

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ - ΠΑΙΔΙΟΥ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΛΕΠΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΣΥΓΚΥΤΙΝΗΣ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΟΥ
ΠΛΑΚΟΥΝΤΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ Β. ΜΟΥΣΙΩΛΗΣ
ΕΙΔΙΚΕΥΟΜΕΝΟΣ ΙΑΤΡΟΣ ΣΤΗ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ- ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ
20 ΟΚΤΩΒΡΙΟΥ 2011**

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
Α. ΛΕΠΤΙΝΗ.....	12
Γενικά.....	12
Παραγωγή λεπτίνης.....	12
Δομή γονιδίου- Ρύθμιση έκφρασης του γονιδίου.....	13
Δομή πρωτεΐνης	13
Ρύθμιση έκκρισης λεπτίνης.....	14
Ρύθμιση κυκλοφορίας λεπτίνης- Πρωτεΐνες δέσμησης.....	15
Λεπτίνη και αναπαραγωγή.....	16
Υποδοχείς λεπτίνης.....	18
Εντόπιση υποδοχέων λεπτίνης.....	20
Σύνδεση λεπτίνης- υποδοχέων- Μεταφορά σήματος	21
Β. Λιπαρά οξέα και εγκυμοσύνη.....	25
Σχηματισμός λιπαρών οξέων	25
Μηχανισμοί μεταφοράς των λιπαρών οξέων	27
Μεμβρανικές πρωτεΐνες	28
Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	29
Συνδυασμένη δράση μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών FABP.....	31
Πρωτεΐνες δέσμησης και μεταφορά των λιπαρών οξέων στον πλακούντα	31
Μεταβολισμός των λιπαρών οξέων στον πλακούντα.....	33
Μηχανισμοί εκλεκτικής μεταφοράς των LCPUFA στον πλακούντα.....	33
Γ. Συγκυτίνες 1,2 και υποδοχείς ASCT 1, 2	36
Συγκυτίνη 1.....	36
Γενικά.....	36
Μορφή και δομή της συγκυτίνης 1	36
Ρόλος της συγκυτίνης 1 στον πλακούντα.....	39
Εντόπιση της συγκυτίνης 1 στον πλακούντα.....	39
Ρύθμιση έκφρασης συγκυτίνης 1 και σύντηξης τροφοβλαστικών κυττάρων	40
Συγκυτίνη 2.....	41
Γενικά.....	41
Μορφή και δομή της συγκυτίνης 2	42
Εντόπιση της συγκυτίνης 2 στον πλακούντα.....	42
Ρόλος της συγκυτίνης 2.....	43
Υποδοχείς συγκυτίνης 1 (ASCT)	44
Υποδοχέας ASCT1	44

Μορφή, δομή, μεταβολικοί δρόμοι του υποδοχέα ASCT1	44
Ρόλος του υποδοχέα ASCT1	44
Υποδοχέας ASCT2	46
Γενικά.....	46
Μορφή, δομή και μεταβολικοί δρόμοι του υποδοχέα ASCT2	46
Ρόλος του υποδοχέα ASCT2	47
Αλληλεπίδραση συγκυτιοτροφοβλάστης με κυτταροτροφοβλάστη	47
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	50
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
Λήψη υλικού.....	51
Πρωτόκολλο καλλιέργειας.....	51
Πρωτόκολλο επανακαλλιέργειας	52
Υπολογισμός επιπέδων β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG) σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων.....	52
Εκχύλιση RNA τροφοβλαστικών κυττάρων	53
Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)	54
Αντίστροφη μεταγραφάση- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)	56
Συνθήκες αντίδρασης ενίσχυσης της λεπτίνης:.....	56
Καθαρισμός των προϊόντων PCR	57
Ανάλυση αλληλουχίας των προϊόντων PCR	58
Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων- στόχων με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	59
Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	59
Α. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.....	61
Β. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης	61
Γ. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού.....	63
Ανάλυση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων με την τεχνική RT-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.	67
Α. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA	67
Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση	67
Β. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR	68
Κυτταρομετρική ανάλυση του φαινοτύπου.....	71
Απομόνωση πρωτεϊνών	71
Western blot ανάλυση	72
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	74
Υπολογισμός επιπέδων β-hCG σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων	74
Μέτρηση κυτοκερατίνης-7.....	74
Έκφραση των γονιδίων λεπτίνης και υποδοχέων λεπτίνης σε τροφοβλαστικό ιστό πριν και μετά καλλιέργεια	75

Ποσοτική έκφραση των γονιδίων λεπτίνης και υποδοχέων λεπτίνης.....	76
Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης H- FABP σε τροφοβλαστικό ιστό.....	83
Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης L- FABP σε τροφοβλαστικό ιστό.....	83
Έκφραση της πρωτεΐνης H- FABP.....	84
Έκφραση της πρωτεΐνης L- FABP	85
Έκφραση του πρωτεϊνικού μορίου FAT/ CD36.....	85
Έκφραση των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2.....	86
Ποσοτική έκφραση των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2	87
Επίδραση της φορσκολίνης (forskolin) στην έκφραση των μορίων της συγκυτίνης 1, 2 και των ASCT1 και 2.....	88
Επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση των μορίων της συγκυτίνης 1, 2 και των ASCT1 και 2.....	89
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	93
Καλλιέργειες κυττάρων. Παραγωγή β-hCG και κυτοκερατίνης.....	93
Λιπαρά οξέα	95
Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (H- FABP, L- FABP).....	95
Διαμεμβρανική πρωτεΐνη FAT/CD36 και ενδοκυττάρια δεξαμενή αυτής.....	97
Συγκυτίνες και υποδοχείς αυτών.....	98
Διαφορική έκφραση των συγκυτινών σε συγκύτιο και κυτταροτροφοβλαστη	98
Υποδοχείς συγκυτίνης 1	99
Προτεινόμενο μοντέλο ρόλου και αλληλεπίδρασης συγκυτινών	99
Επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση των μορίων συγκυτίνης 1, 2 και των υποδοχέων ASCT1, 2	101
Επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης στην έκφραση των υποδοχέων λεπτίνης	102
Επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης φορσκολίνης στην έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων αυτής.....	104
Προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης λεπτίνης, υποδοχέων αυτής και πρωτεΐνης FAT/ CD36.	104
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	106
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	108
ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ- ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ.....	117
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	118
SUMMARY	120

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- 1) Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής
- 2) Αθανάσιος Καλλιτσάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 3) Παναγούλα Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) Ιωάννης Ε. Μεσσήνης, Καθηγητής, Επιβλέπων
- 2) Αθανάσιος Καλλιτσάρης, Αναπληρωτής Καθηγητής, Μέλος της Τριμελούς
- 3) Παναγούλα Κόλλια, Επίκουρη Καθηγήτρια, Μέλος της Τριμελούς
- 4) Γεώργιος Συρογιαννόπουλος, Καθηγητής
- 5) Γεώργιος Κουκούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 6) Αντώνιος Γούναρης, Αναπληρωτής Καθηγητής
- 7) Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο πλακούντας είναι ένα όργανο μοναδικής αξίας. Επιτελεί ένα πλήθος λειτουργιών, δρώντας ως ενδοκρινής αδένας, τμήμα του κυκλοφορικού συστήματος του εμβρύου, ως ανοσορυθμιστικό όργανο καθώς και συμμετέχοντας στη μεταφορά θρεπτικών ουσιών/μεταβολιτών και οξυγόνου προς και από το έμβρυο. Επιχειρήσαμε να αποκρυπτογραφήσουμε επιπλέον μέρος των λειτουργιών μεταφοράς θρεπτικών ουσιών και πως η λεπτίνη επιδρά σε αυτές. Επιπλέον, περιγράψαμε την έκφραση της συγκυτίνης 1 και 2, μορίων που εκφράζονται στον πλακούντα και των οποίων ο ρόλος δεν έχει αποκρυπτογραφηθεί πλήρως ακόμα.

Είναι γνωστό ότι το αναπτυσσόμενο έμβρυο έχει ανάγκη τα λιπαρά οξέα για την ανάπτυξη του. Ο ρόλος του πλακούντα σε αυτή τη διαδικασία δεν είναι επακριβώς γνωστός. Θεωρείται ότι ενδεχομένως το μητρικό λίπος κινητοποιείται από τη λεπτίνη του πλακούντα. Στον πλακούντα έχει διαπιστωθεί η παρουσία ενός συστήματος μεμβρανικών πρωτεϊνών δέσμευσης λιπαρών οξέων (fatty acid binding proteins, FABPs) που διευκολύνει τη διαδικασία μεταφοράς τους και περιλαμβάνει την μεμβρανική και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες δέσμευσης λιπαρών οξέων (plasma membrane fatty acid binding proteins, FABPs). Η παρουσία του συστήματος των πρωτεϊνών FABP στην συγκυτιοτροφοβλάστη φαίνεται να διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην εκλεκτική αυτή μεταφορά των λιπαρών οξέων μέσω του πλακούντα.

Αντικείμενο της μελέτης αυτής ήταν να διευκρινισθεί ο μηχανισμός εκλεκτικής μεταφοράς λιπαρών οξέων δια του πλακούντα και ο πιθανός ρόλος της λεπτίνης στη διαδικασία αυτή. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε, σε κύτταρα κυτταροτροφοβλάστης, η επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση των πρωτεϊνών FAT και των κυτταροπλασματικών FABP, τόσο σε επίπεδο πρωτεΐνης, όσο και σε επίπεδο γονιδίου.

Σε ότι αφορά στις συγκυτίνες, διαπιστώθηκε ο ρόλος τους σε διαδικασίες διαφοροποίησης από την κυτταροτροφοβλάστη προς συγκυτιοτροφοβλάστη ενώ θεωρείται ότι συμμετέχουν σε ανοσιακούς μηχανισμούς και στη διαδικασία εμφύτευσης του πλακούντα. Θελήσαμε να μελετήσουμε ταυτόχρονα την έκφρασή τους σε διαφοροποιημένα και μη τροφοβλαστικά κύτταρα καθώς και την τυχόν αλληλεπίδρασή τους με το μόριο της λεπτίνης. Τα συμπεράσματά μας πιθανόν να φωτίσουν μέχρι τώρα άγνωστες πτυχές της λειτουργίας τους.

Ξεκινώντας την εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής, είχα ως δεδομένο ότι ένα τέτοιο επιστημονικό έργο απαιτεί τη μέγιστη πνευματική καταπόνηση. Στην πορεία διαπίστωσα ότι απαιτούνται εξίσου τεράστια σωματικά και ψυχικά αποθέματα. Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής, χρειάστηκε να κινητοποιήσω το μέγιστο των πνευματικών, ψυχικών, σωματικών, οργανωτικών και άλλων ικανοτήτων μου, δείχνοντας μου τα όρια μου και συμβάλλοντας στην αυτογνωσία μου. Επιπλέον, γνώρισα ανθρώπους υψηλού επιστημονικού και πνευματικού επιπέδου που εκτίμησα απεριόριστα.

Οι δυσκολίες ήταν πολλές και η πορεία δύσκολη: πράγματι, από τις πρώτες αποτυχημένες προσπάθειες κυτταροκαλλιιεργειών, τις απογοητεύσεις από τα αποτελέσματα των πειραματικών μεθόδων, τις δυσκολίες κατανόησης των τεχνικών μοριακής βιολογίας μέχρι την αποδοχή των δημοσιεύσεων, τη συγγραφή της τελευταίας παραγράφου και την παρουσίασης της διατριβής μεσολάβησε ένα μεγάλο χρονικό διάστημα και αρκετοί άνθρωποι που συν-ετέλεσαν στην επίτευξη του στόχου.

Πρώτα και κύρια, θα ήθελα να ευχαριστήσω το σεβαστό Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Ιωάννη Μεσσήνη. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ σε ένα τόσο υψηλό επίπεδο, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής. Η συμβολή του ήταν καθοριστική από την έμπνευση της ιδέας μέχρι και την προσπέραση των εκάστοτε εμφανιζόμενων εμποδίων στην πορεία και η αρωγή του αενάως παρούσα. Στο χρονικό διάστημα της εργασίας μου κάτω από τις οδηγίες του, θεωρώ ότι αποκόμισα κάτι από τον τρόπο σκέψης και δράσης του. Η εμπειρία αυτή ήταν πολύτιμη και θα με συνοδεύει στο υπόλοιπο της επιστημονικής μου σταδιοδρομίας.

Κατόπιν, θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτατες ευχαριστίες μου στην Επίκουρη Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής του Ανθρώπου, κα Παναγούλα Κόλλια. Ο ρόλος της ήταν πολλαπλός: με μύησε στον κόσμο της Μοριακής Βιολογίας (μέχρι τότε αόρατος, απροσπέλαστος και γνωστός μόνο από τα συγγράμματα), με δίδαξε τον τρόπο σκέψης στον τομέα αυτό και με καθοδήγησε σε όλη τη διάρκεια της διατριβής. Ήταν δίπλα μου σε καθημερινή βάση και με στήριξε ακόμη και ψυχολογικά όταν εμφανίζονταν (φαινομενικά) απροσπέλαστες δυσκολίες. Με το προσωπικό της παράδειγμα αφοσίωσης και αγάπης για το αντικείμενο της, ενέπνευσε και εμένα για να ανακαλύψω τα όρια μου και να τα επεκτείνω.

Κατόπιν, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τη Λέκτορα Μαιευτικής-Γυναικολογίας, κα Χαρά Σκέντου. Η συμμετοχή της ήταν καθοριστικότερη στην εκπόνηση της διατριβής. Τις οφείλω πολλά και αποτελεί τιμή μου η συνεργασία μαζί της.

Ευχαριστώ όλους όσους βοήθησαν, με διάφορους τρόπους στην ολοκλήρωση της διατριβής μου. Την Διδάκτορα Πνευμονολογίας κα Ανδριάννα Παπαιωάννου, τη Λέκτορα Παθολογικής Ανατομικής κα Μαρία Σαμαρά, τη Διδάκτορα Μοριακής Βιολογίας κα Ελένη Κατσιάνη καθώς και τη Διδάκτορα Μοριακής Βιολογίας κα Ιωάννα Χιώτογλου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κ Αθανάσιο Καλλιτσάρη που σαν μέλος της Τριμελούς Επιτροπής συνέβαλε στην πραγματοποίηση της διδακτορικής διατριβής. Εξίσου ευχαριστώ τον Καθηγητή Παιδιατρικής Γεώργιο Συρογιαννόπουλο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Παθολογίας-Ενδοκρινολογίας Γεώργιο Κουκούλη, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Νεογνολογίας Αντώνιο Γούναρη καθώς και τον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας Κωνσταντίνο Νταφόπουλο για τη συμβολή και συμμετοχή τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου: τους αγαπημένους μου γονείς, Βύρωνα και Βασιλική που προέταξαν τη μόρφωση των τέκνων τους σαν προτεραιότητα στη ζωή τους και με πολλές προσωπικές στερήσεις συνέβαλλαν τα μέγιστα στο να επιτύχω το στόχο. Η στάση ζωής και το παράδειγμά τους αποτέλεσαν σπουδαία μαθήματα Ηθικής για μένα. Ευχαριστώ την αγαπημένη μου αδερφή Δήμητρα για τη στήριξη που μου προσέφερε αγόγγυστα όλα αυτά τα χρόνια και τη θεία μου, Χριστίνα Κοντογιάννη για τη σημαντική της συμβολή και τη συμπαράστασή της.

Σε όλους τους άνωθεν αναφερόμενους οι ευχαριστίες μου και η ευγνωμοσύνη μου είναι δύσκολο να αποτυπωθούν σε χαρτί. Αποτελεί το ελάχιστο που θα μπορούσα να κάνω για να εκφράσω τα βαθύτατα αισθήματά μου. Τους ευχαριστώ.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΛΕΠΤΙΝΗ

Γενικά

Το 1950 ο Ingalls και συνεργάτες του ανέφεραν την ύπαρξη μιας μετάλλαξης στον ποντικό, η οποία μεταβιβαζόταν με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα η οποία προκαλούσε υπερβολική παχυσαρκία ήδη από τη νεαρή ηλικία και σχετιζόταν με σακχαρώδη διαβήτη [1]. Ο ποντικός αυτός ονομάστηκε ob/ ob. Μεταγενέστερα, ο Coleman περιέγραψε και δεύτερη μετάλλαξη που ονομάστηκε db/ db και ήταν επίσης μεταβιβαζόμενη με αυτοσωμικό υπολειπόμενο χαρακτήρα και συνδυαζόταν με παχυσαρκία [2]. Έτσι, διατυπώθηκε για πρώτη φορά η υπόθεση της ύπαρξης κάποιου παράγοντα στο αίμα υπεύθυνου για τον έλεγχο της πρόσληψης τροφής και τη ρύθμιση των επιπέδων του μεταβολισμού. Το υπεύθυνο γονίδιο κωδικοποιήθηκε το 1994 από τον Zhang [3] και το πρωτεϊνικό προϊόν αυτού του γονιδίου ονομάστηκε λεπτίνη. Οι εμπνευστές της ονομασίας της πρωτεΐνης χρησιμοποίησαν την ελληνική λέξη «λεπτός» για να υποδηλώσουν την άμεση σχέση της πρωτεΐνης με τη ρύθμιση του σωματικού βάρους και την πρόσληψη τροφής.

Παραγωγή λεπτίνης

Η λεπτίνη παράγεται κυρίως από τον λευκό λιπώδη ιστό και λειτουργεί σαν «λιποστάτης». Συγκεκριμένα, όταν αυξάνει το σωματικό λίπος, αυξάνει και η παραγωγή λεπτίνης, η οποία δρώντας ενδοκρινικά μεταφέρει το μήνυμα στον υποθάλαμο και έτσι μειώνεται η πρόσληψη ενέργειας (τροφής) ενώ αυξάνει η κατανάλωσή της (αυξάνοντας τη θερμογένεση), με στόχο τη διατήρηση του ιδανικού βάρους σώματος. Έχει, επίσης, εντοπιστεί σε σημεία του γαστρεντερικού σωλήνα [4], στον πλακούντα [5], στον εγκέφαλο, στη μήτρα, στις ωοθήκες και ενδεχομένως στο μαστό.



Εικόνα 1. Απεικόνιση του μορίου της λεπτίνης

Στην κύηση η λεπτίνη παράγεται από τα κύτταρα χοριακών λαχνών μετά την 8^η εβδομάδα και από αμνιακά κύτταρα στο 2^ο και 3^ο τρίμηνο. Σχετικά με την παραγωγή λεπτίνης στον πλακούντα μετά από καλλιέργειες κυττάρων από πλακούντες διαφόρων ηλικιών, διαπιστώθηκε ότι η έκκριση λεπτίνης ήταν 50 φορές υψηλότερη σε χοριακό ιστό από πλακούντες 1^{ου} τριμήνου από αυτή από τελειόμηνους

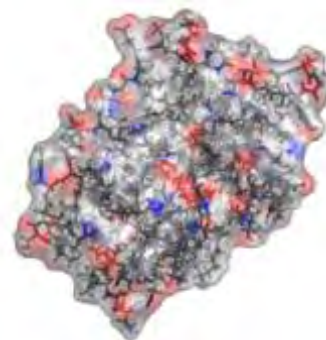
πλακούντες [5, 6]. Ανοσοϊστοχημικές μελέτες έχουν δείξει εντονότερη παρουσία της λεπτίνης στο κυτταρόπλασμα συγκυτιοτροφοβλάστης παρά σε κυτταροτροφοβλάστη [7]. Ορισμένοι επιστήμονες θεωρούν ότι η λεπτίνη μπορεί να εντοπιστεί σε συγκυτιοτροφοβλάστη και κυτταροτροφοβλάστη πρώτου τριμήνου ενώ στο τρίτο τρίμηνο, όπου η παρουσία της κυτταροτροφοβλαστικής σειράς είναι περιορισμένη, η λεπτίνη μπορεί να εντοπιστεί μόνο στη συγκυτιοτροφοβλάστη [8].

Δομή γονιδίου- Ρύθμιση έκφρασης του γονιδίου

Στον άνθρωπο το γονίδιο της λεπτίνης ονομάζεται (ob) LEP και βρίσκεται στο 7q 31.3 χρωμόσωμα. Η πλήρης αλληλουχία του ob γονιδίου στον άνθρωπο εκτείνεται περίπου σε 23.000 bp και αποτελείται από τρία εξώνια με μεγάλη διαφορά σε μήκος μεταξύ τους και αρκετά μεγάλη 5' και 3' αμετάφραστη περιοχή.

Δομή πρωτεΐνης

Το πρωτεϊνικό μόριο της λεπτίνης αποτελείται από 167 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 16 kDa και με βάση την κρυσταλλική δομή της προσομοιάζει περισσότερο με κυτοκίνη, αν και η αλληλουχία των αμινοξέων της δεν παρουσιάζει ομολογία με αυτές [9]. Είναι ένα επίμηκες μόριο με διαστάσεις, κατά προσέγγιση, 20 x 25 x 45 Å. Αποτελείται από τέσσερις αντιπαράλληλες α- έλικες (A, B, C, D), συνδεδεμένες με δύο μακρείς διασταυρωμένους συνδέσμους (AB και CD) και ένα βραχύ βρόγχο (BC), σε αριστερόστροφη ελικοειδή διάταξη. Αυτές οι τέσσερις αλυσίδες διατάσσονται σε δύο στρώματα αντιπαράλληλων ζευγαριών ελίκων A και D απέναντι στις B και C [10]. Η δομή της λεπτίνης αφήνει αρκετές υδροφοβικές θέσεις εκτεθειμένες, μερικές από τις οποίες



φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στη σύνδεση με τον υποδοχέα.

Εικόνα 2. Πιθανή στερεοχημική διάταξη της λεπτίνης

Οι καλύτερα διατηρημένες περιοχές της πρωτεΐνης σε διάφορα είδη βρίσκονται στις τέσσερις α- έλικες. Ο δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ της κυστεΐνης (cysteine) 96 και της κυστεΐνης (cysteine) 146 φαίνεται να είναι σημαντικός για τη διαμόρφωση της τελικής μορφής της λεπτίνης και για τη σύνδεση με τον υποδοχέα, γιατί μεταλλάξεις σε κάποια από αυτά τα αμινοξέα καθιστά την ορμόνη βιολογικά ανενεργή [9].

Παράγοντας	Επίδραση στη λεπτίνη	Αναφορά
Σωματικό λίπος	Αύξηση	[14-16, 25]
Γυναικείο φύλο (οιστρογόνα)	Αύξηση	[17-21]
Γλυκόζη/ ινσουλίνη	Αύξηση	[22, 24, 26]
Συμπαθητικό σύστημα	Μείωση στο λιπώδη ιστό	[27-30]
PPAR γ αγωνιστές	Μείωση	[13, 31]
Γλυκοκορτικοειδή	Αύξηση	[24, 32, 33]
Κυτοκίνες	TNF-α +/-	[34-37]
hPL	Μείωση	[38]
Προγεστερόνη	Μείωση	[38]

Πίνακας 1. Επίδραση διαφόρων παραγόντων στην έκφραση της λεπτίνης

διατροφικό σήμα που αναγνωρίζεται από τα λιποκύτταρα για τη παραγωγή λεπτίνης [22, 23].

Σχετικά με τους ρυθμιστικούς παράγοντες της έκφρασης της λεπτίνης σε κύτταρα που προέρχονται από ανθρώπινο πλακούντα διαπιστώθηκε *in vitro*, αλλά θεωρείται ότι και *in vivo* η σύνθεση και έκκριση της λεπτίνης αυξάνεται μέσω της ενεργοποίησης της πρωτεϊνικής κινάσης A και C [6, 24], πράγμα που διαφοροποιεί αρκετά τη ρύθμιση της έκκρισης της στον πλακούντα καθώς η πρωτεϊνική κινάση A καταστέλλει την έκφραση της λεπτίνης σε καλλιέργειες λιποκυττάρων. Συνοπτικά η επίδραση διαφόρων παραγόντων στην έκφραση της λεπτίνης παρατίθεται στον πίνακα 1.

Ρύθμιση κυκλοφορίας λεπτίνης- Πρωτεΐνες δέσμευσης

Η λεπτίνη κυκλοφορεί στο αίμα, ελεύθερη ή συνδεδεμένη με πρωτεΐνες. Στους ανθρώπους, η πλειοψηφία της λεπτίνης κυκλοφορεί συνδεδεμένη με τουλάχιστον δύο μακρομόρια του ορού που μπορεί να καθορίζουν την βιολογική δράση και βιοδιαθεσιμότητα στους ιστούς- στόχους [39]. Αν και οι δεσμευτικές πρωτεΐνες της λεπτίνης δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστές, θεωρείται ότι η διαλυτή μορφή του υποδοχέα ανήκει σε αυτές. Σε λεπτά άτομα με σχετικά χαμηλά αποθέματα λίπους, η πλειοψηφία της λεπτίνης βρίσκεται σε συνδεδεμένη μορφή (50%), ενώ στα παχύσαρκα άτομα το ποσοστό αυτό υπολογίζεται περίπου στο 20% [40, 41]. Στα παχύσαρκα άτομα το ποσοστό της ελεύθερης λεπτίνης είναι αυξημένο στον ορό.

Η ελεύθερη μορφή λεπτίνης ίσως έχει μεγαλύτερη ταχύτητα turnover εξαιτίας της πρωτεολυτικής διάσπασης και/ ή της αυξημένης κάθαρσης. Αυτή η υπόθεση υποστηρίζεται

από παρατηρήσεις σε ob/ob ποντικούς, όπου η ημίσεια ζωή της εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης είναι κατά πολύ βραχύτερη από αυτή σε φυσιολογικά πειραματόζωα [39].

Σε συνθήκες νηστείας, η ελάττωση των επιπέδων της ελεύθερης λεπτίνης είναι μεγαλύτερη σε λεπτά από ότι σε παχύσαρκα άτομα, αν και δεν παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα της δεσμευμένης λεπτίνης σε καμία από τις δύο ομάδες [40]. Φαίνεται ότι ο λόγος των επιπέδων ελεύθερης προς ολική λεπτίνη δεν είναι σταθερός αλλά ότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία που επηρεάζεται από τις μεταβολικές και διατροφικές συνθήκες.

Λεπτίνη και αναπαραγωγή

Η συμμετοχή της λεπτίνης στην αναπαραγωγή αποδείχτηκε όταν η χορήγηση λεπτίνης αποκατέστησε τη γονιμότητα θηλυκών και αρσενικών ob/ob ποντικών [42, 43]. Η χορήγηση λεπτίνης σε θηλυκά ποντίκια λίγο πριν την ήβη οδήγησε σε πρόωμη ωρίμανση του αναπαραγωγικού άξονα συνοδευόμενη από φαινόμενα που συνοδεύουν την ήβη, όπως διάνοξη του κόλπου, οίστρο και κυκλικότητα [44]. Σε συμφωνία με τα ανωτέρω ευρήματα, η λεπτίνη αυξάνεται σε αγόρια και κορίτσια πριν την εμφάνιση άλλων αναπαραγωγικών ορμονών που σχετίζονται με την ήβη [18, 45]. Στα αγόρια, κυρίως στα τελευταία στάδια της ήβης και στην εφηβεία- τα επίπεδα λεπτίνης παρουσιάζονται ελαττωμένα. Αυτό εξηγείται προφανώς από τις επιδράσεις των ορμονών του φύλου στην έκκριση λεπτίνης αλλά και εξαιτίας της διαφοροποίησης στο σωματικό λίπος.

Είναι άγνωστο, μέχρι στιγμής, αν η λεπτίνη ασκεί άμεση ή έμμεση δράση στους μηχανισμούς αναπαραγωγής. Ίσως, η λεπτίνη να ενεργοποιεί την ήβη άμεσα σηματοδοτώντας την ενεργοποίηση των απαιτούμενων ενεργειακών αποθηκών για την αναπαραγωγή [44]. Αυτή η θεωρία μπορεί παράλληλα να εξηγεί και την θεωρία του Frisch που σχετίζει τη γονιμότητα με τις αποθήκες σωματικού λίπους [46]. Ενδεχομένως, η λεπτίνη να μην αποτελεί το πρωτεύον σήμα που επάγει την έναρξη της ήβης, αλλά ίσως να λειτουργεί επιτρέποντας, σαν μεταβολική πύλη, την ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος, όταν και εφόσον οι μεταβολικές αποθήκες θεωρηθούν επαρκείς [47].

Πειραματικά δεδομένα έχουν αποδείξει ότι η λεπτίνη προκαλεί την έκκριση GnRH από τον υποθάλαμο προκαλώντας κατόπιν έκκριση γοναδοτροπινών [48]. Η έκκριση FSH και LH οδηγεί στην έκκριση στεροειδών από τις γονάδες οδηγώντας στην ανάπτυξη της αναπαραγωγικής οδού και την επαγωγή της ήβης [42, 48].

Σε ανθρώπους, έχει δειχθεί ότι τα επίπεδα λεπτίνης είναι υψηλότερα στην ωχρινική παρά στην ωοθυλακική φάση [49, 50]. Η σχέση μεταξύ του δείκτη μάζας σώματος (BMI) και της κυκλοφορούσας λεπτίνης έχει παρατηρηθεί ότι ποικίλλει σε διαφορετικούς κύκλους με την καλύτερη συσχέτιση μεταξύ τους να συμβαίνει στην ωχρινική φάση, όπου οι συγκεντρώσεις της προγεστερόνης και της λεπτίνης είναι αυξημένες [49].

Σε κάποιες εργασίες αναφέρεται ότι τα επίπεδα λεπτίνης είναι υψηλότερα σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από ότι σε μετεμμηνοπαυσιακές [50, 51], υποδηλώνοντας σαφώς ότι τα οιστρογόνα ενδεχομένως παίζουν ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων λεπτίνης. Άλλοι, αντιθέτως, δεν μπόρεσαν να βρουν διαφορές στα επίπεδα λεπτίνης σε σχέση με την εμμηνόπαυση [52].

Επειδή κατά τη διάρκεια της κύησης επιτελούνται πολλές φυσιολογικές μεταβολές, μερικώς σαν συνέπεια μιας ενδοκρινικής προσαρμογής, αναζητήθηκε ο ρόλος της λεπτίνης στην εγκυμοσύνη. Τα επίπεδα λεπτίνης στο πλάσμα εγκύων είναι αυξημένα ιδίως στο δεύτερο και στο τελευταίο τρίμηνο [49]. Εντούτοις, δεν σχετίζονται με το βάρος ή το BMI της μητέρας στην αρχή και στο τέλος της κύησης [5]. Μετά τον τοκετό, τα επίπεδα λεπτίνης επιστρέφουν στα κανονικά προ εγκυμοσύνης επίπεδα μέσα σε 24 ώρες. Είναι γνωστό ότι κατά τη διάρκεια του πρώτου μισού της κύησης ο μεταβολισμός της μητέρας μεταπίπτει από μια αναβολική κατάσταση στην οποία τα θρεπτικά συστατικά αποθηκεύονται σε καταβολική, όπου υπάρχει μια αυξημένη χρήση λιπαρών οξέων και ελαττωμένη της γλυκόζης. Καθώς οι μητρικές ανάγκες για γλυκόζη ελαττώνονται, η λιπόλυση αυξάνεται και τα λιπαρά οξέα αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας. Η λεπτίνη μπορεί να ευθύνεται, εν μέρει, για αυτές τις μεταβολές γιατί έχει αποδειχθεί ότι ασκεί άμεση λιπολυτική δράση στον λευκό λιπώδη ιστό [53]. Εξάλλου, η λεπτίνη μπορεί να αποτελεί μέρος του συστήματος ρύθμισης του ενεργειακού ισοζυγίου της μητέρας κατά τη διάρκεια της κύησης και μπορεί να αποτελεί σημαντικό μεσολαβητή στρατηγικών που αποσκοπούν στην εξοικονόμηση ενέργειας και στην βελτιστοποίηση της ανάπτυξης του εμβρύου [54].

Το εύρημα των αυξημένων επιπέδων λεπτίνης στις εγκυμονούσες εγείρει και ένα άλλο ενδιαφέρον θέμα: αυτό της αντίστασης στην λεπτίνη. Σύμφωνα με ορισμένες θεωρίες, η αντίσταση στην λεπτίνη εξασφαλίζει τη δυνατότητα συνέχισης πρόσληψης της τροφής με κανονικό τρόπο. Η επαναφορά των επιπέδων της λεπτίνης πολύ σύντομα μετά τον τοκετό προϋποθέτει την παύση της αντίστασης στη λεπτίνη με σκοπό την αποκατάσταση φυσιολογικών επιπέδων κορεσμού. Μεταβολές στη ρύθμιση αυτού του μηχανισμού μπορεί να εξηγούν διαφορές στην πρόσληψη λίπους στη διάρκεια της κύησης καθώς και τη δυσκολία απώλειας κιλών μετά το τέλος της κύησης.

Ο Masuzaki έδειξε ότι ήδη από την 8^η εβδομάδα της κύησης η λεπτίνη παράγεται από κυτταροτροφοβλάστες και συγκυτιοτροφοβλάστες στις χοριακές λάχνες του ανθρώπινου πλακούντα σε επίπεδα παρόμοια με αυτά που απαντώνται σε λιπώδη ιστό [5]. Δεν έχει διευκρινιστεί ακόμα η πιθανότητα δράσης της λεπτίνης πλακουντιακής προέλευσης περιφερικά καθώς και ο ρόλος έκκρισης της λεπτίνης από τον πλακούντα τη στιγμή που υπάρχει ελαττωμένη ευαισθησία του υποθαλάμου της μητέρας στη λεπτίνη.

Το σωματικό βάρος και σύσταση του σώματος αλλάζουν δραματικά στα έμβρυα και στα νεογνά. Παρατηρώντας την αύξηση της εμβρυϊκής λεπτίνης, όπως μετρήθηκε σε αίμα από τον ομφάλιο λώρο, ερευνητές [55, 56] διατύπωσαν την άποψη ότι η λεπτίνη εμπλέκεται στην ανάπτυξη του εμβρύου. Ο Hoggard και συν παρατήρησαν υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της λεπτίνης και του Ob- Rb στον πλακούντα και σε εμβρυϊκούς ιστούς διατυπώνοντας την άποψη ότι η λεπτίνη ίσως παίζει ρόλο στην αύξηση και ανάπτυξη του εμβρύου [57].

Θέση δράσης	Δράση της λεπτίνης	Αναφορά
Τροφοβλαστικά κύτταρα	Αύξηση μιτωτικής δραστηριότητας	[58]
	Αύξηση έκκρισης β- hCG	[59]
Αγγειακό σύστημα	Αγγειογένεση	[60]
	Αγγειοδιαστολή	
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Αύξηση μιτωτικής δραστηριότητας	[61]
Επιθηλιακά κύτταρα πνεύμονα	Αύξηση μιτωτικής δραστηριότητας	[62]
β- κύτταρα παγκρέατος	Αύξηση μιτωτικής δραστηριότητας	[63]

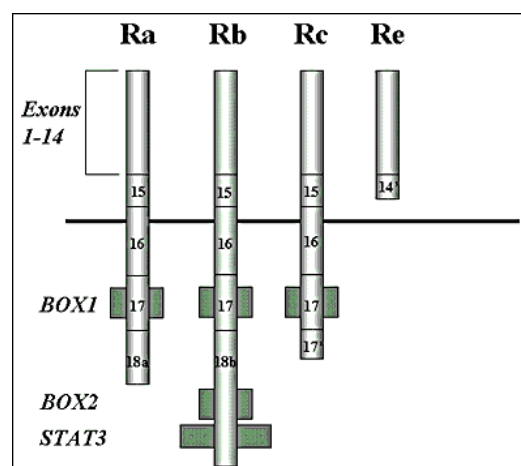
Πίνακας 2. Επίδραση της λεπτίνης σε διάφορους ιστούς- στόχους

Από την άλλη, η έλλειψη λεπτίνης δεν αποτρέπει την εμβρυϊκή ανάπτυξη καθώς δύο παιδιά με έλλειψη λεπτίνης [64] καθώς και ob/ ob ποντικοί είναι γνωστό ότι μεγαλώνουν φυσιολογικά. Η λεπτίνη ενδεχομένως να εμπλέκεται σε έλεγχο της διαθεσιμότητας θρεπτικών ουσιών στη μητέρα καθώς και στην ομοιόσταση της ενέργειας του εμβρύου καθώς τα επίπεδα της λεπτίνης στον ορό σχετίζονται με την αύξηση του βάρους του εμβρύου [65]. Συνοπτικά, οι κυριότερες δράσεις της λεπτίνης σε διάφορα όργανα και συστήματα παρατίθενται στον πίνακα 2.

Υποδοχείς λεπτίνης

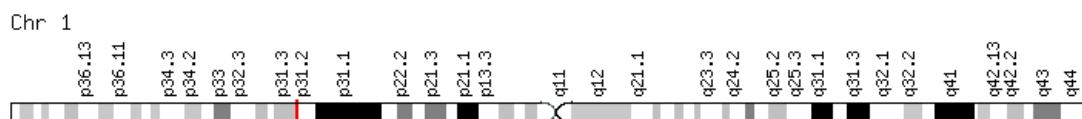
Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου της λεπτίνης (ob), το 1995 απομονώθηκε και χαρτογραφήθηκε ο υποδοχέας της πρωτεΐνης (obese receptor, Ob-R) [66]. Κωδικοποιείται από το γονίδιο του διαβήτη db που βρίσκεται στην περιοχή 1p31.

Οι υποδοχείς λεπτίνης ανήκουν στην τάξη I των υποδοχέων κυτοκινών και παράγονται σε διάφορες ισομορφές που διαφέρουν μεταξύ τους στο μήκος και



Εικόνα 4. Ισομορφές του υποδοχέα της λεπτίνης

προέρχονται από διαφορετικό μάτισμα του ίδιου γονιδίου. Οι μορφές αυτές ονομάζονται Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re [67]. Οι υποδοχείς έχουν ένα εξωκυττάριο τμήμα 840 αμινοξέων, ένα διαμεμβρανικό τμήμα 34 αμινοξέων και ένα εσωκυττάριο τμήμα που διαφέρει ανάλογα με την κάθε μορφή υποδοχέα και έχει μήκος από 5 έως και 274 αμινοξέα. Το εξωκυττάριο τμήμα που αποτελεί τη θέση σύνδεσης με τη λεπτίνη είναι ομόλογο σε μεγάλο βαθμό με τις υπομονάδες gp130 των υποδοχέων IL-6, G-CSF και LIF που σχετίζονται με την επαγωγή του σήματος [10]. Διαθέτει δύο περιοχές σύνδεσης που παρουσιάζουν ομοιότητες με τις αντίστοιχες των κυτοκινών (Trp- Ser- X- Ser- Trp) και μια περιοχή σύνδεσης αντίστοιχη με της φμπρονεκτίνης τύπου III [66, 68].



Εικόνα 5. Χρωμοσωμική εντόπιση του γονιδίου του υποδοχέα της λεπτίνης

Ο μακρύτερος υποδοχέας Ob-Rb διαθέτει μια ενδοκυττάρια περιοχή 302 αμινοξέων με ειδικές αλληλουχίες που είναι γνωστό ότι συνδέονται με ενδοκυτταρικά μόρια επαγωγής του σήματος. Η τρέχουσα άποψη είναι ότι συμμετέχει στη μετάδοση του σήματος και θεωρείται επί του παρόντος ότι αποτελεί το μοναδικό λειτουργικά ενεργό υποδοχέα, αν και υπάρχουν και άλλες απόψεις [69-71]. Αυτό ισχυροποιείται από πειραματικές μελέτες στις οποίες η έλλειψη της μακράς μορφής του υποδοχέα στα παχύσαρκα ποντίκια db/db οδήγησε στον φαινότυπο αυτό [67, 72]. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η μορφή Ob-Rb είναι ο λειτουργικά ενεργός υποδοχέας που είναι απαραίτητος για την ενεργειακή ομοιόσταση. Εκφράζεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε λίγα σημεία του σώματος, μεταξύ των οποίων οι πυρήνες του υποθαλάμου. Εκτός από τον υποθάλαμο, ο υποδοχέας Ob-Rb εκφράζεται σε χαμηλότερα επίπεδα και σε κάποια περιφερικά όργανα, όπως οι πνεύμονες, οι νεφροί, το ήπαρ, το πάγκρεας, η καρδιά, οι σκελετικοί μύες, τα λιποκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα μονοκύτταρα του αίματος, οι οστεοβλάστες, τα κύτταρα του ενδομητρίου, του πλακούντα και του ομφαλίου λώρου, τον προστάτη και την ωοθήκη [73-77].

Ο ρόλος των ισομορφών που διαθέτουν ένα βραχύ ενδοκυτταρικό τμήμα (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd) δεν έχει ακόμα καθοριστεί. Από αυτούς, ο Ob-Ra εκφράζεται περισσότερο από τους υπόλοιπους [78] και βρίσκεται σε μια πλειάδα ιστών [66]. Έχει προταθεί ότι οι βραχείες μορφές των υποδοχέων συμμετέχουν στην κάθαρση της λεπτίνης ή στη διευκόλυνση της μεταφοράς της λεπτίνης ενδοκυτταρικά [79, 80]. Προφανώς, ο ρόλος των βραχέων υποδοχέων είναι άλλος από αυτόν της ρύθμισης του βάρους, όπως για παράδειγμα η δυνατότητα μεταφοράς σήματος [69-71].

Η μορφή Ob-Re που στερείται ενδοκυττάριου τμήματος αποτελεί τη διαλυτή μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης [67]. Πιστεύεται ότι αυτή η μορφή του υποδοχέα λειτουργεί ως η κύρια πρωτεΐνη δέσμευσης της λεπτίνης στο πλάσμα [81]. Για το σχηματισμό της επικρατεί η θεωρία ότι αποτελεί θραύσμα των διαμεμβρανικών μορφών που προέκυψε από ενζυματική διάσπαση [82]. Σε ποντικούς έχειδειχθεί ότι η διαλυτή μορφή του υποδοχέα μπορεί να λειτουργεί ως ένα σύστημα ρυθμιστικού διαλύματος για την λεπτίνη που κυκλοφορεί ελεύθερη [76]. Θεωρείται ότι ο κύριος ρόλος της διαλυτής μορφής του υποδοχέα είναι να καθυστερεί την κάθαρση της λεπτίνης και να αυξάνει τη διαθέσιμη λεπτίνη στη κυκλοφορία [83]. Υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση της λεπτίνης με το BMI ενώ αντιθέτως, η έκφραση της διαλυτής μορφής του υποδοχέα λεπτίνης είναι αντιστρόφως ανάλογη αυτού. Έτσι, σε παχύσαρκα άτομα παρατηρείται αύξηση της λεπτίνης και μείωση της διαλυτής μορφής του υποδοχέα που μπορεί να οδηγήσει σε 25πλάσια αύξηση της ελεύθερης λεπτίνης στη κυκλοφορία [84].

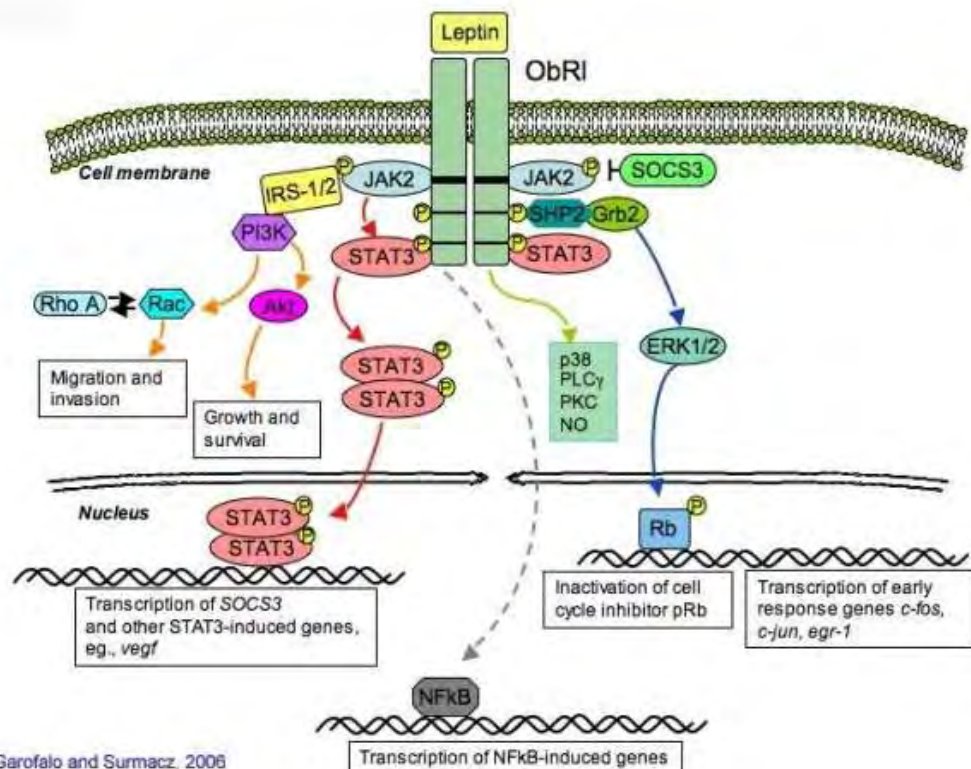
Εντόπιση υποδοχέων λεπτίνης

Αρχικά, ο υποδοχέας της λεπτίνης εντοπίσθηκε στον υποθάλαμο [66] αλλά και σε διάφορους άλλους ιστούς ποντικού όπως στον πνεύμονα, το νεφρό και άλλους [85]. Άλλες θέσεις έκφρασης των υποδοχέων της λεπτίνης αποτελούν το ήπαρ, η καρδιά, οι πνεύμονες, το λεπτό έντερο, οι όρχεις και οι ωοθήκες, όπως επίσης ο σπλήνας, το πάγκρεας και ο λιπώδης ιστός [67].

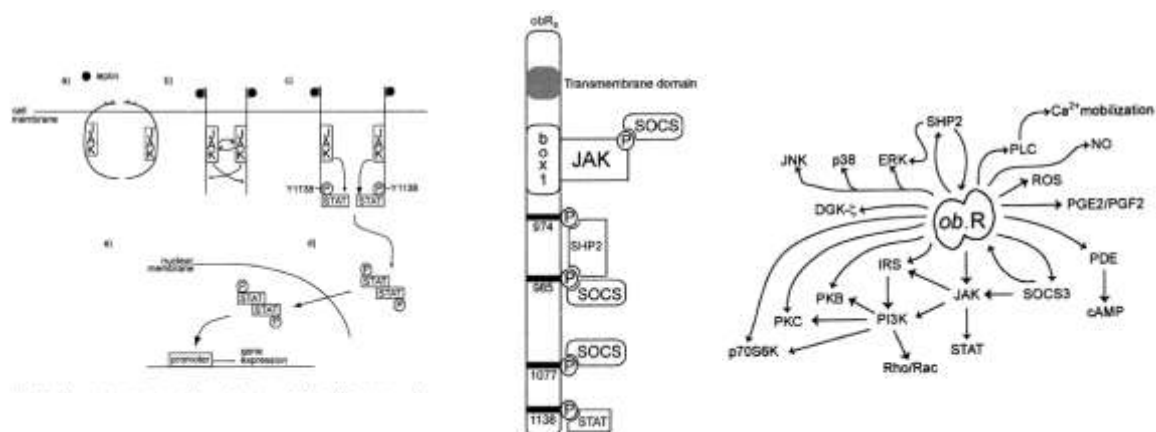
Σε ότι αφορά στην έκφραση του υποδοχέα στον ανθρώπινο πλακούντα, με τη χρήση *in situ* υβριδισμού σε τελειόμηνους πλακούντες διαπιστώθηκε ότι τόσο η μακρά μορφή του υποδοχέα όσο και οι βραχείες εκφράζονται σε επίπεδο συγκυτιοτροφοβλάστης και συγκεκριμένα στη κορυφαία μεμβράνη, ενώ η βασική μεμβράνη, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα στρωματικά κύτταρα παρέμεναν αρνητικά [86-88]. Για τη βραχεία μορφή υπάρχει η άποψη ότι εντοπίζεται στην ίδια περιοχή με τη μακρά μορφή [87] εντούτοις, από μελέτες άλλων ερευνητών, βρέθηκε έκφρασή της και στη βασική μεμβράνη και μάλιστα σε παρόμοιο βαθμό με την έκφρασή της στη μικρολαχνώδη μεμβράνη [88]. Με τη χρήση αντισώματος που συνδέεται με όλες τις μορφές του υποδοχέα λεπτίνης, διαπιστώθηκε η παρουσία αυτών στη συγκυτιοτροφοβλάστη πρώτου και τρίτου τριμήνου [8].

Σύνδεση λεπτίνης- υποδοχέων- Μεταφορά σήματος

Η περιοχή σύνδεσης της λεπτίνης με τον υποδοχέα της έχει εντοπιστεί με μεγάλη ακρίβεια και βρίσκεται στην περιοχή μεταξύ των αμινοξέων 428- 635. Η λεπτίνη και ο



Εικόνα 6. Συνολικό μοντέλο δράσης της λεπτίνης



Εικόνα 7. Μεταβολικοί δρόμοι που συμμετέχει ο υποδοχέας της λεπτίνης

υποδοχέας της συνδέονται ισχυρά με αναλογία 1:1 [89]. Η δομή και η στερεοδιάταξη του υποδοχέα της λεπτίνης είναι άγνωστες επί του παρόντος. Οι μελέτες που έχουν γίνει βασίζονται σε υποδοχείς που είναι ομόλογοι του υποδοχέα της λεπτίνης. Αυτοί ανήκουν στην οικογένεια των κυτοκινών τάξης I, όπως οι υποδοχείς αυξητικής ορμόνης (GHR), ερυθροποιητίνης (EPOR) και G-CSF (G-CSFR). Η αναλογία σύνδεσης συνδέτη με υποδοχέα

είναι 1: 2 για τους δύο πρώτους υποδοχείς, ενώ για τον G-CSFR ποικίλλει και μπορεί να είναι 1: 1, 2: 2, 4: 4.

Έχει αναφερθεί ότι οι υποδοχείς λεπτίνης σε φυσιολογικά επίπεδα έκφρασης βρίσκονται με τη μορφή διμερών σε ποσοστό περίπου 60% [90]. Μόλις εκτεθούν στη λεπτίνη η διαμόρφωση τους αλλάζει. Οι αλλαγές στη διαμόρφωση πιστεύεται ότι επάγονται από την ίδια τη λεπτίνη. Τελικά, η σύνδεση λεπτίνης- υποδοχέα διαπιστώνεται ότι γίνεται σε αναλογία 1: 1 ή 2: 2 δημιουργώντας διμερή και τετραμερή, αντίστοιχα. Αυτό το μοντέλο έχει προφανείς ομοιότητες με το σύστημα G-CSF [91]. Μετά τη σύνδεση λεπτίνης-υποδοχέα πραγματοποιείται μετακίνηση του συμπλέγματος στο εσωτερικό του κυττάρου [92]. Αναφέρεται ότι δυνατότητα εσωτερικοποίησης διαθέτει και ο υποδοχέας Ob- Ra αλλά σε μικρότερο βαθμό από τον αντίστοιχο του Ob- Rb [93]. Μια πιθανή εξήγηση αυτής της διαφοράς μπορεί να είναι ότι απλά ο υποδοχέας Ob- Ra ανακυκλώνεται πιο γρήγορα στην επιφάνεια από ότι η μακρά μορφή του υποδοχέα [92]. Ελάττωση όμως της παρουσίας του υποδοχέα Ob- Rb στην επιφάνεια του κυττάρου μπορεί να οδηγήσει στις περιπτώσεις παχύσαρκων (όπου έχουμε και υπερλεπτιναιμία) λόγω αντίστασης στη λεπτίνη.

Το σύστημα επαγωγής του σήματος της λεπτίνης έχει μελετηθεί καλά και θεωρείται ότι επιτυγχάνεται κυρίως μέσω του μονοπατιού JAK/ STAT [25, 94]. Το σύστημα επαγωγής του σήματος JAK/ STAT έχει μεγάλη σημασία για τη δράση ουσιών, όπως οι κυτοκίνες και κάποιοι αυξητικοί παράγοντες. Οι υποδοχείς λεπτίνης δεν διαθέτουν ενδογενή ικανότητα να ενεργοποιούν την κινάση της τυροσίνης και για το λόγο αυτό εξαρτώνται για την επαγωγή σημάτων από κινάσες, όπως η JAK2. Όλοι οι διαμεμβρανικοί υποδοχείς διαθέτουν ένα μοτίβο (box 1) που μπορεί να συνδέεται με την κινάση Janus (JAK), αλλά μόνο η μακρά μορφή του υποδοχέα λεπτίνης (Ob-Rb) διαθέτει και ένα δεύτερο μοτίβο (box 2) και μόρια τυροσίνης που μπορούν, δυνητικά, να αποτελούν θέσεις σύνδεσης με τις πρωτεΐνες STAT εξασφαλίζοντας τις πρόσθετες δυνατότητες επαγωγής του σήματος που διαθέτει αυτή η μορφή του υποδοχέα [95-97]. Οπότε, οι πρωτεΐνες JAK είναι κινάσες της τυροσίνης που σχετίζονται άμεσα με τον υποδοχέα της λεπτίνης και χρησιμοποιούνται από αυτόν για να φωσφορυλιώσουν τον ίδιο τον υποδοχέα καθώς και πρωτεΐνες στόχους, όπως οι STAT. Η φωσφορυλίωση της τυροσίνης στη θέση Tyr1138 ενεργοποιεί τη σύνδεση του STAT3 οδηγώντας σε φωσφορυλίωση του STAT3, διμερισμό και, τελικά, μετακίνηση στον πυρήνα όπου τροποποιείται η μεταγραφική δραστηριότητα πολλών γονιδίων- στόχων. Έχουν εντοπιστεί κάποια από αυτά και αφορούν γονίδια νευροπεπτιδίων που εμπλέκονται στη διατροφή. Έτσι, η λεπτίνη αυξάνει την έκφραση γονιδίων, όπως το POMC/ CART και μειώνει την έκφραση των NPY/ AgRP και MCH [98].

Παρότι υπάρχει η πεποίθηση ότι οι κινάσες είναι οι κυρίαρχοι ρυθμιστές της ενδοκυττάριας μεταφοράς σήματος, υπάρχουν δεδομένα που αναδεικνύουν την ύπαρξη ενός επιπλέον μηχανισμού. Η φωσφατάση της τυροσίνης SHP-2 συνδέεται στη θέση Y985 που ανήκει στην περιοχή SH2 του υποδοχέα, ενεργοποιείται και κατόπιν μπορεί να καταστείλει την περαιτέρω ενεργοποίηση του STAT3 με μείωση της μεταφοράς του σήματος της λεπτίνης [99, 100].

Ένας άλλος ρυθμιστικός μηχανισμός που καταστέλλει τη μετάδοση του σήματος του υποδοχέα της λεπτίνης είναι οι πρωτεΐνες καταστολής του σήματος των κυτοκινών (SOCS). Ο τρόπος με τον οποίο συμβαίνει αυτό είναι η σύνδεσή τους σε φωσφορυλιωμένες από την κινάση της τυροσίνης θέσεις του υποδοχέα ή και με φωσφορυλιωμένες JAK πρωτεΐνες μετά από σύνδεσή τους με την περιοχή SH2 την οποία διαθέτουν [101]. Η χορήγηση λεπτίνης σε ob/ ob αλλά όχι σε db/ db ποντίκια οδήγησε σε αύξηση μόνο του mRNA της SOCS-3 του υποθαλάμου [102]. Η SOCS-3 είναι μια πρωτεΐνη που περιέχει περιοχή SH2 που μπορεί να συνδεθεί με την φωσφορυλιωμένη Tyr985 και την JAK2, αναστέλλοντας τη δράση της JAK2 και τελικά μπλοκάροντας την επαγωγή του σήματος από τον υποδοχέα της λεπτίνης. Αυτή η αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση θεωρείται από κάποιους καθοριστικό σημείο στην εξήγηση φαινομένων αντίστασης στη λεπτίνη [103].

Συμμετοχή στην επαγωγή του σήματος έχει και το μονοπάτι των ενεργοποιούμενων από μιτογόνα κινασών (MAP κινασών) ή αλλιώς γνωστές και ως κινάσες ρυθμιζόμενες από εξωκυτταρικά σήματα (ERKs, extracellular-signal regulated kinases). Σε πειράματα που έγιναν σε λιπώδη ιστό αρουραίου και σε ηπατικό ιστό παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων φωσφορυλίωσης της MAPK κινάσης τρεις ως τέσσερις φορές μετά την χορήγηση λεπτίνης. Παρόμοια ευρήματα διαπιστώθηκαν σε παγκρεατικά κύτταρα και σε μυοβλάστες αρουραίου [104, 105]. Φαίνεται ότι κατόπιν της σύνδεσης της λεπτίνης με τον υποδοχέα έχουμε ενεργοποίηση της ERK μέσω φωσφορυλίωσης της Tyr985. Σε αυτή τη διαδικασία έχουμε και συμμετοχή της φωσφορυλιωμένης SHP- 2 [97]. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [106], η ενεργοποίηση της ERK από τη λεπτίνη επιτυγχάνεται μέσω δύο ανεξάρτητων μονοπατιών: το ένα απαιτεί τη φωσφορυλίωση της Tyr985 του υποδοχέα της λεπτίνης, ενώ το άλλο δεν απαιτεί το ενδοκυττάριο τμήμα του υποδοχέα. Στο πρώτο μονοπάτι συμμετέχει και η φωσφορυλιωμένη SHP- 2, ενώ και τα δύο μονοπάτια απαιτούν τη δράση της φωσφατάσης SHP- 2, υποδηλώνοντας έτσι ότι η SHP- 2 έχει τόσο καταλυτικό όσο και ρόλο προσαρμογέα στην όλη διαδικασία. Ένα άλλο συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι και οι βραχείες μορφές του υποδοχέα μπορεί να συμμετέχουν στην άσκηση βιολογικών δράσεων της λεπτίνης εκτός αυτών των σχετιζόμενων με την παχυσαρκία [58]. Η ενεργοποίηση της ERK επιδρά στην έκφραση αρκετών γονιδίων ενεργοποιώντας το c- fos αλλά χωρίς να

επηρεάζει την έκφραση των πρωτεϊνών SOCS. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η παρουσία της λεπτίνης ενεργοποιεί και άλλες κινάσες που ανήκουν στην οικογένεια των κινασών MAP. Έτσι, έχει παρατηρηθεί αύξηση της δραστηριότητας του p38, αν και υπάρχουν διαφωνίες στο θέμα αυτό [107, 108]. Από την ίδια οικογένεια έχουμε επίσης ενεργοποίηση της κινάσης JNK (NH2-terminal c-Jun kinase/stress-activated protein kinase) [61].

Άλλα συστήματα που ενεργοποιούνται από τη λεπτίνη είναι το μονοπάτι της PI-3 κινάσης που σχετίζεται και με την ινσουλίνη μέσω του υποστρώματος του υποδοχέα ινσουλίνης (IRS, insulin receptor substrate) [109], το AMPK που συμμετέχει στην οξείδωση των λιπαρών οξέων σε σκελετικούς μύες [110], το μονοπάτι της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB) και C (PKC), του κυκλικού AMP (cAMP PDE) και του οξειδίου του αζώτου (NO) [78].

Από πειράματα που έγιναν με τη χρήση της κυτταροσειράς BeWo, όπου εκφράζει υποδοχείς λεπτίνης και μπορεί να παράγει λεπτίνη, διαπιστώθηκε ότι η άποψη που θεωρεί ότι το μονοπάτι JAK/ STAT αποτελεί τον κύριο μηχανισμό επαγωγής του σήματος, ίσως δεν ισχύει στον πλακούντα [58]. Οι διαφορές που εντόπισαν οι ερευνητές, τουλάχιστον στην κυτταροσειρά BeWo, προσδίδουν ένα διαφορετικό ρόλο στις βραχείες μορφές του υποδοχέα της λεπτίνης. Παρατηρήθηκε ότι σε κύτταρα BeWo η πρωτεΐνη JAK2 ήταν ήδη ενεργοποιημένη και δεν μπορούσε να ενεργοποιηθεί περαιτέρω υπό την επίδραση της λεπτίνης. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι δεν πραγματοποιείται φωσφορυλίωση στις πρωτεΐνες STAT1 αλλά, και το σημαντικότερο, και στην STAT3 που έχει καίριο ρόλο στη μεταφορά του σήματος. Αντιθέτως, αυτό που παρατηρήθηκε είναι μια άμεση ενεργοποίηση του συστήματος της αντίδρασης καταρράκτη MAPK που αφορούσε στη φωσφορυλίωση των p42- 44, ενώ δεν παρατηρήθηκε φωσφορυλίωση του p38. Επιπρόσθετα, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων mRNA του c- fos ενώ τα επίπεδα του c- myc παρέμειναν αμετάβλητα. Η μιτωτική δραστηριότητα των κυττάρων στα οποία προστέθηκε λεπτίνη ήταν επίσης αυξημένη.

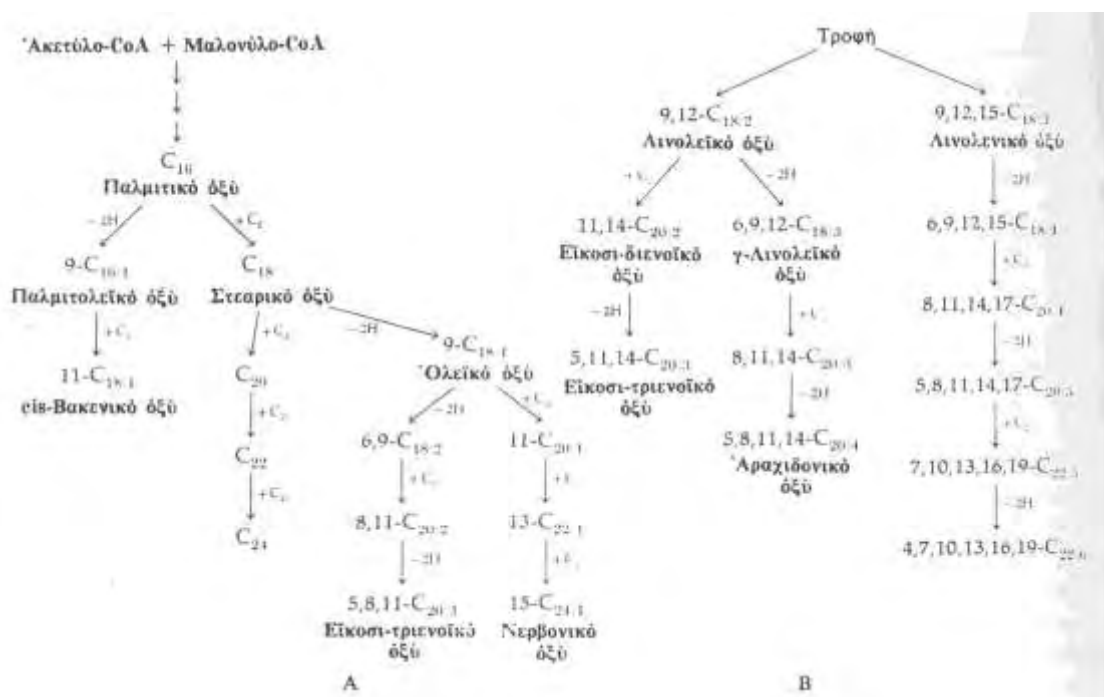
Το εύρημα της ενεργοποίησης του συστήματος MAPK μπορεί να εξηγηθεί από την ύπαρξη μιας περιοχής (motif) box1 που εμφανίζεται σε όλες τις μορφές των υποδοχέων και που μπορεί να ενεργοποιήσει την JAK2 και κατόπιν το σύστημα MAPK. Η μη- ενεργοποίηση όμως της STAT3 που απαιτεί την ύπαρξη box2 (που υπάρχει μόνο στη μακρά μορφή του υποδοχέα) οδηγεί στο συμπέρασμα ότι και η ενεργοποίηση του συστήματος MAPK επάγεται μέσω των βραχέων μορφών των υποδοχέων λεπτίνης. Εξάλλου, η αύξηση της μιτωτικής δραστηριότητας των κυττάρων BeWo υπό την επίδραση λεπτίνης (που πραγματοποιείται μέσω MAPK και c- fos) δίνει στοιχεία για την δράση της λεπτίνης εκτός νευρικού συστήματος και είναι συμβατή με ανάλογα ευρήματα σε παγκρεατικά, εμβρυονικά και εντερικά κύτταρα [111, 112].

B. Λιπαρά οξέα και εγκυμοσύνη

Τα λιπαρά οξέα χρησιμεύουν στο έμβρυο ως πηγή ενέργειας για τη διατήρηση της ρευστότητας, διαπερατότητας και της διάταξης των κυτταρικών μεμβρανών καθώς και ως πρόδρομα μόρια σημαντικών βιοενεργών συμπλεγμάτων, όπως οι προστακυκλίνες, οι προσταγλανδίνες, τα θρομβοξανία και τα λευκοτριένια. Όλα τα λιπαρά οξέα μπορούν να χρησιμεύσουν ως πηγή ενέργειας, αλλά οι δομικές και μεταβολικές λειτουργίες απαιτούν, κυρίως, τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ο ανθρώπινος οργανισμός στερείται της δυνατότητας να συνθέσει λιπαρά οξέα με διπλούς δεσμούς τρία (n-3) ή έξι (n-6) άτομα άνθρακα από το n άκρο και έτσι απαιτείται η πρόσληψή τους από τη διατροφή με τη μορφή του λινολεϊκού (linoleic 18:2 n-6, LA) ή του α- λινολενικού (18:3 n-3, αLN) γνωστών και ως απαραίτητων λιπαρών οξέων, ή με τα μακράς αλύσου πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (LCPUFA) που αποτελούν παράγωγά τους. Από αυτά, τα πιο σημαντικά στις μεταβολικές λειτουργίες είναι το dihomogamma linolenic acid (18:3 n-6, DGLA), το αραχιδονικό οξύ (20:4 n-6, AA), το εικοσοπενταενοϊκό οξύ (20:5 n-3, EPA) και το εικοσιδια-εξαενοϊκό οξύ (22:6 n-3, DHA).

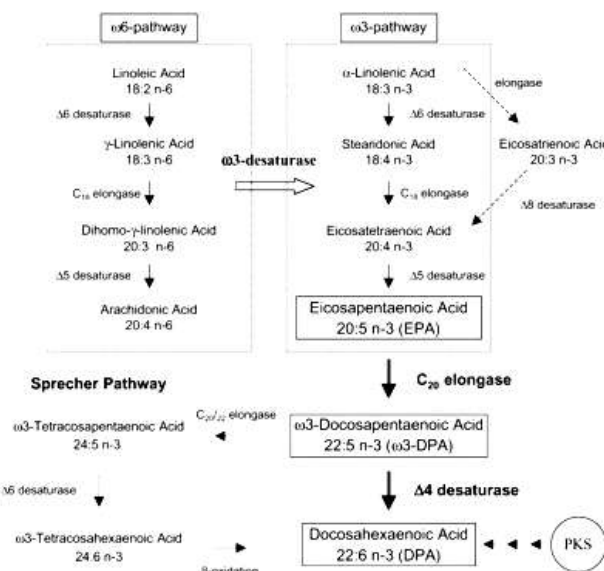
Σχηματισμός λιπαρών οξέων

Μετά από την πρόσληψη τους με την τροφή, το LA (18:2n-6) και το αLN (18:3n-3) υφίστανται αντιδράσεις αποκορεσμού και επιμήκυνσης από την Δ6 αποκορεσμάση (D7)



Εικόνα 8. Σύνθεση λιπαρών οξέων. Α: Σχηματισμός πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από το παλμιτικό. Β: Σχηματισμός πολυακόρεστων λιπαρών οξέων από τα απαραίτητα λιπαρά οξέα

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, αλλά και στη νεογνική περίοδο, οι απαιτήσεις για τα LCPUFA είναι ιδιαιτέρως αυξημένες. Το κατά πόσο αυτά θα είναι διαθέσιμα για το έμβρυο είναι συνάρτηση πολλών παραγόντων. Έτσι, ρόλο και συμμετοχή έχει ο βαθμός πρόσληψής τους από τη μητέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μέσω της διατροφής.



Εικόνα 9. Μεταβολικοί δρόμοι σύνθεσης λιπαρών οξέων

Επιπλέον, ρόλο παίζουν οι πολλές φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές προσαρμογής που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της κύησης. Τέλος, ο πλακούντας, παίζει σημαντικό ρόλο αποτελεί το φραγμό και το σημείο επικοινωνίας της μητρικής κυκλοφορίας με το αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Στις μελέτες που έχουν σχέση με τα LCPUFA τα αποτελέσματα που αναφέρονται αφορούν κυρίως στην οπτική και διανοητική ανάπτυξη στην αρχή της ζωής. Ο λόγος που αναζητούνται αυτές οι παράμετροι είναι ότι έχει διαπιστωθεί ότι ο εγκέφαλος και ο αμφιβληστροειδής απαιτούν υψηλή συγκέντρωση DHA για να λειτουργήσουν σωστά [113]. Έχει διαπιστωθεί ότι το DHA είναι το κυριότερο πολυακόρεστο λιπαρό οξύ στα άπω τμήματα των ραβδίων και κωνίων του αμφιβληστροειδή [114]. Τα φωσφολιπίδια της φαιάς ουσίας του εγκεφάλου περιέχουν υψηλά ποσά DHA (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη και φωσφατιδυλοσερίνη) και AA (φωσφατιδυλινοσιτόλη). Εξάλλου, το AA βρίσκεται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών όλου του σώματος (κυρίως με τη μορφή φωσφατιδυλινοσιτόλης). Υπερβολική χρήση του DHA από τον αναπτυσσόμενο αμφιβληστροειδή και εγκέφαλο οδηγεί σε διαταραχές του ηλεκτροαμφιβληστροειδογραφήματος και των αντιδράσεων των μαθησιακών συμπεριφορών των προκλητών οπτικών δυναμικών (visual evoked potential) [113], ενώ τελευταία διατυπώθηκε η άποψη ότι η εξάντληση του DHA επηρεάζει και τη μεταφορά του σήματος στις μεμβράνες του απώτερου τμήματος των ραβδίων του αμφιβληστροειδούς [115]. Εξάλλου, το AA αποτελεί πρόδρομο μόριο εικοσανοειδών και λευκοτριενίων που παίζουν ρόλο στη μετάδοση του σήματος στις νευρωνικές συνάψεις.

Η συγκέντρωση DHA και AA στο λιπώδη ιστό του εμβρύου είναι εντυπωσιακά υψηλότερη από αυτή του λιπώδους ιστού της μητέρας. Ενδιαφέρον, όμως παρουσιάζει και το γεγονός ότι ένα σχετικά μικρό ποσοστό DHA από αυτό που βρίσκεται στο λιπώδη ιστό

του εμβρύου εναποτίθεται στον εγκέφαλο του εμβρύου. Μέσα σε δύο ώρες από τη στιγμή της γέννησης, τα αποθέματα λίπους του εμβρύου αρχίζουν να καταβολίζονται ταχέως [116]. Σε έρευνες που η δίαιτα της μητέρας στερείτο πηγών DHA, διαπιστώθηκε ότι τα αποθέματα DHA του νεογνού φτάνουν για χρονικό διάστημα περίπου δύο μηνών [117]. Φαίνεται λοιπόν ότι αυτή η αποθήκη DHA χρησιμεύει για τη διασφάλιση της ομαλής ανάπτυξης του νευρικού συστήματος τους πρώτους μήνες της ζωής και την ελαχιστοποίηση του κινδύνου από τη στέρηση αυτών των συστατικών [118].

Μηχανισμοί μεταφοράς των λιπαρών οξέων

Όλα τα λιπαρά οξέα μπορούν να διέρχονται τις φωσφολιπιδικές διπλοστοιβάδες των κυττάρων με απλή διάχυση και ενσωμάτωση [119], η δε ταχύτητα με την οποία γίνεται αυτή η παθητική μεταφορά είναι πολύ υψηλή. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η παρουσία ενός συστήματος πρωτεϊνών δέσμευσης λιπαρών οξέων (fatty acid binding proteins, FABPs) που διευκολύνει τη διαδικασία μεταφοράς τους και περιλαμβάνει ένα σύστημα πρωτεϊνών που εντοπίζονται στην επιφάνεια του κυττάρου και άλλων που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα. Στις πρώτες ανήκουν η μεμβρανική δεσμευτική πρωτεΐνη των λιπαρών οξέων (plasma membrane fatty acid binding protein, FABP_{pm}) και οι πρωτεΐνες μεταφορείς των λιπαρών οξέων (fatty acid translocase, FAT και fatty acid transport protein, FATP). Στο κυτταρόπλασμα βρίσκονται μια σειρά δεσμευτικών πρωτεϊνών των λιπαρών οξέων που βρίσκονται σε αρκετές ισομορφές και ονομάζονται συνολικά κυτταροπλασματικές (cytosolic FABPs, cFABPs). Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί εννιά διαφορετικοί τύποι [120-123]

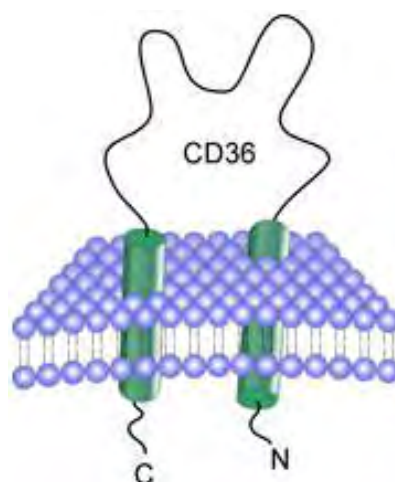
Τα λιπαρά οξέα παρέχονται με μορφή συμπλέγματος με την αλβουμίνη και σε ακυλιωμένη μορφή μέσα στις τριακυλογλυκερόλες των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών, από τις οποίες μπορούν να αποχωριστούν με τη δράση του ενζύμου λιποπρωτεϊνική λιπάση. Όταν το ενδοθήλιο δεν διαθέτει πόρους (fenestrae), όπως συμβαίνει στους μύες και το νεφρό, τα λιπαρά οξέα μεταφέρονται μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων για να συνδεθούν με την αλβουμίνη του διάμεσου χώρου. Σε περιπτώσεις που υπάρχουν πόροι, όπως στο ήπαρ, τα λιπαρά οξέα διέρχονται απευθείας. Η αποδέσμευση των λιπαρών οξέων από την αλβουμίνη πραγματοποιείται με τη βοήθεια πρωτεϊνών δέσμευσης της αλβουμίνης (Alb.BP) που βρίσκονται στην ενδοαυλική επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων και στη μεμβράνη των παρεγχυματικών κυττάρων [124, 125]. Η διέλευση, κατόπιν, των λιπαρών οξέων από την κυτταρική μεμβράνη γίνεται με απλή διάχυση, με τη βοήθεια πρωτεϊνών ή με συνδυασμό και των δύο τρόπων. Στο κυτταρόπλασμα, στη πλειοψηφία τους, τα λιπαρά οξέα είναι συνδεδεμένα με τις κυτταροπλασματικές FABP. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί η

ύπαρξη μιας ειδικής πρωτεΐνης δέσμευσης του acyl- CoA σε μια ποικιλία κυττάρων, που συμμετέχει στη διοχέτευση του λιπαρού οξέος στο σημείο του μεταβολισμού του [126].

Μεμβρανικές πρωτεΐνες

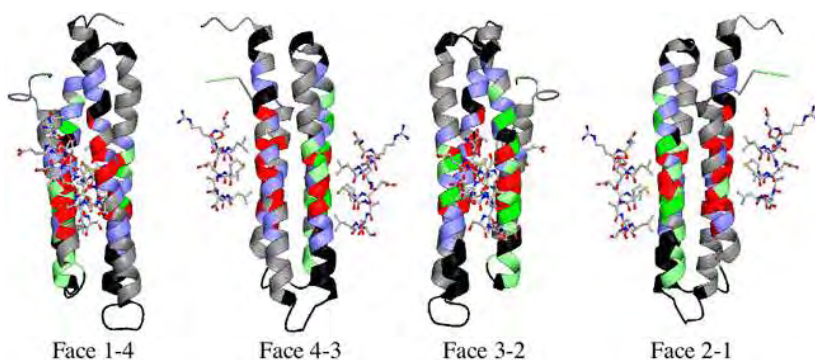
Η μεμβρανική δεσμευτική πρωτεΐνη των λιπαρών οξέων (FABPpm) είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη MB 40- 43kDa που εντοπίστηκε αρχικά σε ηπατικά κύτταρα [127] και αργότερα ανιχνεύτηκε και στο λιπώδη ιστό, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες και στο έντερο.

Η τρανσλοκάση των λιπαρών οξέων (fatty acid translocase, FAT/ CD36) είναι μια πρωτεΐνη MB 88 kDa, ενσωματωμένη στην κυτταρική μεμβράνη, ομόλογη με το ανθρώπινο αντιγόνο διαφοροποίησης των λευκοκυττάρων CD36 και εντοπίστηκε αρχικά σε λιποκύτταρα [128]. Έκφραση του FAT/ CD36 παρατηρείται σε ιστούς, όπως ο λιπώδης, στην καρδιά, στους σκελετικούς μύες, στο έντερο, στο σπλήνα και σε μικρότερη συγκέντρωση στον όρχι. Αναφέρεται ότι δεν παρουσιάζει ειδικότητα σε κάποιο συγκεκριμένο λιπαρό οξύ [118] και ότι το επίπεδο έκφρασης της



Εικόνα 11. Αναπαράσταση FAT/ CD36

καθορίζεται από διάφορους παράγοντες. Σε σκελετικούς μύες και στο μυοκάρδιο αρουραίων ο καθοριστικός παράγοντας είναι η οξειδωτική ικανότητα των μυών [129]. Αλλού, έχει αναφερθεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης κατά τη διαφοροποίηση των προλιποκυττάρων σε λιπώδη [128], στους σκελετικούς μύες και στο μυοκάρδιο διαβητικών ζώων και στην καρδιά ζώων που η διατροφή τους ήταν πλούσια σε λιπαρά οξέα



Εικόνα 10. Αναπαράσταση στερεοχημικής δομής FATP

Στην κυτταρική μεμβράνη εντοπίστηκε και η πρωτεΐνη μεταφοράς των λιπαρών οξέων (fatty acid- transport protein, FATP) [130]. Είναι ενσωματωμένη στη μεμβράνη και έχει MB 63 kDa. Η πρωτεΐνη FATP εντοπίζεται στο λιπώδη ιστό, στην καρδιά και τους σκελετικούς μύες και λιγότερο σε εγκέφαλο, νεφρό, πνεύμονα και ήπαρ.

Επιπρόσθετα, υπάρχουν ενδείξεις για την ύπαρξη μιας μεμβρανικής πρωτεΐνης με ρόλο FABP και στα λιποκύτταρα (MB 22 kDa) [131] και μια άλλη στην καρδιά και στο νεφρό (MB 60 kDa) [132], αλλά χωρίς να έχουν ακόμη χαρακτηριστεί.

Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

Οι κυτταροπλασματικές FABP (cFABP) ανήκουν σε μία οικογένεια πρωτεϊνών μεγέθους 14- 15 kDa με την ικανότητα να συνδέουν υδρόφοβα μόρια με υψηλή συνάφεια. Κάθε τύπος πήρε το όνομά του από τον ιστό στον οποίο βρέθηκε ότι εκφράζεται [121]. Αν συμπεριληφθούν και οι τέσσερις κυτταρικές πρωτεΐνες δέσμησης ρετινοειδών (CRBP, CRABP) τότε μέχρι τώρα, έχουν ταξινομηθεί δεκατρείς διαφορετικές μορφές. Αν και διαφέρουν στην αλληλουχία των αμινοξέων σημαντικά (ταύτιση αλληλουχίας 15- 70%), έχουν παρόμοια τριτοταγή δομή παίρνοντας μορφή αχιβάδας (clamshell) με το υδρόφοβο μόριο να τοποθετείται ανάμεσα στα δύο μέρη [133].



Εικόνα 12. Αναπαράσταση στερεοχημικής δομής cFABPs

Σε γενικές γραμμές, οι cFABP παρουσιάζουν ισχυρή συνάφεια στη σύνδεση με λιπαρά οξέα μακριάς αλύσου. Ο βαθμός της συνάφειάς τους είναι συγκρίσιμος με αυτόν της αλβουμίνης του πλάσματος. Κάποιες από αυτές συνδέονται αποκλειστικά και μόνο με λιπαρά οξέα μακράς αλύσου (I- FABP, H- FABP), άλλες συνδέονται με εικοσανοειδή (E- FABP, L- FABP) και κάποιες με μόρια αμφο-υδροφοβικότητας (L- FABP). Παρατηρούνται σε σχετική αφθονία σε ιστούς που χρησιμοποιούν ευρέως το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων, όπως το ήπαρ, ο λιπώδης ιστός και η καρδιά [120]. Επίσης, παρατηρείται το φαινόμενο έκφρασης περισσότερων του ενός μορφών cFABP σε κύτταρα ενός τύπου. Για παράδειγμα, στα εντεροκύτταρα εκφράζονται ταυτόχρονα οι μορφές I- FABP, L- FABP, I- LBP και η CRBP II [134].

Όπως και στις μεμβρανικές πρωτεΐνες, η έκφραση των κυτταροπλασματικών FABP υπόκειται σε μεταβολές υπό την επίδραση διαφόρων μεταβολικών και φαρμακολογικών παραγόντων με αποτέλεσμα την αλλαγή σε μεταβολικές παραμέτρους των λιπιδίων [120]. Στο πλαίσιο αυτό παρατηρείται, για παράδειγμα, αύξηση της έκφρασης FABP σε ήπαρ, έντερο, καρδιά και νεφρούς όταν αυξηθεί το περιεχόμενο της διατροφής σε λίπος. Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί ότι τα ίδια τα κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα μπορούν,

λειτουργώντας ως αρχικοί αγγελιοφόροι, να επάγουν την έκφραση της A- LBP σε καλλιέργειες λιπωδών κυττάρων [135] και του H- FABP σε κύτταρα μυοκαρδίου αρουραίου [136]. Για να συμβεί αυτό, στην περίπτωση των λιπωδών κυττάρων, πιθανότατα εμπλέκεται ένας υποδοχέας ενεργοποιούμενος από τα λιπαρά οξέα (FAAR), η παρουσία του οποίου παραμένει να αποδειχθεί και σε άλλους ιστούς.

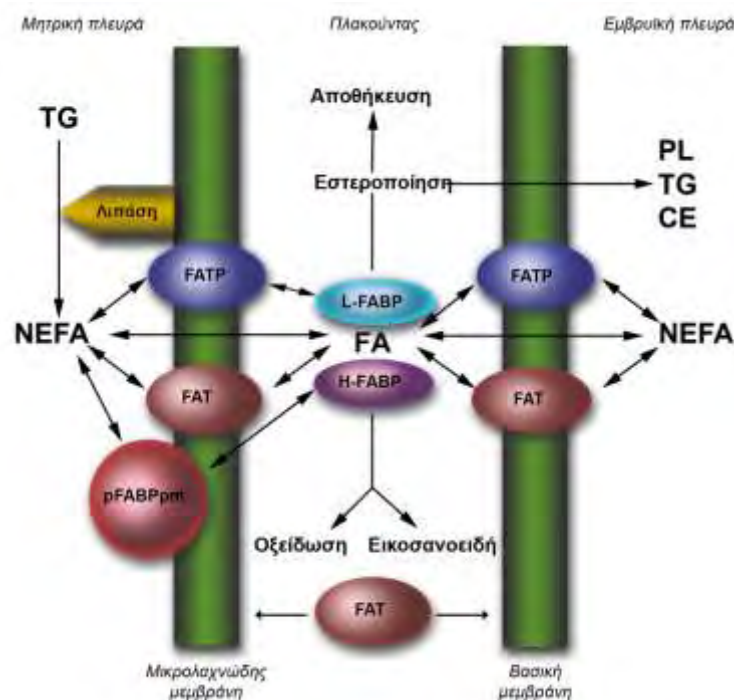
Η σημασία της ύπαρξης των κυτταροπλασματικών FABP έγκειται σε μία σειρά βιολογικών λειτουργιών για τις οποίες είναι υπεύθυνες. Ο κύριος ρόλος τους είναι η συμμετοχή τους στη μετακίνηση (translocation) των λιπαρών οξέων μακράς αλύσου στο κυτταρόπλασμα [137]. Με άλλα λόγια, οι cFABP μπορούν να παρομοιαστούν με το ενδοκυτταρικό ανάλογο της αλβουμίνης του πλάσματος. Σχετιζόμενες επιπλέον ενέργειες είναι, μεταξύ των άλλων, η «παγίδευση» των λιπαρών οξέων ή λιποφιλικών ουσιών ενδοκυττάρια έτσι ώστε να περιορίσουν τη συγκέντρωση λιπαρών οξέων που δεν είναι δεσμευμένα με κάποια πρωτεΐνη (ελεύθερα) στο εσωτερικό του κυττάρου. Επιπλέον, συμμετέχουν άμεσα στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων λειτουργώντας ως ευοδωτικοί ή ανασταλτικοί συν-παράγοντες για αντιδράσεις στις οποίες τα λιπαρά οξέα είναι ρυθμιστές ή το υπόστρωμα. Τέλος, θα μπορούσαν να επηρεάζουν τη μεταβολική τύχη των λιπαρών οξέων συνδεδεμένα εκλεκτικά με αυτά. Έχει, ακόμα, προταθεί ο ρόλος τους ως ενδοκυττάρων αυξητικών παραγόντων. Στα ηπατοκύτταρα, η L- FABP προάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό παρουσία καρκινογόνων [138], ενώ η H- FABP (δρώντας εξωκυτταρίως) αναφέρεται ότι προάγει την υπερτροφία και διαφοροποίηση μυοκαρδιακών κυττάρων [139].

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι κυτταροπλασματικές FABP συμμετέχουν σε μονοπάτια επαγωγής σημάτων και στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων από τα λιπαρά οξέα [140, 141]. Αν, για παράδειγμα, σε κάποια μεταβολική διεργασία παραγόταν αραχιδονικό οξύ που χρησιμοποιείτο ως δεύτερος αγγελιοφόρος, η H- FABP θα μπορούσε δεσμεύοντας το να αναστείλει την αρνητική παλίνδρομη ρύθμιση εξαιτίας της παραγωγής του. Παρόμοια, συνδεδεμένη με την ουσία που φέρει το σήμα (signaling compound) ή λειτουργεί ως δεύτερος αγγελιοφόρος, η cFABP μπορεί να τη μεταφέρει και/ ή να την τροποποιεί.

Τέλος, άλλοι πιθανοί ρόλοι των κυτταροπλασματικών FABP είναι να κατευθύνουν τη μεταφορά των λιπαρών οξέων σε συγκεκριμένους μεταβολικούς δρόμους και να προστατεύουν τα κύτταρα από τις ανεπιθύμητες ενέργειες των λιπαρών οξέων μακράς αλύσου [120, 141] αν και για αμφότερες αυτές τις δράσεις δεν έχουμε ακόμα πλήρη τεκμηρίωση.

Συνδυασμένη δράση μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών FABP

Η μεταφορά των λιπαρών οξέων σε επίπεδο ιστών και κυτάρων υποβοηθείται από την παρουσία ενός αριθμού πρωτεϊνών που μπορούν να συνδέονται με τα λιπαρά οξέα με αντιστρεπτό τρόπο. Αντικειμενικός στόχος αυτών των συστημάτων είναι η επάρκεια των λιπαρών οξέων ώστε το κύτταρο να μπορεί συνεχώς να επωφελείται από την



Εικόνα 13. Μοντέλο αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών μεταφοράς των λιπαρών οξέων (μετά και από τα ευρήματά μας. βλ. Συζήτηση)

παραμένει σε κατάλληλα για την κυτταρική λειτουργία επίπεδα. Ελάχιστα πειραματικά δεδομένα υπάρχουν για τους μηχανισμούς αλληλεπίδρασης και ρύθμισης των FABP και συγκεκριμένα για την αλληλεπίδραση του FAT/ CD36 με την H- FABP [142].

Η σημασία των FABP (μεμβρανικών και κυτταροπλασματικών) ως συστήματα διαχείρισης των λιπαρών οξέων έγκειται στη διευκόλυνση της μεταφοράς τους σε υδατικά περιβάλλοντα και η διατήρηση ενός σχετικά σταθερού επιπέδου των μη συνδεδεμένων με πρωτεΐνη λιπαρών οξέων. Τέλος, γίνεται εφικτή η ρύθμιση και ο έλεγχος των διαδικασιών μεταβολισμού τους, τα οποία διαφορετικά θα μπορούσαν να αποβούν επικίνδυνα για τη βιωσιμότητα του κυττάρου.

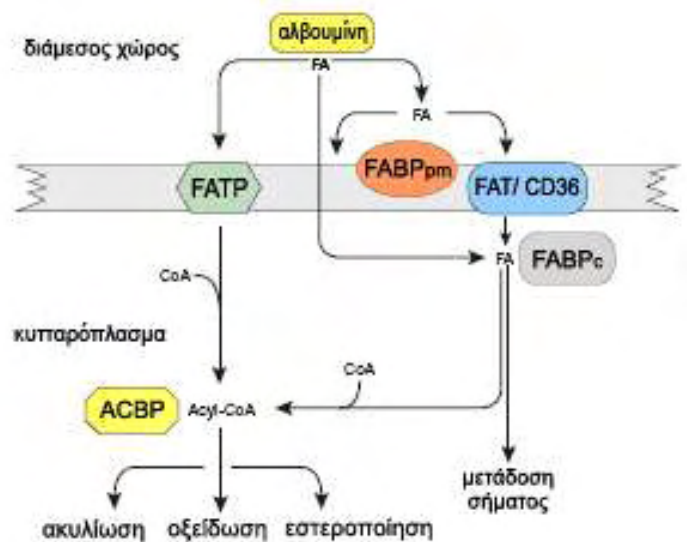
Πρωτεΐνες δέσμευσης και μεταφορά των λιπαρών οξέων στον πλακούντα.

Στον ανθρώπινο πλακούντα εξακολουθεί να ισχύει το γενικό πλαίσιο που περιγράφηκε παραπάνω ως προς τους τρόπους πρόσληψης και μεταφοράς των λιπαρών οξέων και ως προς τις πρωτεΐνες που συμμετέχουν σε αυτή τη διαδικασία. Εντούτοις παρατηρούνται κάποιες διαφοροποιήσεις.

Τα λιπίδια της μητρικής κυκλοφορίας οφείλουν να διαπεράσουν το ανατομικό και λειτουργικό σύνορο που οριοθετείται από τη στοιβάδα της συγκυτιοτροφολάστης του

πλακούντα. Το συγκύτιο, πάχους περίπου 5 μm αποτελείται από δύο μεμβράνες: τη μικρολαχνώδη (microvillous) που βρίσκεται προς την πλευρά της μητρικής κυκλοφορίας και τη βασική που βρίσκεται στην πλευρά της εμβρυϊκής κυκλοφορίας.

Η μεταφορά τους από τη μητρική στην εμβρυϊκή κυκλοφορία γίνεται με παθητική διάχυση και με τη βοήθεια ενός



Εικόνα 14. Μεταβολικοί δρόμοι λιπαρών οξέων

αριθμού πρωτεϊνών. Στον πλακούντα ανευρίσκεται μια διαφορετική μορφή FABP, η πλακουντιακή FABP (pFABP). Παρότι έχει παρόμοιο μέγεθος με την FABP των υπόλοιπων κυττάρων, έχει διαφορετική σύνθεση αμινοξέων και η εντοπίζεται αποκλειστικά στη μικρολαχνώδη μεμβράνη [143]. Η pFABP φαίνεται ότι δρα ως ένας εξωκυττάριος δέκτης λιπαρών οξέων, διευκολύνοντας τη διάχυση μέσω της φωσfolιπιδικής στιβάδας και αυξάνοντας τοπικά τη βαθμίδωση συγκέντρωσης λιπαρών οξέων εκτός και εντός κυττάρου. Η pFABP δείχνει μεγαλύτερη συνάφεια και δυνατότητα σύνδεσης με το AA και το DHA σε σχέση με το LA και το ολεϊκό οξύ. Άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες που έχουν βρεθεί στον πλακούντα είναι η FAT/ CD36 και η FATP. Διαπιστώθηκε ότι αμφότερες εντοπίζονται τόσο στη μικρολαχνώδη όσο και στη βασική επιφάνεια της συγκυτιοτροφοβλάστης. Τέλος, ενδοκυτταρικά, έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη της καρδιακής και ηπατικής FABP (ισομορφές H-FABP και L-FABP) [143].

Οι πρωτεΐνες FAT/ CD36 και FATP επιτρέπουν την αμφίδρομη ροή των λιπαρών οξέων εντός και εκτός κυττάρου. Στην περίπτωση της συγκυτιοτροφοβλάστης, η παρουσία τους στη βασική και μικρολαχνώδη επιφάνεια μπορεί να αποτελεί μέρος ενός συστήματος που να επιτρέπει τη μεταφορά λιπαρών οξέων και προς τις δύο κατευθύνσεις [144-146]. Αυτό, φαινομενικά, έρχεται σε αντίθεση με την παρατηρούμενη βαθμίδωση συγκέντρωσης των λιπαρών οξέων και τα αυξημένα επίπεδα συγκέντρωσης τους στο έμβρυο σε σχέση με τη μητέρα. Από αρκετές μελέτες έχει αναδειχθεί ο ρόλος των κυταροπλασματικών FABP του πλακούντα (H-FABP και L-FABP) στην απομάκρυνση των λιπαρών οξέων και τη διοχέτευσή τους σε καθορισμένους μεταβολικούς δρόμους. Αυτή η λειτουργία τους θεωρείται

καθοριστικός παράγοντας για την εμφάνιση της παρατηρούμενης καθαρής πρόσληψης (net uptake) λιπαρών οξέων κατά τη διάρκεια της κύησης από το έμβρυο [120, 147, 148].

Μεταβολισμός των λιπαρών οξέων στον πλακούντα

Τα τριγλυκερίδια της μητρικής κυκλοφορίας αποτελούν την κυριότερη πηγή μη-εστεροποιημένων λιπαρών οξέων (NEFA) για τον πλακούντα. Με τη βοήθεια της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης μεταβολίζονται προς NEFA και προσλαμβάνονται από τη μικρολαχνώδη μεμβράνη. Συνήθως, πρόκειται για λιπαρά οξέα μακράς αλυσού.

Κατά τη διάρκεια της κύησης, παρατηρείται αύξηση του ρυθμού ανακύκλωσης (turnover) των τριγλυκεριδίων της μητέρας με αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα. Αυτή η κινητοποίηση των NEFA από τα αποθέματα λίπους της μητέρας φαίνεται ότι ρυθμίζεται από τον πλακούντα και καθοδηγείται από τη λεπτίνη που παράγεται σε αυτόν και βγαίνει στη μητρική κυκλοφορία [149]. Ανάμεσα στην πλειάδα των ρόλων της, η λεπτίνη δρα και επάγοντας τη λιπόλυση [5], ενώ επίσης έχουν συσχετιστεί τα κυκλοφορούντα της επίπεδα στη μητρική κυκλοφορία με το λόγο βάρους του εμβρύου προς τον πλακούντα [150]. Η τελευταία παρατήρηση υποδηλώνει την ύπαρξη ενός μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο ο πλακούντας μπορεί να ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα λιπαρών οξέων ανάλογα με τη ζήτηση του εμβρύου [149].

Μηχανισμοί εκλεκτικής μεταφοράς των LCPUFA στον πλακούντα

Η παρατήρηση της υψηλότερης συγκέντρωσης LCPUFA στην εμβρυϊκή πλευρά υποστηρίζει την ύπαρξη κάποιου ρυθμιστικού μηχανισμού που εδράζεται στον πλακούντα. Το επίπεδο στο οποίο λειτουργεί ο/ή οι μηχανισμοί μπορεί να βρίσκεται σε επίπεδο δράσης της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, πρόσληψης από τη μικρολαχνώδη μεμβράνη, μεταβολισμού εντός του πλακούντα ή αλλαγή της μορφής με την οποία τα λιπαρά οξέα εξέρχονται στην εμβρυϊκή κυκλοφορία [149].

Ανεξαρτήτως των μηχανισμών που πιθανόν να εμπλέκονται στη διαδικασία, έχει αποδειχθεί από διάφορες μελέτες, ότι ο κυριότερος παράγοντας που καθορίζει το μίγμα των λιπαρών οξέων που θα είναι προς διάθεση στο έμβρυο είναι η σύνθεση των λιπαρών οξέων που περιέχονται στη μητρική δίαιτα [151-153].

Οι μετρήσεις των AA και DHA στο κλάσμα των NEFA που παράγεται από τη λιποπρωτεϊνική λιπάση έδειξε ότι οι συγκεντρώσεις τους στο μεσολάχιο διάστημα του πλακούντα είναι τρεις ως τέσσερις φορές παραπάνω από ότι στη μητρική κυκλοφορία [154]. Φαίνεται ότι τριγλυκερίδια που περιέχουν ακόρεστα οξέα ιδίως στη θέση sn-2 του μορίου τους αποτελούν καλύτερο υπόστρωμα για τη λιποπρωτεϊνική λιπάση [155, 156] και

οδηγούν σε αύξηση της συγκέντρωσής τους στην εμβρυϊκή κυκλοφορία χωρίς να υπάρχει κάποια ειδική ευαισθησία του πλακούντα προς αυτά.

Ο επιλεκτικός μηχανισμός των λιπαρών οξέων που εισέρχονται στον πλακούντα μπορεί να οδηγήσει σε τροποποίηση του μίγματος λιπαρών οξέων που διοχετεύεται στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Έχει προταθεί ότι ο πλακούντας μπορεί να αποτελεί τόπο σύνθεσης AA και DHA. Ωστόσο, τα ευρήματα δεν δίνουν πειστικές αποδείξεις προς αυτή την κατεύθυνση: από τα ένζυμα που απαιτούνται για τη σύνθεση αυτών των λιπαρών οξέων, η ποσότητα mRNA της Δ5- αποκορεσμάσης βρίσκεται μειωμένη στον πλακούντα σε σχέση με άλλους ιστούς [157], ενώ δεν ανιχνεύεται η ύπαρξη Δ6 και Δ5 αποκορεσμάσης και ούτε έχει παρατηρηθεί επιμήκυνση ή αποκορεσμός του LA ή αLN σε πλακούντα [158]. Έχει παρατηρηθεί δραστηριότητα επιμήκυνσης και αποκορεσμού των λιπαρών οξέων στον αναπτυσσόμενο εγκέφαλο και στο ήπαρ του εμβρύου [159], χωρίς όμως να μπορεί να αποσαφηνιστεί η συμμετοχή αυτού του μηχανισμού στα εμβρυϊκά LCPUFA. Έτσι, δεν φαίνεται προς το παρόν να υπάρχουν σημαντικά στοιχεία που να υποστηρίζουν ένα σημαντικό ρόλο για σύνθεση αυτών των λιπαρών οξέων στον πλακούντα.

Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η διατήρηση των LCPUFA από τον πλακούντα. Σε έρευνες που ελέγχθηκε η σύνθεση του μίγματος των λιπαρών οξέων τόσο από τη μητρική όσο και από την εμβρυϊκή κυκλοφορία, διαπιστώθηκε ότι, η πρόσληψη τους το τελευταίο τρίμηνο ακολουθούσε τη σειρά AA> DHA> αLN> LA. Ο πλακούντας, ωστόσο, εκλεκτικά κατακρατούσε AA και έτσι τελικά η σειρά με την οποία τα λιπαρά οξέα μεταφέρονταν στην εμβρυϊκή κυκλοφορία ήταν DHA> αLN> LA> AA [158]. Η παραπάνω παρατήρηση καθώς και άλλες μελέτες [160] δείχνουν ότι ο πλακούντας απαιτεί, για την ικανοποίηση των μεταβολικών του αναγκών, ένα ελάχιστο επίπεδο AA που χρησιμοποιείται ως πρόδρομο μόριο των εικοσανοειδών PGE₂, PGD₂, TXA₂, 12- HETE. Σε περίπτωση επάρκειας του AA, το περίσσειμα διατίθεται προς την εμβρυϊκή κυκλοφορία και αυτή η διαφορετική διαχείριση του AA και του DHA είναι συμβατή και με την παρατήρηση ότι το έμβρυο είναι περισσότερο εξαρτημένο από την πλακουντιακή παροχή DHA σε σχέση με AA.

Ένας άλλος τρόπος ρύθμισης της επιλεκτικής συγκέντρωσης LCPUFA στην εμβρυϊκή κυκλοφορία αποτελεί η μορφή με την οποία τα λιπαρά οξέα ελευθερώνονται από τον πλακούντα. Η έλλειψη δράσης λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στη βασική μεμβράνη του πλακούντα είναι συμβατή με την άποψη ότι εστεροποιημένα λιπαρά οξέα δεν μπορούν να επαναπροσληφθούν από τον πλακούντα, ουσιαστικά παγιδεύοντας τα στην εμβρυϊκή κυκλοφορία. Έχει διαπιστωθεί ότι ποσοστό 90% του LA που εισέρχεται στην εμβρυϊκή κυκλοφορία βρίσκεται με τη μορφή NEFA, ενώ 60% του AA με τη μορφή PL [161]. Η μετατροπή των PUFA/ LCPUFA σε εστέρες των λιπιδίων οδηγεί σε κατακράτησή τους από το

έμβρυο, ενώ τα NEFA, που περιέχουν μικρότερο ποσό LCPUFA μπορούν να επαναπροωθηθούν σε άγνωστο βαθμό προς τον πλακούντα [149].

Γ. Συγκυτίνες 1,2 και υποδοχείς ASCT 1, 2

Συγκυτίνη 1

Γενικά

Το όνομα συγκυτίνη (syncytin) προτάθηκε από τον Mi το 2000 για να περιγράψει το προϊόν του γονιδίου *env* (envelope, κάψα επιφάνειας) του ιού HERV-W. Διαπιστώθηκε ότι το γενετικό υλικό αυτού του ενδογενή ρετροϊού έχει ενσωματωθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα και η λειτουργικά ενεργή πρωτεΐνη του εκφράζεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη του ανθρώπινου πλακούντα. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε ότι αν εισαχθεί το γενετικό υλικό αυτού του ιού σε κύτταρα COS, επάγεται ο σχηματισμός πολυπύρηνων συγκυτίων [162]. Παρόμοια επίδραση είχε και σε κύτταρα BeWo και 293T [163]. Αντιθέτως, καταστολή της έκφρασης της συγκυτίνης με τη χρήση αντισυνθετικών (antisense) ολιγονουκλεοτιδίων είχε ως αποτέλεσμα ελάττωση της σύντηξης και της διαφοροποίησης καλλιεργούμενων τροφοβλαστικών κυττάρων [164]. Μετά την ανακάλυψη και δεύτερου μορίου με παρόμοια δράση μετονομάστηκε σε συγκυτίνη 1.

Ο σχηματισμός του συγκυτίου είναι καθοριστικό σημείο για τη φυσιολογική λειτουργία του πλακούντα. Η συγκυτιοτροφοβλάστη δημιουργείται από την σύντηξη των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων και σχηματίζει μια μονή στιβάδα που αποτελεί το εξωτερικό, ανατομικό και λειτουργικό όριο του πλακούντα.

Μορφή και δομή της συγκυτίνης 1

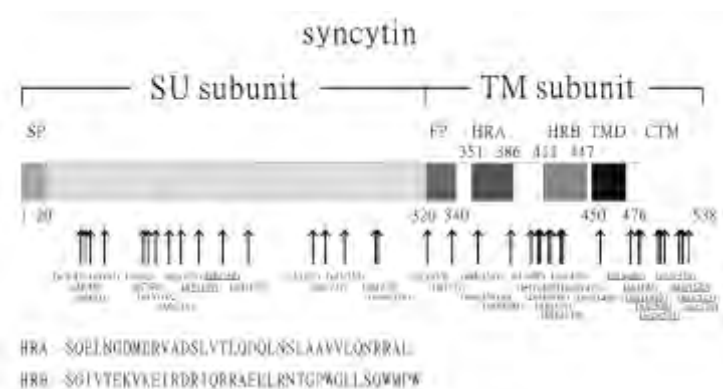
Το γονίδιο το υπεύθυνο για τη συγκυτίνη 1 εντοπίζεται στη θέση 7q21- q22. Υπάρχουν άλλες αναφορές όπου η εντόπιση του γονιδίου αναφέρεται στη θέση 7q21.2 (Blond et al. (1999)), ενώ η μελέτη με Southern ανάλυση αναφέρεται ότι το γονίδιο HERV-W είναι ευρέως διαδεδομένο, με πολλαπλά αντίγραφα και αλληλουχίες που εντοπίζονται στις θέσεις 7q21-q22, 14q11-q12, 21q22.3 και Xq22. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι μήκους 538 αμινοξέων και περιέχει ένα αμινο-τελικό πεπτίδιο-οδηγό και μία καρβοξυ-τελική



Εικόνα 15. Αναπαράσταση στερεοχημικής δομής συγκυτίνης 1

υδροφοβική αλληλουχία προσδεδεμένη στη μεμβράνη. Διαθέτει ένα διαμεμβρανικό (TM) και ένα τμήμα επιφάνειας (SU) με μία και επτά θέσεις γλυκοζυλίωσης, αντίστοιχα. Με

τεχνικές ανάλυσης SDS-PAGE υπολογίστηκε το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης στα 60 kDa και κατόπιν γλυκοζυλίωσης στα 80 kDa. Με τεχνική Northern Blot εντοπίστηκαν μετάγραφα HERV- W μεγέθους 4 και 8 kb σε μεγάλο αριθμό στον πλακούντα, ενώ σε μικρότερη συγκέντρωση εντοπίστηκε μετάγραφο 8 kb στον όρχι. Μικρότερος αριθμός μεταγράφων HERV- W εντοπίζονται στα επινεφρίδια, ο μυελός των οστών, ο μαστός, το κόλο, ο νεφρός, η ωοθήκη, ο προστάτης, το δέρμα, ο σπλήνας, ο θύμος, ο θυρεοειδής, ο εγκέφαλος και η τραχεία. Σε ασθενείς που πάσχουν από σκλήρυνση κατά πλάκας (multiple sclerosis) τα επίπεδα HERV- W mRNA και πρωτεϊνών είναι σημαντικά αυξημένα, ιδίως στα αστροκύτταρα και στη μικρογλοία. Η έκφραση της συγκυτίνης στον πλακούντα είναι υψηλότερη στα πρώτα στάδια της εγκυμοσύνης, ενώ τα επίπεδά της μειώνονται προς το τέλος της εγκυμοσύνης.



397, με ανοσοκασταλτικές ιδιότητες. Αυτό το τμήμα μήκους 25 αμινοξέων παρατηρείται και σε πολλές άλλες πρωτεΐνες ρετροϊκής προέλευσης. Η κυτταροπλασματική περιοχή του μορίου από άλλους θεωρείται απαραίτητη για την πραγματοποίηση της σύντηξης των κυττάρων (πηγή NCBI) από τη συγκυτίνη 1, ενώ άλλοι θεωρούν ότι παίζει ρυθμιστικό ρόλο στην όλη διαδικασία. Για τη σύντηξη πιστεύεται ότι το N- άκρο του μορίου παίζει καθοριστικό ρόλο με την εξαίρεση τριών περιοχών (S^{51} , V^{139} , E^{156}) [165]

Με βάση τις τρέχουσες θεωρίες, η πρωτεΐνη παρουσιάζει τουλάχιστον τρεις καταστάσεις χωροδιάταξης: 1. το αρχικό προ-σύντηξης στάδιο (pre-fusion native state), 2. το ενδιάμεσο προ-φουρκέτας στάδιο (pre-hairpin intermediate state), και 3. μετα-σύντηξης στάδιο φουρκέτας (post-fusion hairpin state). Κατά τη διαδικασία σύντηξης, τμήματα της πρωτεΐνης που παρουσιάζουν μορφή περιελιγμένων σπειραμάτων τροποποιούν τη διάταξη τους και σχηματίζουν ένα τριμερές που τοποθετεί το πεπτιδίο σύντηξης (FP) σε κοντινή θέση με το C- άκρο του εξωκυττάριου τμήματος της πρωτεΐνης. Ο σχηματισμός αυτός φαίνεται να επιτρέπει την έναρξη της σύντηξης των κυτταρικών μεμβρανών.

Η ώριμη μορφή της πρωτεΐνης σχηματίζεται *in vivo* μετά από ενζυματική διάσπαση του μορίου. Οι γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου αρχικά παράγονται σε πρόδρομη, ανενεργή μορφή και παρουσιάζουν εκτεταμένη N- γλυκοζυλίωση. Στα σωμάτια Golgi (πιθανότατα με δράση της φουρίνης) πραγματοποιείται η ενζυμική διάσπαση και η δημιουργία των υπομονάδων SU και TM. Το σημείο διάσπασης μεταξύ των δύο υπομονάδων απαιτεί την ελάχιστη αλληλουχία [KR]- X- [KR]- R. Αυτές οι υπομονάδες θα επανασυνδεθούν σχηματίζοντας ετεροδιμερή και θα μετακινηθούν προς την κυτταρική μεμβράνη.

Η λειτουργικά ενεργή πρωτεΐνη αποτελείται από ένα τριμερές σύμπλεγμα ετεροδιμερών SU- TM που συνδέονται μεταξύ τους, πιθανότατα, με ένα ασταθή δισουλφιδικό δεσμό. Σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό αυτού του δεσμού παίζει η περιοχή CXXC που βρίσκεται σε ένα ευρύ φάσμα πρωτεϊνών ρετροϊκής προέλευσης. Το τμήμα αυτό σχηματίζει το δισουλφιδικό δεσμό με την περιοχή CX6CC που απαντάται στη διαμεμβρανικό τμήμα της πρωτεΐνης. Όταν η συγκυτίνη 1 συνδεθεί με τον υποδοχέα της πραγματοποιείται ισομερισμός του δεσμού ανάμεσα στις αλυσίδες. Αυτό διευκολύνει την κυτταρική σύντηξη. Αξίζει να σημειωθεί ότι το επιφανειακό τμήμα δεν αγκιστρώνεται στη μεμβράνη, αλλά εντοπίζεται στην εξωκυτταρική επιφάνεια διαμέσου της σύνδεσής του με το διαμεμβρανικό τμήμα.

Η θέση σύνδεσης της συγκυτίνης 1 με τους υποδοχείς ASCT1 και ASCT2 έχει εντοπιστεί και θεωρείται ότι τα τελευταία 124 αμινοξέα του N- άκρου της υπομονάδας SU της ώριμης πρωτεΐνης είναι αρκετά για την αλληλεπίδραση με τους υποδοχείς [166].

Επιπρόσθετα, δύο παρεμβαλλόμενες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (HRA και HRB) ταυτοποιήθηκαν στην υπομονάδα TM. Ο ρόλος τους φαίνεται να είναι ρυθμιστικός της δραστηριότητας σύντηξης της συγκυτίνης με πιο δραστικό αναστολέα την περιοχή HRB [165].

Τα πρωτεϊνικά μόρια που προκύπτουν ως προϊόντα πολυμορφισμού διατηρούν την ικανότητα πρόκλησης σύντηξης.

Ρόλος της συγκυτίνης 1 στον πλακούντα

Από τη στιγμή που ανακαλύφθηκε η ύπαρξη του γονιδιακού υλικού του ρετροϊού HERV- W έγιναν προσπάθειες ταυτοποίησης του ρόλου της. Η έκφραση του μορίου στον πλακούντα, προσέλκυσε το ενδιαφέρον των ερευνητών στον πιθανό ρόλο της συγκυτίνης 1 στις διεργασίες που επιτελούνται σ' αυτό το όργανο και στη σχέση της με την ανθρώπινη αναπαραγωγή.

Οι πειραματικές αποδείξεις ότι, (i) η συγκυτίνη 1 προκαλεί σύντηξη, *in vitro*, σε μια σειρά κυτταρικών σειρών [162, 163], (ii) ανευρέθηκε στη συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα [163, 164] και (iii) ότι συμμετέχει άμεσα στη σύντηξη και διαφοροποίηση ανθρώπινων τροφοβλαστικών κυττάρων [164], στηρίζουν την υπόθεση της ύπαρξης ρόλου της στη διαδικασία πλακουντοποίησης. Έτσι εξηγείται, από εξελικτικής σκοπιάς, το γιατί το γενετικό υλικό του ιού δεν εξαφανίστηκε, αλλά διατηρήθηκε χάρη στην απόκτηση ενός σημαντικού ρόλου στη μορφογένεση του πλακούντα και στην ανθρώπινη αναπαραγωγή συνολικά. Αυτοί και άλλοι πιθανοί ρόλοι της συγκυτίνης 1 παρατίθενται στον πίνακα 3.

Ρόλος	Αναφορά
Ανοσοκαταστολή και προστασία του εμβρύου από τη μητέρα με ανοσοκαταστολή	[162]
Κυτταρική αντίσταση στη μόλυνση από τον νεκρωτικό του σπλήνα ιό	[167]
Συγκυτιοποίηση	[163]
Περιορισμός τροφοβλαστικής διεισδυτικότητας	[162]
Αύξηση παραγωγής προ- φλεγμονωδών μορίων (IL-1-βητα, iNOS και άλλων οξειδοαναγωγικών μορίων στο νευρικό σύστημα. Συμμετοχή στη παθοφυσιολογία της σκλήρυνσης κατά πλάκας	[168]

Πίνακας 3. Πιθανοί ρόλοι της συγκυτίνης σε διάφορα συστήματα και όργανα

Εντόπιση της συγκυτίνης 1 στον πλακούντα

Αρχικά, mRNA συγκυτίνης 1 εντοπίστηκε με τη χρήση Northern Blot στον πλακούντα και σε μικρότερο βαθμό στον όρχι [162]. Με *in situ* υβριδισμό σε δείγματα τελειόμηνων και νεαρότερων πλακούντων, mRNA μετάγραφα ανευρεθήκαν μόνο στη συγκυτιοτροφοβλάστη [162]. Μειωμένο mRNA συγκυτίνης παρατηρήθηκε σε δείγματα από κυήσεις με προεκλαμψία [169]. Στις παραπάνω εργασίες δεν γίνεται ειδική αναφορά για την τυχόν ύπαρξη ή όχι συγκυτίνης 1 στην κυτταροτροφοβλάστη .

Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων που αναπτύχθηκαν για διάφορα πεπτίδια του μορίου της συγκυτίνης 1, στοιχειοθετήθηκε η εντόπιση της συγκυτίνης στη βασική μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης αλλά, σε κάποιες περιπτώσεις, και στην κορυφαία μεμβράνη [162]. Χρησιμοποιώντας το ίδιο αντίσωμα σε δείγματα από πλακούντες πρώτου

τριμήνου, αναδείχθηκε η παρουσία συγκυτίνης 1 σε τροφοβλαστικό ιστό από πλακουντιακές λάχνες αλλά και εκτός λαχνών (extra villous) [170]. Με τη χρήση ενός μονοκλωνικού αντισώματος που αναπτύχθηκε έναντι μιας ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης, που περιελάμβανε ένα μεγάλο τμήμα του μορίου της συγκυτίνης (αμινοξέα 68 ως 446), υπήρξε σχετική διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων. Σε τομές δειγμάτων από πλακούντες στη 13^η εβδομάδα της κύησης, η συγκυτίνη ανιχνεύθηκε στη συγκυτιοτροφοβλάστη αλλά και σε μερικές περιοχές της κυτταροτροφοβλάστης [163]. Με τη χρήση του ίδιου αντισώματος σε πλακούντες πρώτου και τελευταίου τριμήνου διαπιστώθηκε η εντόπιση της συγκυτίνης 1 στην κορυφαία μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης [164]. Τέλος, πάντα με τη χρήση του ίδιου αντισώματος, καθορίστηκε ότι η παρουσία της συγκυτίνης 1 είναι πιο έντονη σε πλακούντες 1^{ου} τριμήνου σε σχέση με τελειόμηνους. Οι ίδιοι ερευνητές παρατήρησαν πιο έντονη έκφραση του μορίου στη συγκυτιοτροφοβλάστη και σε εξωλαχνική τροφοβλάστη, ενώ η έκφρασή της σε κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα ήταν ασθενής [171]. Αλλού, η εκτίμηση των επιπέδων mRNA της συγκυτίνης 1 έδειξε ελαφρά υψηλότερα επίπεδα σε πλακούντες τρίτου τριμήνου και, παραδόξως, χαμηλότερα στο δεύτερο τρίμηνο της εγκυμοσύνης σε σχέση με τα υπολογισμένα επίπεδα στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης [172].

Με τη χρήση ενός άλλου πολυκλωνικού αντισώματος που αναπτύχθηκε έναντι ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης που περιελάμβανε ένα το τμήμα 21 ως 215 των αμινοξέων του μορίου της συγκυτίνης διαπιστώθηκε η ομοιόμορφη ανίχνευση συγκυτίνης στη συγκυτιοτροφοβλάστη ενώ η παρουσία της στην κυτταροτροφοβλάστη ήταν αρκετά περιορισμένη [173].

Σε προεκλαμπτικούς πλακούντες, η συγκυτίνη κυρίως ανιχνεύτηκε στην κορυφαία μεμβράνη [169].

Ρύθμιση έκφρασης συγκυτίνης 1 και σύντηξης τροφοβλαστικών κυττάρων

Όπως και για άλλα βιολογικά μακρομόρια, η έκφραση της συγκυτίνης μπορεί να ρυθμιστεί σε διαφορετικά επίπεδα. Στάδια στα οποία μπορεί να γίνει αυτή η ρύθμιση είναι η μεταγραφή, το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing), η σταθερότητα του mRNA, η αποτελεσματικότητα της μετάφρασης, τυχόν μετα- μεταφραστικές τροποποιήσεις, η ενδοκυτταρική στόχευση και η σταθερότητα της πρωτεΐνης [173].

Ο ρυθμός μεταγραφής του γονιδίου καθορίζεται από την περιοχή του υποκινητή και την 5' μακριά επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (5' long terminal repeat region). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι ο ειδικός για τον πλακούντα μεταγραφικός παράγοντας GCMa αλληλεπιδρά

με δύο θέσεις σύνδεσης πριν από την 5' LTR του HERV-W γονιδίου (συγκυτίνη 1) και με αυτό τον τρόπο διεγείρει τη μεταγραφή του mRNA της συγκυτίνης [174]. Παρόμοιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στις κυτταροσειρές BeWo και JEG3, όπου παρατηρήθηκε ότι η υπερέκφραση του παράγοντα GCMa οδηγούσε σε αύξηση του mRNA και της πρωτεΐνης της συγκυτίνης, όχι όμως και στην κυτταροσειρά HeLa. Αξιοσημείωτη είναι και η παρατήρηση ότι το 3' άκρο της U3 περιοχής στην 5' LTR περιοχή του HERV-W γονιδίου περιέχει ένα TATA box που σχετίζεται με την έκφραση της συγκυτίνης σε κύτταρα [175].

Έχει δειχθεί ότι υπάρχουν πολλά μετάγραφα του γονιδίου της συγκυτίνης ως αποτέλεσμα εναλλακτικού ματίσματος και η μεταξύ τους αναλογία διαφέρει κατά τη διάρκεια της κύησης [171, 176]. Από αυτά τα προϊόντα, το μετάγραφο των 3.1 kb φαίνεται να είναι αυτό που μεταφράζεται σε πρωτεΐνη, ενώ στον όρχι, το μοναδικό μετάγραφο που είναι παρόν είναι αυτό των 8.1 kb [162].

Πέρα από τη μετάφραση του γονιδίου, η απόκτηση της ικανότητας να προκαλείται σύντηξη ενεργοποιείται μόνο μετά από την ενζυματική διάσπαση της πρωτεΐνης στις υπομονάδες SU και TM που θα επανενωθούν μεταξύ τους σχηματίζοντας την ώριμη πρωτεΐνη που αποτελείται από ένα τριμερές σύμπλεγμα ετεροδιμερών SU- TM που συνδέονται μεταξύ τους, πιθανότατα, με δισουλφιδικό δεσμό [176].

Εξωτερικοί παράγοντες που ενδεχομένως να προκαλούν διαφοροποίηση της έκφρασης της συγκυτίνης έχουν περιγραφεί. Το μοντέλο που συνήθως χρησιμοποιείται είναι οι κυτταροσειρές BeWo, JAR και JEG3. Σε αυτές έχει δειχθεί ότι η διέγερση τους με τον παράγοντα φορσκολίνη, που προκαλεί αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων cAMP, επάγει τη σύντηξη των κυττάρων [177, 178]. Η φορσκολίνη δείχθηκε μεταγενέστερα ότι αυξάνει και τα επίπεδα συγκυτίνης στις ίδιες κυτταροσειρές [162, 179]. Το συμπέρασμα που προκύπτει λοιπόν είναι ότι κομμάτι του ρυθμιστικού μηχανισμού έκφρασης της συγκυτίνης είναι εξαρτώμενο από το cAMP.

Η υποξία προκαλεί ελάττωση των επιπέδων mRNA της συγκυτίνης 1. Επιπλέον, η διέγερση στα επίπεδα συγκυτίνης που προκαλείται από τη φορσκολίνη παρουσιάζεται μειωμένη σε συνθήκες υποξίας [180, 181]. Σε συνθήκες υποξίας in vivo, όπως σε περιπτώσεις προεκλαμψίας, έχει δειχθεί ελάττωση των επιπέδων έκφρασης της συγκυτίνης [169].

Συγκυτίνη 2

Γενικά

Η Blaise και συνεργάτες περιέγραψε την ύπαρξη στον πλακούντα μιας δεύτερης πρωτεΐνης που προέρχεται από έναν ενδογενή ρετροϊό [182]. Μετά από έλεγχο πολλών αλληλουχιών ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης του ανθρώπινου γονιδιώματος που

προέρχονται από ρετροϊούς, διαπιστώθηκε ότι η πρωτεΐνη του φακέλου ενός μέλους της οικογένειας HERV- FRD προκαλεί σύντηξη. Η πρωτεΐνη αυτή ονομάστηκε συγκυτίνη 2 και επάγει τη δράση της μέσω διαφορετικών υποδοχέων από τη συγκυτίνη 1. Αυτοί οι υποδοχείς κατά τη διάρκεια εξέλιξης της διατριβής δεν ήταν γνωστοί. Πρόσφατα διαπιστώθηκε ότι ο υποδοχέας για τη συγκυτίνη 2 είναι ο MFSD2 (*Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2*) [183].

Μορφή και δομή της συγκυτίνης 2

Το γονίδιο κωδικοποίησης της συγκυτίνης 2 εντοπίζεται στη θέση 6p24.1. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται είναι μεγέθους 538 αμινοξέων. Διαθέτει μία διαμεμβρανική και μία εξωκυτταρική υπομονάδα και μία θέση διάσπασης-αποκοπής (cleavage site) ανάμεσά τους. Το τμήμα TM περιέχει υδροφοβικές περιοχές και αντιστοιχεί στο πεπτίδιο που είναι υπεύθυνο για τη σύντηξη. Επιπλέον, στην υπομονάδα αυτή περιέχεται και η ανοσοκατασταλτική περιοχή του μορίου. Με αναλύσεις που χρησιμοποιούσαν Northern Blot και RT-PCR διαπιστώθηκε η ύπαρξη ενός μεταγράφου 3.8- kb της συγκυτίνης 2 σε κύτταρα πλακούντα και κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα [182].

Μελέτες στην κρυσταλλική δομή της συγκυτίνης 2 ανέδειξαν την ύπαρξη ενός κεντρικού τμήματος 54 αμινοξέων στο εξωκυτταρικό τμήμα του μορίου. Αυτό το τμήμα αποτελείται από 3 αλυσίδες που συνδέονται μεταξύ τους και η διαμόρφωση αυτή είναι ανάλογη



δομικά αλλά όχι σε αλληλουχία, με αντίστοιχες περιοχές του HTLV-1 και του ιού λευχαιμίας του μυός Moloney [184].

Εικόνα 17. Αναπαράσταση στερεοχημικής δομής της συγκυτίνης 2

Η συγκυτίνη 2 εντοπίζεται αποκλειστικά ή σχεδόν αποκλειστικά στον πλακούντα. Έχει δειχθεί η ύπαρξή μεταγράφων της συγκυτίνης 2 και σε κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Επίσης, παρατηρήθηκε η έκφρασή της στις κυτταροσειρές BeWo (χοριοκαρκίνωμα), T47D (καρκίνωμα του μαστού) και ελάχιστη έκφραση στην NT2/ D1 (τερατοκαρκίνωμα) [182].

Εντόπιση της συγκυτίνης 2 στον πλακούντα

Ο υπολογισμός των επιπέδων mRNA της συγκυτίνης 2 σε πλακούντες και των τριών τριμήνων έδειξε σταδιακή πτώση των επιπέδων συγκυτίνης 2 με την πρόοδο της κύησης. Η

πτώση στο τελευταίο τρίμηνο φτάνει στο 40% σε σχέση με τα επίπεδα του πρώτου τριμήνου. Τα ίδια τα επίπεδα της συγκυτίνης 2 ήταν υποδεκαπλάσια των αντίστοιχων της συγκυτίνης 1 υποδεικνύοντας ένα διαφορετικό πλαίσιο έκφρασης μεταξύ των δύο μορίων [172].

Στη μοναδική μελέτη με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος που αναπτύχθηκε προς τη συγκυτίνη 2, δείχτηκε ότι η συγκυτίνη 2 απαντάται αποκλειστικά στα τροφοβλαστικά κύτταρα των λαχνών και όχι εξωλαχνικά. Πιο συγκεκριμένα, διαπίστωσαν ότι η συγκυτίνη 2 εντοπιζόταν, με μη ομοιόμορφο τρόπο, στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Σε κάποια από αυτά στο κυτταρόπλασμα και σε άλλα στην κυτταρική μεμβράνη και ειδικότερα στην πλευρά επαφής της με την συγκυτιοτροφοβλάστη [185].

Ρόλος της συγκυτίνης 2

Έρευνες που έγιναν για το ρόλο της συγκυτίνης 2 [182] έδειξαν ότι το μόριο αυτό μπορεί να προκαλέσει τη σύντηξη σε μια σειρά κυτταρικών πληθυσμών, μεταξύ των οποίων και πολλών ανθρώπινων. Τα κύτταρα στα οποία η συγκυτίνη 2 προκαλούσε σύντηξη ήταν διαφορετικά από αυτά στα οποία είχε δράση η συγκυτίνη 1. Αυτό υποδηλώνει ότι την ύπαρξη άλλων υποδοχέων σε σχέση με τη συγκυτίνη 1. Έχει προταθεί, χωρίς όμως να είναι πλήρως διευκρινισμένο, ότι και η συγκυτίνη 2 εμπλέκεται στις διαδικασίες του σχηματισμού του πλακούντα [182]. Η άποψη αυτή ενισχύεται από έρευνες με τη χρήση μονοκλωνικού αντισώματος για τη συγκυτίνη 2 στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα (κυτταρική μεμβράνη και κυτταρόπλασμα) των χοριακών λαχνών, όπου θεωρείται ότι η συγκυτίνη 2 παίζει ενεργό ρόλο στη διαδικασία διαφοροποίησης των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστη. Η εντόπισή της στην κυτταρική μεμβράνη των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων εξυπηρετεί αυτό το σκοπό, ενώ η εντόπιση στο κυτταρόπλασμα αντανακλά τη δυναμική διαδικασία της κυτταρικής σύντηξης [185].

Επίσης, η παρουσία μιας ανοσοκατασταλτικής περιοχής στο μόριο της συγκυτίνης 2, πιθανολογεί τη συμμετοχή της στην προστασία του εμβρύου από το ανοσοποιητικό σύστημα της μητέρας [186].

Προς το παρόν δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες της έκφρασης της συγκυτίνης 2 σε παθολογικές καταστάσεις, όπως το χοριοκαρκίνωμα όπου έχουμε διαταραχή της τροφοβλαστικής διείσδυσης και η προεκλαμψία, τα σύνδρομα Down και HELLP όπου έχουμε διαταραχές στη δομή του πλακούντα.

Επιπλέον, δεν είναι διευκρινισμένη ακόμα η σχέση της με τη συγκυτίνη 1, τυχόν αλληλεπίδραση ή αλληλορύθμιση των δύο μορίων και η επίδραση παραγόντων στην έκφρασή της. Από πειράματα σε κύτταρα αιλουροειδών διαπιστώθηκε ισχυρή δράση

σύντηξης της συγκυτίνης 2 και παντελής έλλειψη δράσης της συγκυτίνης 1. Σε ανθρώπινα κύτταρα διαφορετικής ιστικής προέλευσης η δράση της συγκυτίνης 1 δεν συμβάδιζε πάντα με ταυτόχρονη δράση της συγκυτίνης 2. Αυτές οι διαφορές πιθανόν να εξηγούνται με βάση το ότι η επαγωγή της δράσης των δύο αυτών μορίων πραγματοποιείται μέσω διαφορετικών υποδοχέων και τυχόν έλλειψη των αντίστοιχων για τη συγκυτίνη 2 μπορεί να έχει αρνητικά αποτελέσματα.

Υποδοχείς συγκυτίνης 1 (ASCT)

Στον ανθρώπινο πλακούντα εκφράζεται μια πλειάδα συστημάτων μεταφοράς αμινοξέων [187]. Σκοπός τους είναι η διευκόλυνση της μεταφοράς αμινοξέων στο αναπτυσσόμενο έμβρυο για την επίτευξη των αναβολικών του απαιτήσεων. Εκτός από την διάχυση με παθητικό τρόπο των αμινοξέων διαμέσου του πλακούντα, η μεταφορά τους γίνεται και μέσω συγκεκριμένων υποδοχέων, όπως ASCT1 και ASCT2.

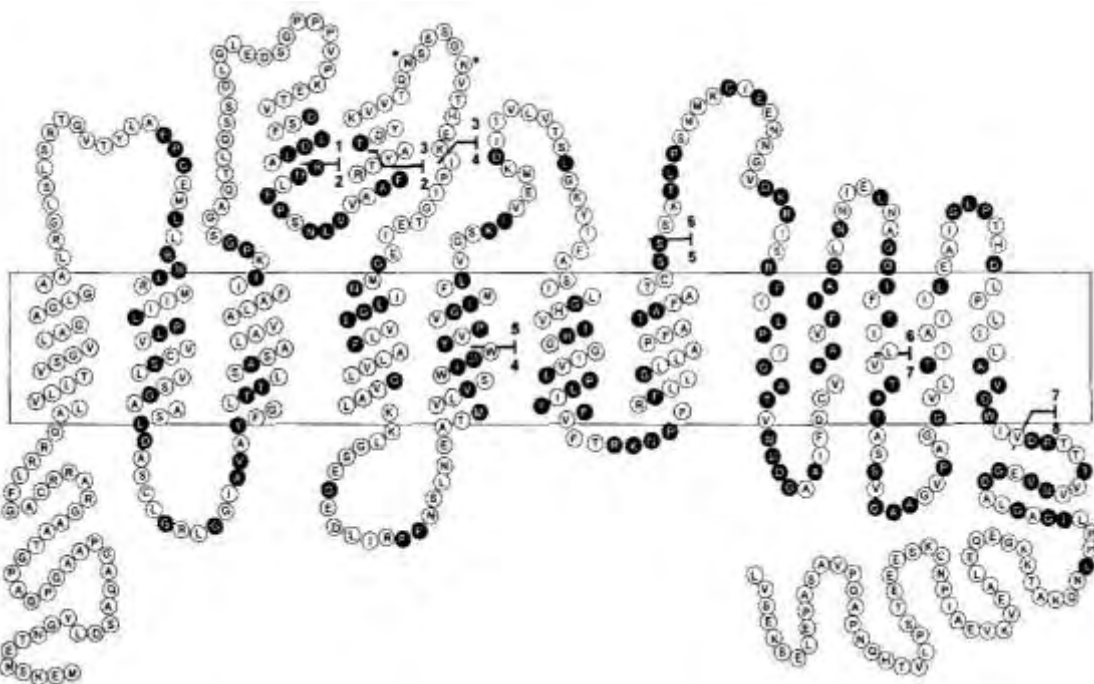
Υποδοχέας ASCT1

Μορφή, δομή, μεταβολικοί δρόμοι του υποδοχέα ASCT1

Το γονίδιο κωδικοποίησης του υποδοχέα αμινοξέων ASCT1 εντοπίζεται στη θέση 2p15- p13 και έχει μέγεθος 4652 bp. Διαθέτει περιοχή ανοικτού πλαισίου ανάγνωσης 1572 bp και 8 εξώνια που εκτείνονται σε μια περιοχή τουλάχιστον 40 kb γενομικού DNA από τα οποία κωδικοποιείται η πολυπεπτιδική αλυσίδα μεγέθους 524 αμινοξέων (αλλού 532 [188]). Ο υποδοχέας ASCT1 ανήκει στο σύστημα μεταφοράς αμινοξέων ASC και μεταφέρει αλανίνη, σερίνη, κυστεΐνη και θρεονίνη και όχι γλουταμικό και ασπαρτικό.

Ρόλος του υποδοχέα ASCT1

Η ασθενής φυλογενετική σχέση του ρετροϊού HERV- W με μία ομάδα ιών που περιελάμβανε τους RD114, BaEV και άλλους, καθώς και η ανακάλυψη ότι κάποιοι από αυτούς χρησιμοποιούν ως βοηθητικό υποδοχέα τον ανθρώπινο ASCT1 [189], έστρεψε το ενδιαφέρον των επιστημόνων προς αντίστοιχη σχέση αυτού του υποδοχέα με τον ρετροϊό HERV- W.



Εικόνα 18. Αναπαράσταση δομής ASCT1

Πραγματικά, διαπιστώθηκε ότι το πρωτεϊνικό προϊόν του γονιδίου του φακέλου του ιού HERV- W (η συγκυτίνη 1) προκαλούσε μαζική συγκυτιοποίηση σε κυτταρικά μοντέλα που ο ανθρώπινος υποδοχέας ASCT1 ήταν παρών. Σε σύγκριση με τον άλλο υποδοχέα που έχει τεκμηριωθεί η συσχέτιση του με τη συγκυτίνη 1 (ASCT2), στο συγκεκριμένο πειραματικό πρότυπο, ο σχηματισμός συγκυτίου ήταν πολύ πιο έντονος παρουσία του υποδοχέα ASCT1 [190].

Εκτός του πλακούντα, διαπιστώθηκε η έκφραση του υποδοχέα ASCT1 σε υψηλές συγκεντρώσεις στο ήπαρ, στον εγκέφαλο, σε σκελετικούς μύες και στο πάγκρεας [191]. Στον πλακούντα, αναφέρεται η εντόπιση του υποδοχέα ASCT1 στη βασική μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης [192, 193]. Επιπλέον, τόσο σε καλλιέργειες τροφοβλάστης όσο και στην κυτταροσειρά BeWo, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη δραστηριότητα μεταφοράς αμινοξέων από τον υποδοχέα σε πιο αδιαφοροποίητο τροφοβλαστικό ιστό, με ελάττωση αυτής κατά τη διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστη [193].

Έχει διαπιστωθεί ότι η γλυκοζυλίωση του τμήματος C της λούπας 2 της εξωκυττάριας περιοχής ECL2 (extracellular loop 2) του υποδοχέα ASCT1 οδηγεί σε αποκλεισμό θέσεων σύνδεσης για τους ιούς και με αυτό τον τρόπο περιορίζει τη χρήση του υποδοχέα από τον ιό RD114 και τους ρετροϊούς του πιθήκου τύπου D [190].

Σε καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων BeWo καθώς και τροφοβλαστικών κυττάρων, αναφέρεται ελάττωση της συγκέντρωσης RNA για τον υποδοχέα ASCT1 υπό την επίδραση

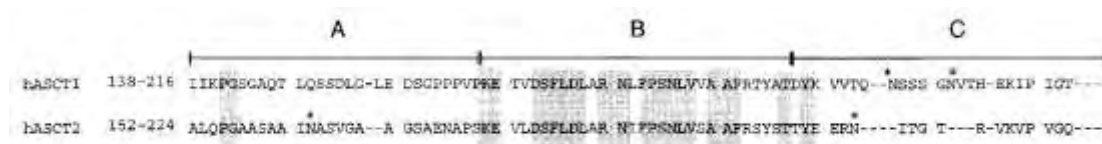
του cAMP αναλόγου φορσκολίνης, που προκαλεί διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστη [194].

Υποδοχέας ASCT2

Γενικά

Από έρευνες διαπιστώθηκε ότι η συγκυτίνη 1 ασκεί τη δράση της μέσω του υποδοχέα ρετροϊών των θηλαστικών τύπου D [163], ο οποίος έχει ταυτοποιηθεί και έχει εξακριβωθεί ότι παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με τον υποδοχέα αμινοξέων τύπου B0 (ASCT2, SLC1A5) [195]. Ο υποδοχέας ASCT2 ανήκει στην οικογένεια των εξαρτώμενων από το νάτριο υποδοχέων μεταφοράς αμινοξέων B0 και η δράση του παρουσιάζει επικάλυψη με το σύστημα ASC [188]. Εμφανίζει ειδικότητα απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό ουδέτερων αμινοξέων. Σε αυτά περιλαμβάνονται τα αμινοξέα L- αλανίνη, L- γλουταμινικό, L- λευκίνη και γλυκίνη, ενώ αποκλείονται ανιονικά ή κατιονικά, καθώς και N- μεθυλιωμένα αμινοξέα [196].

Σε κάποιες μελέτες περιγράφεται η εντόπιση αυτού του υποδοχέα στη βασική μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης [169], στην ίδια περιοχή δηλαδή με τη συγκυτίνη 1. Αυτή η συνύπαρξη ενδεχομένως να εξυπηρετεί τη διαφοροποίηση και ενσωμάτωση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων στη συγκυτιοτροφοβλάστη.



Εικόνα 19. Σύγκριση γονιδιακής ομολογίας ASCT1 και ASCT2

Μορφή, δομή και μεταβολικοί δρόμοι του υποδοχέα ASCT2

Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον υποδοχέα ASCT2 εντοπίζεται στη θέση 19q13.3 και είναι μεγέθους 2856 bp με ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης 1626 bp. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι μεγέθους 541 αμινοξέων και το αναμενόμενο μοριακό βάρος υπολογίζεται στα 57 kDa [197].

Αναλύσεις υδροφοβικότητας έδειξαν ότι το μόριο του υποδοχέα ASCT2 διαθέτει δέκα διαμεμβρανικές περιοχές. Επιπλέον διαθέτει δύο περιοχές με δυνατότητα N-γλυκοζυλίωσης και δύο για φωσφορυλίωση από την πρωτεϊνική κινάση C [197]. Παρουσιάζει 61% ταύτιση και 77% ομοιότητα με τον υποδοχέα ASCT1 [191]. Η περιοχή με τη μεγαλύτερη ταύτιση είναι το τμήμα B της ECL2 περιοχής [190]. Παρομοίως με τον ASCT1, το τμήμα C της ECL2 περιοχής του υποδοχέα φαίνεται να παίζει ρόλο στη ρύθμιση της δράσης της συγκυτίνης 1 με τις θέσεις γλυκοζυλίωσης που διαθέτει [198].

Εκτός του πλακούντα, ο υποδοχέας ASCT2 εντοπίστηκε στον πνεύμονα, σε σκελετικούς μύες, στο νεφρό και στο πάγκρεας καθώς και σε κυτταρικές σειρές JAR και τις κυτταροσειρές εντερικής προέλευσης Caco- 2 και HT- 29. Σε όλες τις περιπτώσεις, το μοναδικό μετάγραφο που εντοπίστηκε είναι μεγέθους 2.9 kb. Ο υποδοχέας RDR (RD114/type D virus interference group), είναι ένα αλληλόμορφο του γονιδίου για τον υποδοχέα μεταφοράς ουδέτερων αμινοξέων, SLC1A5. Έχει βρεθεί ότι ο SLC1A5, εκτός από τις σχετιζόμενες με τα αμινοξέα δράσεις, λειτουργεί και ως υποδοχέας ρετροϊών, ενώ ο υποδοχέας RDR παρουσιάζει ειδικότητα στη μεταφορά ουδέτερων αμινοξέων [199].

Ρόλος του υποδοχέα ASCT2

Μελέτες έκφρασης της συγκυτίνης 1 και του υποδοχέα ASCT2 στην κυτταροσειρά BeWo έδειξαν μια αντίστροφη σχέση μεταξύ τους, όταν επιδράσει στις καλλιέργειες ο παράγοντας φορσκολίνη. Αυτό το cAMP ανάλογο, προάγει τη διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων προς φαινότυπο συγκυτιοτροφοβλάστης. Χρησιμοποιώντας ημιποσοτική RT- PCR, οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι ενώ η συγκυτίνη 1 αυξανόταν μετά από 24 ώρες και μέχρι το τέλος του πειράματος (72 ώρες), ο υποδοχέας ASCT2 παρουσίαζε ελάττωση που το μέγιστο έφτανε στις 48 ώρες (στο ήμισυ σε σχέση με την ομάδα που δεν είχε προστεθεί φορσκολίνη. Παρόμοια, οι ερευνητές συμπέραναν ελάττωση και της ικανότητας του συστήματος B0 προς μεταφορά αμινοξέων, αν και η συνολική μεταφορική ικανότητα αμινοξέων δεν επηρεάστηκε [200].

Με βάση τα πειραματικά ευρήματα, θεωρείται ότι μεταξύ των άλλων ρόλων του, ο υποδοχέας ASCT2 ίσως να περιορίζει και τη διείσδυση του τροφοβλαστικού ιστού βοηθώντας στην κυτταρική σύντηξη και διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστη [200].

Αλληλεπίδραση συγκυτιοτροφοβλάστης με κυτταροτροφοβλάστη

Το συγκύτιο είναι υπεύθυνο για πολλές από τις λειτουργίες του πλακούντα. Θεωρείται ότι διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στη μεταφορά οξυγόνου, στην πρόσληψη θρεπτικών ουσιών και την απομάκρυνση παραπροϊόντων του μεταβολισμού. Συμμετέχει, επίσης, στην παραγωγή ενός μεγάλου αριθμού ορμονών και σε ανοσολογικές διαδικασίες

Είναι γνωστό ότι το σχηματισμένο συγκύτιο δεν παρουσιάζει φαινόμενα πολλαπλασιασμού του [201]. Αντιθέτως, τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα αποτελούν ένα πληθυσμό προγονικών κυττάρων με ιδιαίτερα αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού που ξεπερνά κατά πολύ τις απαιτήσεις για αύξηση [202]. Επιπλέον, η συγκυτιοτροφοβλάστη έχει υψηλό ρυθμό ανανέωσης μιας και, στα πλαίσια αποπτωτικών φαινομένων, παρατηρείται

αποβολή (shed) και είσοδος στη μητρική κυκλοφορία τμημάτων συγκυτίου με η μορφή γιγαντιαίων αποπτωτικών σωματίων [202, 203]. Η απώλεια αυτού του υλικού αναπληρώνεται με τη σύντηξη των τροφοβλαστικών κυττάρων. Ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι φτωχή σε ουριδίνη σε σχέση με την κυτταροτροφοβλάστη [204]. Αυτό σημαίνει ότι η μεταγραφική δραστηριότητα της είναι περιορισμένη και ότι το περισσότερο από το RNA που είναι απαραίτητο για τη μαζική παραγωγή πρωτεϊνών που επιτελείται, προέρχεται απευθείας από την κυτταροτροφοβλάστη. Αυτό βέβαια δεν προϋποθέτει ότι όλα τα mRNA μόρια που απαντώνται στην συγκυτιοτροφοβλάστη είναι απαραίτητο να μεταγραφεί σε κυτταροτροφοβλάστη [173].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

Λήψη υλικού

Το υλικό της μελέτης αποτελείται από τροφοβλαστικό ιστό ανθρώπινου πλακούντα. Πιο συγκεκριμένα, στα πλαίσια της λήψης δείγματος χοριακών λαχνών (chorionic villous sampling, CVS) στο Ιατρείο Προγεννητικού Ελέγχου της Μαιευτικής- Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας που πραγματοποιείτο για διαγνωστικούς λόγους, μέρος του υλικού χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας.

Το υλικό τοποθετείται σε φιαλίδιο που περιέχει διάλυμα HANKS (100ml διαλύματος) εμπλουτισμένο με 200 IU ηπαρίνης (0.2 ml διαλύματος 1000 IU/ml), 2 mg αμφοτερικίνης (0.2 ml διαλύματος 10 mg/ml) και 1 ml πενικιλλίνης/στρεπτομυκίνης (10,000 units /mL πενικιλλίνης και 10,000 ug/ml στρεπτομυκίνης).

Πρωτόκολλο καλλιέργειας

- Μεταφορά του υλικού σε σωληνάριο falcon και πραγματοποιούνται διαδοχικές εκπλύσεις με φυσιολογικό ορό για την απομάκρυνση τυχόν προσμίξεων.
- Τεμαχισμός των λαχνών σε τρυβλίο με τη χρήση νυστεριού για ομογενοποίηση του ιστού=
- Τοποθέτηση του υλικού σε σωληνάριο falcon και επώαση παρουσία των ενζύμων κολλαγενάσης (collagenase type I, code number 17100, Gibco) σε συγκέντρωση 100 U/ml και θρυψίνης/EDTA (0.25% θρυψίνη, 1mM EDTA₄Na) (1X), Invitrogen). Η επώαση πραγματοποιείται σε κλίβανο στους 37° C για χρονικό διάστημα 40 λεπτών.
- Εξουδετέρωση της δράσης των ενζύμων με την προσθήκη τριπλάσιας ποσότητας θρεπτικού υλικού Chang.
- Φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές για 7 λεπτά. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού Chang.
- Αναδιάλυση του ιζήματος με το θρεπτικό υλικό. Ακολούθως, νέα φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές για 7 λεπτά, αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη 2ml Chang.
- Αναδιάλυση του ιζήματος με το θρεπτικό υλικό. Επαναλαμβανόμενες αναρροφήσεις των τμημάτων του ιστού μέσα από σύριγγα ινσουλίνης με σκοπό την περαιτέρω μηχανική διάσπαση του ιστού.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 1700 στροφές για 7 λεπτά, αφαίρεση υπερκείμενου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 1 ml θρεπτικό υλικό Chang.
- Μεταφορά του ιστού σε φιάλη καλλιέργειας επιφάνειας 25 cm² και επώαση σε κλίβανο θερμοκρασίας 37° C και περιεκτικότητας σε CO₂ 5%.
- Προσθήκη επιπλέον ποσότητας θρεπτικού υλικού Chang στη φιάλη καλλιέργειας, ανάλογα με τη ποσότητα του ιστού. Ο τελικός όγκος θρεπτικού υλικού στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ήταν 3 ml.

Στα δείγματα που προορίζονται για καλλιέργειες πραγματοποιείται αλλαγή του θρεπτικού υλικού την 6^η ημέρα της καλλιέργειας. Στα δείγματα όπου ο αριθμός των κυττάρων καταλάμβανε άνω του 70% της επιφάνειας της φιάλης καλλιέργειας, συνήθως τη 10^η ημέρα της καλλιέργειας, πραγματοποιείται επανακαλλιέργεια και διαμοιρασμός του υλικού σε δύο νέες φιάλες καλλιέργειας.

Πρωτόκολλο επανακαλλιέργειας

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού και προσθήκη στη φιάλη καλλιέργειας ποσότητα θρυψίνης ικανή να καλύπτει όλη την επιφάνεια της φιάλης.
- Επώαση σε κλίβανο 37° C για 5-10 λεπτά και κατόπιν προσθήκη τριπλάσιας ποσότητας θρεπτικού υλικού προς εξουδετέρωση της δράσης της θρυψίνης.
- Συλλογή του υλικού και μεταφορά σε σωληνάριο falcon.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 10 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου, επαναδιάλυση του ιζήματος σε διάλυμα PBS και νέα φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες.
- Επανάληψη του προηγούμενου σταδίου.
- Επαναδιάλυση του ιζήματος με προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού Chang και διαμοίραση σε δύο φιάλες καλλιέργειας με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας θρεπτικού υλικού σε κάθε φιάλη.

Υπολογισμός επιπέδων β-χοριακής γοναδοτροπίνης (β-hCG) σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων

Η παρουσία τροφοβλαστικών κυττάρων στην καλλιέργεια αξιολογήθηκε με βάση την έκκριση χοριακής γοναδοτροπίνης. Η παραγωγή β-hCG από τα τροφοβλαστικά κύτταρα θεωρείται ότι αποτελεί δείκτη της διαφοροποίησης τους σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Η παραγωγή β-hCG από κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα είναι πολύ μικρή, ενώ, αντίθετα, η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελεί τον κύριο τρόπο παραγωγής του μακρομορίου.

Για το σκοπό αυτό, το υπερκείμενο καλλιεργητικό μέσο συλλέχθηκε σε διάφορες ημέρες καλλιέργειας με σκοπό τη μέτρηση της ορμόνης.

Η μέτρηση έγινε με τη χρήση του Kit-ELISA β -hCG (Αναλυτής Elecsys and cobase). Περιληπτικά, 10μl του δείγματος μαζί με μονόκλωνο αντίσωμα-συνδεδεμένο με βιοτίνη, ειδικό για τη χοριακή γοναδοτροπίνη και μονόκλωνο ειδικό αντίσωμα έναντι της χοριακής γοναδοτροπίνης-συνδεδεμένο με ρουθένιο αντιδρούν για να σχηματίσουν ένα σύμπλοκο τύπου σάντουιτς. Μετά την προσθήκη μικροσωματιδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη, το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.

Το μίγμα της αντίδρασης αναρροφάται στο κελί μέτρησης όπου τα μικροσωματίδια είναι μαγνητικά δεσμευμένα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη προσδεδεμένες ουσίες απομακρύνονται με Procell (διάλυμα έκπλυσης). Η εφαρμογή φορτίου στο ηλεκτρόδιο επάγει χημειοφθορισμό, ο οποίος μετράται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή. Τα αποτελέσματα καθορίζονται μέσω καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία είναι ειδική για το μηχάνημα και προκύπτει από βαθμονόμηση δυο σημείων και από μια κύρια καμπύλη που προέρχεται κάθε φορά από το σειριακό αριθμό του αντιδραστηρίου.

Εκχύλιση RNA τροφοβλαστικών κυττάρων

Η εκχύλιση του RNA των τροφοβλαστικών κυττάρων έγινε με τη μέθοδο του ισοθειοκυανικού γουανιδίου. Στα δείγματα που απομονώθηκε RNA χωρίς να μεσολαβήσει καλλιέργεια του ιστού πραγματοποιείται καθαρισμός του ιστού από τυχόν προσμίξεις ή ερυθροκύτταρα με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις με διάλυμα PBS. Στα δείγματα, όπου είχε προηγηθεί καλλιέργεια, ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων από τη φιάλη καλλιέργειας, όπως περιγράφεται στη διαδικασία επανακαλλιέργειάς τους.

Στη συνέχεια και στις δύο περιπτώσεις, προστίθεται στο ίζημα των κυττάρων διάλυμα φαινόλης/ ισοθειοκυανικού γουανιδίου σε αναλογία 0.2 ml/10⁶ κύτταρα και ακολουθούν:

1. Ομογενοποίηση: λύση των κυττάρων με διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα σε διάλυμα φαινόλης/ισοθειοκυανικού γουανιδίου. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε πάγο.
2. Διαχωρισμός φάσεων: Προσθήκη χλωροφόρμιου σε αναλογία όγκου 1/10 προς τον όγκο του διαλύματος φαινόλης/ισοθειοκυανικού γουανιδίου και έντονη ανάδευση.
3. Φυγοκέντρηση του διαλύματος των κυττάρων επί 15 λεπτά στις 12000 στροφές σε θερμοκρασία 4°C.

4. Κατακρήμνιση RNA: Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο erppendorf. Το RNA κατακρημνίζεται με προσθήκη ίσης ποσότητας ισοπροπανόλης και φυλάσσεται στους -20°C επί 16 ώρες.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές επί 20 λεπτά στους 4°C για σχηματισμό του ιζήματος RNA στον πυθμένα του σωληναρίου.
6. Έκπλυση RNA: Το υπερκείμενο απορρίπτεται και προστίθεται 1ml αιθανόλης 70%, για την απομάκρυνση των αλάτων ή άλλων προσμίξεων του RNA. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 12000 στροφές επί 20 λεπτά στους 4°C .
7. Απόρριψη του υπερκειμένου και επανάληψη του σταδίου 6 δύο φορές.
8. Επαναδιάλυση RNA: Στέγνωμα του ιζήματος και επαναδιάλυση σε 100μl νερό ελεύθερο από RNAάσες.
9. Έλεγχος της ποιότητας και της συγκέντρωσης RNA: Στο στάδιο αυτό γίνεται έλεγχος της ποιότητας και ποσότητας του RNA με ηλεκτροφόρηση και με φωτομέτρηση.

Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Η σύνθεση του cDNA (Πίνακας 2) γίνεται με αντίστροφη μεταγραφή *in vitro* χρησιμοποιώντας ως εκκινητές εξανουκλεοτίδια τυχαίας αλληλουχίας (random primers) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Η αντίδραση γίνεται σε τελικό όγκο 20μl. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την αντίδραση είναι η αντίστροφη μεταγραφάση Moloney (Moloney murine leukemia virus, M-MLV, 200U/μl) (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Για την αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται επίσης RT-buffer (5x), dNTPs (10mM), αναστολέας RNAσών, DTT (0.1M). Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται ολικό κυτταρικό RNA, το οποίο διαλύεται αρχικά σε ddH₂O σε όγκο που αντιστοιχεί σε ποσότητα 1 μg RNA. Το διάλυμα RNA αρχικά θερμαίνεται στους 65°C επί 10 λεπτά για την αποδιάταξη δευτερογενών δομών RNA σε θερμικό κυκλοποιητή Perkin-Elmer Cetus. Για κάθε δείγμα χρησιμοποιείται αρχικά όγκος διαλύματος RNA αντίστοιχος με 1 μg, 1 μl διάλυμα Rnandom Primers και ποσότητα ddH₂O ως τελικού όγκου 13 μl. Μετά το τέλος της αρχικής αποδιάταξης, τα δείγματα παραμένουν επί 5 λεπτά σε πάγο και κατόπιν γίνεται προσθήκη ποσότητας από προπαρασκευασμένο διάλυμα που περιέχει 1st strand buffer 5x, dNTPs και MMLV ως τελικού όγκου 20μl. Οι αναλογίες των διαλυμάτων καθώς και οι συνθήκες της αντίδρασης περιγράφονται στον πίνακα 4.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
*RT Buffer 5x	4 µl
dNTPs (10mM)	2 µl
Τυχαίοι εκκινητές (Random Primers) (500µg/ml)	1 µl
MMLV- RT (200U/µl)	1 µl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 20 µl
Υπόστρωμα	
RNA	1 µg

Πίνακας 4. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση σύνθεσης cDNA. *Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος (RT buffer) 5x: 250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375mM KCl, 15mM MgCl.

Συνθήκες αντίδρασης σύνθεσης cDNA:

1. 37°C, 60 λεπτά
2. 94°C, 2 λεπτά
3. τελική θερμοκρασία: 4°C

Το ενδεχόμενο ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων από αδυναμία ενίσχυσης του RNA μπορεί να αποκλεισθεί με ενίσχυση αλληλουχιών, που αντιστοιχούν σε μετάγραφα γονιδίων, τα οποία εκφράζονται πάντα στον υπό ανάλυση ιστό (μετάγραφα “αναφοράς”). Στην παρούσα μελέτη, ως μετάγραφο “αναφοράς” χρησιμοποιείται το mRNA του γονιδίου RaRa (retinoic acid receptor, alpha). Έτσι, ως μάρτυρες για την αποτελεσματικότητα της σύνθεσης cDNA, 5µl του προϊόντος cDNA ενισχύεται με PCR, σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον πίνακα 5, χρησιμοποιώντας τους ειδικούς εκκινητές για τις αλληλουχίες του cDNA RaRa :

RaRa-Forward: 5' - GGTGCCTCCCTACGCCTTCT- 3' και

RaRa-Reverse: 5' - GGCGCTGACCCCATAGTGG- 3'.

Συνθήκες αντίδρασης ενίσχυσης του γονιδίου RaRa

-αρχική αποδιάταξη: 94°C, 5 λεπτά

-κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 40 κύκλους. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

φάση αποδιάταξης: 94°C, 1 λεπτό

φάση σύνδεσης εκκινητών: 53°C, 1 λεπτό

φάση επέκτασης μορίων DNA: 72°C, 1 λεπτό

-τελική επέκταση συντεθειμένων μορίων DNA: 72°C, 10 λεπτά

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
*RB 10x buffer	5 μ l
MgCl ₂ (50mM)	2 μ l
dNTPs (10mM)	1 μ l
RaRa- F	2 μ l
RaRa- R	2 μ l
Taq polymerase (5units/ μ l)	0,3 μ l
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50 μ l
Υπόστρωμα	
Cdna	5 μ l

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης του γονιδίου RaRa.
 *Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RB 10x(RT buffer): 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin.

Αντίστροφη μεταγραφάση- Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR)

Η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης μελετήθηκε με την τεχνική RT-PCR με τη χρήση των εκκινητών:

5'- forward - GCATTGGGGAACCCTGTG-3', που εκτείνεται από το 3 έως το 20 νουκλεοτίδιο και

5'-reverse-AGCACCCAGGGCTGAGGT-3, που εκτείνεται από το 502 έως το 485 νουκλεοτίδιο του γονιδίου της λεπτίνης, αντίστοιχα .

Στις παραπάνω αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα cDNA.και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 6.

Συνθήκες αντίδρασης ενίσχυσης της λεπτίνης:

1. Αρχική αποδιάταξη: 92°C, 5 λεπτά
2. Κυρίως αντίδραση: διεξάγεται σε 30 κύκλους, σε θερμικό κυκλοποιητή Perkin-Elmer Cetus. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:
 - α. στάδιο αποδιάταξης: 92°C, 20 δευτερόλεπτα
 - β. στάδιο σύνδεσης εκκινητών: 57°C, 30 δευτερόλεπτα
 - γ. στάδιο επιμήκυνσης αλυσίδας DNA: 72°C, 20 δευτερόλεπτα
3. Τελική σύνθεση DNA: 72°C, 10 λεπτά

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ
*RB 10x buffer	5,0 μl
MgCl ₂ (50mM)	2,0 μl
dNTPs (10mM)	1,0 μl
Lep-R	2,0 μl
Lep-F	2,0 μl
Taq polymerase (5units/μl)	0,5 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τελικό όγκο αντίδρασης 50μl
Υπόστρωμα	
cDNA	10μl, DNA:1μg

Πίνακας 6. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για την αντίδραση ενίσχυσης της λεπτίνης.
***Σύνθεση ρυθμιστικού διαλύματος RB 10x(RT buffer): 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatin**

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της αντίδρασης και τον έλεγχο τυχόν επιμόλυνσης των αντιδραστηρίων, σε κάθε πείραμα περιλαμβανόταν ένα σωληνάριο που περιείχε όλα τα αντιδραστήρια εκτός από το υπόστρωμα (PCR control). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σε κάθε αντίδραση ένα σωληνάριο με 1μg cDNA λιποκυττάρων (Clontech USA). Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 2% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου σε ρυθμιστικό διάλυμα 1xTAE buffer και εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια πηγής UV. Για την αξιολόγηση των προϊόντων ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους φX174/HaeIII και 100 bp DNA ladder.

Καθαρισμός των προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πηκτή αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης 3% με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr, 10mg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE. Κάθε προϊόν PCR απομονώνεται κόβοντας με προσοχή την πηκτή ακριβώς δίπλα στη ζώνη του προϊόντος. Το κομμάτι πηκτής που περιέχει τη ζώνη τοποθετείται σε σωληνάριο erppendorf. Για τον καθαρισμό του προϊόντος PCR από την πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται το QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Χρησιμοποιούνται στήλες με ικανότητα δέσμευσης του προϊόντος PCR σε μεμβράνη από πηκτή σιλικόνης. Τα διαλύματα του kit βοηθούν τη σωστή ανάκτηση του DNA το οποίο προσροφάται στη μεμβράνη παρουσία υψηλής αλατότητας, ενώ τα υπόλοιπα συστατικά διέρχονται από τη στήλη. Το προϊόν PCR τελικά εκλύεται με διάλυμα Tris.

Στη συγκεκριμένη διαδικασία υποβλήθηκαν προϊόντα PCR των γονιδίων συγκυτίνης 1 και 2 και των υποδοχέων ASCT-1/-2.

Διαλύματα που περιέχονται στο kit:

- Διάλυμα QG : περιέχει ισοθειοκυανικό γουανιδίνιο
- Διάλυμα PE : απαιτεί προσθήκη αιθανόλης (96-100%)

Διαδικασία:

1. Ζύγισμα του τμήματος πηκτής και προσθήκη 3 όγκων διαλύματος QG για ένα όγκο πηκτής (100mg ~ 100μl).
2. Επώαση στους 50°C επί 10 λεπτά. Vortex κάθε 2-3 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η πλήρης διαλυτοποίηση της αгарόζης.
3. Προσθήκη όγκου ισοπροπανόλης (ίσου με τον όγκο της πηκτής αгарόζης) στο δείγμα και ανάδευση.
4. Μεταφορά του μείγματος στη στήλη που είναι τοποθετημένη σε δοχείο συλλογής των 2 ml.
5. Φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm επί 2 λεπτά.
6. Απόρριψη του διηθήματος και επανατοποθέτηση της στήλης στο δοχείο συλλογής.
7. Προσθήκη 0.5ml διαλύματος QG και φυγοκέντρηση (12.000 rpm, 2 λεπτά).
8. Απόρριψη διηθήματος, προσθήκη 0.75ml διαλύματος PE.
9. Αναμονή 2-5 λεπτά και φυγοκέντρηση (12.000 rpm, 2 λεπτά).
10. Απόρριψη διηθήματος και φυγοκέντρηση επί 2 λεπτά (13.000 rpm).
11. Τοποθέτηση της στήλης σε καθαρό σωληνάριο μικροφυγοκέντρου (1.5 ml).
12. Προσθήκη 50μl δις απεσταγμένου νερού στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης και φυγοκέντρηση (13.000 rpm, 2 λεπτά) για την έκλυση του DNA.

Ανάλυση αλληλουχίας των προϊόντων PCR

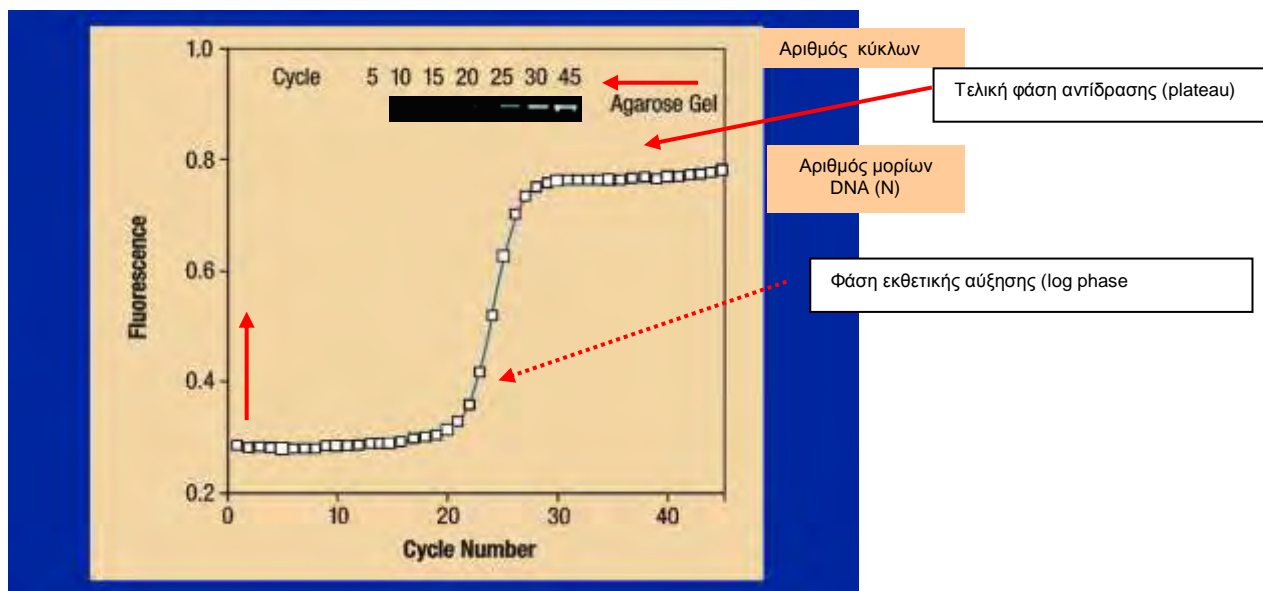
Άμεση ανάλυση της αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των καθαρισμένων προϊόντων PCR με τη μέθοδο τερματισμού των νεοσυντεθειμένων αλυσίδων DNA με διδεοξυριβονουκλεοτίδια (μέθοδος Sanger) σε αυτόματο αναλυτή [Applied Biosystems ABI 3730 sequencer, version 1 "Big Dye" dye-terminator chemistry (ABI)]. Για την ανάλυση του κωδικού και του αντισυνθετικού (3'→5', antisense) κλώνου χρησιμοποιήθηκαν ειδικοί για την αλληλουχία εκκινητές, συμπληρωματικοί με τις αλληλουχίες των γονιδίων συγκυτίνη-1,

συγκυτίνη-2 και των υποδοχέων ASCT-1/-2. Κάθε αντίδραση επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές σε προϊόντα PCR τριών ανεξάρτητων αντιδράσεων ενίσχυσης που είχαν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικές ημέρες.

Ανάλυση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των γονιδίων-στόχων με την τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Γενικές αρχές PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των γονιδίων συμβάλλει ουσιαστικά στη μελέτη των βιολογικών διεργασιών και στην κατανόηση της παθογένειας των ασθενειών. Για το σκοπό αυτό, πρόσφατα αναπτύχθηκαν μέθοδοι ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου (real time quantitative PCR, RQ-PCR) που αντικατέστησαν την πολύπλοκη και χρονοβόρα ημιποσοτική, συναγωνιστική ανάλυση PCR (competitive PCR). Πρόκειται για τη διαδικασία ενίσχυσης μιας DNA αλληλουχίας με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και ταυτόχρονα της ανίχνευσης του παραγόμενου προϊόντος σε πραγματικό χρόνο σε όλη τη διάρκεια της αντίδρασης Real-time PCR. Η ποσοτική αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου συνίσταται σε αξιόπιστη ανίχνευση και μέτρηση των προϊόντων που δημιουργούνται κατά τη διάρκεια κάθε κυτταρικού κύκλου αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, τα οποία αντιστοιχούν άμεσα στο ποσό του αρχικού μητρικού μορίου κατά την έναρξη της PCR. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να μετρηθεί η ποσότητα του προϊόντος PCR ενώ η αντίδραση βρίσκεται ακόμη στην εκθετική φάση (Εικόνα 20). Για να επιτευχθεί αυτό, χρειάζεται να έχουμε μια μέθοδο για την ανίχνευση της ποσότητας του προϊόντος PCR και ένα μηχάνημα στο οποίο να καταγράφονται τα αποτελέσματα κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου PCR. Οι εφαρμογές της RQ-PCR πραγματικού χρόνου είναι πολυάριθμες. Περιλαμβάνουν μελέτες για την έκφραση του mRNA, μετρήσεις αριθμού αντιγράφων σε γενομικό ή ιϊκό DNA, μετρήσεις αριθμού διαγονιδιακών αντιγράφων, αναφορές για διάκριση αλληλομόρφων και επιβεβαίωση δεδομένων από μικροσυστοιχίες, ποσοτικοποίηση χιμαιρικών μεταγράφων για την ανίχνευση ελάχιστης υπολειμματικής νόσου σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες και ανάλυση της έκφρασης των κυτταροκινών και πολλών άλλων παραγόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ποσοτικοποίηση είναι η ανάλυση γονιδίων αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς δεν πρέπει να διαφέρει ως προς τον αριθμό των αντιγράφων ή το επίπεδο έκφρασης σε σχέση με τα δείγματα υπό μελέτη.

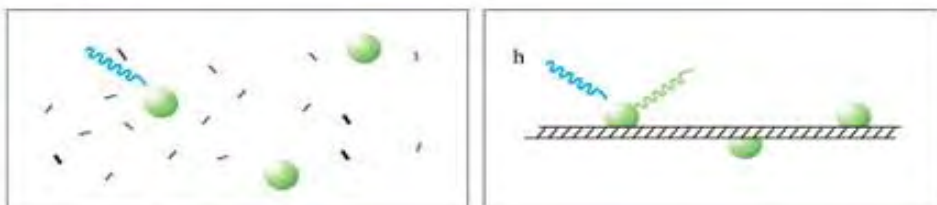


Εικόνα 20. Κινητική της αντίδρασης της PCR

Σήμερα, είναι διαθέσιμες τρεις κύριες παραλλαγές τεχνικών PCR πραγματικού χρόνου (RQ-PCR) (Εικόνα 21):

- ❑ Ανάλυση με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υδρόλυσης
- ❑ Ανάλυση με ανιχνευτές υβριδισμού (Hybprobes)

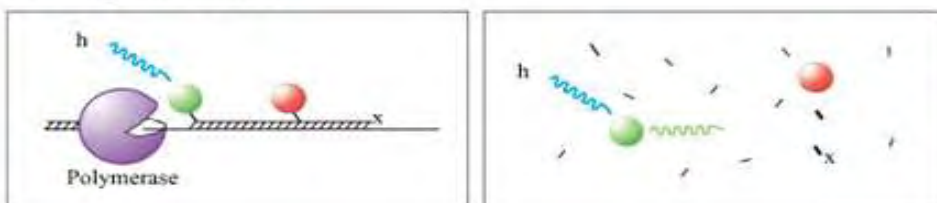
I. SYBR Green



II. Hybridization Probes



III. TaqMan Probes

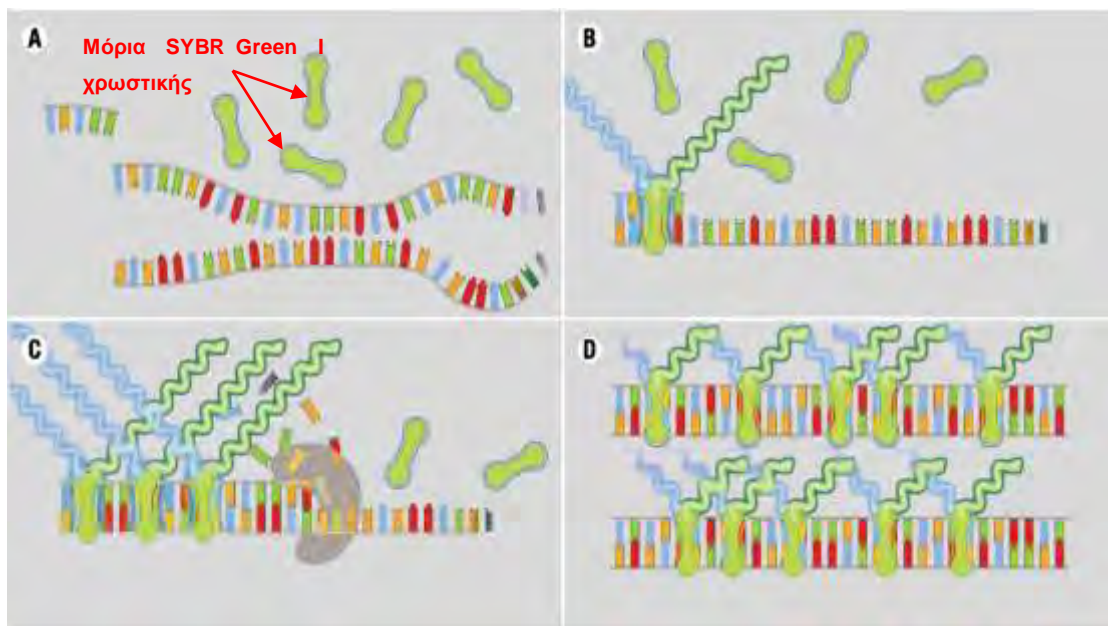


Εικόνα 21. Παραλλαγές PCR πραγματικού χρόνου. I. Χρωστική SYBR Green. II. Ανιχνευτές υβριδισμού. III. Ανιχνευτές υδρόλυσης.

Ανιχνευτές

A. Ανάλυση RQ-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I

Η απλούστερη τεχνική RQ-PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR μετά την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα 32). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης. Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει



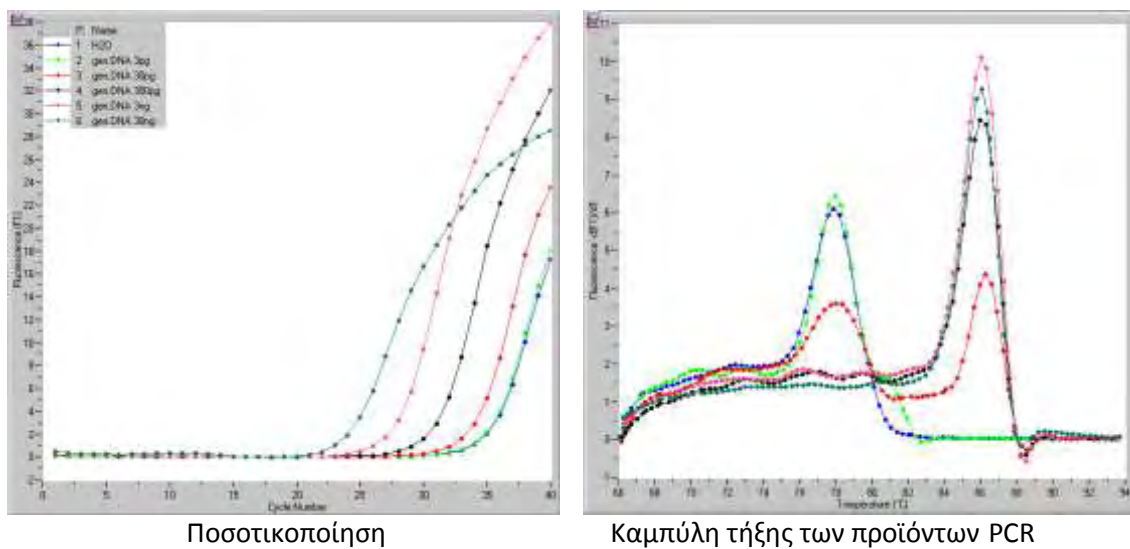
Εικόνα 22. Η χρωστική SYBR Green I παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και εκπέμπει φθορισμό που ανιχνεύεται από το μηχάνημα.

απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί ν' ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Εικόνα 23).

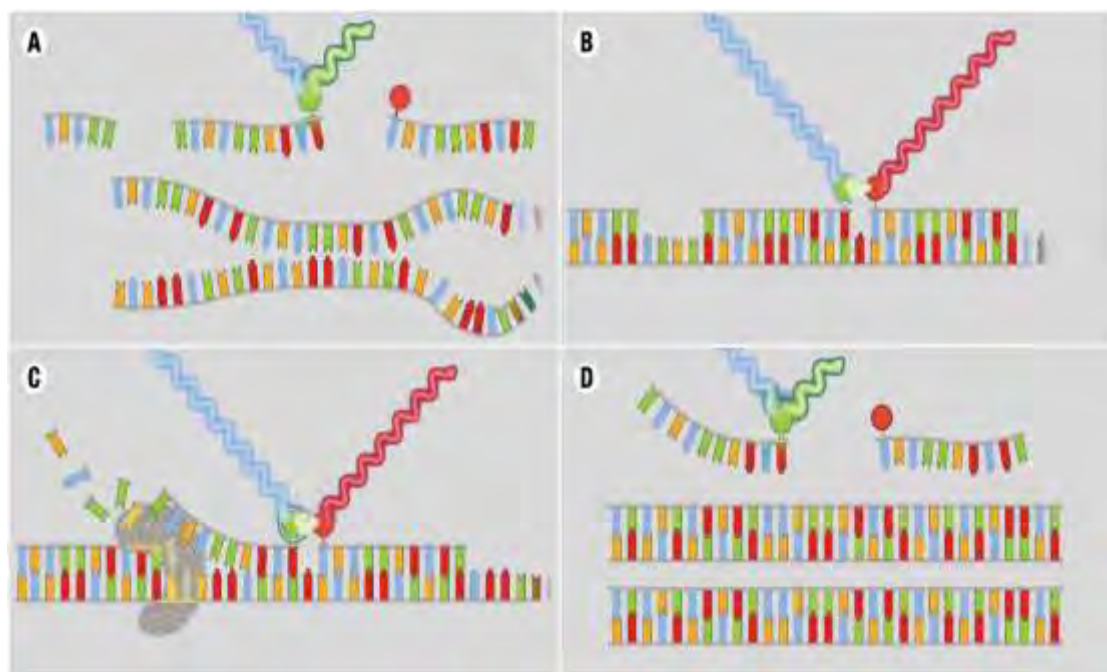
B. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υδρόλυσης (hydrolysis probes) εκμεταλλεύεται την 5'-3' ενεργότητα εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης για ν' ανιχνεύσει και να ποσοτικοποιήσει τα ειδικά προϊόντα PCR που παράγονται καθώς εξελίσσεται η αντίδραση. Ο ανιχνευτής υδρόλυσης είναι συζευγμένος με ένα φθορισμόχρωμα αναφοράς (π.χ. FAM, VIC ή JOE) και μ' έναν καταστολέα φθορισμοχρώματος (π.χ. TAMRA), ο οποίος θα βρίσκεται μέσα στην αλληλουχία-στόχο. Καθώς τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται σε μικρή απόσταση, όσο ο ανιχνευτής είναι άθικτος, ο φθορισμός που εκπέμπεται από το

φθορισμόχρωμα αναφοράς απορροφάται από τον καταστολέα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου, ο ανιχνευτής υδρόλυσης αντικαθίσταται αρχικά από την αλυσίδα DNA μέσω της Taq πολυμεράσης και σταδιακά υδρολύεται από αυτή λόγω της ενεργότητας εξωνουκλεάσης της Taq πολυμεράσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό του φθορισμοχρώματος αναφοράς και του καταστολέα του και επιτρέπει τη σταδιακή ανίχνευση του φθορισμού που επέμπει το φθορισμόχρωμα αναφοράς (Εικόνα 24).



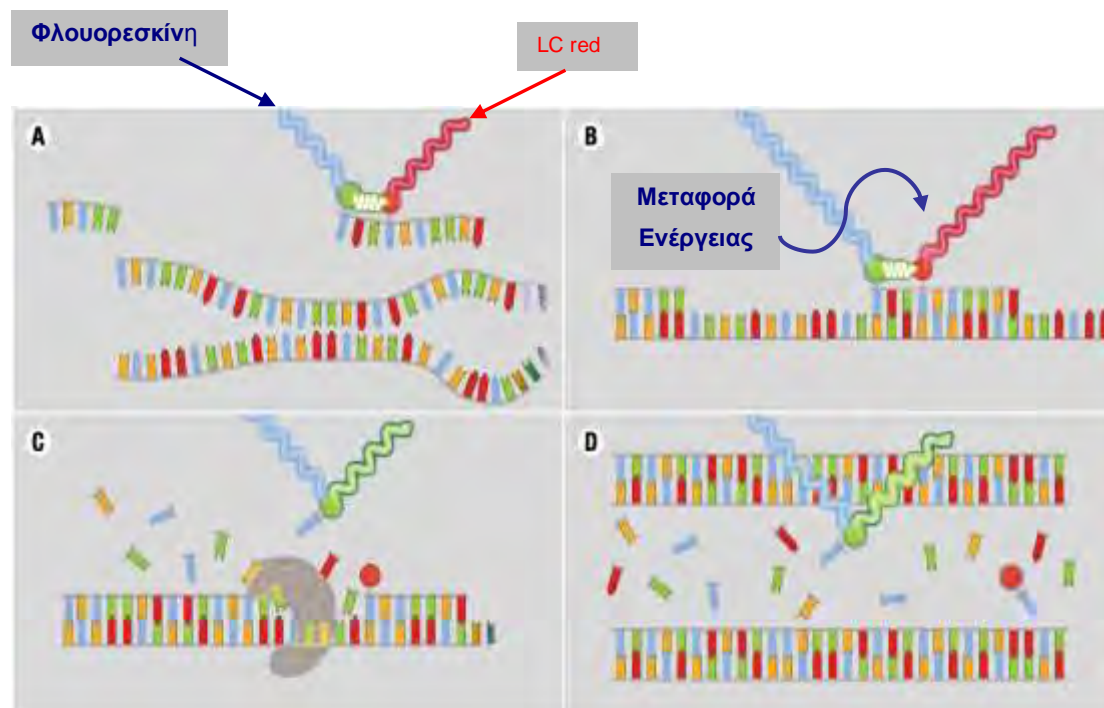
Εικόνα 23. Παρακολούθηση της PCR με τη χρήση της SYBR Green I χρωστικής



Εικόνα 24. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υδρόλυσης

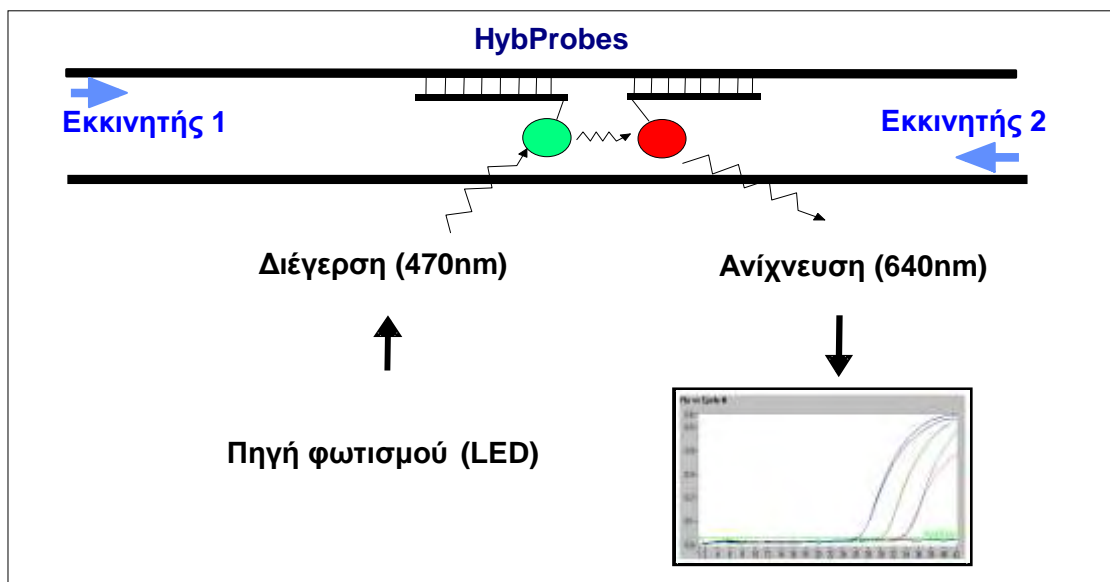
Γ. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού

Η ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτή υβριδισμού χρησιμοποιεί δύο αλληλοεπικαλυπτόμενους ανιχνευτές συγκεκριμένης αλληλουχίας, ο ένας σημασμένος στο 3' άκρο μ' ένα φθορισμόχρωμα-δότη (π.χ. FAM) και ο άλλος σημασμένος στο 5' άκρο μ' ένα



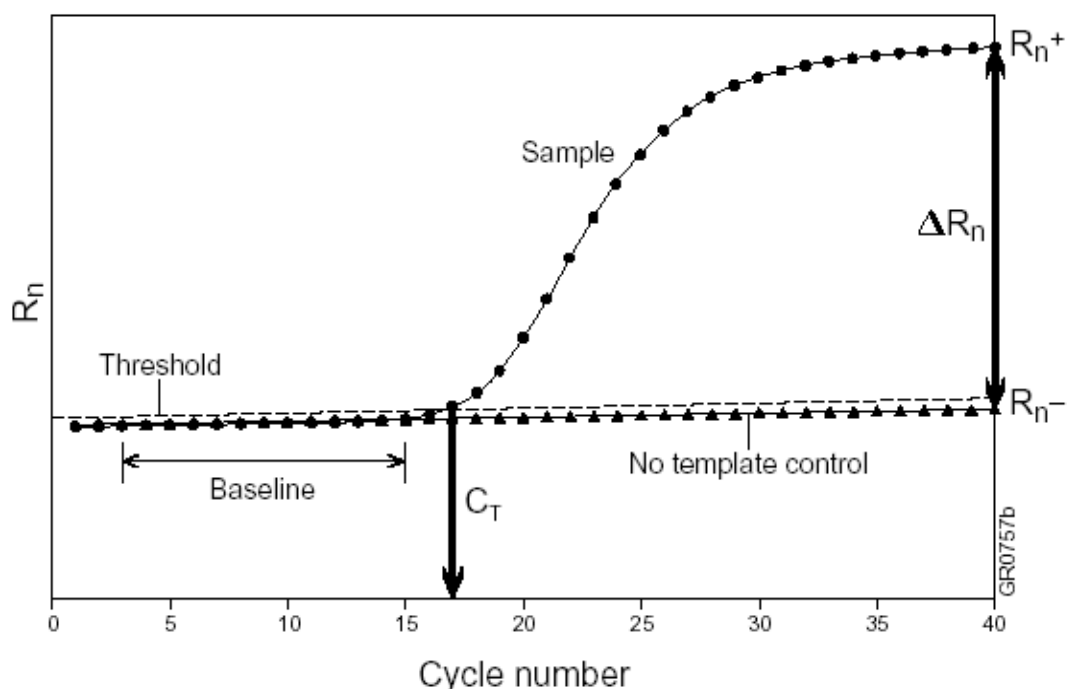
Εικόνα 25. Ανάλυση RQ-PCR με το πρωτόκολλο των ανιχνευτών υβριδισμού

φθορισμόχρωμα-δέκτη (π.χ. LC Red 640, LC Red 705). Οι δύο ανιχνευτές υβριδίζονται σε γειτονικές αλληλουχίες-στόχους στο πολυμερισμένο τμήμα DNA: έτσι τα δύο φθορισμοχρώματα συμπλησιάζουν (η απόσταση μεταξύ τους κυμαίνεται από 1-5 νουκλεοτίδια). Κατά τη διέγερση του φθορισμοχρώματος-δότη, εκπέμπεται ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος. Όταν τα δύο φθορισμοχρώματα βρίσκονται κοντά, το φως που εκπέμπεται από τον δότη θα διεγείρει το φθορισμόχρωμα-δέκτη, διαδικασία που αναφέρεται και ως μεταφορά συντονισμένης ενέργειας φθορισμού (fluorescence resonance energy transfer, FRET). Αυτό οδηγεί σε εκπομπή του φθορισμού, ο οποίος ανιχνεύεται κατά το στάδιο υβριδοποίησης και στο πρώτο μέρος του σταδίου επιμήκυνσης της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Εικόνα 25).



Εικόνα 26. Ένταση σήματος φθορισμού με βάση τη φάση της αντίδρασης

Σε όλους τους προαναφερόμενους τύπους RQ-PCR ανάλυσης η ένταση του σήματος φθορισμού αυξάνει εκθετικά κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Με βάση την ένταση του φθορισμού χωρίς ειδικότητα (background), καθορίστηκε το διαχωριστικό σημείο ή ουδός (cut-off level) για τον ειδικό φθορισμό. Αυτό το όριο (ή γραμμή μετάπτωσης) χρησιμοποιείται για να υπολογιστεί ο κύκλος μετάπτωσης (C_t) κάθε δείγματος, που είναι ο κύκλος της αντίδρασης PCR στον οποίο ο φθορισμός υπερβαίνει για πρώτη φορά τον ουδό μετάβασης. Η τιμή μετάπτωσης είναι ευθέως ανάλογη προς το ποσό της αλληλουχίας-στόχου που περιέχεται στο δείγμα (Εικόνα 27).



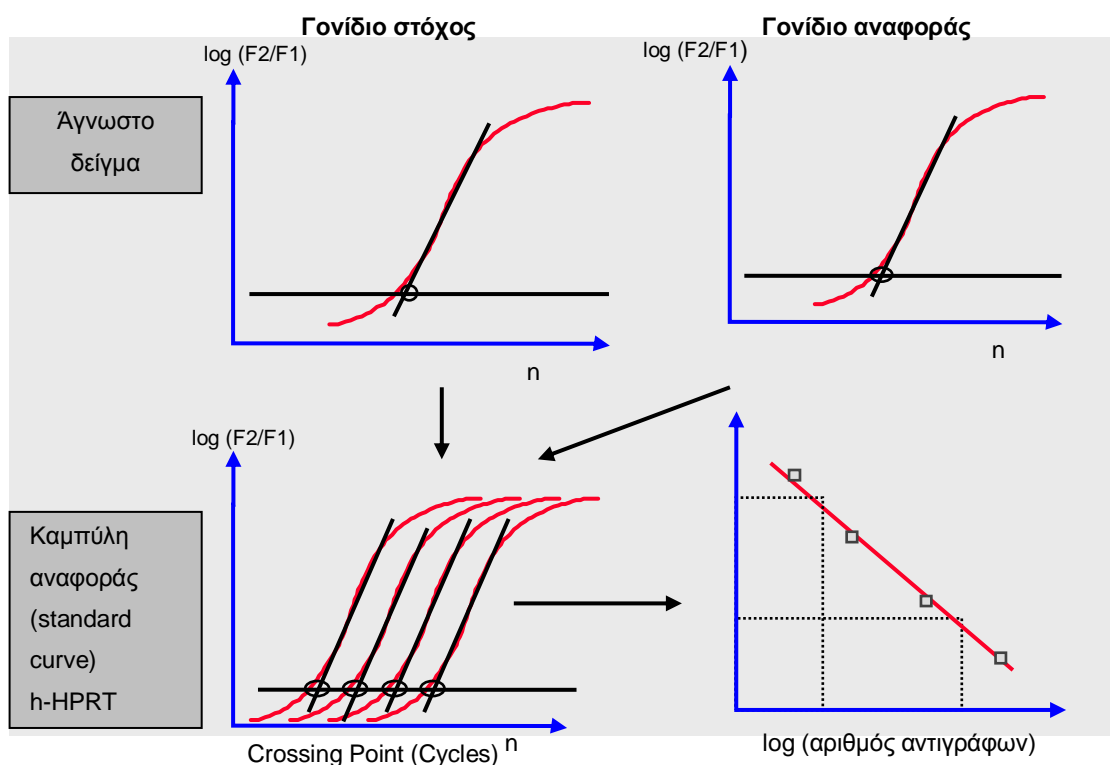
Εικόνα 27. Ανίχνευση του σήματος φθορισμού.

Το σημείο κατά το οποίο το κάθε δείγμα εισέρχεται στην εκθετική φάση της αντίδρασης ορίζεται ως το “κατώφλι” μεταβολής του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος (Threshold Cycle ή C_t), είναι στατιστικά σημαντικό και αποτυπώνεται (μετράται) ως σήμα φθορισμού. Η μεταβολή αυτή της συγκέντρωσης γίνεται σε συγκεκριμένο κύκλο και εξαρτάται απόλυτα από την αρχική συγκέντρωση του κάθε δείγματος.

Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί θετικό, εάν η ελάχιστη τιμή μετάπτωσης ενός ή περισσότερων αντιγράφων του δείγματος αυτού είναι καθαρά εκτός κλίμακας των τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων (π.χ. τουλάχιστον κατά έναν κύκλο χαμηλότερα από την κατώτερη ένδειξη που παρουσιάζει ένα μη ειδικά πολυμερισμένο δείγμα) και σε ορισμένη απόσταση (π.χ. τέσσερις κύκλοι) από το τελικό στάδιο διάλυσης που χρησιμοποιείται για να εξασφαλίσει μέγιστη ευαισθησία.

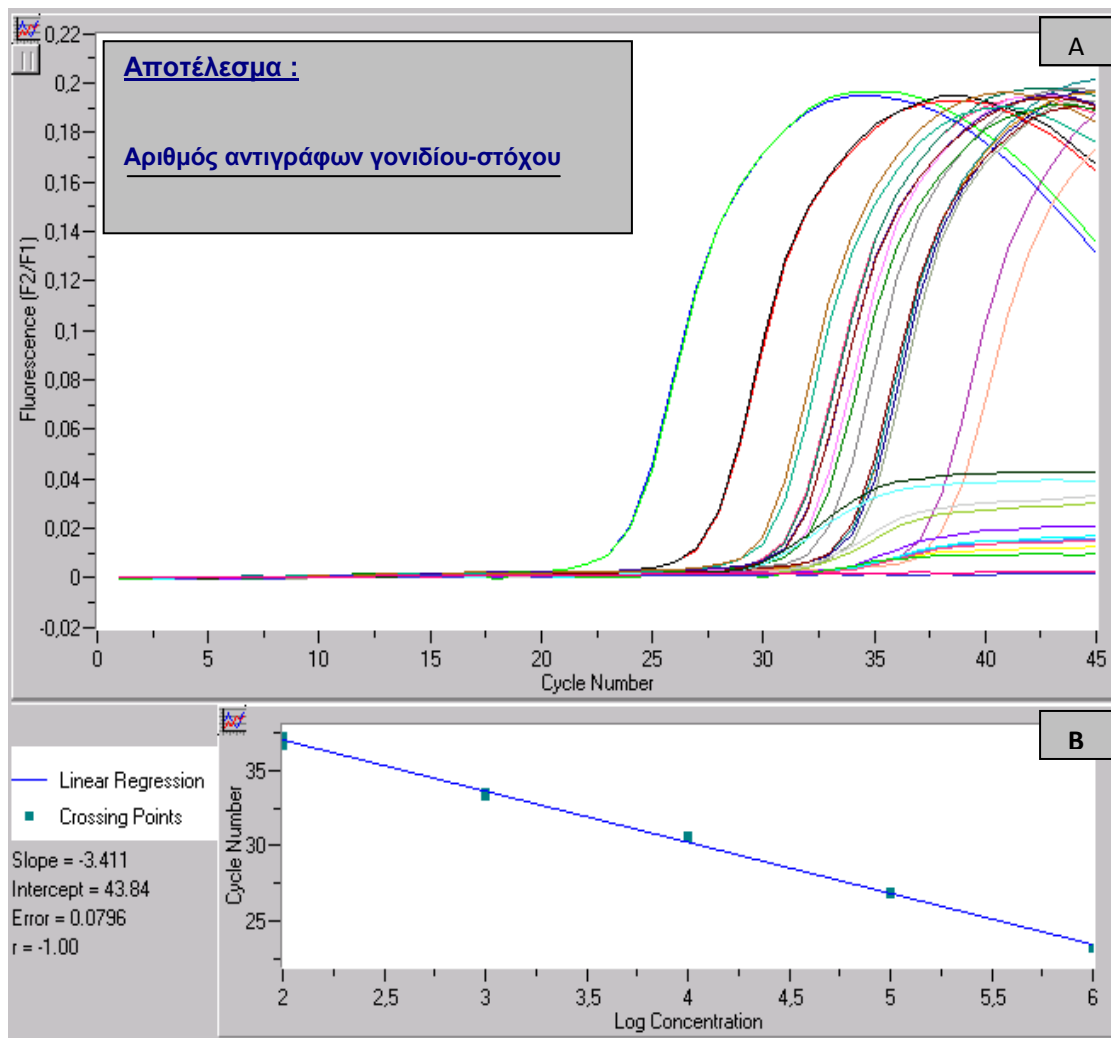
Ένα δείγμα μπορεί να θεωρηθεί αρνητικό, εφόσον δεν παρατηρείται καθόλου ενίσχυση και όταν η κατώτερη τιμή μετάπτωσης του συγκεκριμένου δείγματος βρίσκεται εντός ή κοντά στην κλίμακα τιμών μετάπτωσης των αρνητικών δειγμάτων. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι ανάλυσης με την RQ-PCR: η «σχετική» ποσοτικοποίηση και η ποσοτικοποίηση μέσω «πρότυπης καμπύλης» που καλείται επίσης και «απόλυτη» ποσοτικοποίηση.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση γίνεται σύγκριση ανάμεσα στο δείγμα (DNA ή cDNA) που αφορά το γονίδιο που μας ενδιαφέρει και στο αντίστοιχο δείγμα που χρησιμοποιείται



Εικόνα 28. Σχετική ποσοτικοποίηση αριθμού αντιγράφων με τη χρήση πρότυπης καμπύλης

ως γονίδιο 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.



Εικόνα 29. Ανάλυση RQ-PCR με ανιχνευτές υβριδισμού στο μηχάνημα LightCycler (Roche).

A. Κάθε καμπύλη αντιστοιχεί σε διαφορετικό δείγμα και αντικατοπτρίζει τη συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων στο συγκεκριμένο δείγμα. Η σχετική ποσοτικοποίηση επιτυγχάνεται με το λόγο του αριθμού αντιγράφων του γονιδίου στόχου που μελετάται προς τον αριθμό αντιγράφων του γονιδίου αναφοράς. **B.** Η πρότυπη καμπύλη (standard curve) του γονιδίου αναφοράς που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση.

Η μέθοδος ποσοτικοποίησης με χρήση πρότυπης καμπύλης εφαρμόζεται επιτυχώς για να μετρηθεί μικρός αριθμός γονιδίων σε λίγα ή πολλά δείγματα καθώς και για να μετρηθεί ο αριθμός των ιικών αντιγράφων σ' ένα δεδομένο δείγμα. Για να ποσοτικοποιηθούν οι στόχοι στα δείγματα υπό μελέτη, κατασκευάζεται μια πρότυπη

καμπύλη (standard curve) με αραιώσεις (πενταπλάσια ή δεκαπλάσια διαδοχική αραιώση) γνωστών δειγμάτων, συνήθως πλασμιδιακού DNA που φέρει το γονίδιο που μας ενδιαφέρει (Εικόνα 29).

Ανάλυση της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων με την τεχνική RT-PCR και ανιχνευτές υβριδοποίησης.

A. Απομόνωση RNA και προετοιμασία cDNA

Ολικό κυτταρικό RNA απομονώνεται από δείγματα είτε άμεσα μετά τη λήψη τους ή με τη συλλογή κυττάρων από καλλιέργειες (η μέθοδος περιγράφηκε παραπάνω) και μεταγράφεται *in vitro* σε cDNA με τη βοήθεια της αντίστροφης μεταγραφάσης του ιού AMV (AMV kit) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Ο τελικός όγκος του cDNA (20 μ l) αραιώνεται σε αναλογία 1:10, όπως προτείνεται.

Πρωτόκολλο σύνθεσης cDNA με την AMV αντίστροφη μεταγραφάση

- Ανάμειξη του RNA με το ddH₂O
- Επώαση στους 65 °C για 10 min
- Τα δείγματα παραμένουν για 5 λεπτά στον πάγο
- Προσθήκη των υπολοίπων αντιδραστηρίων (παρατίθενται στον Πίνακα 7). Οι ποσότητες του υποστρώματος RNA και του νερού υπολογίζονται κατάλληλα ώστε να εξασφαλίζεται 1 μ g RNA σε τελικό όγκο cDNA 20 μ l.

Συνθήκες της αντίδρασης:

1. 25 °C για 10 λεπτά
2. 42 °C για 60 λεπτά
3. 99°C για 5 λεπτά
4. 4°C

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	ΟΓΚΟΣ / ΔΕΙΓΜΑ
cDNA	x μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4.0 μ l
ddH ₂ O	(12,2- x) μ l
Random Primers	2.0 μ l
RNAase inhibitor (50 u/ μ l)	1.0 μ l
AMV (50 u/ μ l)	0.8 μ l
ΤΕΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ	20 μ l

Πίνακας 7. Αντιδραστήρια και συγκεντρώσεις για τη σύνθεση cDNA με AMV KIT

B. Πρωτόκολλο αντίδρασης RQ-PCR

Για την εκτίμηση της έκφρασης των mRNA μεταγράφων των εξεταζόμενων γονιδίων χρησιμοποιήθηκε το kit “Light Cyclor FastStart DNA Master Hybridization Probes” ενώ όλα τα πειράματα επιτεύχθηκαν στο μηχάνημα Light Cyclor (Roche) (Εικόνα 30).



Εικόνα 30. Α. Μηχάνημα Light Cyclor ((Roche). Β. Δίσκος τοποθέτησης τριχοειδών (carousel) Γ. Υάλινα τριχοειδή (Glass capillaries)

Το συγκεκριμένο kit προσφέρεται ιδιαίτερα για εφαρμογές PCR με “εκκίνηση σε υψηλή θερμοκρασία”. Η έναρξη της PCR σε υψηλές θερμοκρασίες συμβάλλει στην εξειδίκευση και ευαισθησία της μεθόδου. Κάθε δείγμα αναλύεται τόσο ως προς το γονίδιο που μας ενδιαφέρει όσο και ως προς το γονίδιο αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι το

γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο PBGD). Στο πρωτόκολλο περιλαμβάνεται και η ενίσχυση προτύπων δειγμάτων RNA του γονιδίου PBGD που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων ($5 \times 10^6 - 5 \times 10^2$ ανά 5 μ l δείγματος).

□ Διάλυμα αντίδρασης (*mix*) για το γονίδιο αναφοράς (PBGD):

- Δις απεσταγμένο νερό	: 7.6 μ l
- $MgCl_2$ 25 mM	: 2.4 μ l
-Διάλυμα ανίχνευσης PBGD (10X)	: 2.0 μ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2.0 μ l
- Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1.0 μ l

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 15 μ l προστίθενται 5 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

□ Διάλυμα αντίδρασης για τα γονίδια συγκυτίνη 1, 2 και ASCT 1, 2 Ob- Rb:

-Δις απεσταγμένο νερό	: 10,2 μ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2,0 μ l
- Εκκινητής -s (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l
-Εκκινητής -as (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l
- $MgCl_2$ 25 mM	: 0,8 μ l
-Ανιχνευτής FL (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l
-Ανιχνευτής LC (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1,0 μ l

Στον τελικό όγκο του κυρίου διαλύματος της αντίδρασης που είναι 18 μ l προστίθενται 2 μ l cDNA του δείγματος (αραίωση 1:10).

□ Διάλυμα αντίδρασης για τα γονίδια Ob, Ob- Ra:

Δις απεσταγμένο νερό	: 9,4 μ l
-Διάλυμα FastStart DNA Master ανιχνευτών υβριδισμού (10X)	: 2,0 μ l
-Εκκινητής FTLs (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l
-Εκκινητής FTLas (Πίνακας 8)	: 1,0 μ l

-MgCl ₂ 25 mM	: 1,6 μl
-Ανιχνευτής FTL- FL (Πίνακας 8)	: 1,0 μl
-Ανιχνευτής FTL- LC (Πίνακας 8)	: 1,0 μl
-Ουρακίλη-DNA γλυκοζυλάση (UNG)	: 1,0 μl

□ Πειραματικό πρωτόκολλο ενίσχυσης

Το πρωτόκολλο αποτελείται από τρία προγράμματα :

Πρόγραμμα 1:

Προ-επάση (ενεργοποίηση του ενζύμου) επί 10 λεπτά και αποδιάταξη του cDNA στους 95°C επί 10 λεπτά, για έναν κύκλο.

Πρόγραμμα 2:

Η ενίσχυση της cDNA αλληλουχίας-στόχου πραγματοποιείται σε τρία στάδια επί 45 κύκλους:

- Αποδιάταξη στους 95°C επί 10 δευτερόλεπτα ανά κύκλο.
- Σύνδεση με τον εκκινητή (διαφορετική θερμοκρασία ανάλογα με το είδος του εκκινητή και του ανιχνευτή που χρησιμοποιούνται)

Συγκυτίνη (SYNC) 1, 2 και ASCT 1, 2: 56 °C επί 10 δευτερόλεπτα

Ob- Rb: 55 °C επί 7 δευτερόλεπτα

Ob- Ra: 57 °C επί 10 δευτερόλεπτα

Ob: 55 °C επί 5 δευτερόλεπτα

- Επιμήκυνση

Συγκυτίνη (SYNC) 1, 2 και ASCT 1, 2: στους 72°C επί 7 δευτερόλεπτα

Ob- Rb στους 72°C επί 20 δευτερόλεπτα

Ob- Ra στους 72°C επί 24 δευτερόλεπτα

Ob στους 72°C επί 6 δευτερόλεπτα

Πρόγραμμα 3:

Ψύξη στους 40°C επί 30 δευτερόλεπτα για ένα κύκλο.

Τα αποτελέσματα περιγράφονται ως στρογγυλοποιημένες τιμές σε σχέση με το ενδογενώς εκφραζόμενο γονίδιο αναφοράς PBGD. Τα ποσά των μεταγράφων του γονιδίου-στόχου και των αντίστοιχων του γονιδίου PBGD καθορίζονται για κάθε δείγμα με εκτίμηση του μέσου όρου των τιμών των δύο αντιγράφων του κάθε δείγματος. Στη συνέχεια, το ποσό των μεταγράφων που μας ενδιαφέρουν (γονίδιο-στόχος) διαιρείται με το ποσό των μεταγράφων του γονιδίου αναφοράς και ο λόγος που προκύπτει είναι μια στρογγυλοποιημένη τιμή μεταγράφων του γονιδίου-στόχου ως προς την έκφραση του γονιδίου αναφοράς PBGD.

Κυτταρομετρική ανάλυση του φαινοτύπου

Για την παρασκευή του δείγματος χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές χρώσης και έκπλυσης. Σύντομα 50-100μl από τα κύτταρα επώασθηκαν για 15 λεπτά με κορεσμένο ισοδύναμο του μονόκλωνου αντισώματος για την κυτοκερατίνη Cytokeratin clone LP34 (Beckman Coulter, Miami USA) με το CD45 ως κοινό σημείο αναφοράς. Ακολούθησε έκπλυση των κυττάρων και επαναδιάλυση σε 1ml PBS.

Για τη μέτρηση της κυτοκερατίνης χρησιμοποιήθηκε το DNA PrepReagent Kit (Beckman Coulter). Κερατίνη και IgG1 για ισοτυπικό έλεγχο προστέθηκαν για τη χρώση των κυττάρων.

Τα αποτελέσματα ερμηνεύονται χρησιμοποιώντας cytomics FC 500 Flow cytometer (Beckman Coulter). Για την ανάλυση εφαρμόστηκε μια στρατηγική διαχωρισμού με CD45/SS (sidescatter) για την απομόνωση των CD45 αρνητικών τροφοβλαστικών κυττάρων.

Απομόνωση πρωτεϊνών

- Συλλογή των κυττάρων σε σωληνάριο falcon και υπολογισμός των κυττάρων που περιέχονται στον πληθυσμό (ο ιδανικός πληθυσμός είναι $1-3 \times 10^6$).
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και πλένουμε το ίζημα με PBS.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 2.000 rpm σε θερμοκρασία 4 °C.
- Επανάληψη της έκπλυσης και της φυγοκέντρησης.
- Μετά την απομάκρυνση του PBS, προσθέτουμε διάλυμα λύσης των κυττάρων και μετάγγιση σε σωληνάριο eppendorf.
- Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3.000 rpm.

- Συλλογή του υπερκειμένου μέσα στο οποίο βρίσκονται οι πρωτεΐνες.

Western blot ανάλυση

Το Western Blot πραγματοποιήθηκε με το kit NuPAGE (Novex Bis-Tris Gels). Αρχικά οι πρωτεΐνες απομονώνονται με την διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω και στη συνέχεια αναμειγνύονται με διάλυμα NuPAGE LDS Sample (4x) και διάλυμα NuPAGE Sample reducing Agent (10x).

Τοποθετούμε την πηκτή ακρυλαμίδης (4-12%) στην ειδική συσκευή και στη συνέχεια ηλεκτροφορούμε $\approx 40 \mu\text{g}$ αποδιαταγμένων πρωτεϊνών στα 100V για περίπου 30 min. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας της έκφρασης της πρωτεΐνης-στόχου.

Ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε φίλτρο νιτροκυτταρίνης και επώαση με το, ειδικό για την προς μελέτη πρωτεΐνη, αντίσωμα. Η αποτύπωση των πρωτεϊνών γίνεται πάνω σε φιλμ με τη χρήση χημειοφθορίζοντων διαλυμάτων.

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των μορίων γινόταν με τον υπολογισμό της αναλογίας έκφρασης του μορίου-στόχου προς την πρωτεΐνη αναφοράς που σε όλα μας τα πειράματα ήταν η ακτίνη. Ο υπολογισμός του λόγου έκφρασης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του προγράμματος ImageJ v 1.38 (Wayne Rasbands National Institutes of Health, USA).

Εκκινητής	Αλληλουχία
RAR6	5'-GGTGCCTCCCTACGCCTTCT-3'
RAR8	5'-GGCGCTGACCCCATAGTGGT-3'
SYNC1 F	5'-AGG AGC TTC GAA ACA CTG GA- 3'
SYNC1 R	5'-GTG AGC TAA GTT GCA AGC CC- 3'
SYNC2 F	5'-ATA CAT TCA TGA ACA TTG ACA CCA TGG CT- 3'
SYNC2 R	5'-ATA CAT GCT CAG CTT AAT TTA CCC AAA AGC AAC ATT- 3'
ASCT1 F	5'-ACA TGG ACG GAG CAG CCA TCT- 3'
ASCT1 R	5'-CAG AGG CAG GTC ATG AGT AG- 3'
ASCT2 F	5'-GGC TTG GTA GTG TTT GCC AT- 3'
ASCT2 R	5'-GGG CAA AGA GTA AAC CCA CA- 3'
H-FABP F	5'-AGC ATC ACT ATG GTG GAC GAC G- 3'
H-FABP R	5'-GAT GAT TGT GGT AGG CTT GG- 3'

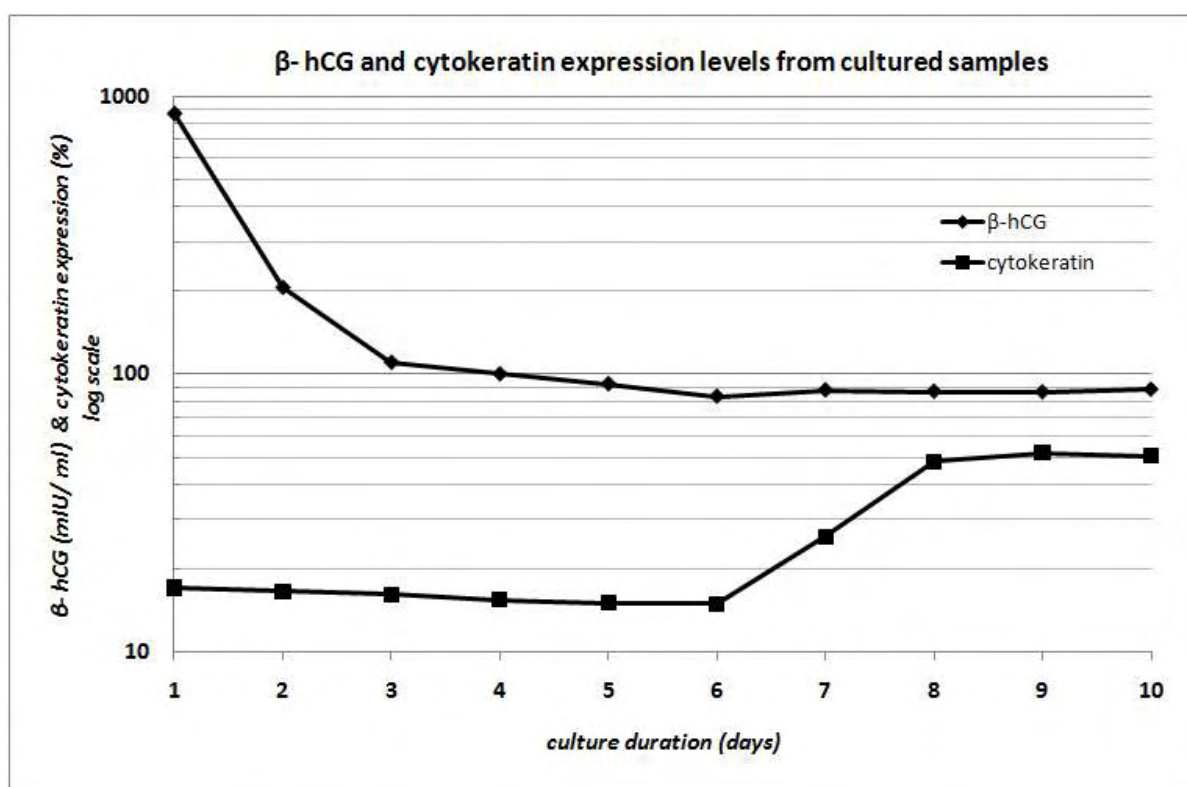
L-FABP F	5'-CGC TGG GTC CAA AGT GAT- 3'
L-FABP R	5'-ATG TCG CCG TTG AGT TCG- 3'
syncytin-1 s	5'- CCA ATG GAT GCC CTG GAT -3'
syncytin-1 as	5'-CCA GGG GTC TGC GGT A-3'
syncytin-2 s	5'-CAC TCT TCC AAG TAC AGT CTG TAA TG- 3'
syncytin-2 as	5'-GAT TTA TCT AGC AAA GTT CCC TGA G- 3'
ASCT1 s	5'-TGT TTG CTC TGG TGT TAG GAG T- 3'
ASCT1 as	5'-TTC CAA CAA GGA ACA TGA TGC- 3'
ASCT2 s	5'-CCG CTT CTT CAA CTC CTT CAA T- 3'
ASCT2 as	5'-CCA GCA GGC AGC ACA GAA T- 3'
syncytin-1 FL	5'-TCC AGA ATC GAA GCT GTA AAA CTA CAA ATG—FL
syncytin-1 LC	5'-LC-Red 640- GCC CAA GAT GCA GTC GTC CAA GAC TAA GA—PH
syncytin-2 FL	5'-AAC CAA CAG ACT TAC CAA ACA TAC ACC C—FL
syncytin-2 LC	5'-LC Red 640- CAA CCA ATT CCG CCA TCA ACC A—PH
ASCT1 FL	5'-CCG AAG GAG AAG ACC TCA TCC GT—FL
ASCT1 LC	5'-LC Red 640-TCT TCA ATT CCC TCA ACG AGG CGA—PH
ASCT2 FL	5'- TCA TGT TCC TGG TGG CTG GCA A—FL
ASCT2 LC	5'- LC Red 640-ATC GTG GAG ATG GAG GAT GTG GGT TT—PH
Ob- Ra FL	5'- GGAGAAAAAGCTGAACCAGGCCC-FL
Ob- Ra LC	5'- LC Red 640-TTTGGATCTTCATGCCCTGGGTTCTG —PH
Ob- Rb FL	5'- GGAGAAAAAGCTGAACCAGGCCC-FL
Ob- Rb LC	5'- LC Red 640-TTTGGATCTTCATGCCCTGGGTTCTG —PH
Ob FL	5'- GGAGAAAAAGCTGAACCAGGCCC-FL
Ob LC	5'- LC Red 640-TTTGGATCTTCATGCCCTGGGTTCTG —PH

Πίνακας 8. Αλληλουχίες εκκινητών και ανιχνευτών υβριδισμού

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Υπολογισμός επιπέδων β -hCG σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων

Η παραγωγή β -hCG από τα τροφοβλαστικά κύτταρα θεωρείται δείκτης της διαφοροποίησής τους σε συγκυτιοτροφοβλάστη, εφόσον θεωρείται ο κύριος τύπος παραγωγής της. Η έκφραση β -hCG παρουσίασε σημαντική μείωση αυξανόμενων των ημερών καλλιέργειας των τροφοβλαστικών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα, η απότομη πτώση των επιπέδων β -hCG παρατηρήθηκε στο χρονικό διάστημα των 7 πρώτων ημερών, ενώ κατόπιν η πτωτική πορεία συνεχιζόταν με ομαλότερο ρυθμό και διατηρούταν σε ένα στεθερό επίπεδο.



Εικόνα 31. Παραγωγή β - hCG και ανίχνευση κυτοκερατίνης από καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων σε διαφορετικές μέρες καλλιέργειας

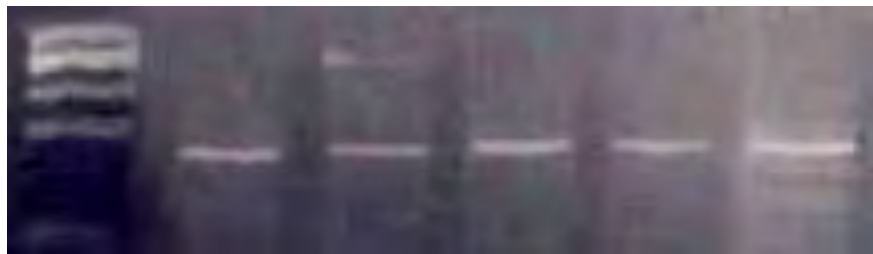
Μέτρηση κυτοκερατίνης-7

Η κυτοκερατίνη 7 αποτελεί δείκτη που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εξακρίβωση της παρουσίας συγκυτίων σε μία ομάδα κυττάρων και παρουσιάζεται σε σχέση αναλογίας με τα διαφοροποιημένα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Ο έλεγχος των

επιπέδων της κυτοκερατίνης- 7 ανέδειξε παρόμοια αποτελέσματα με τη μέτρηση β- hCG και αποτελεί επιβεβαίωση της δημιουργίας ενός status καλλιεργείων σε σχετικά αδιαφοροποίητη κατάσταση.

Έκφραση των γονιδίων λεπτίνης και υποδοχέων λεπτίνης σε τροφοβλαστικό ιστό πριν και μετά καλλιέργεια

Τα αποτελέσματα για την ενίσχυση του γονιδίου της λεπτίνης σε δείγματα προερχόμενα από καλλιέργειες 10 ημερών με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ανέδειξαν την παρουσία mRNA μεταγράφων της λεπτίνης (Εικόνα 32).



Εικόνα 32. Έκφραση mRNA του γονιδίου της λεπτίνης

Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα για τη βραχεία (Ob- Ra) (Εικόνα 33) και τη μακρά μορφή (Ob- Rb) (Εικόνα 34) του υποδοχέα της λεπτίνης σε ένα αριθμό δειγμάτων καλλιεργημένων και μη κυττάρων τροφοβλαστικού ιστού.



Εικόνα 33. Έκφραση mRNA του γονιδίου της βραχείας μορφής του υποδοχέα (Ob-Ra)

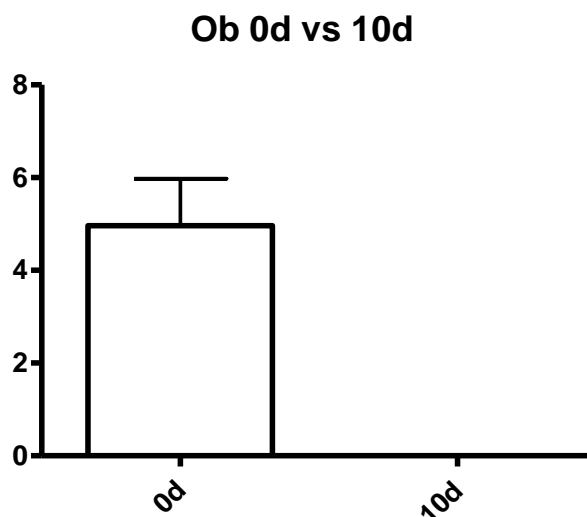


Εικόνα 34. Έκφραση mRNA του γονιδίου της μακράς μορφής του υποδοχέα (Ob-Rb)

Ποσοτική έκφραση των γονιδίων λεπτίνης και υποδοχέων λεπτίνης

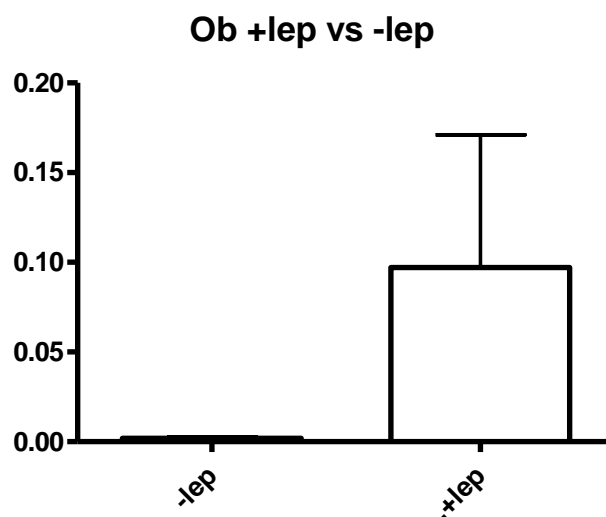
Διερευνώντας τις ποσοτικές μεταβολές στην συγκέντρωση των mRNA μεταγράφων της λεπτίνης (Ob) και των υποδοχέων της (Ob-Ra, Ob-Rb) σε δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που επεξεργάστηκαν άμεσα και σε άλλα που καλλιιεργήθηκαν παρουσία ή όχι άλλων παραγόντων διαπιστώθηκαν τα εξής:

Σε ότι αφορά στο γονίδιο της λεπτίνης, υπάρχει στατιστικώς σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της λεπτίνης σε δείγματα που καλλιιεργήθηκαν για 10 ημέρες (0,0019), σε σχέση με άλλα που επεξεργάστηκαν άμεσα (4,964) (Εικόνα 35).



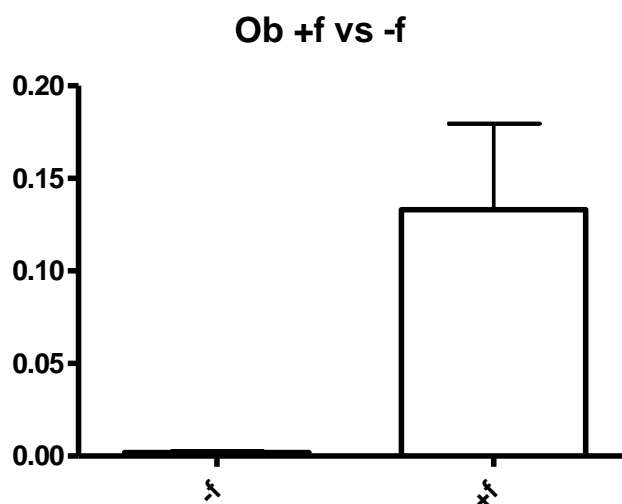
Εικόνα 35. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης (Ob) σε φρέσκα (0 d) δείγματα και από καλλιέργειες (10 d)

Τα επίπεδα των mRNA μεταγράφων του γονιδίου της λεπτίνης παρουσίασαν αύξηση όταν σε δείγματα, που έχουν καλλιιεργηθεί για χρονικό διάστημα 10 ημερών, προστεθεί στο θρεπτικό υλικό λεπτίνη σύμφωνα με το πρωτόκολλό μας. Η έκφραση ήταν 0,0019 για τα φρέσκα προς 0,1211 για τα δείγματα που είχαν καλλιιεργηθεί (Εικόνα 36).



Εικόνα 36. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης (Ob) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης

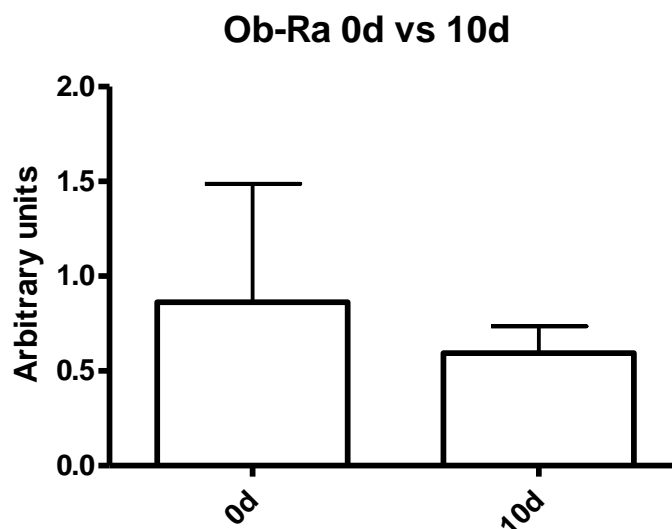
Ομοίως, όταν στο θρεπτικό υλικό δειγμάτων που καλλιεργούνται για το ίδιο χρονικό διάστημα προστεθεί φορσκολίνη (cAMP ανάλογο που προάγει τη διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστη) έχουμε στατιστικώς σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του γονιδίου της λεπτίνης (0,0021 προς 0,1332 αντίστοιχα) (Εικόνα 37).



Εικόνα 37. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης (Ob) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη φορσκολίνης

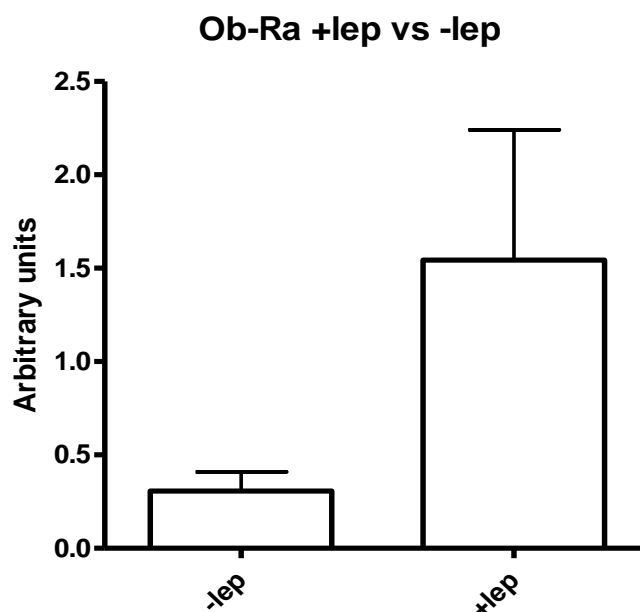
Σε ότι αφορά στη βραχεία μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob-Ra) διαπιστώνεται μια παρόμοια συμπεριφορά με αυτή του mRNA του γονιδίου της λεπτίνης. Πιο

συγκεκριμένα, υπάρχει ελάττωση των επιπέδων του υποδοχέα σε καλλιέργειες χρονικής διάρκειας 10 ημερών (από 0,8630 σε 0,5942) (Εικόνα 38).



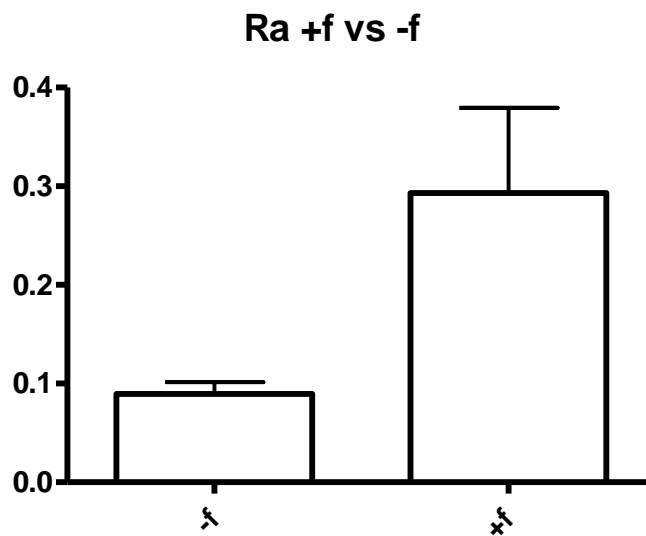
Εικόνα 38. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της βραχείας μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob-Ra) σε φρέσκα (0 d) και δείγματα από καλλιέργειες (10 d)

Η επίδραση εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης (συγκέντρωσης 10 ng/ ml.) στο καλλιεργητικό μέσο προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα Ob- Ra (από 0,3068 σε 1,544) (Εικόνα 39).



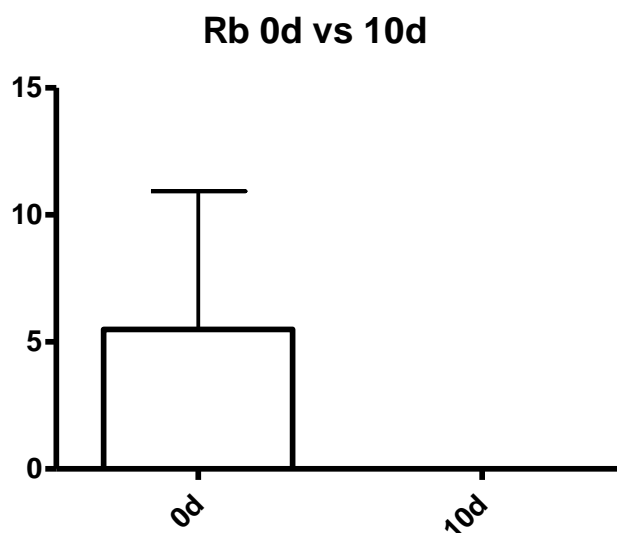
Εικόνα 39. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της βραχείας μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Ra) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης

Τέλος, η προσθήκη φορσκολίνης έχει ως αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων του mRNA του βραχύ υποδοχέα της λεπτίνης (0,0896 στην ομάδα που δεν προστέθηκε φορσκολίνη προς 0,2932 στην ομάδα της φορσκολίνης) (Εικόνα 40).



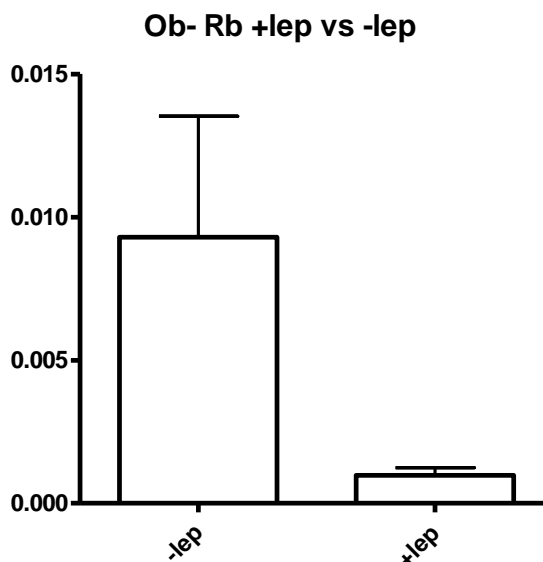
Εικόνα 40. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της βραχείας μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Ra) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη φορσκολίνης

Διαφοροποίηση παρατηρείται στην έκφραση των mRNA μεταγράφων της μακράς μορφής του υποδοχέα (Ob-Rb). Σε δείγματα που έχουν καλλιεργηθεί για χρονικό διάστημα 10 ημερών διαπιστώνεται στατιστικά σημαντική ελάττωση των επιπέδων σε σχέση με μη καλλιεργημένα-«φρέσκα» δείγματα (5,489 και 0,007148 αντίστοιχα) (Εικόνα 41).



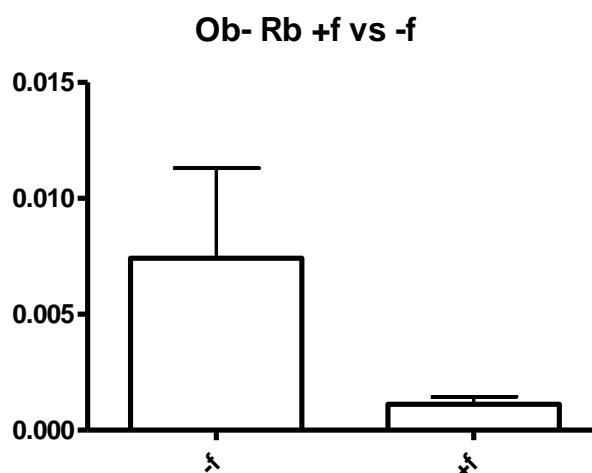
Εικόνα 41. Συγκριτική έκφραση του mRNA της μακράς μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob-Rb) σε φρέσκα (0 d) και δείγματα από καλλιέργειες (10 d)

Σε δείγματα που καλλιεργήθηκαν για χρονικό διάστημα 10 ημερών διαπιστώνεται ότι η προσθήκη εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης (συγκέντρωσης 10 ng/ ml.) προκαλεί στατιστικά σημαντική ελάττωση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα Ob- Rb (τιμές 0,009298 και 0,00098 αντίστοιχα) (Εικόνα 42).



Εικόνα 42. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της μακράς μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Rb) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης

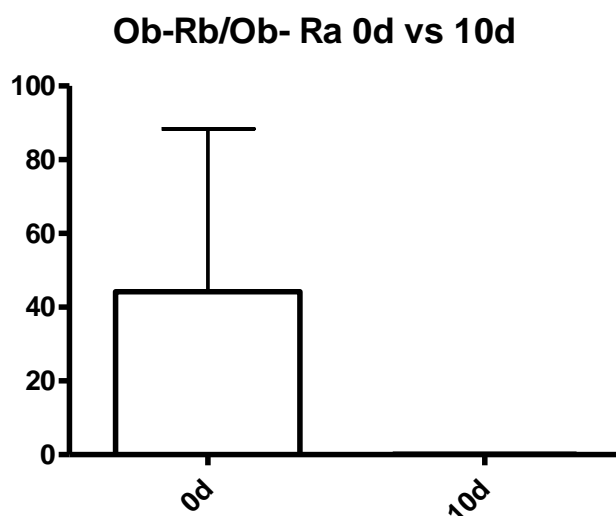
Ομοίως, η επίδραση φορσκολίνης σε καλλιέργειες ίδιας χρονικής διάρκειας επιφέρει στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων mRNA του υποδοχέα Ob- Rb (0,007418 στην ομάδα που δεν προστέθηκε προς 0,001125 στην ομάδα που προστέθηκε φορσκολίνη) (Εικόνα 43).



Εικόνα 43. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της μακράς μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Rb) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη φορσκολίνης

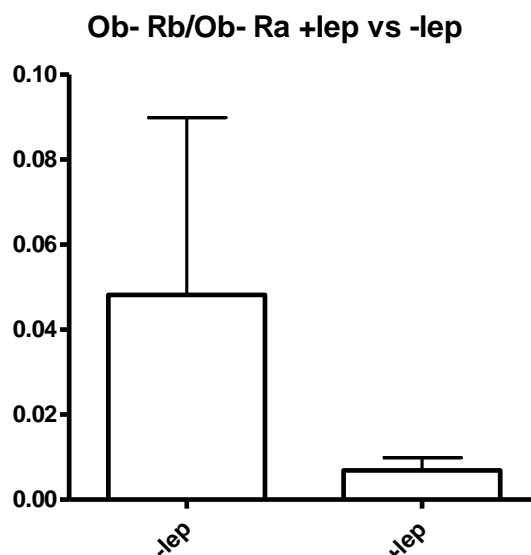
Η μελέτη της αναλογίας έκφρασης των δύο μορφών των υποδοχέων και ο υπολογισμός του λόγου Ob- Rb προς Ob- Ra (Rb/ Ra) ανέδειξε διαφορές ανάλογα με τις συνθήκες της καλλιέργειας.

Πιο συγκεκριμένα, παρατηρείται ελάττωση του λόγου Rb/ Ra σε δείγματα που καλλιεργήθηκαν για χρονικό διάστημα 10 ημερών (44,21 στα «φρέσκα» προς 0,08813 στα καλλιεργημένα δείγματα). Η μεταβολή αυτή οφείλεται σε ελάττωση και των δύο συντελεστών του κλάσματος, με σημαντικότερη την πτώση των επιπέδων των μεταγράφων mRNA της μακράς μορφής (Ob- Rb) (Εικόνα 44).



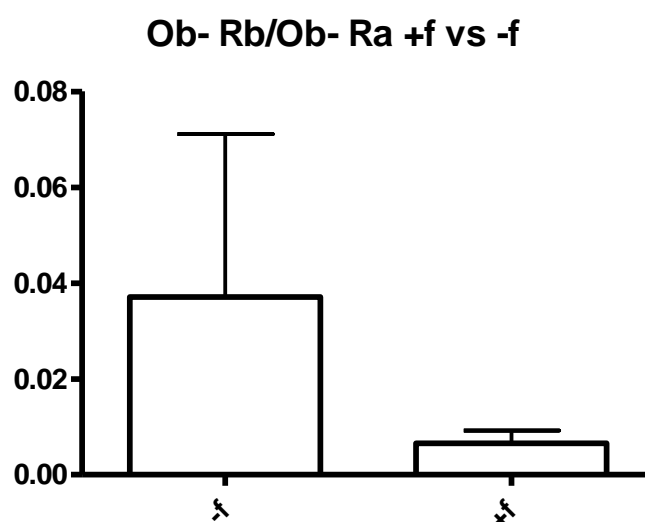
Εικόνα 44. Συγκριτική έκφραση της αναλογίας mRNA των γονιδίων της μακράς προς τη βραχεία μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Rb/ Ob-Ra) σε φρέσκα (0 d) και δείγματα από καλλιέργειες (10 d)

Όταν στα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που καλλιεργούνται για χρονικό διάστημα 10 ημερών προστεθεί εξωγενώς λεπτίνη, η αναλογία Rb/ Ra παρουσιάζει και πάλι ελάττωση (0,04815 στην ομάδα χωρίς και 0,006909 στην ομάδα με προσθήκη λεπτίνης). Η ελάττωση αυτή οφείλεται στην πτώση των επιπέδων Rb και στην ταυτόχρονη άνοδο των επιπέδων Ra (Εικόνα 45).



Εικόνα 45. Συγκριτική έκφραση της αναλογίας mRNA των γονιδίων της μακράς προς τη βραχεία μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Rb/ Ob-Ra) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης

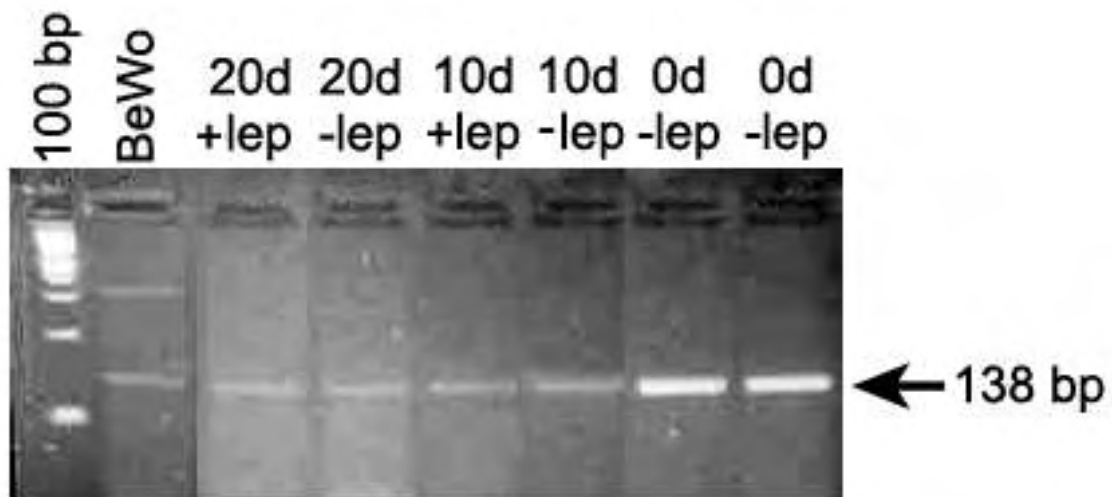
Τέλος, κατόπιν επίδρασης με φορσκολίνη σε καλλιέργειες τροφοβλαστικού ιστού για χρονικό διάστημα 10 ημερών παρατηρείται ελάττωση της αναλογίας Rb/ Ra (στην ομάδα που δεν προστέθηκε φορσκολίνη 0,03707, ενώ στην ομάδα που προστέθηκε 0,006558). Αυτή η μεταβολή οφείλεται ομοίως στην πτώση των επιπέδων της μακράς μορφής του υποδοχέα (Ob- Rb) και στην αύξηση των επιπέδων της βραχείας μορφής (Ob- Ra) (Εικόνα 46)



Εικόνα 46. Συγκριτική έκφραση της αναλογίας mRNA των γονιδίων της μακράς προς τη βραχεία μορφή του υποδοχέα της λεπτίνης (Ob- Rb/ Ob-Ra) σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη φορσκολίνης

Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης H- FABP σε τροφοβλαστικό ιστό

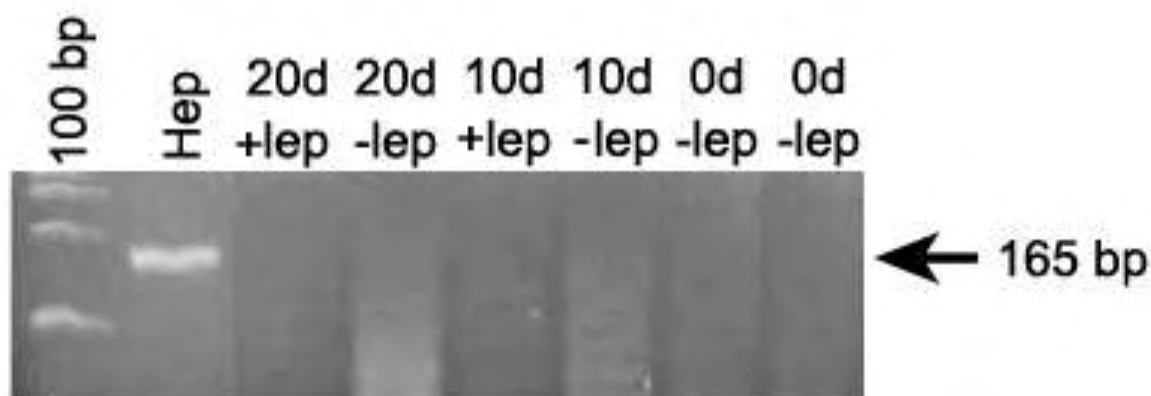
Η έκφραση των mRNA μεταγράφων της πρωτεΐνης H- FABP μελετήθηκε σε τροφοβλαστικό ιστό (CVS) άμεσα (0d) και σε ιστό που καλλιεργήθηκε για διάστημα ως και 20 ημερών (10d, 20d) παρουσία ή όχι λεπτίνης (+lep, -lep). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά BeWo που έχει δειχθεί ότι εκφράζει την H- FABP. Όλα τα δείγματα, 0, 10/20d (+/- lep), εξέφραζαν mRNA H- FABP μετάγραφα (Εικόνα 47).



Εικόνα 47. Έκφραση mRNA του γονιδίου της H- FABP

Μελέτη της έκφρασης του γονιδίου της πρωτεΐνης L- FABP σε τροφοβλαστικό ιστό

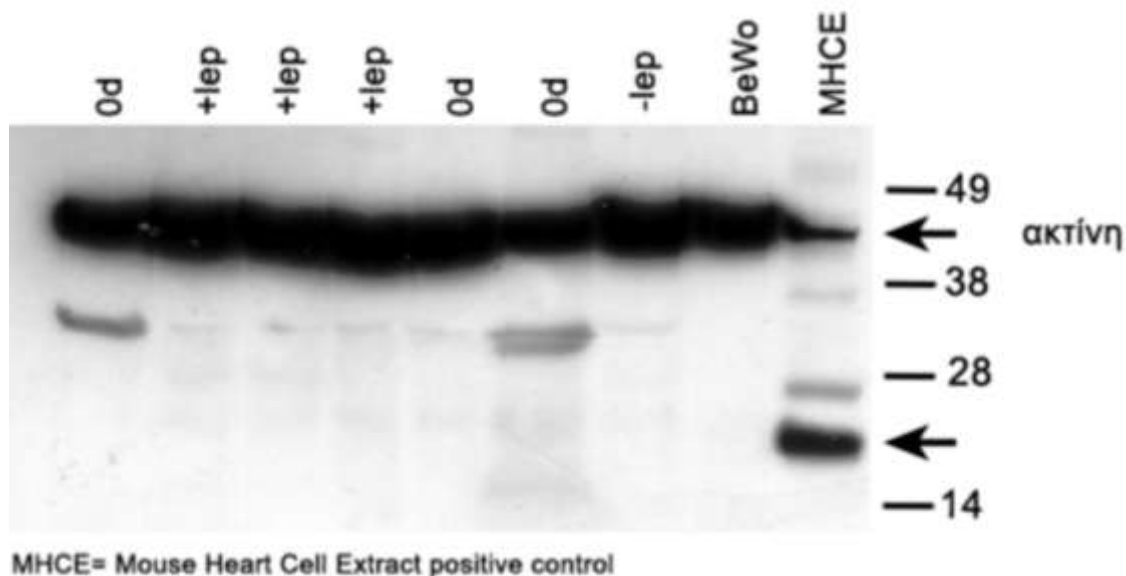
Οι cDNA αλληλουχίες των mRNA μεταγράφων της πρωτεΐνης L- FABP ενισχύθηκαν και μελετήθηκαν σε ιστό CVS που συλλέχθηκε άμεσα (0d) και σε ιστό που καλλιεργήθηκε για διάστημα 10 και 20 ημερών (10d, 20d) παρουσία ή όχι λεπτίνης(+lep, -lep). Ως θετικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ομογενοποιημένο φυσιολογικό ηπατικό παρέγχυμα (Hep) που έχει δειχθεί ότι εκφράζει την L- FABP. Σε κανένα από τα δείγματα δεν ανιχνεύθηκαν μετάγραφα L- FABP (Εικόνα 48).



Εικόνα 48. Έκφραση mRNA του γονιδίου της L- FABP

Εκφραση της πρωτεΐνης H- FABP

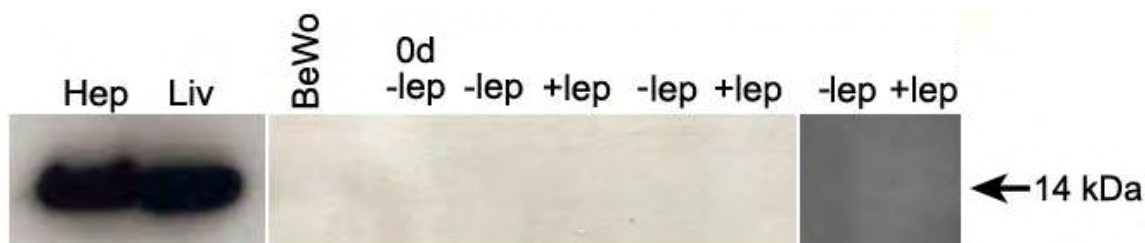
Σε κανένα από τα μελετημένα δείγματα δεν παρατηρήθηκε έκφραση της πρωτεΐνης H- FABP. Η έλλειψη έκφρασης παρατηρήθηκε τόσο σε δείγματα που επεξεργασθήκαν άμεσα μετά τη λήψη τους όσο και σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων παρουσία ή όχι λεπτίνης (Εικόνα 49). Αυτό το εύρημα είναι συμβατό και με την έλλειψη έκφρασης μεταφράφων στην ποιοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Εικόνα 49. Έκφραση της πρωτεΐνης H- FABP σε φρέσκα (0d) και καλλιεργημένα για 10 μέρες δείγματα παρουσία (+lep) ή απουσία (-lep) λεπτίνης 10 ng/ ml

Έκφραση της πρωτεΐνης L- FABP

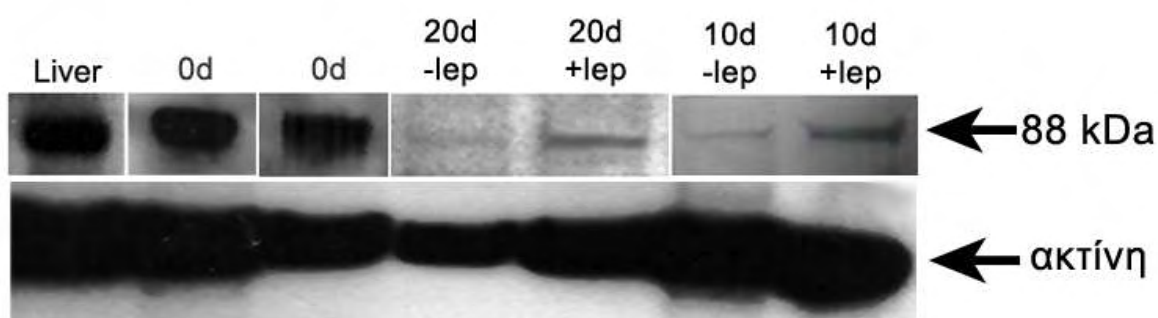
Παρόμοια με την H- FABP πρωτεΐνη, η έκφραση της πρωτεΐνης L- FABP δεν παρατηρήθηκε σε κανένα από τα δείγματα, ανεξαρτήτως ημερών καλλιέργειας ή επίδρασης λεπτίνης, παρά την παρουσία των αντίστοιχων mRNA μεταγράφων (Εικόνα 50).



Εικόνα 50. Έκφραση της πρωτεΐνης L- FABP σε φρέσκα (0d) και καλλιεργημένα για 10 μέρες δείγματα παρουσία (+lep) ή απουσία (-lep) λεπτίνης 10 ng/ ml

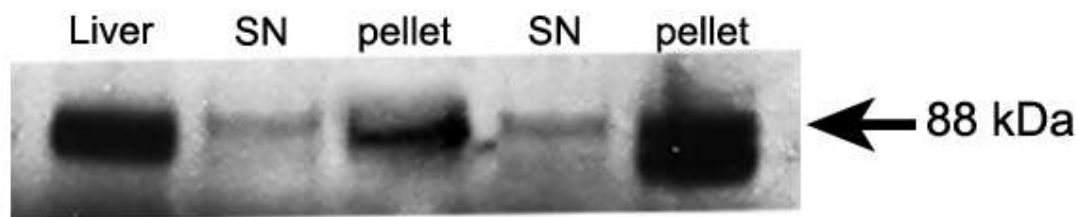
Έκφραση του πρωτεϊνικού μορίου FAT/ CD36

Η παρουσία της πρωτεΐνης FAT/ CD36 διαπιστώθηκε σε όλα τα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που επεξεργάστηκαν είτε άμεσα είτε κατόπιν καλλιέργειας (Εικόνα 51). Στα δείγματα που καλλιεργήθηκαν, κατόπιν στατιστικής επεξεργασίας της έκφρασης του FAT/ CD36 διαπιστώθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάλογα με την παρουσία ή όχι λεπτίνης στο καλλιεργητικό μέσο.



Εικόνα 51. Έκφραση της πρωτεΐνης FAT/ CD36 στην κυτταρική μεμβράνη σε διάφορες μέρες καλλιέργειας με (+) ή χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης

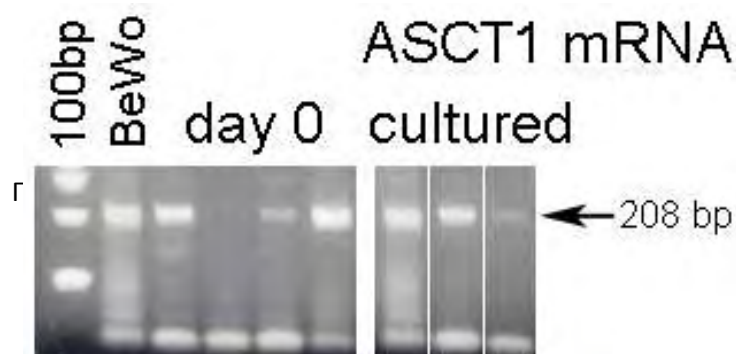
Επιπλέον, για πρώτη φορά, διαπιστώθηκε η παρουσία του μορίου FAT/ CD36 στο κυτταρόπλασμα δειγμάτων τροφοβλαστικού ιστού που επεξεργάστηκαν άμεσα μετά τη λήψη του (Εικόνα 52).



Εικόνα 52. Έκφραση της πρωτεΐνης FAT/ CD36 στην κυτταρική μεμβράνη (pellet) και στο κυτταρόπλασμα (SN) φρέσκων δειγμάτων

Έκφραση των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2

Η χρήση ποιοτικής PCR ανέδειξε την παρουσία τόσο στα δείγματα μας όσο και στην κυτταροσειρά BeWo (θετικός μάρτυρας) όλων των αναζητούμενων μορίων. Τα δείγματα μας περιελάμβαναν τόσο δείγματα που επεξεργάσθηκαν άμεσα, όσο και άλλα προερχόμενα από καλλιέργειες χρονικής διάρκειας 10 ημερών (Εικόνα 53).

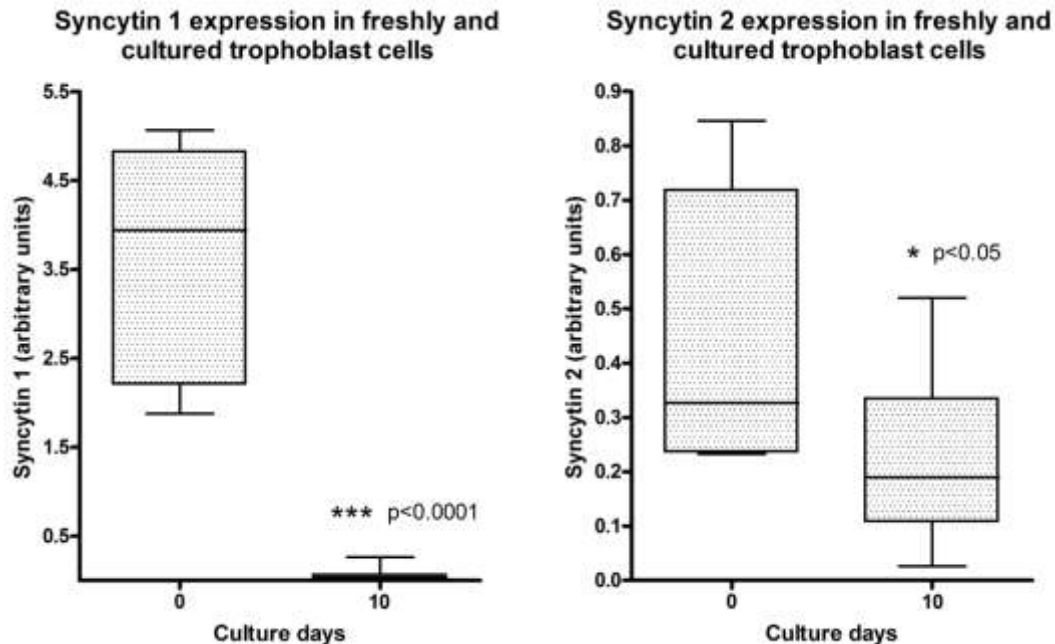




Εικόνα 53. Έκφραση mRNA για τα γονίδια της συγκυτίνης 1 (Α), συγκυτίνης 2 (Β), ASCT1 (Γ) και ASCT2 (Δ)

Ποσοτική έκφραση των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2

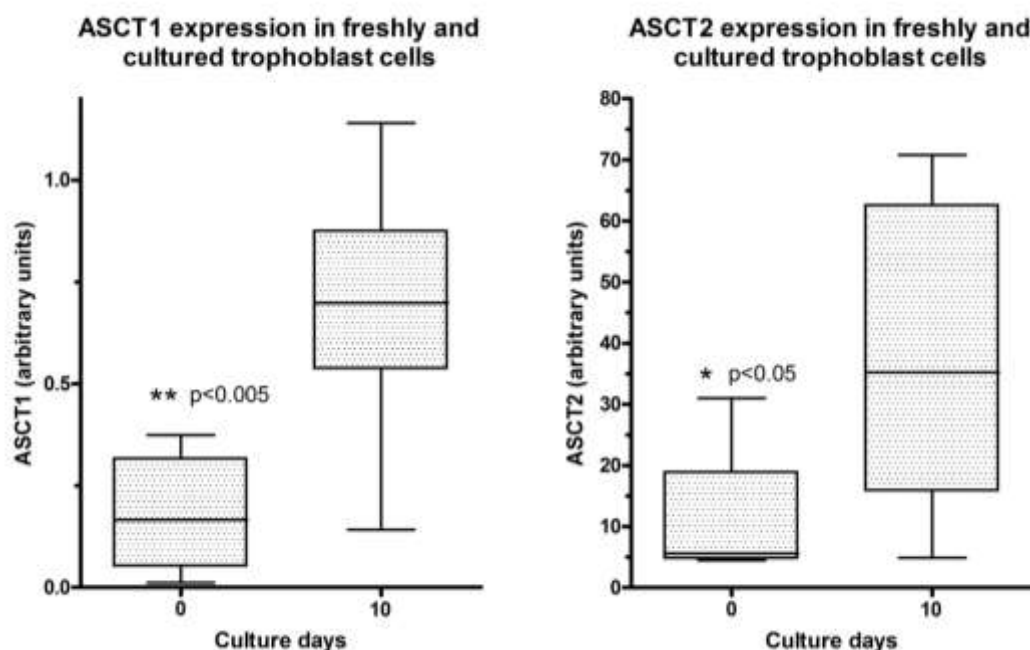
Η ποσοτική έκφραση του mRNA των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2 έγινε σε δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που επεξεργάσθηκαν είτε άμεσα μετά τη λήψη τους είτε καλλιεργήθηκαν για χρονικό διάστημα 10 ημερών με ή χωρίς προσθήκη λεπτίνης



Εικόνα 54. Συγκριτική έκφραση του mRNA των μορίων της συγκυτίνης 1 και συγκυτίνης 2 σε φρέσκα (0 d) και δείγματα από καλλιέργειες (10 d)

Τα επίπεδα τόσο της συγκυτίνης 1 όσο και της συγκυτίνης 2 είναι στατιστικώς σημαντικά μειωμένα στα δείγματα που προέρχονταν από καλλιέργειες 10 ημερών σε σχέση με τα αντίστοιχα μη καλλιεργημένα. Η έκφραση σε φρέσκα και καλλιεργημένα δείγματα

ήταν 3,599 και 0,054 για τη συγκυτίνη 1 και 0,447 και 0,224 για τη συγκυτίνη 2 αντίστοιχα (Εικόνα 54).



Εικόνα 55. Συγκριτική έκφραση του mRNA των μορίων συγκυτίνης ASCT1 και ASCT2 σε φρέσκα (0 d) και δείγματα από καλλιέργειες (10 d)

Από τα παραπάνω διαγράμματα, φαίνεται ότι τα επίπεδα της συγκυτίνης 1 στα μη καλλιεργημένα-«φρέσκα» δείγματα είναι περίπου 10πλάσια από τα αντίστοιχα της συγκυτίνης 2. Αντιθέτως, στα καλλιεργούμενα δείγματα, τα επίπεδα συγκυτίνης 1 ελαττώνονται σε πολύ σημαντικότερο βαθμό από τα αντίστοιχα της συγκυτίνης 2. Πιο συγκεκριμένα, η συγκυτίνη 1 ελαττώνεται κατά 66,4 φορές ενώ η συγκυτίνη 2 μόλις κατά 1,99.

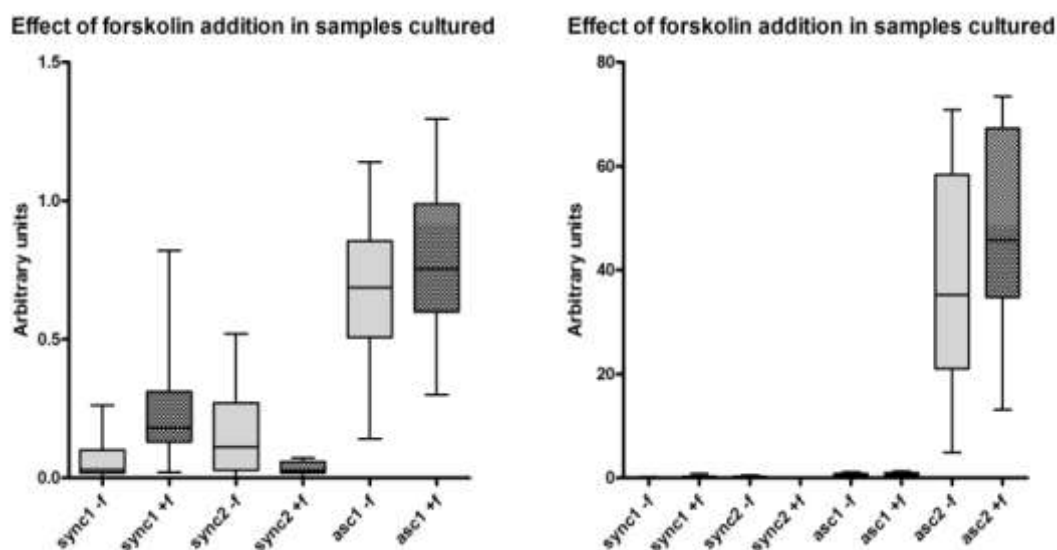
Αντιθέτως με την πτώση των επιπέδων των μορίων της συγκυτίνης, η έκφραση των υποδοχέων ASCT1 και ASCT2 παρουσιάζοταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα δείγματα που καλλιεργήθηκαν. Η αύξηση αυτή για τον υποδοχέα ASCT1 ήταν κατά 3,7 (από 0,18 σε 0,668) και για τον ASCT2 κατά 3,5 φορές (από 10,57 σε 36,79) (Εικόνα 55).

Επίδραση της φορσκολίνης (forskolin) στην έκφραση των μορίων της συγκυτίνης 1, 2 και των ASCT1 και 2.

Σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων διάρκειας 10 ημερών προστέθηκε στο θρεπτικό υλικό ποσότητα φορσκολίνης και μελετήθηκε η επίδρασή της στην έκφραση των γονιδίων συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2. Η φορσκολίνη είναι ένα cAMP

ανάλογο που προάγει τη διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης προς το σχηματισμό συγκυτίων και έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε μελέτες κυτταρικής σύντηξης.

Η επίδραση της φορσκολίνης επέφερε μεταβολές στην έκφραση του mRNA των αναζητούμενων μορίων ως εξής: σε ότι αφορά στη συγκυτίνη 1, η επίδραση της



Εικόνα 56. Συγκριτική έκφραση του mRNA των γονιδίων συγκυτίνης 1 (sync1), συγκυτίνης 2 (sync2), ASCT1 και ASCT2, με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη φορσκολίνης σε καλλιέργειες

φορσκολίνης σε καλλιέργειες 10 ημερών οδήγησε σε στατιστικώς σημαντική αύξηση της έκφρασής της (από 0,062 σε 0,257). Αντιθέτως, η επίδραση της φορσκολίνης σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του μορίου της συγκυτίνης 2 (από 0,191 σε 0,037). Και σε αυτή την περίπτωση η μεταβολή ήταν στατιστικώς σημαντική (Εικόνα 56).

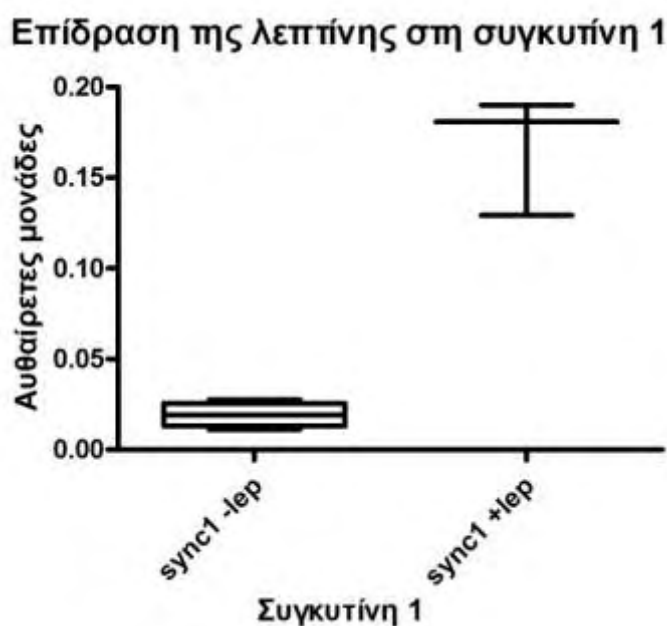
Σε ότι αφορά στους υποδοχείς ASCT1 και ASCT2, η παρατηρούμενη μικρή αύξηση των επιπέδων τους δεν αποδείχθηκε στατιστικώς σημαντική για τα επίπεδα σημαντικότητας που είχαμε προκαθορίσει ($p = 0,05$). Στα δείγματα που δεν είχε προστεθεί φορσκολίνη η έκφραση ήταν 0,681 για τον ASCT1 και 37,41 για τον ASCT2. Όταν προστέθηκε φορσκολίνη οι συγκεντρώσεις έγιναν 0,783 και 47,61 αντίστοιχα (Εικόνα 56)

Επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση των μορίων της συγκυτίνης 1, 2 και των ASCT1 και 2.

Στα πλαίσια της διερεύνησης του ρόλου της λεπτίνης στη φυσιολογία του πλακούντα, μελετήθηκε η επίδραση εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης σε δείγματα που καλλιεργούνταν και η σύγκριση της έκφρασης των μορίων της συγκυτίνης 1, συγκυτίνης 2, ASCT1 και ASCT2.

Από τη επεξεργασία των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι η έκφραση της συγκυτίνης 1 εμφανίζεται στατιστικώς σημαντικά αυξημένη στα δείγματα που καλλιεργήθηκαν παρουσία

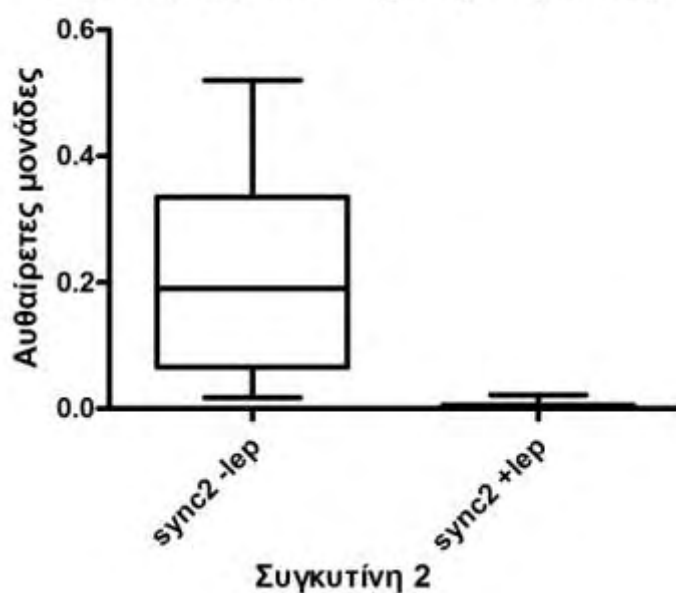
λεπτίνης στο θρεπτικό μέσο. Η μεταβολή ήταν η κατά 8,67 φορές μεγαλύτερη έκφραση στα δείγματα που προστέθηκε λεπτίνη (από 0,01923 σε 0,16667) (Εικόνα 57).



Εικόνα 57. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της συγκυτίνης 1 σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης.

Σε ότι αφορά στο αποτέλεσμα της επίδρασης της λεπτίνης στη συγκυτίνη 2, παρατηρείται ότι στην ομάδα των καλλιεργημένων δειγμάτων που προστέθηκε λεπτίνη τελικής συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ τα επίπεδα συγκυτίνης 2 εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση. Η έκφραση της συγκυτίνης 2 σ' αυτή την ομάδα μειώθηκε κατά 21,2 φορές (από 0,2179 σε 0,01027) (Εικόνα 58).

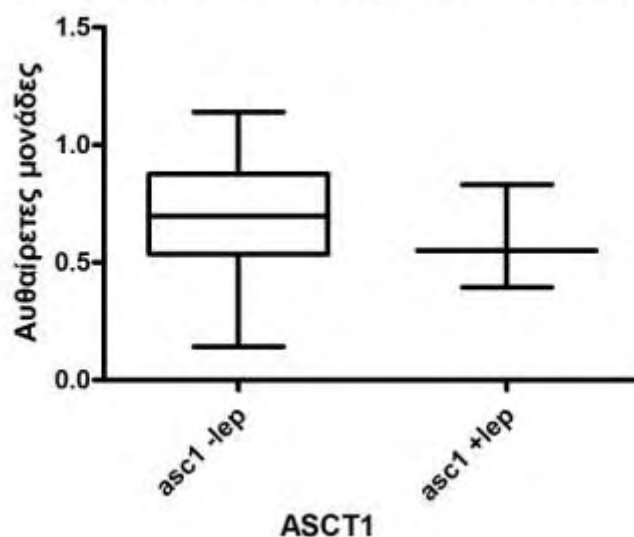
Επίδραση της λεπτίνης στη συγκυτίνη 2



Εικόνα 58. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου της συγκυτίνης 2 σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης.

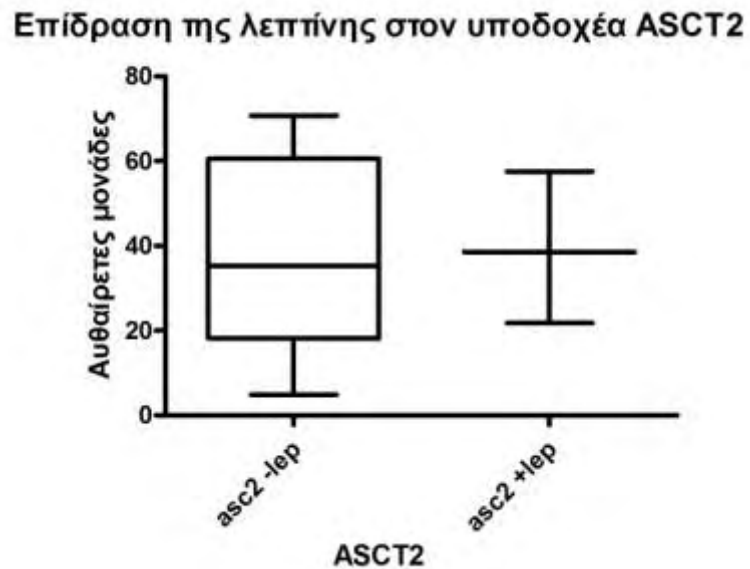
Όταν προστέθηκε λεπτίνη σε δείγματα που καλλιεργούνταν, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην έκφραση του υποδοχέα αμινοξέων ASCT1. Η έκφραση ήταν 0,6699 στα δείγματα χωρίς και 0.5918 στα δείγματα με προσθήκη λεπτίνης (Εικόνα 59).

Επίδραση της λεπτίνης στον υποδοχέα ASCT1



Εικόνα 59. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου του υποδοχέα ASCT 1 σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης.

Ομοίως, τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η προσθήκη λεπτίνης σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων δεν επέφερε στατιστικώς σημαντική μεταβολή στην έκφραση του υποδοχέα αμινοξέων ASCT2. Η έκφραση ήταν 36,79 στα δείγματα χωρίς και 39,33 στα δείγματα με προσθήκη λεπτίνης (Εικόνα 60).



Εικόνα 60. Συγκριτική έκφραση του mRNA του γονιδίου του υποδοχέα ASCT 2 σε δείγματα με (+) και χωρίς (-) την προσθήκη λεπτίνης.

Καλλιέργειες κυττάρων. Παραγωγή β-hCG και κυτοκερατίνης

Ο τόπος κύριας παραγωγής της β- hCG είναι το συγκύτιο. Στις μετρήσεις των επιπέδων της στο καλλιεργητικό μέσο, παρατηρούνται εντυπωσιακές διαφορές στις τιμές μεταξύ των πρώτων ημερών καλλιέργειας (7 ημέρες στα δείγματα που καλλιεργήσαμε) και των τιμών που ανευρίσκονται μετέπειτα (μετά τις 7 μέρες και μέχρι 60 μέρες σε ένα δείγμα). Αυτά τα διαφορετικά επίπεδα αντανακλούν στη διαφορετική αναλογία της παρουσίας διαφοροποιημένων συγκυτίων. Είναι φανερό ότι με τις συνθήκες καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν, δημιουργήθηκε ένα καινούργιο status κυττάρων στο οποίο περιλαμβάνονταν κυρίως κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Αυτή η κατάσταση πραγματοποιούνταν μέσα στο διάστημα της αρχικής καλλιέργειας, παρέμενε σχετικά σταθερή μετά από αρκετές ανακαλλιέργειες και διατηρούνταν για αρκετό χρονικό διάστημα.

Εκτός από τη β- hCG, και η κυτοκερατίνη 7 αποτελεί δείκτη που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εξακρίβωση της παρουσίας συγκυτίων σε μία ομάδα κυττάρων και παρουσιάζεται σε σχέση αναλογίας με τα διαφοροποιημένα συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα. Ο έλεγχος των επιπέδων της κυτοκερατίνης- 7 ανέδειξε παρόμοια αποτελέσματα με τη μέτρηση β- hCG και αποτελεί επιβεβαίωση της δημιουργίας ενός status καλλιεργείων σε σχετικά αδιαφοροποίητη κατάσταση. Εντούτοις, τα επίπεδα της κυτοκερατίνης έτειναν προς μηδενικές τιμές μετά από έναν αριθμό ανακαλλιεργείων (όπως μετρήθηκαν σε καλλιέργειες διάρκειας 60 ημερών)

Το θεωρητικό μοντέλο που πιθανά εξηγεί αυτή την κατάσταση είναι συνδυασμός δύο παραγόντων: ο πρώτος, που έχει περιγραφεί σε μία αναφορά στη βιβλιογραφία, έχει να κάνει με την αδυναμία στερρής προσκόλλησης της συγκυτιοτροφοβλάστης στην επιφάνεια της φλάσκας [205]. Φαίνεται, ότι οι αλλαγές του θρεπτικού υλικού απομάκρυναν ένα ποσοστό κυττάρων που είχε διαφοροποιηθεί και δεν μπορούσε να συγκρατηθεί. Επιπλέον, οι ανακαλλιέργειες με τη μεθοδολογία που πραγματοποιούνταν, προκαλούσαν αποκόλληση μέρους του συγκυτίου, διακοπή της συνέχειας του με την κυτταροτροφοβλάστη άρα και πιθανή νέκρωσή του.

Ο δεύτερος παράγοντας έχει να κάνει με τις συνθήκες καλλιέργειας. Φαίνεται ότι η διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστη ενισχύεται όταν η επώαση του ιστού πραγματοποιείται σε συνθήκες όπου τα κύτταρα βρίσκονται πλησιέστερα μεταξύ τους. Πράγματι, τα επίπεδα της β- hCG και της κυτοκερατίνης παρουσίαζαν αύξηση όταν η καλλιέργεια πραγματοποιούνταν σε τρυβλίο επιφανείας 9.5 cm² (6- well culture plate,

Sarstedt) σε σχέση με την καλλιέργεια σε φλάσκα επιφάνειας 25 cm² (στοιχεία δεν απεικονίζονται).

Άμεση σύγκριση με πειραματικά μοντέλα άλλων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί μιας και δεν απαντάται στη βιβλιογραφία μακροχρόνια καλλιέργεια τροφοβλαστικού ιστού. Όλες οι αναφορές περιορίζονται σε oligοήμερη μελέτη καλλιέργειών ενώ, αντιθέτως, εμείς πραγματοποιήσαμε (σε μία τουλάχιστον περίπτωση) καλλιέργεια διάρκειας περίπου 60 ημερών. Άλλη, πιθανώς σημαντική, διαφορά είναι ότι στις περισσότερες από τις δημοσιευμένες έρευνες χρησιμοποιούταν τροφοβλαστικός ιστός από τελειόμηνους πλακούντες. Εμείς, χρησιμοποιήσαμε υλικό που προερχόταν από πλακούντες ηλικίας μεταξύ πρώτου και δευτέρου τριμήνου. Δεν είναι γνωστό αν η ηλικία κύησης παίζει κάποιο ρόλο, αλλά πάντως το υλικό μας περιείχε μεγαλύτερη ποσοστιαία αναλογία τροφοβλαστικού ιστού από αυτό που απαντάται σε τελειόμηνους πλακούντες.

Η μέθοδος που χρησιμοποιήσαμε δεν χρησιμοποιείται τυπικά στη διεθνή βιβλιογραφία. Η ανάγκη να καθαριστεί ο τελειόμηνος πλακούντας και να απομονωθούν τα τροφοβλαστικά κύτταρα οδήγησε στη χρήση συστημάτων βαθμίδωσης με διάλυμα Percoll στις περισσότερες περιπτώσεις. Σε εμάς, αυτή η μέθοδος δεν απέδωσε λόγω και της μικρής ποσότητας ιστού που είχαμε στη διάθεσή μας. Πρόσφατα δημοσιευμένα δεδομένα στα οποία χρησιμοποιήθηκε μέθοδος καλλιέργειας ίδιας λογικής με τη δική μας, οδήγησε σε συμπεράσματα παρόμοια με τα δικά μας. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι ο ιστός που παραμένει μετά την ανακαλλιέργεια παρουσιάζει χαρακτηριστικά εξωλάχνιας τροφοβλάστης [206].

Με βάση τα αποτελέσματα μας, είναι λογικό να υποθέσει κανείς ότι με τις συγκεκριμένες συνθήκες, ο καλλιεργούμενος ιστός μετέπτυξε σχετικά γρήγορα σε μία κατάσταση χαμηλής διαφοροποίησης. Με βάση τις μετρούμενες τιμές β- hCG και κυτοκερατίνης μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η πλειονότητα των κυττάρων βρισκόταν στη μορφή της κυτταροτροφοβλάστης. Η διαθεσιμότητα ενός σχετικά αδιαφοροποίητου ιστού με δυναμικό διαφοροποίησης είτε προς συγκυτιοτροφοβλάστη, είτε προς εξωλαχνική τροφοβλάστη (EVT) με παρόμοια φαινοτυπική εμφάνιση και βιοχημική συμπεριφορά έχει το πλεονέκτημα της δυνατότητας σύγκρισης της έκφρασης διαφόρων μακρομορίων μετά από την επίδραση διαφόρων παραγόντων.

Στηριζόμενοι στα παραπάνω, θεωρήσαμε ότι για τα πειράματα επίδρασης ουσιών σε κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα, η χρήση δειγμάτων που καλλιεργήθηκαν από 10 ως και 20 ημέρες αποδίδει τα μέγιστα. Εξασφαλίζει την επάρκεια ικανής ποσότητας ιστού και ταυτόχρονα τη διάθεση αυτού του ιστού κυρίως σε μορφή κυτταροτροφοβλάστης. Επιπλέον, θεωρούμε ότι το καλλιεργητικό μοντέλο που χρησιμοποιήσαμε καθώς και η

χρήση τροφοβλαστικού ιστού που προέρχεται από CVS μπορεί να αποτελέσει μία σχετικά απλή και αποτελεσματική μέθοδο μελέτης του συγκεκριμένου ιστού.

Λιπαρά οξέα

Η παρουσία στον πλακούντα ενός αριθμού πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη δέσμευση και μεταφορά λιπαρών οξέων από τη μητρική προς την εμβρυϊκή κυκλοφορία υποδηλώνει και τη σημασία που αυτά έχουν στην ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

Πράγματι, η επαρκής και απρόσκοπτη μεταφορά λιπαρών οξέων και ιδίως των λεγόμενων «απαραίτητων», εξασφαλίζει την ομαλή ανάπτυξη του νευρικού συστήματος του εμβρύου. Πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα απαραίτητα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε όργανα όπως ο εγκέφαλος και ιστούς όπως ο αμφιβληστροειδής.

Η ανυπαρξία εμπορικών διαθέσιμων μονοκλωνικών αντισωμάτων για κάθε μία από τις πρωτεΐνες που εμπλέκονται, δυσχεραίνει τη μελέτη του φαινομένου σε πλήρη έκταση. Στις μελέτες που έχουν γίνει, χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα που παράχθηκαν από τους ίδιους τους ερευνητές ή προσφέρθηκαν σε αυτούς. Εξάλλου, πολλές από τις έρευνες αφορούν άλλους ιστούς και κυρίως τον μυϊκό.

Σε ότι αφορά στις πρωτεΐνες που μελετήσαμε, τα αποτελέσματα έρχονται να προσθέσουν νέα στοιχεία στα μέχρι σήμερα γνωστά. Επιπρόσθετα, η μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης έρχεται να προσθέσει νέα στοιχεία για το ρόλο αυτής της ορμόνης στις μεταβολικές διεργασίες που επιτελούνται στον πλακούντα.

Κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (H- FABP, L- FABP)

Τα αποτελέσματα μας διαφοροποιούνται σε σχέση με τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα. Στη βιβλιογραφία υπάρχει δημοσιευμένος ένας αριθμός μελετών που αναφέρουν την ύπαρξη του ισοενζύμου σε ανθρώπινους πλακούντες. Αυτές οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε πλακούντες δευτέρου και τρίτου τριμήνου [207, 208], αν και υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες στη βιβλιογραφία όπου χρησιμοποιήθηκαν και πλακούντες 1^{ου} τριμήνου [207].

Παρά την ανεύρεση μεταγράφων RNA στο υλικό της μελέτης μας, στάθηκε αδύνατη οποιαδήποτε τεκμηρίωση της πρωτεϊνικής έκφρασης του μορίου της H- FABP. Στα πειράματα με τη μέθοδο Western Blot χρησιμοποιήθηκαν οι μέγιστες δυνατές συγκεντρώσεις cDNA και υψηλότερες συγκεντρώσεις του αντίστοιχου αντισώματος. Αντίστοιχες τροποποιήσεις έγιναν και σε επιμέρους στάδια της διαδικασίας ώστε να

εξασφαλιστεί η καταγραφή έστω και ελάχιστης ποσότητας πρωτεΐνης. Μπορούμε με ασφάλεια να θεωρήσουμε ότι είτε η H- FABP δεν εκφράζεται πρωτεϊνικά ή ότι η έκφρασή της είναι κάτω από το κατώφλι ευαισθησίας της μεθόδου.

Η ερμηνεία αυτού του ευρήματος δεν είναι ευχερής. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι το υλικό μας προερχόταν από τροφοβλάστη κύψεων στις οποίες η μεταφορά λιπαρών οξέων δεν ήταν ακόμα πλήρως εγκατεστημένη. Δεν πρέπει να μας διαφεύγει ότι σημαντική μεταφορά λιπαρών οξέων διαμέσου του πλακούντα συμβαίνει σε μεταγενέστερα στάδια της κύησης. Σε ότι αφορά στα καλλιεργημένα δείγματα, η αδυναμία έκφρασης πιθανόν να σχετίζεται και με τα καλλιεργητικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και τα οποία δεν επάγαν την πρωτεϊνική έκφραση μορίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Εξάλλου, ο ρόλος των κυτταροπλασματικών FABP είναι η δέσμευση κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων, η συγκράτηση τους εντός της συγκυτιοτροφοβλάστης και η απόδοσή τους στην εμβρυϊκή πλευρά. Έτσι, συμβάλλουν στη δημιουργία βαθμίδωσης της συγκέντρωσης αυτών. Στην περίπτωση που οι απαιτήσεις για λιπαρά οξέα από πλευράς εμβρύου δεν είναι ιδιαιτέρως αυξημένες, ίσως δεν εγκαθίσταται το παραπάνω σύστημα βαθμίδωσης. Τέλος, μόνο για την H- FABP έχει προταθεί και μία σχέση αλληλεπίδρασης με την πλακουντιακή μεμβρανική πρωτεΐνη pFABP-pm ενώ ενδείξεις υπάρχουν και για αλληλεπίδραση με τη διαμεμβρανική πρωτεΐνη FAT/ CD36 [209] οπότε το κυτταροπλασματικό status ίσως τελικά σχετίζεται/ ρυθμίζεται/ επηρεάζεται από περισσότερους παράγοντες που δεν είναι καλά κατανοητοί. Τέλος, η επίδραση εξωγενούς λεπτίνης, όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο της διατριβής, δεν ανέδειξε τυχόν παρουσία της πρωτεΐνης H- FABP. Φαίνεται, λοιπόν, ότι η λεπτίνη, τουλάχιστον στις συνθήκες της μελέτης μας, δεν ασκεί άμεση δράση στην κυτταροπλασματική αυτή πρωτεΐνη.

Για την πρωτεΐνη L-FABP, η ερμηνεία της αδυναμίας ανεύρεσης τόσο πρωτεϊνικών μορίων όσο και μεταγράφων RNA πιθανά σχετίζεται με τους ίδιους λόγους που περιγράφηκαν για την H- FABP. Τα ευρήματα επίσης, πιθανόν να υποδηλώνουν έναν μέχρι τώρα άγνωστο τρόπο ρύθμισης της έκφρασης αυτών των δύο μορίων που οι μέχρι τώρα γνώσεις περιγράφουν ότι έχουν ένα περίπου αλληλοεπικαλυπτόμενο ρόλο [209]. Και στην περίπτωση της L- FABP, η εξωγενώς χορηγούμενη λεπτίνη δεν προκάλεσε την έκφραση είτε σε πρωτεϊνικό επίπεδο ή σε επίπεδο mRNA. Έτσι, διαπιστώνεται ότι η λεπτίνη δεν ασκεί άμεση δράση στην έκφραση και της έτερης κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης.

Διαμεμβρανική πρωτεΐνη FAT/CD36 και ενδοκυττάρια δεξαμενή αυτής

Τα αποτελέσματα μας σχετικά με την πρωτεΐνη FAT/ CD36 πέρα από την επιβεβαίωση των μέχρι τώρα γνωστών έρχονται να προσθέσουν νέες πληροφορίες σχετικά με τη «συμπεριφορά» αυτού του μορίου στον πλακούντα.

Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη FAT κυρίως εκφράζεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα ήδη σε αρκετή ποσότητα από το τέλος του 1^{ου} τριμήνου της κύησης. Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πολλαπλάσια έκφραση του μορίου σε δείγματα που επεξεργάστηκαν άμεσα μετά τη λήψη τους και ήταν πλουσιότερα σε συγκυτιοτροφοβλάστη από ότι όταν καλλιεργήθηκαν και υπολείπονταν σε αυτή. Το συμπέρασμα αυτό είναι συμβατό με το ρόλο του συγκυτίου στην ανταλλαγή ουσιών στη διάρκεια της κύησης. Η πρωτεΐνη FAT/ CD36 είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που θεωρείται ότι λειτουργεί σαν τρανσλοκάση λιπαρών οξέων και έχει σαν τελικό αποτέλεσμα τη διευκόλυνση της μεταφοράς τους προς την εμβρυϊκή πλευρά. Η εντόπισή της κατά κύριο λόγο στο συγκύτιο είναι συμβατή τελεολογικά με την επιτέλεση του ρόλου της μιας και το συγκύτιο αποτελεί την ανατομική θέση όπου επιτυγχάνεται η επικοινωνία του μητρικού με το εμβρυϊκό περιβάλλον.

Επιπρόσθετα, τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά ότι στο κυτταρόπλασμα της συγκυτιοτροφοβλάστης ανευρίσκεται ποσότητα της μεμβρανικής πρωτεΐνης FAT/ CD36. Αντίστοιχο εύρημα είχε μέχρι τώρα διαπιστωθεί μόνο σε μυϊκά κύτταρα [210]. Κατ' αναλογία με το ρόλο της ενδοκυττάριας δεξαμενής FAT/ CD36 στα μυϊκά κύτταρα, μπορούμε να υποθέσουμε ότι και στη συγκυτιοτροφοβλάστη υφίσταται μηχανισμός οξείας μετακίνησης των μορίων FAT/ CD36 προς την κυτταρική μεμβράνη όταν παραστεί ανάγκη. Η ακριβής σημασία και η εξακρίβωση του τρόπου με τον οποίο επιτελείται αυτό το φαινόμενο στον πλακούντα, απομένει να μελετηθεί.

Τέλος, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν για πρώτη φορά την απευθείας επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση του μορίου FAT/ CD36 σε τροφοβλαστικό ιστό. Καλλιεργημένα δείγματα υπό την επίδραση εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης παρουσιάζουν αυξημένη έκφραση της μελετούμενης πρωτεΐνης σε σχέση με τα αντίστοιχα στα οποία δεν είχε επιδράσει η λεπτίνη. Το συμπέρασμα που προκύπτει από τα ανωτέρω ευρήματα έρχεται να προσφέρει νέα δεδομένα σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο η λεπτίνη συμμετέχει στις μεταβολικές διεργασίες που σχετίζονται με τα λιπαρά οξέα και επιτελούνται στον πλακούντα στη διάρκεια της εγκυμοσύνης. Απομένει να διευκρινιστεί αν αυτή η αύξηση της έκφρασης της τρανσλοκάσης λιπαρών οξέων FAT/ CD36 συνοδεύεται από μεταβολή και στη μεταφορά λιπαρών οξέων διαμέσου της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Συγκυτίνες και υποδοχείς αυτών

Στις περισσότερες από τις μέχρι τώρα δημοσιευμένες έρευνες τα αποτελέσματα προέρχονταν είτε από κυτταρικές σειρές ή από τροφοβλαστικό ιστό που καλλιεργούνταν για βραχύ χρονικό διάστημα. Σε αντίθεση, τα δικά μας αποτελέσματα προέρχονται από καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων μεγαλύτερης διάρκειας, μετά από δειγματοληψία του πλακούντα (CVS) κατά το τέλος του 1^{ου} τριμήνου.

Επιπλέον, τα μόρια της συγκυτίνης 1 και 2 δεν έχουν μελετηθεί, μέχρι τώρα, ταυτόχρονα, ενώ δεν υπάρχουν δεδομένα για τη σχετική μεταξύ τους έκφραση και τις μεταβολές αυτής όταν εκτεθούν, *in vitro*, σε παράγοντες που προκαλούν τη διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη.

Διαφορική έκφραση των συγκυτινών σε συγκύτιο και κυτταροτροφοβλάστη

Τα αποτελέσματά μας προσφέρουν, για πρώτη φορά, εκτίμηση της ποσοτικής έκφρασης των συγκυτινών 1 και 2 σε τροφοβλαστικό ιστό αλλά και σύγκριση της μεταξύ τους έκφρασης.

Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματά μας δείχνουν σημαντική πτώση των επιπέδων της συγκυτίνης 1 σε τροφοβλαστικό ιστό μικρής περιεκτικότητας σε συγκυτιοτροφοβλάστη όταν συγκριθεί με ιστό που περιείχε συγκυτιοτροφοβλάστη σε μεγαλύτερη αναλογία. Αυτό το εύρημα, σε συνδυασμό με την εκ νέου αύξηση των επιπέδων της συγκυτίνης 1 όταν σε τροφοβλαστικό ιστό φτωχό σε συγκυτιοτροφοβλάστη επιδράσει φορσκολίνη (ουσία που προάγει τη διαφοροποίηση προς συγκύτιο) μπορούν να μας οδηγήσουν με ασφάλεια στο συμπέρασμα ότι η συγκυτίνη 1 είναι ένα μόριο που εκφράζεται κυρίως στη συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα. Αυτό το αποτέλεσμα έρχεται να επιβεβαιώσει ήδη δημοσιευμένα ευρήματα που με ανοσοϊστοχημικές μεθόδους εντοπίζουν τη συγκυτίνη 1 κυρίως στο συγκυτιοτροφοβλαστικό στοιχείο [169] αλλά και άλλους που υποστηρίζουν ότι η συγκυτίνη 1 εκφράζεται, σε μικρότερο βαθμό, και στην κυτταροτροφοβλάστη [211]. Επιπλέον, τα αποτελέσματά μας συμφωνούν και με δημοσιευμένα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία η προσθήκη φορσκολίνης σε τροφοβλαστικά κύτταρα από τελειόμηνους πλακούντες οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της συγκυτίνης 1 [164].

Σε ότι αφορά στη συγκυτίνη 2, η παρατηρούμενη ελάττωση της έκφρασης της σε ιστό που έχει καλλιεργηθεί και είναι πτωχός σε συγκυτιοτροφοβλάστη σε σχέση με ιστό που περιέχει συγκυτιοτροφοβλάστη σε μεγαλύτερη ποσότητα είναι λιγότερο εξεσημασμένη, αν και, σύμφωνα με τα ευρήματά μας, στατιστικά σημαντική. Ωστόσο, η, σε αντίθεση με τη

συγκυτίνη 1, ελάττωση των επιπέδων της όταν προστεθεί φορσκολίνη ενδεχομένως υποδηλώνει την πιθανότητα ύπαρξης ενός άγνωστου μέχρι τώρα μηχανισμού αλληλορύθμισης των δύο συγκυτινών και ίσως επιφυλάσσει για τη συγκυτίνη 2 ένα νέο ρόλο. Είναι η πρώτη φορά που κάτι τέτοιο σημειώνεται στη βιβλιογραφία όπως και η πρώτη φορά που μελετούνται ταυτόχρονα τα μόρια της συγκυτίνης 1 και 2.

Υποδοχείς συγκυτίνης 1

Οι υποδοχείς μέσω των οποίων ασκείται η δράση της συγκυτίνης 1 ακολουθούν διαφορετικό τρόπο έκφρασης. Τα επίπεδά τους εμφανίζονται αυξημένα σε καλλιέργειες σε σχέση με δείγματα που επεξεργάστηκαν άμεσα και είναι πιο πλούσια σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Είναι η πρώτη φορά που μελετάται η ποσοτική έκφραση αυτών των υποδοχέων σε τροφοβλαστικό ιστό και ως εκ τούτου δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα. Παρόλα αυτά, σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων, έχουν παρατηρηθεί παρόμοια ευρήματα σε άλλη κατηγορία υποδοχέων αμινοξέων [212]. Η ερμηνεία αυτού του φαινομένου είναι δυσχερής και πιθανότατα δεν οφείλεται μόνο στην παρουσία θρεπτικού υλικού πλούσιου σε αμινοξέα. Απαιτούνται περαιτέρω έρευνες προς αυτή την κατεύθυνση.

Σύμφωνα με τα δικά μας ευρήματα, η επίδραση της φορσκολίνης στους υποδοχείς ASCT1 και ASCT2 δεν επέφερε στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφρασή τους. Δημοσιευμένα δεδομένα από άλλους υπάρχουν μόνο για τον υποδοχέα ASCT2 και αυτά προέρχονται από πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκε η κυτταροσειρά BeWo. Σε μία και μοναδική αναφορά, η προσθήκη φορσκολίνης οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του υποδοχέα [200].

Προτεινόμενο μοντέλο ρόλου και αλληλεπίδρασης συγκυτινών

Μετά την ανακάλυψη της ύπαρξης των γονιδίων που κωδικοποιούν τη συγκυτίνη 1, έγινε προσπάθεια να εξακριβωθεί ο ρόλος τους στο μηχανισμό που βρίσκεται πίσω από τον έλεγχο των φαινομένων σύντηξης που συμβαίνουν στον πλακούντα. Οι κυριότερες πτυχές του θεματος που αναζητούν διευκρίνιση είναι ο μηχανισμός ρύθμισης της σύντηξης των κυτταροτροφοβλαστών, ο ρυθμός απόπτωσης των συγκυτιοτροφοβλαστών καθώς και αν οι μηχανισμοί που ρυθμίζουν τα φαινόμενα απόπτωσης- σύντηξης εδράζονται στην κυτταροτροφοβλάστη, στη συγκυτιοτροφοβλάστη ή και στα δύο.

Σε μία εξαιρετική θεωρητική προσέγγιση που έχει δημοσιευθεί, ο Potgens και συν. [173] προτείνουν διάφορα μοντέλα που περιγράφουν την αναπλήρωση της

συγκυτιοτροφοβλάστης από την υποκείμενη δεξαμενή κυτταροτροφοβλαστών. Στο πιο πιθανό από αυτά, προτάσσεται ως κυρίαρχος μηχανισμός ρύθμισης αυτής της διαδικασίας η σχετική ισορροπία μεταξύ της συγκυτίνης 1 και των υποδοχέων της. Υποθετικά, η κατάσταση μη- σύντηξης μεταπίπτει σε κατάσταση σύντηξης όταν είτε το σήμα (η συγκυτίνη 1) ή ο υποδοχέας (κυρίως ο ASCT2 μιας και για τον ASCT1 δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία) βρίσκεται σε πλεόνασμα. Όποιος και αν υπερτερεί από τους δύο παράγοντες, προκαλεί σύντηξη με το έτερο κύτταρο. Έτσι, οι συγγραφείς προτείνουν ένα μηχανισμό παλίνδρομης ρύθμισης μεταξύ της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης χωρίς κάποιο από τα δύο μέρη να διατηρεί τον πρωταρχικό ρόλο σ' αυτή τη διαδικασία. Στην ίδια μελέτη δεν μελετήθηκε καθόλου η πιθανή συμμετοχή της συγκυτίνης 2 στην όλη διαδικασία.

Σύμφωνα με τα δικά μας αποτελέσματα, αποδείχθηκε, για πρώτη φορά, ότι η παρουσία της φορσκολίνης (ουσίας που προάγει το σχηματισμό συγκυτίνων) προκαλεί αντίθετες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της συγκυτίνης 1 και 2 όταν μελετούνται ταυτόχρονα. Αυτό το εύρημα, πιθανά υποδηλώνει ότι υφίσταται ρόλος για τη συγκυτίνη 2 στη ρύθμιση της διαδικασίας συγκυτιοποίησης. Το συμπέρασμα από τα ευρήματά μας είναι ότι η συγκυτίνη 2, ίσως σε συνεργασία με τη συγκυτίνη 1, ενδεχομένως έχει συμμετοχή στη ρύθμιση των φαινομένων σύντηξης. Συμπεραίνεται ότι η συγκυτίνη 2 πιθανά δρα ως ρυθμιστής της όλης διαδικασίας λειτουργώντας σαν τον περιοριστικό παράγοντα (limiting factor) που δίνει το σήμα για τον τερματισμό της διαδικασίας σύντηξης. Η δράση της συγκυτίνης 2 ασκείται μέσω του πρόσφατα ανευρεθέντα υποδοχέα της και δεν φαίνεται πιθανή η απευθείας αλληλεπίδραση της συγκυτίνης 2 με τη συγκυτίνη 1. Δυστυχώς, κατά τη διάρκεια εκπόνησης του πειραματικού μέρους της διατριβής δεν είχε αναγνωριστεί ακόμα ο υποδοχέας για τη συγκυτίνη 2, αναδεικνύοντας ένα τομέα όπου θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα.

Από τα αποτελέσματά μας φαίνεται ότι η προσθήκη φορσκολίνης (ουσίας που επάγει τη σύντηξη των κυττάρων) σε καλλιέργειες κυττάρων προκαλεί αλλαγή της αναλογίας του κυτταρικού πληθυσμού προς το σχηματισμό συγκυτίνων. Η πτώση των επιπέδων συγκυτίνης 2 σ' αυτές τις συνθήκες ίσως θα μπορούσε να λειτουργεί ως τροχοπέδη/ αναστολέας για να αποφευχθεί, *in vivo*, η υπερβολική και μαζική μετατροπή των κυτταροτροφοβλαστών σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Αυτό είναι συμβατό με ορισμένα δημοσιευμένα ευρήματα σύμφωνα με τα οποία η συγκυτίνη 2 εντοπίζεται μόνο στην κυτταροτροφοβλάστη και μάλιστα πλησίον του στρώματος της συγκυτιοτροφοβλάστης [185]. Με άλλα λόγια, η συγκυτίνη 2 ενδεχομένως καθορίζει κατά πόσο το δυναμικό που έχει η συγκυτίνη 1 προς σύντηξη μπορεί να επιτελεσθεί, οδηγώντας στο σχηματισμό συγκυτίου από κυτταροτροφοβλάστες.

Επιπρόσθετα, μέρος του ρόλου της συγκυτίνης 2 να αποτελεί και ο καθορισμός του ρυθμού μετατροπής των κυτταροτροφοβλαστών σε συγκυτιοτροφοβλάστη. Αποτελέσματα δημοσιευμένων ερευνών δείχνουν ότι τα επίπεδα της συγκυτίνης 2 είναι χαμηλότερα κατά το τρίτο τρίμηνο σε σχέση με το πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης, εύρημα το οποίο βρίσκεται σε αντίθεση με την έκφραση της συγκυτίνης 1 της οποίας τα επίπεδα είναι υψηλότερα κατά το τελευταίο τρίμηνο. [172]. Αυτό θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως ένδειξη ότι η πτωτική πορεία των επιπέδων της συγκυτίνης 2, που αποτελεί αντανάκλαση της μείωσης του αριθμού των διαθέσιμων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, λειτουργεί ως δείκτης/αγγελιοφόρος για μεταβολή του ρυθμού σύντηξης. Το σήμα που επάγεται από τη συγκυτίνη 2, αυτόνομα ή σε συντονισμό με άλλους παράγοντες, πιθανά να ευθύνεται για τον περιορισμό της έκτασης της συγκυτιοποίησης και την οριοθέτηση του σχηματισμού συγκυτίων τόσο χρονικά όσο και χωροταξικά.

Επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση των μορίων συγκυτίνης 1, 2 και των υποδοχέων ASCT1, 2

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν για πρώτη φορά την επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση (τουλάχιστον σε επίπεδο mRNA) μορίων που σχετίζονται με διεργασίες για τις οποίες δεν υπήρχε, μέχρι σήμερα, τεκμηρίωση ότι αυτή (η λεπτίνη) ασκεί κάποιο ρόλο.

Η παρατήρηση της στατιστικώς σημαντικής αύξησης των επιπέδων mRNA της συγκυτίνης 1 όταν επιδράσει σε καλλιέργειες εξωγενώς χορηγούμενη λεπτίνη δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία και έτσι δεν μπορεί να γίνει συσχέτιση ή σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους. Δυσχερής, επίσης, είναι η αξιολόγηση αυτού του ευρήματος. Ο λόγος είναι ότι με βάση τα δεδομένα μας δεν μπορεί να διευκρινιστεί αν η επίδραση είναι άμεση ή οφείλεται σε έμμεση δράση της λεπτίνης. Θα μπορούσε για παράδειγμα η λεπτίνη να προκαλεί διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης προς συγκυτιοτροφοβλάστη και έτσι, έμμεσα, να παρατηρείται αύξηση της συγκυτίνης 1. Σε ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας αναφέρεται ότι η λεπτίνη πιθανά εμπλέκεται στη διαδικασία εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο, ένα εύρημα που υποστηρίζεται από την ύπαρξη υποδοχέων της λεπτίνης στο ενδομήτριο [213] και από αποτελέσματα πειραμάτων σε ποντικούς σύμφωνα με τα οποία η χορήγηση πεπτιδίων ανταγωνιστικών της λεπτίνης ή αντισωμάτων κατά των υποδοχέων αυτής, απέτρεψε την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο [214]. Φαίνεται λοιπόν ότι η λεπτίνη συμμετέχει στο διάλογο ενδομητρίου-γονιμοποιημένου ωαρίου με ένα μέχρι σήμερα όχι πλήρως ξεκαθαρισμένο τρόπο. Στα πειράματα με τους ποντικούς φαίνεται ότι η λεπτίνη προκαλεί αύξηση της

έκφρασης μεταλοπρωτεΐναιών. Τα αποτελέσματά μας έρχονται προς επιβεβαίωση των ευρημάτων για το ρόλο της λεπτίνης στις διαδικασίες εμφύτευσης και στον ανθρώπινο πλακούντα και ενδεχομένως προσθέτουν νέα δεδομένα σχετικά με το μηχανισμό δράσης της λεπτίνης (Castracane, Henson. *Leptin*, Chapter 9 p 161, Ed Springer 2006) είναι, δε, σε αρμονία με την αύξηση των επιπέδων συγκυτίνης 1 που παρατηρήθηκε στα πειράματά μας όταν δημιουργήσαμε συνθήκες διαφοροποίησης προς το σχηματισμό συγκυτίου.

Σε ότι αφορά στην επίδραση της λεπτίνης στα επίπεδα mRNA της συγκυτίνης 2, τα συμπεράσματα που προκύπτουν είναι ανάλογα αυτών για τη συγκυτίνη 1. Και στην περίπτωση της συγκυτίνης 2 δεν υπάρχουν γνωστά βιβλιογραφικά δεδομένα. Αν εντάξουμε τα πειραματικά μας αποτελέσματα στα πλαίσια του ρόλου της λεπτίνης στις διαδικασίες εμφύτευσης, τότε βρίσκονται σε συμφωνία με τα συμπεράσματά μας για μείωση των επιπέδων συγκυτίνης 2 όταν ο ιστός διαφοροποιείται προς συγκυτιοτροφοβλάστη.

Τα αποτελέσματά μας για τους υποδοχείς αμινοξέων ASCT1 και ASCT2 δείχνουν μη στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης τους. Το εύρημα είναι σε αρμονία με την απουσία μεταβολών που έχουν στατιστική αξία στα πειράματά μας με την προσθήκη φορσκολίνης και την επαγωγή της διαφοροποίησης προς συγκυτιοτροφοβλάστη. Και στην περίπτωση των υποδοχέων, το θέμα δεν έχει μελετηθεί, μέχρι τώρα, στη βιβλιογραφία και δεν μπορεί να γίνει άμεση σύγκριση με αποτελέσματα άλλων.

Επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης λεπτίνης στην έκφραση των υποδοχέων λεπτίνης

Η επίδραση της εξωγενούς χορηγούμενης λεπτίνης σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών οδήγησε σε χαρακτηριστικές μεταβολές της συγκέντρωσης mRNA της μακράς και βραχείας μορφής του υποδοχέα λεπτίνης.

Η βραχεία μορφή του υποδοχέα (Ob-Ra), που θεωρείται ότι αποτελεί τον υποδοχέα που διευκολύνει τη μεταφορά του πρωτεϊνικού μορίου της λεπτίνης εντός του κυττάρου ενώ, επίσης, σχετίζεται και με τη ρύθμιση της κάθαρσης του μορίου, παρουσίασε αύξηση των επιπέδων της. Επιπλέον, αναφέρεται ότι αυτή η μορφή του υποδοχέα διαθέτει και ικανότητα εσωτερικοποίησης, έστω και σε μικρότερο βαθμό από τη μακρά μορφή του υποδοχέα [93]. Αυτό το εύρημα μπορεί να θεωρηθεί τελεολογικά ως απάντηση του κυττάρου σε ένα περιβάλλον αυξημένης προσφοράς σε λεπτίνη. Η σύνδεση της λεπτίνης με τη βραχεία μορφή του υποδοχέα αυξάνει το χρόνο ζωής του μορίου της λεπτίνης μιας και ελαττώνει την κάθαρση αυτής. Επιπλέον, αυτή η σύνδεση, προφυλάσσει το κύτταρο από

μιας μεγάλης κλίμακας και απότομη έκθεση σε λεπτίνη αφού το ελεύθερο κλάσμα της λεπτίνης δεν αυξάνει στον ίδιο βαθμό με αύξηση της διαθεσιμότητάς της.

Ακριβώς αντίθετη είναι η συμπεριφορά της μακράς μορφής του υποδοχέα της λεπτίνης στις ίδιες συνθήκες. Η μακρά μορφή του υποδοχέα (Ob-Rb) βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και με τη βοήθεια της η λεπτίνη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα. Θεωρείται ότι αποτελεί τη μορφή του υποδοχέα που επάγει τη μεταφορά του σήματος της λεπτίνης [25, 94]. Η ελάττωση των επιπέδων της μακράς μορφής του υποδοχέα πιθανότατα αποτελεί μέρος του μηχανισμού ομοιόστασης του κύτταρου και, ακόμη, εξηγεί (τουλάχιστον εν μέρει) το φαινόμενο της «αντίστασης στη λεπτίνη» που έχει περιγραφεί. Με την είσοδο της λεπτίνης στο κύτταρο, το μόριο της μακράς μορφής του υποδοχέα απομακρύνεται από την κυτταρική μεμβράνη ελαττώνοντας έτσι τις διαθέσιμες θέσεις περαιτέρω εισόδου λεπτίνης. Η παρατηρούμενη από εμάς ελάττωση της μεταγγραφήs του μορίου που κωδικοποιεί τον υποδοχέα υποδεικνύει την ύπαρξη ενός μηχανισμού αρνητικής αλληλεπίδρασης που είναι ανεξάρτητος της απομάκρυνσης του μορίου του υποδοχέα από την κυτταροπλασματική μεμβράνη και λειτουργεί επιπρόσθετα προς την ίδια κατεύθυνση. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η ανάσχεση της εισόδου της λεπτίνης στο κύτταρο και ως εκ τούτου η άμβλυνση των μεταβολικών διεργασιών που επιτελούνται από τη λεπτίνη παρά την αυξημένη διαθεσιμότητά της στον εξωκυττάριο χώρο. Οι ίδιοι μηχανισμοί εξηγούν εν μέρει και το φαινόμενο της αντίστασης στη λεπτίνη. Θεωρείται ότι γι' αυτό ευθύνεται, κατά ένα ποσοστό, η απουσία υποδοχέων του τύπου της μακράς μορφής από τη μεμβράνη, ο ρυθμός ανακύκλωσής της (επανασύνθεση και μετακίνηση ξανά στη κυτταρική μεμβράνη) και όπως φαίνεται από τα δικά μας πειράματα η ελαττωμένη σύνθεση. Αυτή η κατάσταση βρίσκεται σε αναλογία με προχωρημένα στάδια της εγκυμοσύνης όπου η λεπτίνη κυκλοφορεί σε αυξημένα ποσά σε σχέση με προγενέστερες εβδομάδες κύησης. Από τα πειράματά μας δεν μπορεί να διαπιστωθεί αν αυτή η ελάττωση της έκφρασης της μακράς μορφής του υποδοχέα υπό την επίδραση της λεπτίνης διατηρείται αν η λεπτίνη επιδρά για μεγάλο χρονικό διάστημα. Αν όμως αυτό ισχύει αυτό τότε μπορούμε να μιλήσουμε για την ύπαρξη ενός παλίνδρομου αρνητικού μηχανισμού που δρα αποτρεπτικά και προστατεύει το μητρικό οργανισμό από υπερβολικό καταβολισμό των αποθηκών λιπαρών οξέων.

Επίδραση της εξωγενώς χορηγούμενης φορσκολίνης στην έκφραση της λεπτίνης και των υποδοχέων αυτής

Τα αποτελέσματα της προσθήκης φορσκολίνης σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων, αντανakλούν τις μεταβολές που παρατηρούνται σε περιβάλλον διαφοροποίησης των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων προς το σχηματισμό συγκυτίου. Τα ευρήματά μας βοηθούν στην εξαγωγή συμπερασμάτων για το ρόλο της κυτταροτροφοβλάστης και της συγκυτιοτροφοβλάστης σε σχέση με την έκφραση της λεπτίνης τοπικά, καθώς και για τις επιδράσεις αυτής στις διεργασίες που συμμετέχει.

Έτσι, το εύρημα της αύξησης του mRNA της λεπτίνης (Ob) μετά την επίδραση της φορσκολίνης οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η προεξάρχουσα πηγή λεπτίνης είναι η συγκυτιοτροφοβλάστη και όχι η κυτταροτροφοβλάστη. Επιπλέον, η σχέση της συγκέντρωσης σε δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που επεξεργάστηκαν άμεσα (και περιείχαν αυξημένα ποσοστά συγκυτιοτροφοβλάστης) σε σχέση με καλλιέργειες κυττάρων συνηγορεί προς την ίδια κατεύθυνση. Τα φρέσκα δείγματα που μελετήθηκαν ήταν πλουσιότερα σε συγκυτιοτροφοβλάστη σε σχέση με τα καλλιεργημένα και αυτό, προφανώς, αντανakλά και στη διαφορετική παραγωγή λεπτίνης με τα πλούσια σε συγκυτιοτροφοβλάστη δείγματα να παρουσιάζουν πολλαπλάσια παραγωγή λεπτίνης. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε αρμονία με τη γενική παραδοχή που απαντάται στη βιβλιογραφία ότι η λεπτίνη και οι υποδοχείς της απαντώνται κυρίως στη συγκυτιοτροφοβλάστη [8, 87].

Τα ευρήματα σε σχέση με την επίδραση της φορσκολίνης στην έκφραση των υποδοχέων λεπτίνης πιθανότατα εξηγούνται από την επίδραση που έχει η παραγόμενη λεπτίνη σ' αυτούς. Με άλλα λόγια η αύξηση των επιπέδων της βραχείας μορφής του υποδοχέα και η ελάττωση της μακράς μορφής του υποδοχέα μετά από την επίδραση της φορσκολίνης αποτελεί πιθανά δευτεροπαθή απάντηση στην αύξηση της λεπτίνης από την ίδια ουσία.

Προτεινόμενο μοντέλο αλληλεπίδρασης λεπτίνης, υποδοχέων αυτής και πρωτεΐνης FAT/ CD36

Η σύνθεση των συμπερασμάτων που προκύπτουν από τα πειραματικά μας αποτελέσματα μας κάνει να υιοθετούμε το εξής θεωρητικό μοντέλο αλληλεπίδρασης μεταξύ λεπτίνης, υποδοχέων λεπτίνης και πρωτεΐνης FAT/ CD36.

Προτείνουμε ότι η σταδιακή αύξηση των επιπέδων λεπτίνης που παράγεται από τον πλακούντα προέρχεται από την αυξημένη αναλογία της συγκυτιοτροφοβλάστης και την

αύξηση του πλακούντα, δηλαδή φυσιολογικά με την πρόοδο της κύησης. Η άποψη αυτή τεκμηριώνεται και από έρευνες άλλων αν και μπορεί να εμπλέκονται και άλλοι μηχανισμοί στο ίδιο φαινόμενο [215].

Η λεπτίνη μπορεί να επάγει τη σύνθεση της πρωτεΐνης FAT/ CD36 που συμμετέχει στη μεταφορά των λιπαρών οξέων διαμέσου του πλακούντα. Αυτή η διαδικασία επιτελείται και από την λεπτίνη που παράγεται από το μητρικό σώμα και ο ρυθμός της αυξάνεται με την πρόοδο της εγκυμοσύνης. Αυτό, τελεολογικά, εξυπηρετεί τις μεγαλύτερες ανάγκες του αναπτυσσόμενου κυήματος σε λιπαρά οξέα όσο προχωρά η εγκυμοσύνη. Η διαδικασία αυτή επιτελείται στο σημείο ανταλλαγής ουσιών μεταξύ μητέρας και εμβρύου, δηλαδή στη συγγυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα.

Η σχετική συγκέντρωση των υποδοχέων μακράς και βραχείας μορφής της λεπτίνης εξασφαλίζει μια σχετικά ισορροπημένη και αδιάλειπτη παροχή λιπαρών οξέων το έμβρυο προφυλάσσοντας από απότομες αιχμές προσφοράς και διαστήματα έλλειψης. Στη βιβλιογραφία προστίθεται η άποψη ότι η αύξηση των επιπέδων της διαλυτής μορφής του υποδοχέα (Ob-Re, που θεωρείται ότι πέρχεται από μεμβρανικές ισομορφές του υποδοχέα που αποσπώνται από τον πλακούντα και εισέρχονται στην κυκλοφορία) συμμετέχει στο φαινόμενο αυτό [216].

Η ίδια η λεπτίνη συμμετέχει στις διαδικασίες εμφύτευσης και διαφοροποίησης του τροφοβλαστικού ιστού όπως φαίνεται από την επίδρασή της στην έκφραση των συγγυτινών, αναδεικνύοντας μία ακόμη πτυχή των πλειοτροπικών δράσεων αυτής. Στη βιβλιογραφία πιθανολογείται ότι ο ρόλος της λεπτίνης στην εμφύτευση της βλαστοκύστης ασκείται, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω των μεταλλοπρωτεϊνών [217] χωρίς, όμως, να υπάρχει μια σαφής και τεκμηριωμένη άποψη για τον ακριβή μηχανισμό. Το εύρημά μας μπορεί να προσφέρει διευκρινήσεις σε μία, τουλάχιστον, πτυχή της δράσης της λεπτίνης στο αναπαραγωγικό σύστημα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα κυριότερα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη διατριβή είναι τα παρακάτω:

1. Το μοντέλο καλλιέργειας που χρησιμοποιήσαμε αποτελεί έναν αποτελεσματικό και εύκολο τρόπο μελέτης του τροφοβλαστικού ιστού.
2. Η λεπτίνη προκαλεί σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων αύξηση της βραχείας μορφής του υποδοχέα (Ob- Ra) και ελάττωση της μακράς μορφής αυτού (Ob- Rb).
3. Η λεπτίνη έχει απευθείας επίδραση στην έκφραση της πρωτεΐνης FAT/CD36, αυξάνοντας την έκφρασή της.
4. Διαπιστώνεται η ύπαρξη ενδοκυττάριας δεξαμενής FAT/CD36 στη συγκυτιοτροφοβλάστη.
5. Δεν διαπιστώνεται πρωτεϊνική έκφραση κάποιας από τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες (H-FABP, L-FABP) στον τροφοβλαστικό ιστό της μελέτης μας.
6. Επιπλέον, διαπιστώνεται η παρουσία μεταγράφων RNA μόνο για την H- FABP και όχι για την L-FABP.
7. Εξακριβώθηκε η έκφραση μεταγράφων RNA τόσο για τη συγκυτίνη 1 όσο και για τη συγκυτίνη 2 σε τροφοβλαστικό ιστό από κυήσεις τέλους 1^{ου}, αρχές 2^{ου} τριμήνου.
8. Όταν μελετήθηκαν ταυτόχρονα σε συνθήκες επαγωγής της διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης, παρατηρήθηκε αντίστροφη έκφραση των συγκυτινών: αύξηση της συγκυτίνης 1 και ελάττωση της συγκυτίνης 2.
9. Η λεπτίνη προκαλεί σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων αύξηση της έκφρασης της συγκυτίνης 1 και ελάττωση της έκφρασης της συγκυτίνης 2.

1. Ingalls, A.M., M.M. Dickie, and G.D. Snell, *Obese, a new mutation in the house mouse*. J Hered, 1950. **41**(12): p. 317-8.
2. Coleman, D.L., *Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice*. Diabetologia, 1978. **14**(3): p. 141-8.
3. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
4. Prolo, P., M.L. Wong, and J. Licinio, *Leptin*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(12): p. 1285-90.
5. Masuzaki, H., et al., *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med, 1997. **3**(9): p. 1029-33.
6. Yura, S., et al., *Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(10): p. 3609-14.
7. Senaris, R., et al., *Synthesis of leptin in human placenta*. Endocrinology, 1997. **138**(10): p. 4501-4.
8. Lea, R.G., et al., *Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth-retarded pregnancies*. Mol Hum Reprod, 2000. **6**(8): p. 763-9.
9. Zhang, F., et al., *Crystal structure of the obese protein leptin-E100*. Nature, 1997. **387**(6629): p. 206-9.
10. Zhang, F., et al., *Leptin: structure, function and biology*. Vitam Horm, 2005. **71**: p. 345-72.
11. Fruhbeck, G., M. Garcia-Granero, and J.A. Martinez, *Age-related differences in the thermogenic and ponderal effects following the administration of fragment peptides from the rat ob protein*. Regul Pept, 1998. **73**(2): p. 83-7.
12. Grasso, P., et al., *In vivo effects of leptin-related synthetic peptides on body weight and food intake in female ob/ob mice: localization of leptin activity to domains between amino acid residues 106-140*. Endocrinology, 1997. **138**(4): p. 1413-8.
13. Considine, R.V., *Weight regulation, leptin and growth hormone*. Horm Res, 1997. **48 Suppl 5**: p. 116-21.
14. Blum, W.F., et al., *Human and clinical perspectives on leptin*. Proc Nutr Soc, 1998. **57**(3): p. 477-85.
15. Hamilton, B.S., et al., *Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans*. Nat Med, 1995. **1**(9): p. 953-6.
16. Lonnqvist, F., et al., *Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression*. J Clin Invest, 1997. **99**(10): p. 2398-404.
17. Blum, W.F., *Leptin: the voice of the adipose tissue*. Horm Res, 1997. **48 Suppl 4**: p. 2-8.
18. Garcia-Mayor, R.V., et al., *Serum leptin levels in normal children: relationship to age, gender, body mass index, pituitary-gonadal hormones, and pubertal stage*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 2849-55.
19. Elbers, J.M., et al., *Reversal of the sex difference in serum leptin levels upon cross-sex hormone administration in transsexuals*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(10): p. 3267-70.
20. Casabiell, X., et al., *Gender differences in both spontaneous and stimulated leptin secretion by human omental adipose tissue in vitro: dexamethasone and estradiol stimulate leptin release in women, but not in men*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(6): p. 2149-55.
21. Pineiro, V., et al., *Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone sulphate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro: lack of effect of testosterone*. J Endocrinol, 1999. **160**(3): p. 425-32.
22. Kolaczynski, J.W., et al., *Acute and chronic effects of insulin on leptin production in humans: Studies in vivo and in vitro*. Diabetes, 1996. **45**(5): p. 699-701.
23. Boden, G., et al., *Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(9): p. 3419-23.
24. Coxa, R., et al., *Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast*. Biol Reprod, 2001. **65**(3): p. 814-9.

25. Considine, R.V. and J.F. Caro, *Leptin and the regulation of body weight*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. **29**(11): p. 1255-72.
26. Boden, G., et al., *Effects of prolonged hyperinsulinemia on serum leptin in normal human subjects*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 1107-13.
27. Donahoo, W.T., et al., *Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4139-43.
28. Pinkney, J.H., S.W. Coppack, and V. Mohamed-Ali, *Effect of isoprenaline on plasma leptin and lipolysis in humans*. Clin Endocrinol (Oxf), 1998. **48**(4): p. 407-11.
29. Haynes, W.G., et al., *Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin*. J Clin Invest, 1997. **100**(2): p. 270-8.
30. Stumvoll, M., et al., *Leptin levels in humans are acutely suppressed by isoproterenol despite acipimox-induced inhibition of lipolysis, but not by free fatty acids*. Metabolism, 2000. **49**(3): p. 335-9.
31. Williams, L.B., et al., *Leptin production in adipocytes from morbidly obese subjects: stimulation by dexamethasone, inhibition with troglitazone, and influence of gender*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2678-84.
32. Fried, S.K., et al., *Regulation of leptin production in humans*. J Nutr, 2000. **130**(12): p. 3127S-3131S.
33. Purnell, J.Q. and M.H. Samuels, *Levels of leptin during hydrocortisone infusions that mimic normal and reversed diurnal cortisol levels in subjects with adrenal insufficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(9): p. 3125-8.
34. Yamaguchi, M., et al., *Autocrine inhibition of leptin production by tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) through TNF-alpha type-I receptor in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **244**(1): p. 30-4.
35. Finck, B.N. and R.W. Johnson, *Tumor necrosis factor (TNF)-alpha induces leptin production through the p55 TNF receptor*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2000. **278**(2): p. R537-43.
36. Fawcett, R.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits leptin production in subcutaneous and omental adipocytes from morbidly obese humans*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(2): p. 530-5.
37. Medina, E.A., et al., *Effects of tumor necrosis factor alpha on leptin secretion and gene expression: relationship to changes of glucose metabolism in isolated rat adipocytes*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1999. **23**(8): p. 896-903.
38. Coxa, R., et al., *Progesterone and human placental lactogen inhibit leptin secretion on cultured trophoblast cells from human placentas at term*. Gynecol Endocrinol, 2005. **21**(1): p. 27-32.
39. Houseknecht, K.L., et al., *Evidence for leptin binding to proteins in serum of rodents and humans: modulation with obesity*. Diabetes, 1996. **45**(11): p. 1638-43.
40. Sinha, M.K., et al., *Evidence of free and bound leptin in human circulation. Studies in lean and obese subjects and during short-term fasting*. J Clin Invest, 1996. **98**(6): p. 1277-82.
41. Bray, G.A. and D.A. York, *Clinical review 90: Leptin and clinical medicine: a new piece in the puzzle of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(9): p. 2771-6.
42. Chehab, F.F., M.E. Lim, and R. Lu, *Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin*. Nat Genet, 1996. **12**(3): p. 318-20.
43. Mounzih, K., R. Lu, and F.F. Chehab, *Leptin treatment rescues the sterility of genetically obese ob/ob males*. Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 1190-3.
44. Chehab, F.F., et al., *Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin*. Science, 1997. **275**(5296): p. 88-90.
45. Mantzoros, C.S., J.S. Flier, and A.D. Rogol, *A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(4): p. 1066-70.
46. Frisch, R.E. and J.W. McArthur, *Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset*. Science, 1974. **185**(4155): p. 949-51.
47. Cheung, C.C., et al., *Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat*. Endocrinology, 1997. **138**(2): p. 855-8.

48. Yu, W.H., et al., *Role of leptin in hypothalamic-pituitary function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 1023-8.
49. Hardie, L., et al., *Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy*. Clin Endocrinol (Oxf), 1997. **47**(1): p. 101-6.
50. Shimizu, H., et al., *Estrogen increases in vivo leptin production in rats and human subjects*. J Endocrinol, 1997. **154**(2): p. 285-92.
51. Rosenbaum, M., et al., *Effects of gender, body composition, and menopause on plasma concentrations of leptin*. J Clin Endocrinol Metab, 1996. **81**(9): p. 3424-7.
52. Saad, M.F., et al., *Sexual dimorphism in plasma leptin concentration*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 579-84.
53. Fruhbeck, G., M. Aguado, and J.A. Martinez, *In vitro lipolytic effect of leptin on mouse adipocytes: evidence for a possible autocrine/paracrine role of leptin*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **240**(3): p. 590-4.
54. Prentice, A.M., et al., *Adaptive strategies regulating energy balance in human pregnancy*. Hum Reprod Update, 1995. **1**(2): p. 149-61.
55. Schubring, C., et al., *Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1480-3.
56. Matsuda, J., et al., *Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(5): p. 1642-4.
57. Hoggard, N., et al., *Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 11073-8.
58. Cauzac, M., et al., *Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation*. Placenta, 2003. **24**(4): p. 378-84.
59. Chardonens, D., et al., *Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1alpha and 17beta-oestradiol and its effect on HCG secretion*. Mol Hum Reprod, 1999. **5**(11): p. 1077-82.
60. Bouloumie, A., et al., *Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis*. Circ Res, 1998. **83**(10): p. 1059-66.
61. Bouloumie, A., et al., *Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells*. Faseb J, 1999. **13**(10): p. 1231-8.
62. Tsuchiya, T., et al., *Expression of leptin receptor in lung: leptin as a growth factor*. Eur J Pharmacol, 1999. **365**(2-3): p. 273-9.
63. Kieffer, T.J., et al., *Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells*. Diabetes, 1997. **46**(6): p. 1087-93.
64. Montague, C.T., et al., *Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans*. Nature, 1997. **387**(6636): p. 903-8.
65. Harigaya, A., et al., *Relationship between concentration of serum leptin and fetal growth*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(10): p. 3281-4.
66. Tartaglia, L.A., et al., *Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R*. Cell, 1995. **83**(7): p. 1263-71.
67. Lee, G.H., et al., *Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice*. Nature, 1996. **379**(6566): p. 632-5.
68. White, D.W. and L.A. Tartaglia, *Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(4): p. 303-9.
69. Kellerer, M., et al., *Leptin activates PI-3 kinase in C2C12 myotubes via janus kinase-2 (JAK-2) and insulin receptor substrate-2 (IRS-2) dependent pathways*. Diabetologia, 1997. **40**(11): p. 1358-62.
70. Murakami, T., et al., *A short form of leptin receptor performs signal transduction*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **231**(1): p. 26-9.
71. Bjorbaek, C., et al., *Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels*. Endocrinology, 1998. **139**(8): p. 3485-91.
72. Baumann, H., et al., *The full-length leptin receptor has signaling capabilities of interleukin 6-type cytokine receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8374-8.
73. Emilsson, V., et al., *Expression of the functional leptin receptor mRNA in pancreatic islets and direct inhibitory action of leptin on insulin secretion*. Diabetes, 1997. **46**(2): p. 313-6.

74. Hoggard, N., et al., *Localization of leptin receptor mRNA splice variants in murine peripheral tissues by RT-PCR and in situ hybridization*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **232**(2): p. 383-7.
75. Kielar, D., et al., *Leptin receptor isoforms expressed in human adipose tissue*. Metabolism, 1998. **47**(7): p. 844-7.
76. Lollmann, B., et al., *Detection and quantification of the leptin receptor splice variants Ob-Ra, b, and, e in different mouse tissues*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 648-52.
77. Lord, G.M., et al., *Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression*. Nature, 1998. **394**(6696): p. 897-901.
78. Sweeney, G., *Leptin signalling*. Cell Signal, 2002. **14**(8): p. 655-63.
79. Banks, W.A., et al., *Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin*. Peptides, 1996. **17**(2): p. 305-11.
80. Hileman, S.M., et al., *Transcellular transport of leptin by the short leptin receptor isoform ObRa in Madin-Darby Canine Kidney cells*. Endocrinology, 2000. **141**(6): p. 1955-61.
81. Lammert, A., et al., *Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(4): p. 982-8.
82. Laimer, M., et al., *Weight loss increases soluble leptin receptor levels and the soluble receptor bound fraction of leptin*. Obes Res, 2002. **10**(7): p. 597-601.
83. Zastrow, O., et al., *The soluble leptin receptor is crucial for leptin action: evidence from clinical and experimental data*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003. **27**(12): p. 1472-8.
84. van Dielen, F.M., et al., *Leptin and soluble leptin receptor levels in obese and weight-losing individuals*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(4): p. 1708-16.
85. Tartaglia, L.A., *The leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(10): p. 6093-6.
86. Ashworth, C.J., et al., *Placental leptin*. Rev Reprod, 2000. **5**(1): p. 18-24.
87. Bodner, J., et al., *Leptin receptor in human term placenta: in situ hybridization and immunohistochemical localization*. Placenta, 1999. **20**(8): p. 677-82.
88. Ebenbichler, C.F., et al., *Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncytial, microvillous and basal membranes from human term placenta*. Placenta, 2002. **23**(6): p. 516-21.
89. Sandowski, Y., et al., *Subcloning, expression, purification, and characterization of recombinant human leptin-binding domain*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46304-9.
90. Couturier, C. and R. Jockers, *Activation of the leptin receptor by a ligand-induced conformational change of constitutive receptor dimers*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26604-11.
91. Mistrik, P., F. Moreau, and J.M. Allen, *BiaCore analysis of leptin-leptin receptor interaction: evidence for 1:1 stoichiometry*. Anal Biochem, 2004. **327**(2): p. 271-7.
92. Lundin, A., et al., *Expression and intracellular localization of leptin receptor long isoform-GFP chimera*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1499**(1-2): p. 130-138.
93. Uotani, S., et al., *Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation*. Diabetes, 1999. **48**(2): p. 279-86.
94. Prolo, P., M.L. Wong, and J. Licinio, *Molecul in focus: Leptin*. Int J Biochem Cell Biol, 1998. **30**(12): p. 1285-90.
95. Bjorbaek, C., et al., *Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(51): p. 32686-95.
96. Matsuoka, T., et al., *Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(3): p. 480-4.
97. Banks, A.S., et al., *Activation of downstream signals by the long form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(19): p. 14563-72.
98. Kristensen, P., et al., *Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin*. Nature, 1998. **393**(6680): p. 72-6.
99. Lothgren, A., et al., *A model of activation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 by the human leptin receptor*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1545**(1-2): p. 20-9.
100. Carpenter, L.R., et al., *Enhancing leptin response by preventing SH2-containing phosphatase 2 interaction with Ob receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6061-6.
101. Krebs, D.L. and D.J. Hilton, *SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 16): p. 2813-9.

102. Bjorbaek, C., et al., *Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance*. Mol Cell, 1998. **1**(4): p. 619-25.
103. Bjorbaek, C., et al., *The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance*. J Biol Chem, 1999. **274**(42): p. 30059-65.
104. Kim, Y.B., et al., *In vivo administration of leptin activates signal transduction directly in insulin-sensitive tissues: overlapping but distinct pathways from insulin*. Endocrinology, 2000. **141**(7): p. 2328-39.
105. Berti, L. and S. Gammeltoft, *Leptin stimulates glucose uptake in C2C12 muscle cells by activation of ERK2*. Mol Cell Endocrinol, 1999. **157**(1-2): p. 121-30.
106. Bjorbaek, C., et al., *Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 4747-55.
107. van den Brink, G.R., et al., *Leptin signaling in human peripheral blood mononuclear cells, activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein (MAP) kinase and p70 S6 kinase*. Mol Cell Biol Res Commun, 2000. **4**(3): p. 144-50.
108. Sweeney, G., et al., *High leptin levels acutely inhibit insulin-stimulated glucose uptake without affecting glucose transporter 4 translocation in I6 rat skeletal muscle cells*. Endocrinology, 2001. **142**(11): p. 4806-12.
109. Myers, M.G., Jr., *Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology*. Recent Prog Horm Res, 2004. **59**: p. 287-304.
110. Minokoshi, Y., et al., *Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase*. Nature, 2002. **415**(6869): p. 339-43.
111. Tanabe, K., et al., *Leptin induces proliferation of pancreatic beta cell line MIN6 through activation of mitogen-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **241**(3): p. 765-8.
112. Hardwick, J.C., et al., *Leptin is a growth factor for colonic epithelial cells*. Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 79-90.
113. Innis, S.M., *Essential fatty acids in growth and development*. Prog Lipid Res, 1991. **30**(1): p. 39-103.
114. Giusto, N.M., et al., *Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments*. Prog Lipid Res, 2000. **39**(4): p. 315-91.
115. Niu, S.L., et al., *Reduced G protein-coupled signaling efficiency in retinal rod outer segments in response to n-3 fatty acid deficiency*. J Biol Chem, 2004. **279**(30): p. 31098-104.
116. Van Duyne, C.M. and R.J. Havel, *Plasma unesterified fatty acid concentration in fetal and neonatal life*. Proc Soc Exp Biol Med, 1959. **102**: p. 599-602.
117. Farquharson, J., et al., *Effect of diet on infant subcutaneous tissue triglyceride fatty acids*. Arch Dis Child, 1993. **69**(5): p. 589-93.
118. Haggarty, P., *Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy*. Eur J Clin Nutr, 2004. **58**(12): p. 1559-70.
119. Kamp, F., et al., *Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast*. Biochemistry, 1995. **34**(37): p. 11928-37.
120. Glatz, J.F. and G.J. van der Vusse, *Cellular fatty acid-binding proteins: their function and physiological significance*. Prog Lipid Res, 1996. **35**(3): p. 243-82.
121. Glatz, J.F., et al., *Role of membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in cellular fatty acid metabolism*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **57**(4-5): p. 373-8.
122. Veerkamp, J.H., et al., *Structural and functional studies on different human FABP types*. Mol Cell Biochem, 1999. **192**(1-2): p. 137-42.
123. Veerkamp, J.H., H.T. Van Moerkerk And, and A.W. Zimmerman, *Effect of fatty acid-binding proteins on intermembrane fatty acid transport studies on different types and mutant proteins*. Eur J Biochem, 2000. **267**(19): p. 5959-66.
124. Schnitzer, J.E., et al., *Preferential interaction of albumin-binding proteins, gp30 and gp18, with conformationally modified albumins. Presence in many cells and tissues with a possible role in catabolism*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24544-53.
125. Tiruppathi, C., A. Finnegan, and A.B. Malik, *Isolation and characterization of a cell surface albumin-binding protein from vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 250-4.
126. Knudsen, J., et al., *The function of acyl-CoA-binding protein (ACBP)/diazepam binding inhibitor (DBI)*. Mol Cell Biochem, 1993. **123**(1-2): p. 129-38.

127. Stremmel, W., et al., *Isolation and partial characterization of a fatty acid binding protein in rat liver plasma membranes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(1): p. 4-8.
128. Abumrad, N.A., et al., *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 17665-8.
129. Van Nieuwenhoven, F.A., et al., *Putative membrane fatty acid translocase and cytoplasmic fatty acid-binding protein are co-expressed in rat heart and skeletal muscles*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **207**(2): p. 747-52.
130. Schaffer, J.E. and H.F. Lodish, *Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein*. Cell, 1994. **79**(3): p. 427-36.
131. Trigatti, B.L., D. Mangroo, and G.E. Gerber, *Photoaffinity labeling and fatty acid permeation in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 1991. **266**(33): p. 22621-5.
132. Fujii, S., H. Kawaguchi, and H. Yasuda, *Purification of high affinity fatty acid receptors in rat myocardial sarcolemmal membranes*. Lipids, 1987. **22**(7): p. 544-6.
133. Banaszak, L., et al., *Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins*. Adv Protein Chem, 1994. **45**: p. 89-151.
134. Sacchettini, J.C., et al., *Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium*. J Biol Chem, 1990. **265**(31): p. 19199-207.
135. Amri, E.Z., et al., *Regulation of adipose cell differentiation. I. Fatty acids are inducers of the aP2 gene expression*. J Lipid Res, 1991. **32**(9): p. 1449-56.
136. Van Bilsen, M., J.E. de Vries, and G.J. Van der Vusse, *Long-term effects of fatty acids on cell viability and gene expression of neonatal cardiac myocytes*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **57**(1): p. 39-45.
137. Waggoner, D.W. and D.A. Bernlohr, *In situ labeling of the adipocyte lipid binding protein with 3-[125I]iodo-4-azido-N-hexadecylsalicylamide. Evidence for a role of fatty acid binding proteins in lipid uptake*. J Biol Chem, 1990. **265**(20): p. 11417-20.
138. Sorof, S., *Modulation of mitogenesis by liver fatty acid binding protein*. Cancer Metastasis Rev, 1994. **13**(3-4): p. 317-36.
139. Burton, P.B., et al., *Heart fatty acid binding protein is a novel regulator of cardiac myocyte hypertrophy*. Biochem Biophys Res Commun, 1994. **205**(3): p. 1822-8.
140. Glatz, J.F., et al., *Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding proteins*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1995. **52**(2-3): p. 121-7.
141. Glatz, J.F., M.M. Vork, and G.J. van der Vusse, *Significance of cytoplasmic fatty acid-binding protein for the ischemic heart*. Mol Cell Biochem, 1993. **123**(1-2): p. 167-73.
142. Spitsberg, V.L., E. Matitashvili, and R.C. Gorewit, *Association and coexpression of fatty-acid-binding protein and glycoprotein CD36 in the bovine mammary gland*. Eur J Biochem, 1995. **230**(3): p. 872-8.
143. Campbell, F.M., et al., *Detection and cellular localization of plasma membrane-associated and cytoplasmic fatty acid-binding proteins in human placenta*. Placenta, 1998. **19**(5-6): p. 409-15.
144. Lafond, J., et al., *Implication of ATP and sodium in arachidonic acid incorporation by placental syncytiotrophoblast brush border and basal plasma membranes in the human*. Placenta, 2000. **21**(7): p. 661-9.
145. Lafond, J., et al., *Linoleic acid transport by human placental syncytiotrophoblast membranes*. Eur J Biochem, 1994. **226**(2): p. 707-13.
146. Hendrickse, W., J.P. Stammers, and D. Hull, *The transfer of free fatty acids across the human placenta*. Br J Obstet Gynaecol, 1985. **92**(9): p. 945-52.
147. Glatz, J.F., et al., *Molecular mechanism of cellular uptake and intracellular translocation of fatty acids*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **57**(1): p. 3-9.
148. Veerkamp, J.H., *Fatty acid transport and fatty acid-binding proteins*. Proc Nutr Soc, 1995. **54**(1): p. 23-37.
149. Haggarty, P., *Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth--a review*. Placenta, 2002. **23 Suppl A**: p. S28-38.
150. Hoggard, N., et al., *Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex vivo perfused human term placenta*. Placenta, 2001. **22**(4): p. 347-52.
151. Innis, S.M., *Essential fatty acid transfer and fetal development*. Placenta, 2005. **26 Suppl A**: p. S70-5.
152. Otto, S.J., et al., *Maternal and neonatal essential fatty acid status in phospholipids: an international comparative study*. Eur J Clin Nutr, 1997. **51**(4): p. 232-42.

153. Lakin, V., et al., *Dietary intake and tissue concentration of fatty acids in omnivore, vegetarian and diabetic pregnancy*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1998. **59**(3): p. 209-20.
154. Benassayag, C., et al., *High polyunsaturated fatty acid, thromboxane A₂, and alpha-fetoprotein concentrations at the human feto-maternal interface*. J Lipid Res, 1997. **38**(2): p. 276-86.
155. Christensen, M.S., et al., *Intestinal absorption and lymphatic transport of eicosapentaenoic (EPA), docosahexaenoic (DHA), and decanoic acids: dependence on intramolecular triacylglycerol structure*. Am J Clin Nutr, 1995. **61**(1): p. 56-61.
156. Mortimer, B.C., et al., *Effects of triacylglycerol-saturated acyl chains on the clearance of chylomicron-like emulsions from the plasma of the rat*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1211**(2): p. 171-80.
157. Cho, H.P., M. Nakamura, and S.D. Clarke, *Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase*. J Biol Chem, 1999. **274**(52): p. 37335-9.
158. Haggarty, P., et al., *Long-chain polyunsaturated fatty acid transport across the perfused human placenta*. Placenta, 1997. **18**(8): p. 635-42.
159. Chambaz, J., et al., *Essential fatty acids interconversion in the human fetal liver*. Biol Neonate, 1985. **47**(3): p. 136-40.
160. Haggarty, P., et al., *Effect of maternal polyunsaturated fatty acid concentration on transport by the human placenta*. Biol Neonate, 1999. **75**(6): p. 350-9.
161. Kuhn, D.C. and M. Crawford, *Placental essential fatty acid transport and prostaglandin synthesis*. Prog Lipid Res, 1986. **25**(1-4): p. 345-53.
162. Mi, S., et al., *Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis*. Nature, 2000. **403**(6771): p. 785-9.
163. Blond, J.L., et al., *An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor*. J Virol, 2000. **74**(7): p. 3321-9.
164. Frendo, J.L., et al., *Direct involvement of HERV-W Env glycoprotein in human trophoblast cell fusion and differentiation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(10): p. 3566-74.
165. Chang, C., et al., *Functional characterization of the placental fusogenic membrane protein syncytin*. Biol Reprod, 2004. **71**(6): p. 1956-62.
166. Cheynet, V., G. Oriol, and F. Mallet, *Identification of the hASCT2-binding domain of the Env ERVWE1/syncytin-1 fusogenic glycoprotein*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 41.
167. Ponferrada, V.G., B.S. Mauck, and D.P. Wooley, *The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus*. Arch Virol, 2003. **148**(4): p. 659-75.
168. Antony, J.M., et al., *Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination*. Nat Neurosci, 2004. **7**(10): p. 1088-95.
169. Lee, X., et al., *Downregulation of placental syncytin expression and abnormal protein localization in pre-eclampsia*. Placenta, 2001. **22**(10): p. 808-12.
170. Muir, A., A.M. Lever, and A. Moffett, *Human endogenous retrovirus-W envelope (syncytin) is expressed in both villous and extravillous trophoblast populations*. J Gen Virol, 2006. **87**(Pt 7): p. 2067-71.
171. Smallwood, A., et al., *Temporal regulation of the expression of syncytin (HERV-W), maternally imprinted PEG10, and SGCE in human placenta*. Biol Reprod, 2003. **69**(1): p. 286-93.
172. Okahara, G., et al., *Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs*. Genomics, 2004. **84**(6): p. 982-90.
173. Potgens, A.J., et al., *Syncytin: the major regulator of trophoblast fusion? Recent developments and hypotheses on its action*. Hum Reprod Update, 2004. **10**(6): p. 487-96.
174. Yu, C., et al., *GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 50062-8.
175. Lee, W.J., H.J. Kwun, and K.L. Jang, *Analysis of transcriptional regulatory sequences in the human endogenous retrovirus W long terminal repeat*. J Gen Virol, 2003. **84**(Pt 8): p. 2229-35.
176. Blond, J.L., et al., *Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new human endogenous retrovirus family*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1175-85.
177. Lyden, T.W., A.K. Ng, and N.S. Rote, *Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWo cells during forskolin treatment*. Placenta, 1993. **14**(2): p. 177-86.

178. Adler, R.R., A.K. Ng, and N.S. Rote, *Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR*. Biol Reprod, 1995. **53**(4): p. 905-10.
179. Borges, M., et al., *A two-colour fluorescence assay for the measurement of syncytial fusion between trophoblast-derived cell lines*. Placenta, 2003. **24**(10): p. 959-64.
180. Knerr, I., et al., *Transcriptional effects of hypoxia on fusogenic syncytin and its receptor ASCT2 in human cytotrophoblast BeWo cells and in ex vivo perfused placental cotyledons*. Am J Obstet Gynecol, 2003. **189**(2): p. 583-8.
181. Kudo, Y., et al., *Hypoxia alters expression and function of syncytin and its receptor during trophoblast cell fusion of human placental BeWo cells: implications for impaired trophoblast syncytialisation in pre-eclampsia*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1638**(1): p. 63-71.
182. Blaise, S., et al., *Genomewide screening for fusogenic human endogenous retrovirus envelopes identifies syncytin 2, a gene conserved on primate evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 13013-8.
183. Esnault, C., et al., *A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(45): p. 17532-7.
184. Renard, M., et al., *Crystal structure of a pivotal domain of human syncytin-2, a 40 million years old endogenous retrovirus fusogenic envelope gene captured by primates*. J Mol Biol, 2005. **352**(5): p. 1029-34.
185. Malassine, A., et al., *Expression of the fusogenic HERV-FRD Env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells*. Placenta, 2007. **28**(2-3): p. 185-91.
186. Mangeney, M., et al., *Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20534-9.
187. Kudo, Y. and C.A. Boyd, *Human placental amino acid transporter genes: expression and function*. Reproduction, 2002. **124**(5): p. 593-600.
188. Cariappa, R., E. Heath-Monnig, and C.H. Smith, *Isoforms of amino acid transporters in placental syncytiotrophoblast: plasma membrane localization and potential role in maternal/fetal transport*. Placenta, 2003. **24**(7): p. 713-26.
189. Marin, M., et al., *Sodium-dependent neutral amino acid transporter type 1 is an auxiliary receptor for baboon endogenous retrovirus*. J Virol, 2000. **74**(17): p. 8085-93.
190. Lavillette, D., et al., *The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus type W uses a divergent family of amino acid transporters/cell surface receptors*. J Virol, 2002. **76**(13): p. 6442-52.
191. Arriza, J.L., et al., *Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15329-32.
192. Hoeltzli, S.D. and C.H. Smith, *Alanine transport systems in isolated basal plasma membrane of human placenta*. Am J Physiol, 1989. **256**(3 Pt 1): p. C630-7.
193. Nelson, D.M., et al., *Hypoxia reduces expression and function of system A amino acid transporters in cultured term human trophoblasts*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C310-5.
194. Furesz, T.C., C.H. Smith, and A.J. Moe, *ASC system activity is altered by development of cell polarity in trophoblast from human placenta*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 1): p. C212-7.
195. Tailor, C.S., et al., *A sodium-dependent neutral-amino-acid transporter mediates infections of feline and baboon endogenous retroviruses and simian type D retroviruses*. J Virol, 1999. **73**(5): p. 4470-4.
196. Utsunomiya-Tate, N., H. Endou, and Y. Kanai, *Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14883-90.
197. Kekuda, R., et al., *Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line*. J Biol Chem, 1996. **271**(31): p. 18657-61.
198. Marin, M., et al., *N-linked glycosylation and sequence changes in a critical negative control region of the ASCT1 and ASCT2 neutral amino acid transporters determine their retroviral receptor functions*. J Virol, 2003. **77**(5): p. 2936-45.
199. Rasko, J.E., et al., *The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2129-34.

200. Kudo, Y. and C.A. Boyd, *Changes in expression and function of syncytin and its receptor, amino acid transport system B(0) (ASCT2), in human placental choriocarcinoma BeWo cells during syncytialization*. Placenta, 2002. **23**(7): p. 536-41.
201. Moe, N., *Mitotic activity in the syncytiotrophoblast of the human chorionic villi*. Am J Obstet Gynecol, 1971. **110**(3): p. 431.
202. Huppertz, B., et al., *Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta*. Histochem Cell Biol, 1998. **110**(5): p. 495-508.
203. Yasuda, M., et al., *Apoptotic cells in the human endometrium and placental villi: pitfalls in applying the TUNEL method*. Arch Histol Cytol, 1995. **58**(2): p. 185-90.
204. Huppertz, B., et al., *Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro*. Lab Invest, 1999. **79**(12): p. 1687-702.
205. Guilbert, L.J., et al., *Preparation and functional characterization of villous cytotrophoblasts free of syncytial fragments*. Placenta, 2002. **23**(2-3): p. 175-83.
206. James, J.L., P.R. Stone, and L.W. Chamley, *The isolation and characterization of a population of extravillous trophoblast progenitors from first trimester human placenta*. Hum Reprod, 2007. **22**(8): p. 2111-9.
207. Das, T., G. Sa, and M. Mukherjee, *Characterization of cardiac fatty-acid-binding protein from human placenta. Comparison with placenta hepatic types*. Eur J Biochem, 1993. **211**(3): p. 725-30.
208. Magnusson, A.L., et al., *Triglyceride hydrolase activities and expression of fatty acid binding proteins in the human placenta in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction and diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(9): p. 4607-14.
209. Dutta-Roy, A.K., *Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(10): p. 1360-72.
210. Glatz, J.F., A. Bonen, and J.J. Luiken, *Exercise and insulin increase muscle fatty acid uptake by recruiting putative fatty acid transporters to the sarcolemma*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002. **5**(4): p. 365-70.
211. Malassine, A., et al., *Expression of HERV-W Env glycoprotein (syncytin) in the extravillous trophoblast of first trimester human placenta*. Placenta, 2005. **26**(7): p. 556-62.
212. Kudo, Y. and C.A. Boyd, *Heterodimeric amino acid transporters: expression of heavy but not light chains of CD98 correlates with induction of amino acid transport systems in human placental trophoblast*. J Physiol, 2000. **523 Pt 1**: p. 13-8.
213. Cervero, A., et al., *Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function*. Reprod Biomed Online, 2005. **10**(2): p. 217-23.
214. Ramos, M.P., et al., *Leptin serves as an upstream activator of an obligatory signaling cascade in the embryo-implantation process*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 694-701.
215. Hoggard, N., et al., *Leptin expression in placental and fetal tissues: does leptin have a functional role?* Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 57-63.
216. Gavrilova, O., et al., *Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30546-51.
217. Sagawa, N., et al., *Possible role of placental leptin in pregnancy: a review*. Endocrine, 2002. **19**(1): p. 65-71.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ- ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Μέρος των πειραματικών αποτελεσμάτων που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής ανακοινώθηκαν στο 21^ο Πανερωπαϊκό Συνέδριο Μαιευτικής- Γυναικολογίας (EBCOG, Αμβέρσα, 2010).

1. *Leptin effects on surface fatty acids translocase (FAT)/ CD36 protein expression in human placenta cells cultures.* Mousiolis, A.; Kollia, P.; Skentou, C; Messinis, IE.
2. *Syncytin 1 and 2 study of expression in trophoblast cells cultures: Differentiation towards syncytiotrophoblast causes reverse changes upon their expression.* Mousiolis, A.; Kollia, P.; Skentou, C; Messinis, IE.

Επίσης, μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής πραγματοποιήθηκαν δύο δημοσιεύσεις των αποτελεσμάτων μας:

1. Mousiolis, A.; Kollia, P.; Skentou, C; Messinis, IE. *Effects of leptin on the expression of fatty acid-binding proteins in human placental cell cultures.* Molecular Medicine Reports 2012 Feb; 5(2): 497-502
2. Mousiolis, A.; Kollia, P.; Skentou, C; Messinis, IE. *Syncytins expression in cultured trophoblast cells according to differentiation status.* Central European Journal of Biology 2011; Volume 6, Number 6, 918-924.

Σκοπός: α) η μελέτη της επίδρασης της λεπτίνης στις πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη μεταφορά των λιπαρών οξέων διαμέσου του πλακούντα (FAT/ CD36 και cFABPs) β) η μελέτη της έκφρασης της συγκυτίνης 1 και 2 και η συσχέτιση της μεταξύ τους έκφρασης γ) η επίδραση της λεπτίνης στην έκφραση της συγκυτίνης 1 και 2. **Υλικό- Μέθοδοι:** Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 77 δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που ελήφθησαν κατόπιν βιοψίας τροφοβλαστικού ιστού (CVS). Η μέση ηλικία κύησης κατά τη λήψη των δειγμάτων ήταν 12^{+5} εβδ. (ελάχιστο= 11^{+0} εβδ, μέγιστο= 14^{+1} εβδ, τυπική απόκλιση= 0,89). Τα δείγματα χρησιμοποιήθηκαν είτε άμεσα μετά τη λήψη τους είτε κατόπιν καλλιέργειών για την απομόνωση RNA και πρωτεϊνών. Σε αριθμό δειγμάτων που καλλιεργήθηκαν προστέθηκε φορσκολίνη (ουσία που επάγει τη διαφοροποίηση των κυτταροτροφοβλαστών σε συγκυτιοτροφοβλάστη) και εκτιμήθηκε η έκφραση των μορίων που μελετήθηκαν στα διαφοροποιημένα κύτταρα. **Αποτελέσματα:** Τα κυριότερα αποτελέσματα (παρουσιαζόμενα συνοπτικά) είναι: α) η εξακρίβωση της στατιστικά σημαντικής αύξησης των επιπέδων των μεταγγραφών RNA της βραχείας μορφής του υποδοχέα λεπτίνης (Ob- Ra) όταν επιδράσει σε καλλιέργειες εξωγενώς χορηγούμενη λεπτίνη, β) παρατηρείται στατιστικά σημαντική ελάττωση των επιπέδων των μεταγγραφών RNA της μακράς μορφής του υποδοχέα λεπτίνης (Ob- Rb) όταν επιδράσει σε καλλιέργειες εξωγενώς χορηγούμενη λεπτίνη, γ) παρά την ύπαρξη μεταγγραφών RNA, δεν παρατηρήθηκε πρωτεϊνική έκφραση της H-FABP, δ) δεν παρατηρήθηκε πρωτεϊνική έκφραση ή έκφραση μεταγγραφών RNA για την L-FABP, ε) η εξωγενώς χορηγούμενη λεπτίνη προκαλεί στατιστικά σημαντική αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης FAT/CD36 σε καλλιέργειες τροφοβλαστικών κυττάρων, στ) διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυτταροπλασματικής δεξαμενής της μεβρανικής πρωτεΐνης FAT/CD36 σε φρέσκα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού, ζ) η φορσκολίνη προκαλεί αύξηση στην έκφραση μεταγγραφών RNA της συγκυτίνης 1 όταν επιδράσει σε τροφοβλαστικές καλλιέργειες, η) η φορσκολίνη προκαλεί μείωση της έκφρασης μεταγγραφών RNA της συγκυτίνης 2 όταν επιδράσει σε τροφοβλαστικές καλλιέργειες, θ) η λεπτίνη προκαλεί αύξηση στην έκφραση μεταγγραφών RNA της συγκυτίνης 1 όταν επιδράσει σε τροφοβλαστικές καλλιέργειες, ι) η λεπτίνη προκαλεί μείωση της έκφρασης μεταγγραφών RNA της συγκυτίνης 2 όταν επιδράσει σε τροφοβλαστικές καλλιέργειες. **Συμπεράσματα:** διαπιστώθηκε η δράση της λεπτίνης σε πρωτεΐνες που ενέχονται στη μεταφορά λιπαρών οξέων διαμέσου του πλακούντα. Επιπλέον, διαπιστώθηκε η ύπαρξη κυτταροπλασματικής δεξαμενής της FAT/CD36, κατ' αναλογία με άλλους ιστούς όπως οι μυϊκοί όπου εξυπηρετεί ανάγκες ταχείας μεταφοράς

λιπαρών οξέων. Δεν εξακριβώθηκε η έκφραση κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών δέσμευσης των λιπαρών οξέων κατά διαφοροποίηση προς βιβλιογραφικά δεδομένα. Η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη προκαλεί αύξηση της συγκυτίνης 1 αλλά μείωση της συγκυτίνης 2, κάνοντας ελκυστική τη θεωρία μιας συσχέτισης των μορίων αυτών στη ρύθμιση του φαινομένου πλακουντοποίησης. Η λεπτίνη ασκεί ανάλογη επίδραση στα μόρια της συγκυτίνης κάνοντας πιθανή τη συμμετοχή της σε αυτό το φαινόμενο.

SUMMARY

Aim: i) to study the effect of leptin upon proteins involved in the transportation of fatty acids through the human placenta (FAT/ CD36 και cFABPs) ii) to study the expression of syncytin 1 and 2 and inter- correlate their expression γ) to study the effect of leptin upon expression of syncytin 1 and 2. **Materials and methods:** a total of 77 samples of trophoblastic tissue were used after chorionic villous sampling (CVS). Mean gestational age at sampling was 12⁺⁵ weeks (min= 11⁺⁰ weeks, max= 14⁺¹ weeks, stdev= 0.89). The specimens were either used promptly after sampling or cultured to isolate total RNA or proteins. In a number of specimens forskolin (a substance that induces the differentiation of cytotrophoblasts in syncytiotrophoblasts) was added and the expression of the probed molecules was evaluated. **Results:** Main results (concisely presented) include i) when leptin was added in trophoblastic cell cultures, there was a statistically significant increase at the expression of RNA transcripts of the short form of leptin receptor (Ob- Ra), ii) when leptin was added in trophoblastic cell cultures, there was a statistically significant decrease at the expression of RNA transcripts of the long form of leptin receptor (Ob- Rb), iii) despite the presence of RNA transcripts, no expression of the H- FABP protein was noted, iv) no protein or RNA transcripts expression was noted for L-FABP, v) leptin, when added in trophoblastic cell cultures, increases statistically significantly the expression of the FAT/CD36 protein, vi) in fresh trophoblastic tissue, a cytoplasmic pool of FAT/CD36 membrane protein was noted, vii) when added in trophoblastic cell cultures, forskolin causes an increase in the expression of RNA transcripts of syncytin 1, viii) when added in trophoblastic cell cultures, forskolin causes a decrease in the expression of RNA transcripts of syncytin 2, ix) when added in trophoblastic cell cultures, leptin causes an increase in the expression of RNA transcripts of syncytin 1, x) when added in trophoblastic cell cultures, leptin causes a decrease in the expression of RNA transcripts of syncytin 2. **Conclusions:** leptin effect upon proteins involved in fatty acids transportation through the placenta was noted. Moreover, the presence of a cytoplasmic pool of FAT/CD36 was demonstrated, similarly to other tissues such as the muscular where it serves in case of an acute need of fatty acids transportation. Despite published results, we failed to demonstrate the expression of cytoplasmic fatty acids binding proteins. Differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast increases syncytin 1 but decreases syncytin 2, thus making possible a theory of interplaying of syncytin 1 and 2 during placentation phenomena. Leptin has a similar effect upon syncytin biomolecules, thus pointing to its possible participation in the regulatory mechanism.