, LP, Metzger BE, Lowe Jr WL, Dyer AR, McDade TW, McIntyre HD. Inflammatory mediators and glucose in pregnancy: results from a subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95(12):5427-34.
137. Atègbo JM, Grissa O, Yessoufou A, Hichami A, Dramane KL, Moutairou K, Miled A, Grissa A, Jerbi M, Tabka Z, Khan NA. Modulation of adipokines and cytokines in gestational diabetes and macrosomia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 ; 91(10):4137-43.
138. Rosario FJ, Schumacher MA, Jiang J, Kanai Y, Powell TL, Jansson T. Chronic maternal infusion of full-length adiponectin in pregnant mice down-regulates placental amino acid transporter activity and expression and decreases fetal growth. *J Physiol.* 2012; 590(Pt 6):1495-509.

139. Tie W, Yu H, Chen J, Wang X, Chen W, Zhou R. Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia. *Reprod Sci.* 2009; 16(7):676-84.
140. Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu MC, De Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonne MN. Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8:128.
141. Aye IL, Powell TL, Jansson T. Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta.* 2013; 34 Suppl:S40-5.
142. Aye IL, Powell TL, Jansson T. Review: Adiponectin--the missing link between maternal adiposity, placental transport and fetal growth? *Placenta.* 2013; 34 Suppl:S40-5.
143. McDonald EA, Wolfe MW. The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal-fetal interface. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 66(2):128-36.
144. Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D. Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci.* 1998; 111(Pt 7):995-1004.
145. Fiaschi T, Cirelli D, Comito G, Gelmini S, Ramponi G, Serio M, Chiarugi P. Globular adiponectin induces differentiation and fusion of skeletal muscle cells. *Cell Res.* 2009; 19(5):584-97.
146. Gibson UE, Heid CA, et al. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10):995-1001.