



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



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

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ
ΤΟΥ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ**

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΔΗΜΟΥΛΟΥ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2012**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ-ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗ- ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

2.2 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ

2.2.1 Παράγοντες Διαφοροποίησης

2.3 ΑΠΟΚΙΝΕΣ

2.3.1 Αντιγονεκτίνη

2.3.1.1 Δομή της Αντιγονεκτίνης

2.3.1.2 Υποδοχείς και Μεταγωγή σήματος της Αντιγονεκτίνης

2.3.2 Βιολογικές δράσεις της Αντιγονεκτίνης στη μητέρα και στο Έμβρυο

2.3.3 Αντιγονεκτίνη και Πλακούντας

2.3.4 Αντιγονεκτίνη και Διαφοροποίηση της Τροφοβλάστης

2.4 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

2.4.1 Ο ρόλος των Κασπασών στη Διαφοροποίηση της Τροφοβλάστης

ΣΚΟΠΟΣ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

- 4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**
- 4.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**
- 4.3 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**
- 4.4 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ**
- 4.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ**
- 4.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ**
- 4.7 BRADFORD PROTEIN ASSAY**
- 4.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΤΖΕΛ ΠΟΛΥΑΚΡΙΛΑΜΙΔΙΟΥ**
- 4.9 ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ
WESTERN BLOT**

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

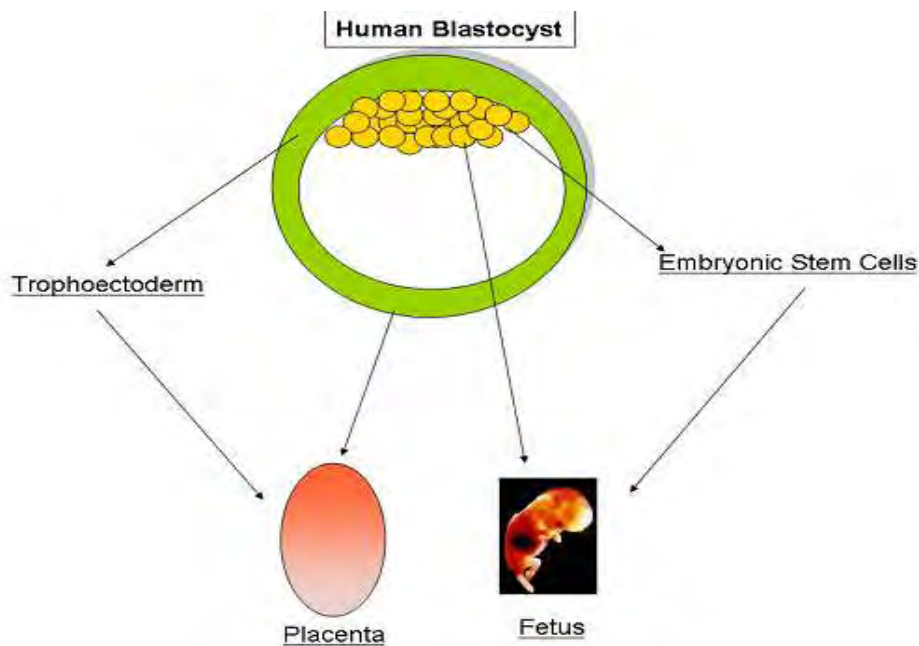
Στην εγκυμοσύνη, η σωστή δημιουργία του πλακούντα εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και την εισβολή της τροφοβλάστης. Οι διαδικασίες αυτές ρυθμίζονται από πλακουντιακές ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και κυτοκίνες. Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι η αντιγονεκτίνη, μία λιποκίνη, έχει αντιμιτωτική δράση στα τροφοβλαστικά κύτταρα, προωθεί τη τροφοβλαστική διαφοροποίηση και έχει περιγραφεί ως παράγοντας που επάγει την απόπτωση. Η διαδικασία της σύντηξης συνδέεται με τον καταρράκτη της απόπτωσης στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα. Οι κασπάσες είναι πρωτεάσες κυστεΐνης που διασπούν κυτταρικά συστατικά για να επηρεάσουν τον καταρράκτη της απόπτωσης. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου της αντιγονεκτίνης στη διαφοροποίηση τροφοβλαστικού ιστού και γι' αυτό το λόγο μελετήσαμε το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω της δραστηριότητας κασπάσης 3. Χρησιμοποιήσαμε την τεχνική Western Blot και δείξαμε ότι η κασπάσης 3 εκφράζεται σε κυτταροτροφοβλάστη που καλλιεργήθηκε στις 24, 48 ώρες, καθώς επίσης και σε τροφοβλάστη 72 ωρών που η συγκυτιοτροφοβλάστη έχει σχηματιστεί. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι η αντιγονεκτίνη μειώνει σταδιακά την δραστηριότητα της κασπάσης 3 στα τροφοβλαστικά κύτταρα καλλιεργημένα για 24, 48 και 72 ώρες, σε σύγκριση με κύτταρα χωρίς αντιγονεκτίνη. Καταλήγουμε ότι, η κυτταροτροφοβλάστη παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα σε κασπάση 3 σε σύγκριση με πιο διαφοροποιημένα συγκύτια. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η αντιγονεκτίνη ενισχύει τη διαδικασία της διαφοροποίησης μειώνοντας την έκφραση της κασπάσης 3 και συμμετέχει στο λειτουργικό σχηματισμό της συγκυτιοτροφοβλάστης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗ-ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Οι τροφοβλαστικές λάχνες του ανθρώπινου πλακούντα είναι ένα επιθηλιακό κάλυμμα των χοριακών λαχνών που επιπλέει στο μητρικό αίμα. Ο όρος τροφοβλάστη έχει εισαχθεί από τον A.A.W. Hubrecht στο τέλος του 19^{ου} αιώνα (A.A.W. Hubrecht 1899) ώστε να χαρακτηρίσει αυτά τα κύτταρα που προκύπτουν από τη βλαστοκύστη, τα οποία δεν θα αποτελέσουν μέρος του εμβρύου αλλά είναι απαραίτητα για τη διατροφή του. Η τροφοβλάστη είναι η πρώτη που διαφοροποιείται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, κατά τη μετάβαση από το στάδιο του μοριδίου στη βλαστοκύστη.

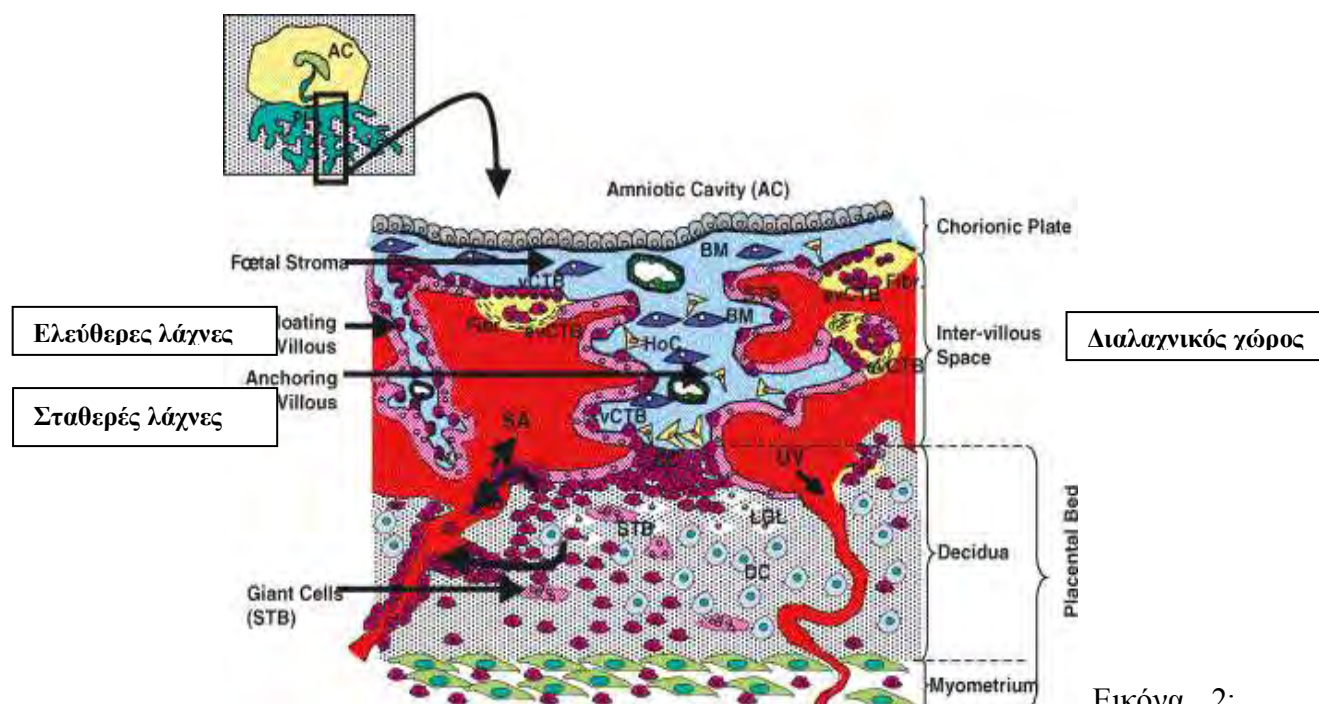
Κατά την εμβρυική ανάπτυξη, την 6-7^η ημέρα, η βλαστοκύστη αποτελείται από το τροφοεκτόδερμα, μια μονή στιβάδα που περιβάλλει το βλαστόκυκλο και θα σχηματίσει τον πλακούντα και κατά συνέπεια τη τροφοβλάστη, και την έσω κυτταρική μάζα, τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα, από όπου θα προκύψει το έμβρυο. Όταν η βλαστοκύστη εμφυτεύει στη μήτρα τα τροφοεκτοδερμικά κύτταρα αναφέρονται ως κυτταροτροφοβλαστικά.



Εικόνα 1: Η δημιουργία πλακούντα από τροφοεκτόδερμα και εμβρύου από τα εμβρυικά βλαστικά κύτταρα (Roger Diaz, Et al 2004).

Αμέσως μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης αρχίζει ο σχηματισμός των ελεύθερων και σταθερών προσαρτημένων λαχνών. Κατά την ανάπτυξη των λαχνών δημιουργούνται οι πρωτοταγείς, δευτεροταγείς και τριτοταγείς λάχνες, εκ των οποίων οι τελευταίες χαρακτηρίζονται από εκ νέου σχηματισμό τριχοειδών από τους μεσεγγυματικούς προδρόμους και είναι ειδικευμένα στις εμβryo-μητρικές ανταλλαγές. Το λαχνικό δένδρο εξαπλώνεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Saito et al 2003).

Οι ελεύθερες λάχνες βρίσκονται βυθισμένες στο μητρικό αίμα και παίζουν ρόλο στην αλλαγή των αερίων και των θρεπτικών συστατικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Οι σταθερές προσαρτημένες λάχνες βρίσκονται σε επαφή με το μητρικό τοίχωμα (Aboagye-Mathiesen et al 1996). Οι σταθερές λάχνες σχηματίζονται από δυο πληθυσμούς κυτταροτροφοβλάστης, τη λαχνική κυτταροτροφοβλάστη (vCTV) και την εξωλαχνική κυτταροτροφοβλάστη (evCTV, γνωστή και ως ενδιάμεση κυτταροτροφοβλάστη). Τα κύτταρα αυτά διαφέρουν φαινοτυπικά, τα λαχνικά κυτταροτροφοβλαστικά είναι ακίνητα, πολικά επιθηλιακά βλαστικά κύτταρα και τελικά διαφοροποιούνται σε συγκύτιο, ενώ τα εξωλαχνικά κυτταροτροφοβλαστικά διαφοροποιούνται σε κινητά και διεισδυτικά μη πολικά επιθηλιακά κύτταρα.

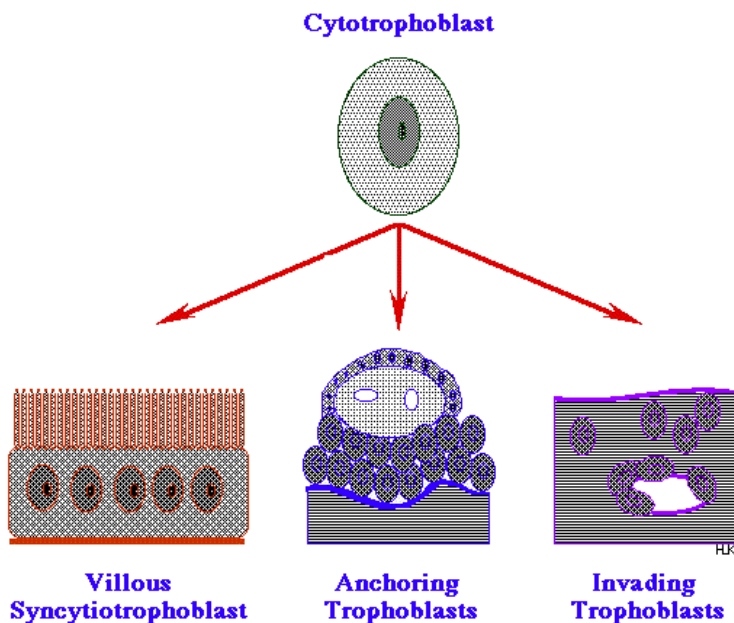


Εικόνα 2:

Εικόνα 2: Τομή εγκάρσια σε σταθερές και ελεύθερες πλακουντιακές λάχνες στις 8 εβδομάδες κύησης (Paul Biscohof 2005).

2.2 ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΗΣ

Οι εξειδικευμένοι τύποι λαχνικών κυττάρων, όπως τα συγκυτιοτροφοβλαστικά και εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα, προκύπτουν από τα κυτταροτροφοβλαστικά βλαστικά κύτταρα. Στη θέση της σύνδεσης και της άμεσης επαφής με τους μητρικούς ιστούς, τα τροφοβλαστικά κύτταρα συγχωνεύονται για να σχηματίσουν μια δεύτερη στιβάδα από τη μεταμιτωτική πολυκυτταρική συγκυτιοτροφοβλάστη (Boyd et al., 1970). Η τροφοβλάστη πλέον οργανώνεται σε δύο στιβάδες, το εξωτερικό στρώμα μη πολλαπλασιαζόμενης πολυπύρηνης συγκυτιοτροφοβλάστης, η οποία έρχεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα και την μονοκύτταρη κυτταροτροφοβλάστη.



Εικόνα 3: Η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη, σταθερές προσαρτημένες και διεισδυτικές λάχνες.

Η κυτταροτροφοβλάστη αποτελεί δεξαμενή από τροφοβλαστικά προγονικά κύτταρα που πολλαπλασιάζονται, αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο και τελικά συγχωνεύονται με την υπερκείμενη πολυπύρηνη στιβάδα (Huppertz et Gauster., 2011). Αυτή η εξωτερική στιβάδα είναι η συγκυτιοτροφοβλάστη, μια πολυπύρηνη στιβάδα χωρίς πλευρικά κυτταρικά σύνορα. Η σύντηξη της κυτταροτροφοβλάστης είναι ένα σημαντικό βήμα για την συγκυτιοτροφοβλάστη και την τροφοδοτεί με πρωτεΐνες,

νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και άλλα οργανίδια. Η συγκυτιοτροφοβλάστη αποτελείται από μια στρώση κυττάρων που συνεχώς και αδιάκοπα επεκτείνεται πάνω από την επιφάνεια όλων των λαχνών του πλακούντα.

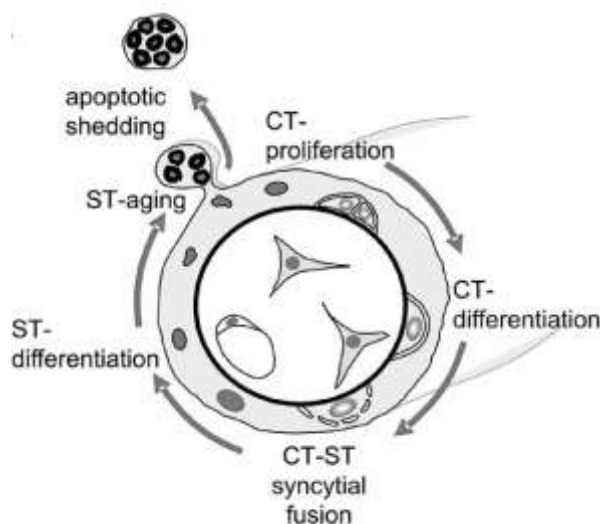
Η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι απαραίτητη για διαδικασίες ενδοκρινικής δραστηριότητας, απελευθερώνοντας ορμόνες που εμπλέκονται στην ομοίωση της εγκυμοσύνης, όπως η χοριακή γοναδοτροπίνη και το πλακουντιακό λακτογόνο. Σε κάθε πλακούντα υπάρχει μια μοναδική συγκυτιοτροφοβλάστη που καλύπτει όλες τις λάχνες του πλακούντα και αποτελεί τον πλακουντικό φραγμό ανάμεσα στους εμβρυικούς ιστούς και την μητρική κυκλοφορία (Benirschke et al, 2006, Midgley et al, 1963, Panigel 1993). Η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι σημαντική για να εξασφαλίσει την ανάπτυξη του εμβρύου και είναι υπεύθυνη για τις λειτουργίες όπως η μεταφορά του οξυγόνου, θρεπτικών και απόβλητων προϊόντων, παραγωγή ορμονών και ανοσολογική αντοχή (Benirschke et al, 2006). Η συγκυτιοτροφοβλάστη είναι σημαντικά διαφοροποιημένη και έχει χάσει την πολλαπλασιαστική της ικανότητα. Επίσης, ο πυρήνας μέσα στην συγκυτιοτροφοβλάστη δείχνει μόνο μέτριους ρυθμούς σύνθεσης RNA (Richart et al, 1961). Επομένως, για να διατηρηθεί αυτή η τεράστια στιβάδα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης είναι απαραίτητη η συνεχόμενη συγχώνευση των συγκυτίων από την κυτταροτροφοβλάστη μαζί με την συγκυτιοτροφοβλάστη (Huppertz et Gauster, 2011).

Η σύντηξη σε συγκύτια είναι μια γενική διαδικασία στους ιστούς των ζώων που χαρακτηρίζεται από χάλαση των διαχωριστικών μερών των πλασματικών μεμβρανών μεταξύ γειτονικών κυττάρων. Η σύντηξη οδηγεί σε συνάθροιση πολυπύρηνων δομών που προέρχονται και διατηρούνται από τη συνεχή σύντηξη μονοπύρηνων κυττάρων. Τυπικά παραδείγματα στον άνθρωπο είναι η συγκυτιοτροφοβλάστη του πλακούντα και οι σκελετικές μυϊκές ίνες που προέρχονται από τη μυοβλάστη (Chen et Olson, 2004). Κατά τη διάρκεια της σύντηξης μεγάλος αριθμός από διαφορετικά και ανεξάρτητα ενδοκυτταρικά μονοπάτια ενεργοποιούνται και οδηγούν σε στενή αλληλεπίδραση των πλασματικών μεμβρανών δύο γειτονικών κυττάρων. Τελικά, από την αλληλεπίδραση, μέρος της πλασματικής μεμβράνης διαλύεται και επιτρέπει την ανταλλαγή κυττοπλασματικών περιεχομένων όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και RNA καθώς επίσης και οργανίδια όπως τα μιτοχόνδρια, το ενδοπλασματικό δίκτυο και τον πυρήνα. Οι πλασματικές μεμβράνες δεν συγχωνεύονται εύκολα έτσι ώστε να

διατηρηθεί η ατομικότητα του κυττάρου (Huppertz et Gauster 2010). Οπότε, για να γίνει η σύντηξη είναι απαραίτητη η προετοιμασία του κυττάρου, η παρουσία και η ενεργοποίηση συγκεκριμένων πρωτεϊνών σύντηξης.

Η αρχική τροφοβλαστική σύντηξη γίνεται ανάμεσα σε δυο μονοπύρηννα τροφοβλαστικά κύτταρα την στιγμή της προσκόλλησης της βλαστοκύστης. Οι υπόλοιπες συντήξεις γίνονται ανάμεσα σε ένα μονοκύτταρο της κυτταροτροφοβλάστης και την πολυπύρηννη στιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης. Η σύντηξη ανάμεσα σε κύτταρα της κυτταροτροφοβλάστης δεν μπορεί να συνεχιστεί αργότερα κατά την εγκυμοσύνη γιατί έτσι θα μειωθεί η δεξαμενή των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων που διατηρούν τη συγκυτιοτροφοβλάστη το οποίο θα οδηγούσε σε νεκρωτικό εκφυλισμό της στιβάδας μέσα σε λίγες ημέρες.

Μέσα στη συγκυτιοτροφοβλάστη πραγματοποιείται περαιτέρω διαφοροποίηση και πακετάρισμά των παλιών υλικών, που προκύπτουν λόγω συσσώρευσης γερασμένων πυρήνων, μέσα σε συγκυτιακούς κόμβους που εξωθούνται στη μητρική κυκλοφορία και στη συνέχεια αποβάλλονται. Αυτές οι αιμοσφαιρικές δομές περιβάλλονται από σφραγισμένες μεμβράνες έτσι ώστε όταν εξωθούνται στην μητρική κυκλοφορία να μην προκαλούν φλεγμονώδη απάντηση στη μητέρα. (Huppertz et al., 2006)

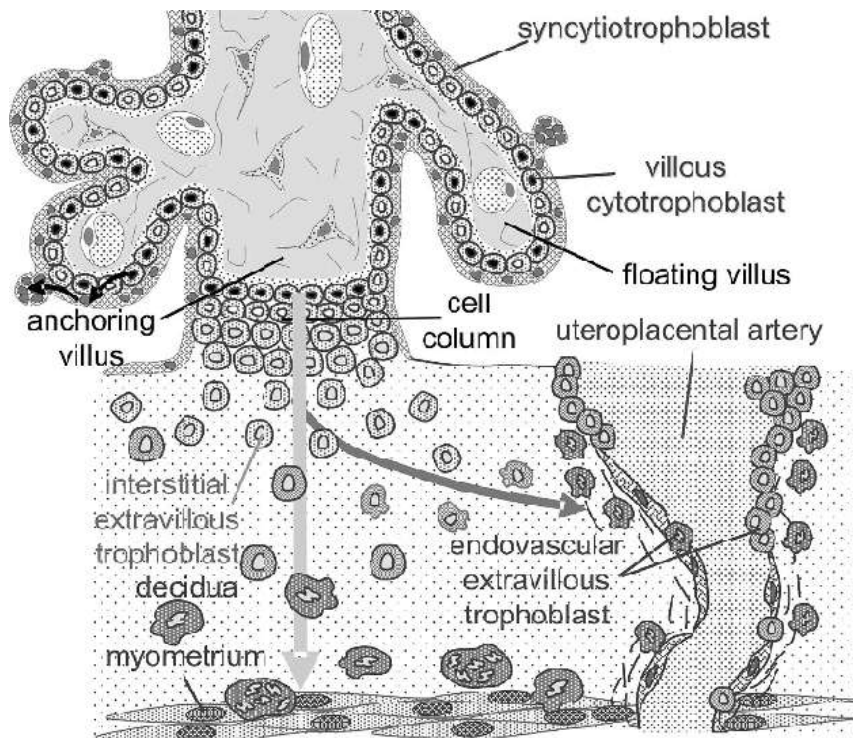


Εικόνα 4: Στάδια διαφοροποίησης της κυτταροτροφοβλάστης (Huppertz et al., 2006)

Περίπου 14 ημέρες μετά την εμφύτευση, τα βλαστικά κύτταρα των κυτταροτροφοβλαστικών λαχνών διαφοροποιούνται για να σχηματίσουν τη διεισδυτική κυτταροτροφοβλάστη που διαπερνά τη συγκυτιοτροφοβλάστη ώστε να σχηματιστούν οι εξωλαχνικές τροφοβλαστικές στήλες (Aplin 1991). Οι εξωλαχνικές τροφοβλαστικές στήλες διεισδύουν στο μητρικό φθαρτό και αποτελούν τη φυσιολογική σύνδεση του πλακούντα με τη μήτρα (Pijnenborg et al. 1980, Kam et al. 1999). Τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα έχουν την ικανότητα να αναδιαμορφώνουν τα αιμοφόρα αγγεία της μήτρας για να καθιερώσουν μια επαρκή παροχή αίματος για το έμβρυο.

Τα εξωλαχνικά τροφοβλαστικά κύτταρα μπορούν να υποδιαιρεθούν σε δύο πληθυσμούς, τα ενδιάμεσα και τον ενδοαγγειακό κύτταρα. Τα ενδιάμεσα κύτταρα εισβάλουν στο ενδιάμεσο χώρο, στο ενδομήτριο και σε ένα μέρος του μυομήτριου. Τα ενδοαγγειακά τροφοβλαστικά κύτταρα διεισδύουν στις σπειροειδείς αρτηρίες, αυξάνοντας έτσι τα θρεπτικά συστατικά και τη μητρική ροή του αίματος προς το πλακούντα (Kaufmann et al., 2003). Ακόμα, έχειδειχτεί ότι τα ενδοαγγειακά τροφοβλαστικά κύτταρα προέρχονται και από διαφοροποίηση των ενδιάμεσων τροφοβλαστικών κυττάρων (Benirschke et al., 2000, Kaufmann et al., 2003).

Τέλος, και οι δύο τύποι της τροφοβλάστης κρατάνε ένα υποσύνολο κυττάρων σε άμεση επαφή με τις λάχνες της βασικής μεμβράνης. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διατηρήσουν την παραγωγική δυνατότητα και να πολλαπλασιάζονται σε απάντηση σε αυξητικούς παράγοντες, όπως FGF4 (Baczyk et al., 2005).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των δύο τύπων της τροφοβλάστης: λαχνική και εξωλαχνική τροφοβλάστη (Huppertz et al., 2006)

2.2.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ

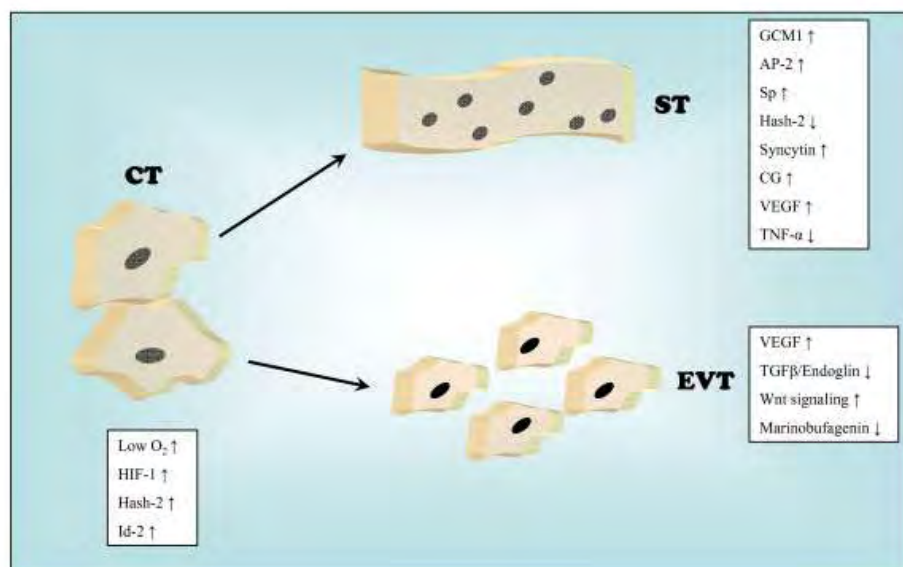
Η διαφοροποίηση της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκυτιοτροφοβλάστη και σε εξωλαχνική τροφοβλάστη καθορίζεται από διαφορετικούς παράγοντες όπως πρωτεΐνες σύντηξης, αυξητικούς παράγοντες, κυτοκίνες, πρωτεϊνικές κινάσες, μεταγραφικούς παράγοντες, ενδοκυτταρικές πρωτεάσες, κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, ορμόνες καθώς και τα επίπεδα οξυγόνου.

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες syncytin-1 και syncytin-2 είναι μέλη των πρωτεϊνών σύντηξης και έχουν προταθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο εντοπισμός της syncytin-1 είναι ακόμα ασαφής, ενώ η syncytin-2 εντοπίζεται στην κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα (Chen et al., 2008, Vargas et al., 2009, Esnault et al., 2008, Malassine et al., 2007, 2008).

Η Forskolin είναι ένα αντιδραστήριο που επάγει τη σύντηξη των τροφοβλαστικών κυτταρικών σειρών BeWo και αυξάνει τη συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού κυκλικού cAMP. Αυτό οδηγεί στην αυξητική ρύθμιση του μεταγραφικού παράγοντα glial cell missing homolog 1 (GCM1) (Knerr et al., 2005). Ο παράγοντας GCM1 έχειδειχτεί ότι συνδέεται άμεσα με την έναρξη της τροφοβλαστικής σύντηξης. Στον ανθρώπινο πλακούντα, ο παράγοντας GCM1 έχειδειχτεί ότι αυξάνει την έκφραση της syncytin-1 (Yu et al., 2002, Malassine et al., 2007). Η δραστηριότητά του ξεκινά μόνο όταν η κυτταροτροφοβλάστη αφήσει τον κυτταρικό κύκλο. Έτσι, η δραστηριότητα του παράγοντα GCM1 έχει συσχετιστεί αρνητικά με τον πολλαπλασιασμό της τροφοβλάστης (Baczyk et al., 2009). Ο παράγοντας GCM1 εκφράζεται μόνο στο υποσύνολο των υψηλά διαφοροποιημένων κυττοτροφοβλαστικών κυττάρων (Baczyk et al., 2004), που προορίζονται για να συγχωνευτούν με τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Αυτό συμφωνεί με την παρατήρηση ότι οι κυττοτροφοβλαστικές λάχνες αφήνουν τον κυτταρικό κύκλο πριν αρχίσουν τη διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστες.

Το οξυγόνο παίζει ρόλο στη τροφοβλαστική διαφοροποίηση, καθώς τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό της κυτταροτροφοβλάστης και αναστέλλουν τη διαφοροποίηση προς συγκυτιοτροφοβλάστη και εξωλαχνικές τροφοβλαστικές στήλες (Jauniaux et al., 2003).

Ένα ακόμα σημαντικό βήμα για τη τροφοβλαστική διαφοροποίηση είναι η εξωτερίκευση των phosphatidylserine. Η ασύμμετρη κατανομή των φωσφολιπιδίων στα δύο φύλλα της πλασματικής μεμβράνης διατηρείται ενεργά (Das et al., 2004). Το εσωτερικό φύλλο περιέχει τα πιο αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια όπως phosphatidylserine (PS) και phosphatidylethanolamine. Όμως, σε κάποιες περιπτώσεις τα κύτταρα ίσως κάνουν ανακατανομή των αρνητικά φορτισμένων φωσφολιπιδίων, ειδικά phosphatidylserine (PS) από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της πλασματικής μεμβράνης. Η συντήρηση αυτής της ασυμμετρίας εξαρτάται από τρεις διαφορετικούς λιπιδιακούς μεταφορείς: scramblase, flippase, floppase (Beyers et al., 2010, Rote et al., 2010). Στους τροφοβλάστες η ανακατανομή των phosphatidylserine (PS-flip) ανιχνεύτηκε σε ένα υποσύνολο υψηλά διαφοροποιημένων κυττοτροφοβλαστικών (Huppertz et al., 1998). Σε BeWo καρκινικές σειρές αυτή η ανακατανομή είναι ουσιώδης για τη διαφοροποίηση και τη σύντηξη των συγκυτίων (Lyden et al., 1993, Adler et al., 2005).



Εικόνα 6: Παράγοντες που παίζουν ρόλο στη τροφοβλαστική διαφοροποίηση από κυτταροτροφοβλάστη σε συγκυτιοτροφοβλάστη και εξωλαχνική τροφοβλάστη (Lunghi et al., 2007)

Οι αυξητικοί παράγοντες και οι κυτοκίνες που προέρχονται από τη μητέρα καθώς και από το έμβρυο επηρεάζουν τη τροφοβλαστική διαφοροποίηση. Οι παράγοντες όπως, epidermal growth factor (EGF) (Morrish et al., 1987), colony stimulating factor (CSF)-1 (Garcia-Lloret et al., 1994), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) (Garcia-Lloret et al., 1994), leukemia-inhibitory factor (LIF) (Yang et al., 2003) και transforming growth factor (TGF)-α (Yang et al., 2003) έχουν περιγραφεί ότι επάγουν την σύντηξη των συγκυτίων της πρωταρχικής κυτταροτροφοβλάστης που *in vitro* προκύπτουν από την έκκριση επαυξημένης ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) και του ανθρώπινου πλακουντιακού γαλακτογόνου (hPL). Ο παράγοντας Vascular endothelial growth factor (VEGF) αυξάνει τον αριθμό και το μέγεθος των συγκυτίων στη πρωταρχική κυτταροτροφοβλάστη *in vitro* (Crocker et al., 2001). Επιμόλυνση με αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια για τον παράγοντα macrophage inhibitory cytokine 1 (MIC-1) σε κυτταροτροφοβλάστη οδηγεί στην αναστολή του σχηματισμού των συγκυτίων (Li et al., 2005). Επίσης, η χοριακή γοναδοτροπίνη που εκκρίνει η συγκυτιοτροφοβλάστη έχει δείχτει ότι έχει αυτοκρινή δράση στις λάχνες της τροφοβλάστης και αυξάνει τον σχηματισμό των συγκυτίων (Yang et al., 2003, Shi et al., 1993). Σε αντίθεση, λίγοι παράγοντες έχουν περιγραφεί ότι δρουν αρνητικά στη διαφοροποίηση της

τροφοβλάστης και μειώνουν το σχηματισμό συγκυτίων. Οι παράγοντες Tumor necrosis factor (TNF)-α και transforming growth factor (TGF)-β έχει δείχτεί ότι βλάπτουν το σχηματισμό συγκυτίων και μειώνουν την έκκριση της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) και του πλακουντιακού γαλακτογόνου (hPL) (Leisser et al., 2006).

Αυξητικοί παράγοντες, κυτοκίνες και άλλοι τοπικοί παράγοντες ίσως συνδέονται με τους αντιστοιχούς υποδοχείς στις λάχνες της τροφοβλάστης. Αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί μεταγενέστερα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιώντας κινάσες και μεταγραφικούς παράγοντες. Δύο μέλη της οικογένειας των mitogen-activated protein kinases (MAPKs), p38 και extracellular signal-regulated kinase 1/ 2 (ERK1/ 2), φάνηκε ότι σχετίζονται με τη ρύθμιση της τροφοβλαστικής διαφοροποίησης και σύντηξης (Daoud et al., 2005, Knerr et al., 2005). Παροδική υπερέκφραση της καταλυτικής υπομονάδας της πρωτεϊνικής κινάσης (PKA) οδηγεί στην ενισχυμένη σύντηξη των τροφοβλαστικών κυτταρικών σειρών BeWo (Knerr et al., 2005).

Οι κυτοκίνες διαμορφώνουν την έκφραση μορίων προσκόλλησης στις μητρικές και εμβρυικές επιφάνειες ρυθμίζοντας την έκφραση των μεταλλοπρωτεϊνών (MMP), σταθεροποιώντας την αλληλεπίδραση της βλαστοκύστης και της μητρικής επιφάνειας και προωθώντας την διείσδυση και τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης. Τα τελευταία χρόνια πολλές μελέτες εξετάζουν τον ρόλο των λιποκινών, όπως της λεπτίνης, της αντιπονεκτίνης και της ρεξιστίνης στη τροφοβλάστη. (Ippolito et al., 2012).

2.3 ΛΙΠΟΚΙΝΕΣ

Οι λιποκίνες αποτελούν πρωτεϊνικά προϊόντα του λιπώδους ιστού με αυτοκρινείς, παρακρινείς και ενδοκρινείς δράσεις (Coppack et al., 2001, Conde et al., 2011). Οι λιποκίνες απελευθερώνονται από το λιπώδη ιστό και μπορούν να επικοινωνήσουν μεταξύ των κυττάρων του λιπώδους ιστού και άλλα κύτταρα όπως ηπατικά ή μυικά. Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχτεί ότι τα τροφοβλαστικά κύτταρα εκφράζουν τις ίδιες λιποκίνες (Yara et al., 2003, Masuzaki et al., 1997, Senaris et al., 1997),

προτείνοντας έτσι ότι τέτοια μόρια ίσως επηρεάζουν την εμβryo-μητρική επιφάνεια από την στιγμή της εμφύτευσης μέχρι το τρίτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης (Mitchell et al., 2005). Οι πιο καλά μελετημένες λιποκίνες είναι η λεπτίνη, η αντιπνεκτίνη και η ρεζιστίνη. (Ippolito et al., 2012)

2.3.1 ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ

Η αντιπνεκτίνη είναι μια κυτοκίνη, η οποία παράγεται κυρίως στο λιπώδη ιστό. Η αντιπνεκτίνη αναφέρεται επίσης με το όνομα GBP-28, apM1, AdipoQ, Acrp30 και κωδικοποιείται από το ADIPOQ γονίδιο (Maeda et al., 1996). Είναι μια αντιποκίνη με πλειοτροπικές δράσεις όπως αντι-φλεγμονώδη, αντι-αγγειογενετική, καθώς και αντι-αθηρογενετικές και αντιμυτωτικές δράσεις σε διάφορους τύπους κυττάρων (Yamauchi et al., 2003, Tilg et Moschen 2006).

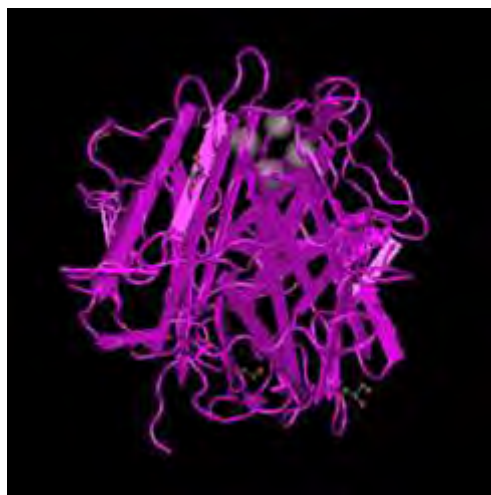
Η αντιπνεκτίνη παρουσιάζει υψηλές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία του αίματος που κυμαίνονται στα 5-30 µg/ml και περιλαμβάνει το 0,01% των συνολικών πρωτεϊνών του πλάσματος (Zavalza-Gomez et al., 2008). Η αντιπνεκτίνη έχει ημερήσια παλμική έκφραση, με μέγιστη έκκριση το πρωί και μειώνεται τη νύχτα (Gavrilu et al., 2003). Οι συγκεντρώσεις στο πλάσμα αποκαλύπτουν τον φυλετικό διμορφισμό, όπου οι άντρες έχουν χαμηλότερα επίπεδα από τις γυναίκες. Κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου τα επίπεδα στο αίμα παραμένουν αμετάβλητα (Daforoulos et al., 2009).

Η απώλεια βάρους αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα της αντιπνεκτίνης στην κυκλοφορία (Coppola et al., 2008). Η αντιπνεκτίνη είναι μια ινσουλινο-ευαίσθητη ορμόνη που μειώνει την παραγωγή γλυκόζης και ενισχύει την ενεργότητα της ινσουλίνης στο ήπαρ (Weyer et al., 2001, Tschritter et al., 2003, Ceddia et al., 2005, Campos et al., 2008). Η αντιπνεκτίνη μειώνει την ηπατική γλυκόζη που παράγεται στο συκώτι (Berg et al., 2001, Combs et al., 2001) και τη συσσώρευση των τριγλυκεριδίων στους σκελετικούς μυς (Yamauchi et al., 2001, Fruebis et al., 2001) ενώ συγχρόνως αυξάνει την οξείδωση των λιπαρών οξέων στο συκώτι (Yamauchi et al., 2001). Τα επίπεδα της αντιπνεκτίνης μειώνονται σε περιπτώσεις όπως η παχυσαρκία, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II (Weyer et al., 2001, Tschritter et al.,

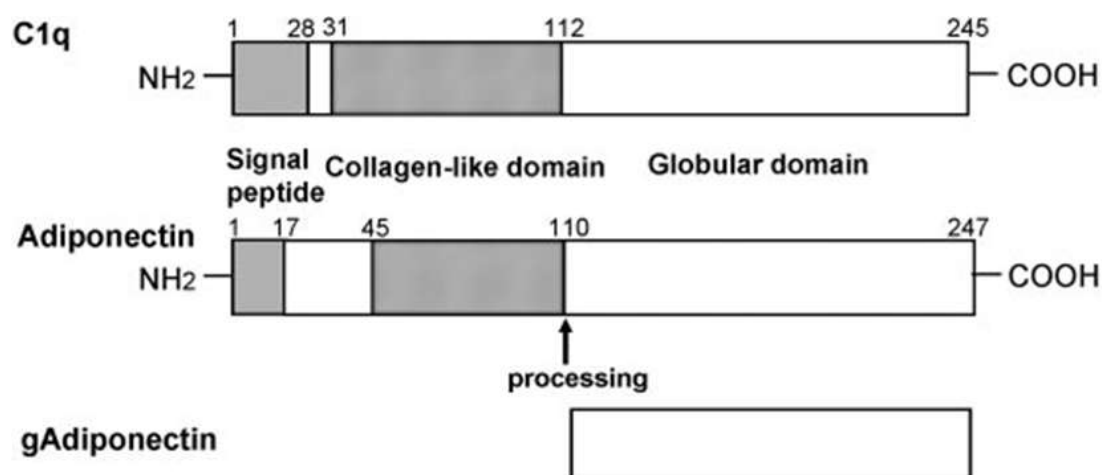
2003), καρδιοαγγειακή νόσος, ενώ αυξάνονται σε περιπτώσεις όπως η χρόνια νευρική ανεπάρκεια, ο διαβήτης τύπου I και η νευρική ανορεξία.

2.3.1.1 ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ

Η αντιπονεκτίνη αποτελείται από 244aa και είναι ένα πολυπεπτίδιο 30kDa (full length, fAd). Περιλαμβάνει μια αμινοτελική αλληλουχία, μια μεταβλητή περιοχή, μία τύπου κολλαγόνου περιοχή, μια σφαιρική περιοχή και μια καρβοξυτελική περιοχή. Επίσης, εμφανίζει ισχυρή ομολογία αλληλουχιών με το κολλαγόνο τύπου VIII και X και το συμπλήρωμα C1q.

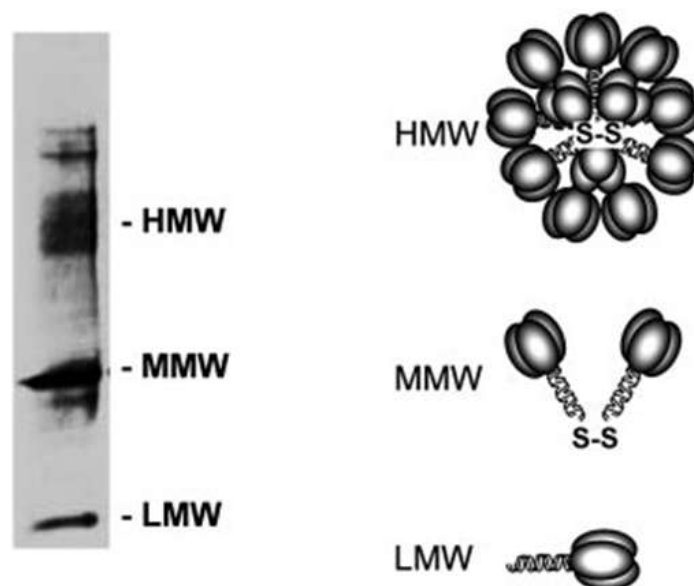


Εικόνα 7: Η κρυσταλική δομή μιας αλυσίδας της αντιπονεκτίνης, σφαιρική περιοχή (Min et al., 2012)



Εικόνα 8: Η δομή και οι περιοχές της αντιπονεκτίνης. Αποτελείται από N-τελικό άκρο Collagen-like αλληλουχία και C-τελικό άκρο σφαιρικής περιοχής (Kadowaki et Yamauchi 2005).

Μετα-μεταγραφική τροποποίηση με υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση παράγει πολλές ισομορφές της αντιπονεκτίνης (Maeda et al., 1996, Scherer et al., 1995, Nakano et al., 1996, Hu et al., 1996). Τα μόρια της αντιπονεκτίνης εκκρίνονται από τα λιποκύτταρα ως τριμερή, που είναι η βασική μονάδα (LMW, ~90kDa), ως μεσαίου μοριακού βάρους (MMW, 6-μερή, ~180kDa) και ως υψηλού μοριακού βάρους (HMW, 12-18μερή, ~360-400kDa) (Goldstein et al., 2009). Η αντιπονεκτίνη υψηλού μοριακού βάρους κυριαρχεί στη κυκλοφορία του αίματος (Hada et al., 2007). Μέσω πρωτεόλυσης δημιουργείται η βιολογικά ενεργή μορφή αντιπονεκτίνης (globular, gAd) 16,5kDa, η οποία περιέχει μόνο το καρβοξυτελικό άκρο (Jones et al., 2010, Lappas et al., 2005).



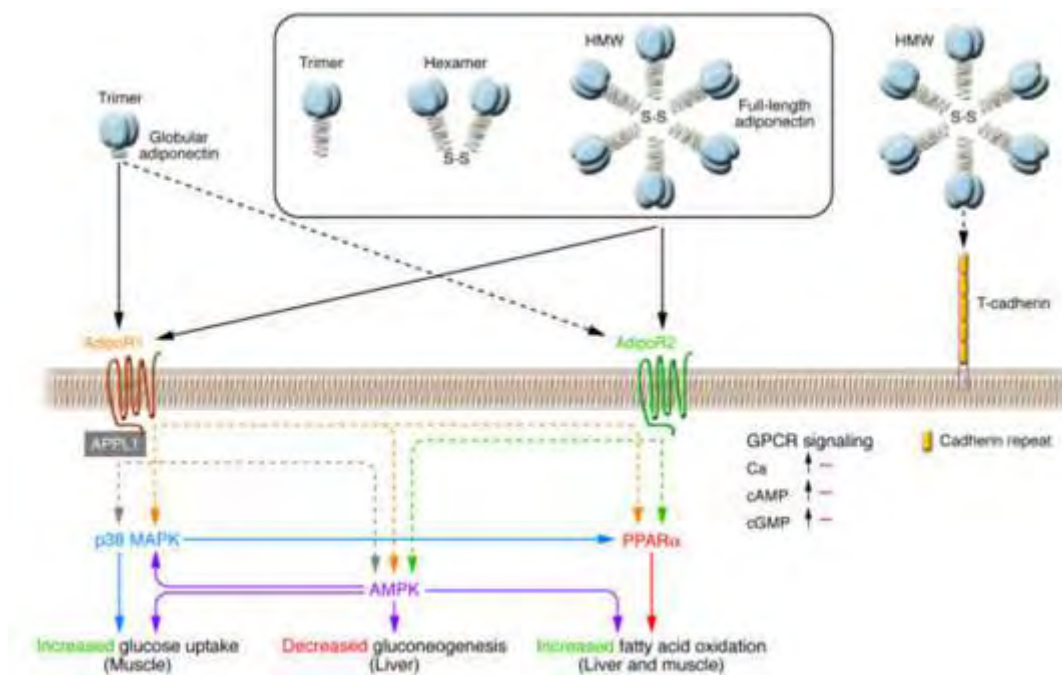
Εικόνα 9: Διαφορετικές μορφές αντιπανεκτίνης ανιχνεύτηκαν χρησιμοποιώντας αντίσωμα αντιπανεκτίνης σε ορό ανθρώπου. HMW, υψηλού μοριακού βάρους MMW, μεσαίου μοριακού βάρους, LMW, χαμηλού μοριακού βάρους, S-S, δισουλφιδικοί δεσμοί (Kadowaki et Yamauchi, 2005).

2.3.1.2 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ ΤΗΣ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΓΩΓΗ ΣΗΜΑΤΟΣ

Οι βιολογικές δράσεις της αντιπανεκτίνης επιτελούνται με αλληλεπίδραση με ειδικές περιοχές των υποδοχέων ADIPOR1, ADIPOR2. Επιπλέον υπάρχει ο υποδοχέας T-cadherin που συνδέεται με τα εξαμερή και υψηλού μοριακού βάρους ισομερή της αντιπανεκτίνης αλλά δεν εκφράζεται στη τροφοβλάστη (Hug et al., 2004, Benaitreau et al., 2009). Οι υποδοχείς ADIPOR1,R2 αποτελούνται από 7 διαμεμβρανικές περιοχές και συνδέονται με G-πρωτεΐνες. Οι υποδοχείς ADIPOR1 και ADIPOR2 εκφράζονται στο ενδομήτριο και στο πλακούντα (Takemura et al., 2006, Caminos et al., 2005, Benaitreau et al., 2009). Η αντιπανεκτίνη παράγεται από τα ενδομητρικά κύτταρα στην εμβρυο-μητρική επιφάνεια (Takemura et al., 2006). Αρχικές μελέτες πρότειναν ότι η αντιπανεκτίνη παράγεται και εκκρίνεται στον πλακούντα (Caminos et al., 2005, Chen et al., 2006), όμως πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το mRNA της αντιπανεκτίνης δεν εκφράζεται στον πλακούντα (Corbetta et al., 2005, Pinar et al., 2008).

Ωστόσο , ο πλακούντας είναι πιθανός στόχος για την αντιγονεκτίνη επειδή το mRNA του υποδοχέα ADIPOR2 εκφράζεται στον πλακούντα (Camino et al., 2005, Meller et al., 2006) και η πρωτεΐνη του ADIPOR2 εντοπίζεται σε συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα (Camino et al., 2005). Οι πρωτεΐνες και των δύο υποδοχέων ADIPOR1 και ADIPOR2 εκφράζονται σε κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα (McDonald et al., 2009). Στο ενδομήτριο, η έκκριση των υποδοχέων ADIPOR1 και ADIPOR2 αυξάνεται κατά την ωχρινική περίοδο, που αντιστοιχεί στην περίοδο εμφύτευσης του εμβρύου (Takemura et al., 2006). Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ότι η αντιγονεκτίνη ενοχοποιείται για την διαδικασία εμφύτευσης.

Η κάθε ισομορφή της αντιγονεκτίνης συνδέεται με διαφορετική συγγένεια με τους υποδοχείς, για παράδειγμα ο υποδοχέας AdipoR1 εκφράζεται στους σκελετικούς μύες και συνδέεται κυρίως με gAd ενώ ο υποδοχέας AdipoR2 εκφράζεται στο ήπαρ και συνδέεται με μεγαλύτερη συγγένεια με fAd (Yamauchi et al., 2003, Jones et al., 2010). Η σύνδεση της αντιγονεκτίνης με τους υποδοχείς ενεργοποιεί διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια όπως PKA, PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α), PRKA (AMP-activated protein kinase), PIK3(phosphoinositide-3-kinase), P38/P42/P44 MAPK (mitogen-activated protein kinase) JUN kinase (Yamauchi et al., 2003, Luo et al., 2005, Miyazaki et al., 2005, Campos et al., 2008, Tilg et al., 2006, Ouchi et al., 2000). Η αύξηση παραγωγής του ενδοκυτταρικού cAMP μέσω του PKA σηματοδοτικού μονοπατιού περιγράφεται ευρέως ως το κύριο σήμα μεσολάβησης για την τροφοβλαστική διαφοροποίηση (Keryer et al., 1998).



Εικόνα 10: Μεταγωγή σήματος μέσω των υποδοχέων της αντιπονεκτίνης. Στα μυοκύτταρα με την ενεργοποίηση του μονοπατιού p38 MAPK μέσω της έκφρασης των υποδοχέων της αντιπονεκτίνης, αυξάνεται η πρόσληψη της γλυκόζης ενώ με την ενεργοποίηση PPARα αυξάνεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Στα ηπατοκύτταρα η μεταγωγή σήματος AMPK, μειώνει την γλυκονεογένεση και με ενεργοποίηση PPARα αυξάνεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων (Kadowaki et al., 2006).

2.3.2 Βιολογικές δράσεις της Αντιπονεκτίνης στη Μητέρα και στο Έμβρυο

Πολλά στοιχεία δείχνουν ότι υπάρχει σημαντική μείωση της αντιπονεκτίνης κατά το δεύτερο μισό της εγκυμοσύνης, προτείνοντας έτσι ότι η παρουσία των μορίων λόγω εγκυμοσύνης είναι ικανά να επηρεάσουν την έκκριση των λιποκινών (Elshorena 2011, Cseh et al., 2004, Paradisi et al., 2010). Όμως, έχουν παρατηρηθεί υψηλά επίπεδα αντιπονεκτίνης κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σύγκριση με τις τιμές μετά τον τοκετό (Mazaki-Tovi et al., 2007, Kajantie et al., 2005). Καταστάσεις υπερινσουλιναϊμίας όπως είναι η εγκυμοσύνη σχετίζονται με μειωμένο αριθμό υποδοχέων αντιπονεκτίνης (Kadowaki et Yamauchi 2005) και κατά συνέπεια με μειωμένη ευαισθησία στην αντιπονεκτίνη και υψηλότερη έκκριση αντιπονεκτίνης.

Έχει προταθεί ότι η αντιπονεκτίνη ίσως παίζει ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου. Η αντιπονεκτίνη βρίσκεται στο αίμα του ομφάλιου λώρου σε τελειόμηνα νεογνά σε διπλάσια ή τριπλάσια συγκέντρωση σε σχέση με ενήλικες και αυτά τα αυξημένα επίπεδα σχετίζονται με την ηλικία της κύησης (Kotani et al., 2004, Lindsay et al., 2003, Kajantie et al., 2004). Ακόμα παραμένει ασαφές, η προέλευση της υψηλής συγκέντρωσης αντιπονεκτίνης στο έμβρυο. Πιθανών, η σχετικά μικρή μάζα λίπους του εμβρύου ίσως επηρεάζει την συγκέντρωση της εμβρυικής αντιπονεκτίνης μέσω ενός αρνητικού μηχανισμού (Kotani et al., 2004, Lindsay et al., 2003).

Από την άλλη, πολλαπλοί εμβρυικοί ιστοί, όπως αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα των τριχοειδών αγγείων του εμβρύου, εκφράζουν αντιπονεκτίνη και με αυτό τον τρόπο ίσως συνεισφέρουν στις υψηλές συγκεντρώσεις της αντιπονεκτίνης (Henson et al., 1998). Έχει προταθεί ότι η αντιπονεκτίνη μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του εμβρύου αυξάνοντας την ευαισθησία στην ινσουλίνη των εμβρυικών ιστών και τα συστατικά του συστήματος IGF (Mantzoros et al., 2004). Πρόσφατες μελέτες προτείνουν ότι η αντιπονεκτίνη έχει διεγερτική επίδραση στην οστεοβλαστική δραστηριότητα, γεγονός που υποδηλώνει ένα πιθανό ρόλο της αντιπονεκτίνης στην γραμμική ανάπτυξη του εμβρύου (Oshima et al., 2005).

2.3.3 Αντιπονεκτίνη και Πλακούντας

Ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει τη λεπτίνη και τη ρεξιστίνη και τους υποδοχείς για τη λεπτίνη και την αντιπονεκτίνη οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι λιποκίνες είναι πιθανώς ρυθμιστές της λειτουργίας της τροφοβλάστης κατά την εμφύτευση (McDonald et Wolfe 2011). Κατά την εγκυμοσύνη η διαδικασία εξαρτάται από την αποδόμηση και την αναδιαμόρφωση της εξωκυτταρικής μήτρας (ECM), τις αλλαγές των μορίων προσκόλλησης της τροφοβλάστης (CAMs) και τον ελεγχόμενο πολλαπλασιασμό, την μετανάστευση και την εισβολή της τροφοβλάστης στο ενδομήτριο. Επιπλέον, εκτενείς διαδικασίες αγγειογένεσης στις λάχνες του πλακούντα και στο μητρικό ενδομήτριο είναι απαραίτητες έτσι ώστε να παρέχουν επαρκή παροχή αίματος στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και τον πλακούντα (McEwan et al., 2009, Cross et al., 2002, Reynolds et Redmer 2001).

Η αντιπονεκτίνη έχει βρεθεί στο εμβryo-μητρικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια της αναδιαμόρφωσης των σπειροειδών αρτηριών. Παρόλο που προηγούμενες μελέτες προτείνουν ότι η αντιπονεκτίνη παράγεται και εκκρίνεται στον ανθρώπινο πλακούντα, πιο πρόσφατες μελέτες δεν συμφωνούν με τις αρχικές παρατηρήσεις (Camínos et al., 2005, Chen et al., 2006, Corbetta et al., 2005, Pinar et al., 2008) και αποδεικνύουν ότι ο ανθρώπινος πλακούντας εκφράζει τους υποδοχείς AdipoR1, R2 μέσω των οποίων η αντιπονεκτίνη επηρεάζει τις λειτουργίες του πλακούντα (Weiwei et al., 2009).

Πειράματα με αντιπονεκτίνη, δείχνουν ότι μειώνεται ο πολλαπλασιασμός των τροφοβλαστικών κυττάρων και ενσωματώνεται η 3[H]-thymidine (Benaitreau et al., 2009). Απέδειξαν ακόμα ότι αυξάνεται η έκκριση hCG και ότι αυτά τα κύτταρα έχουν μεγαλύτερη μεταναστευτική ικανότητα. Για την επίδραση αυτή μεσολάβησε εν μέρει η αύξηση της δραστηριότητας των MMP-2,-9 και η καταστολή της έκφρασης του TIMP-2 mRNA (Benaitreau et al., 2010). Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, προτάθηκε ότι η αντιπονεκτίνη είναι ικανή για να ρυθμίζει τις διεργασίες του πλακούντα διευκολύνοντας την διαφοροποίηση και την μετανάστευση του, χωρίς απαραίτητα να παρακινούνται και να αυξάνονται μιτογόνες απαντήσεις (Benaitreau et al., 2009,2010).

2.3.4. Αντιπονεκτίνη και Διαφοροποίηση της Τροφοβλάστης

Η αντιπονεκτίνη ασκεί αντιμιτωτική δράση στα τροφοβλαστικά κύτταρα (Benaitreau et al., 2009), και προωθεί την τροφοβλαστική διαφοροποίηση (Benaitreau et al., 2010). Η αντιμιτωτική δράση της αντιπονεκτίνης φάνηκε αρχικά σε BeWo και JEG κυτταρικές σειρές. Μετά την επίδραση αντιπονεκτίνης, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των κυττάρων σε σύγκριση με το μάρτυρα και φάνηκε μείωση στη σύνθεση DNA τροφοβλαστικών κυττάρων 1^{ου} τριμήνου (Benaitreau et al., 2009).

Ο σημαντικός ρόλος της αντιπονεκτίνης στη σύντηξη των συγκυτίων του πλακούντα φάνηκε από μελέτες σε τροφοβλαστικά κύτταρα που εκδήλωσαν υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης μετά από χορήγηση αντιπονεκτίνης. Αυτό

παρατηρήθηκε γιατί υπήρχε αυξημένη εντόπιση της desmoplakin στη κυτταρική μεμβράνη και χαμηλότερη της connexin 43 των τροφοβλαστικών κυττάρων (McDonald et al., 2009). Η αντιγονεκτίνη είναι ικανή να αυξήσει την έκφραση των δεικτών σύντηξης όπως η syncytin-2 και να μειώσει τους υποδοχείς E-cadherin κατά τη μεμβρανική χρώση, υποδεικνύοντας έτσι ότι η προωθεί τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων προς συγκυτιοτροφοβλάστη.

Η αντιγονεκτίνη προκαλεί μεγάλη αύξηση της έκφρασης της λεπτίνης σε BeWo κυτταρικές σειρές και σε κυτταροτροφοβλάστες. Η αντιγονεκτίνη θα μπορούσε να ενισχύσει τη θετική δράση της λεπτίνης στον πολλαπλασιασμό και την εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων (Benaitreu et al., 2010). Επιπλέον, σε BeWo κυτταρικές σειρές καθώς και σε κυτταροτροφοβλάστη πλακούντα (5^η-6^η εβδομάδα), η αντιγονεκτίνη αυξάνει την παραγωγή της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG). Αντιθέτως σε κυτταροτροφοβλάστη πλακούντα (10^η-11^η εβδομάδα), η αντιγονεκτίνη μειώνει την παραγωγή της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) (Benaitreu et al., 2010). Αυτές οι παρατηρήσεις έρχονται σε αντίθεση με άλλες μελέτες που δείχνουν μείωση της παραγωγής της χοριακής γοναδοτροφίνης (hCG) λόγω χορήγησης αντιγονεκτίνης σε συγκυτιοτροφοβλάστες (McDonald et al., 2009). Τέλος, η αντιγονεκτίνη χαρακτηρίζεται ως ο νέος ρυθμιστής της παραγωγής της λεπτίνης και της χοριακής γοναδοτροφίνης, που είναι σημαντικές πλακουντιακές ορμόνες (Benaitreau et al., 2010).

Το μονοπάτι της αντιγονεκτίνης ξεκινάει από την σύνδεση του υποστρώματος με τους υποδοχείς ADIPOR1, ADIPOR2 που προκαλούν την ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών κυρίως της AMPK αλλά και PKA μονοπάτια (Ouchi et al., 2000). Η αύξηση της παραγωγής του cAMP λόγω του PKA είναι το κύριο σήμα για τη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης (Keryer et al., 1998). Η αντιγονεκτίνη αυξάνει την απελευθέρωση του cAMP σε BeWo κυτταρικές σειρές ενισχύοντας έτσι το PKA μονοπάτι (Benaitreau et al., 2010).

Η διαδικασία προς το σχηματισμό συγκυτιοτροφοβλάστης σχετίζεται με αρχικά στάδια του αποπτωτικού καταρράκτη μέσα σε κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα (Huppertz et al., 2004). Οι κασπάσες έναρξης 8 και 14 σχετίζονται με αυτή τη

διαδικασία (White et al., 2007, Black et al., 2004). Η αντιγονεκτίνη έχει περιγραφεί ως προ-αποπτωτικός παράγοντας σε αρκετούς κυτταρικούς τύπους, όπως καρκινικά κύτταρα του μαστού (Dieudonne et al., 2006) και ενδομητριάκα κύτταρα (Cong et al., 2007). Παραμένει όμως το ερώτημα αν η δράση της αντιγονεκτίνης στη τροφοβλαστική διαφοροποίηση μεσολαβεί από αυτές τις κασπάσες.

2.4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΚΑΣΠΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΠΤΩΣΗ

Η απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι ένας φυσιολογικός μηχανισμός της ανάπτυξης όλων των ιστών. Η απόπτωση είναι μια γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία για την εύρυθμη λειτουργία όλων των κυττάρων ενός οργανισμού. Κατά την απόπτωση εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα ενεργοποιούν τον αποπτωτικό μηχανισμό με σκοπό την απομάκρυνση των κυττάρων που διανύουν το στάδιο της τελικής διαφοροποίησης ή που έχουν επιζήσει μετά από κάποια γενετική βλάβη. Στην απόπτωση απομακρύνονται κύτταρα που δεν χρειάζονται, ή είναι επιβλαβή και ενδυναμώνεται η ανοσολογική άμυνα ενάντια σε παθογόνους μικροοργανισμούς, ακόμα και στην προστασία από τον καρκίνο (Ellis et al., 1991).

Τα χαρακτηριστικά της απόπτωσης είναι ότι τα κύτταρα χάνουν τις μεσοκυττάριες συνδέσεις και τις εξειδικευμένες δομές της κυτταρικής επιφάνειας και δημιουργούν ακανόνιστες κυτταροπλασματικές προεκβολές. Το κυτταρόπλασμα των κυττάρων συρρικνώνεται και η χρωματίνη του πυρήνα συμπυκνώνεται σε μία ή περισσότερες μάζες. Ακόμα, το DNA και ο πυρήνας του κυττάρου κατακερματίζονται και σχηματίζουν αποπτωτικά σωμάτια. Τα σωμάτια περιβάλλονται από μεμβράνη, έχουν λεία επιφάνεια και περιέχουν ακέραια οργανίδια και τμήματα του πυρήνα. Τέλος, τα αποπτωτικά σωμάτια φαγοκυτταρόνονται από τα μακροφάγα ή από γειτονικά κύτταρα. Με την ταχεία απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμμάτων αποφεύγεται κάθε φλεγμονώδης αντίδραση από το ανοσοποιητικό σύστημα (Lockskin et al., 1991).

Υπάρχουν τρεις μεγάλες οικογένειες πρωτεϊνών που σχετίζονται με την απόπτωση, οι κασπάσες, οι ενδονουκλεάσες και οι τρανσγλουταμινάσες. Οι κασπάσες (Cysteine Aspartate Specific Proteases) είναι πρωτεάσες με πολύ εξειδικευμένη δράση και

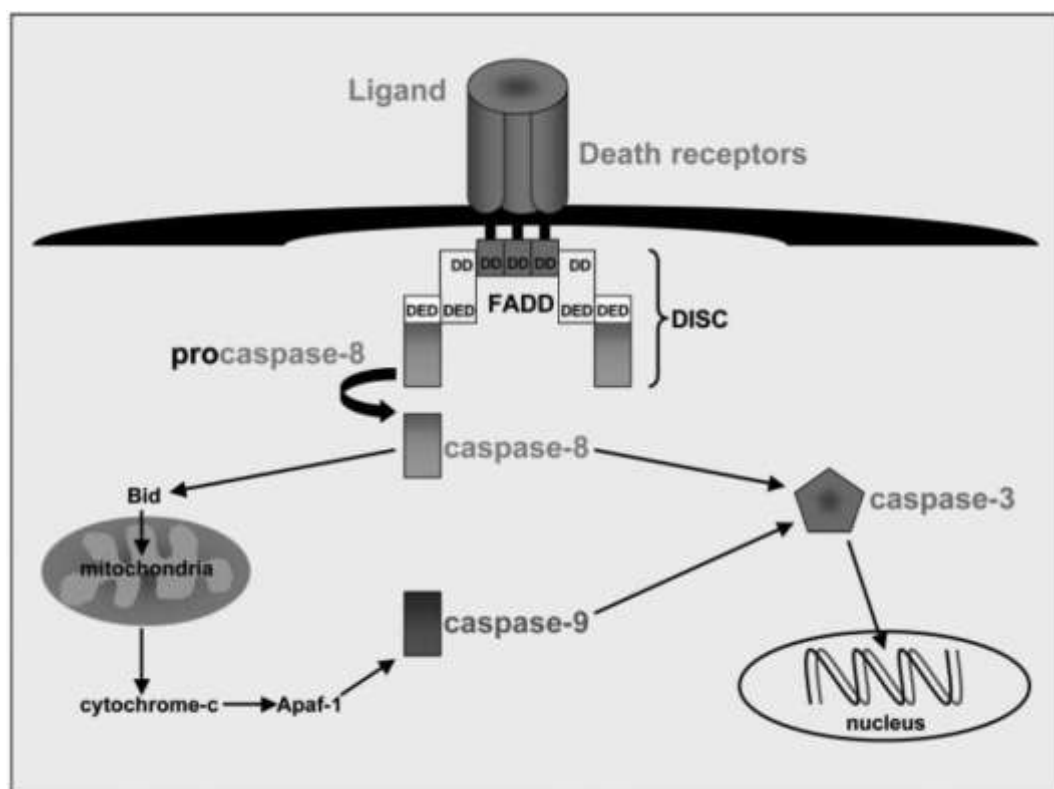
κόβουν την πολυπεπτιδική αλυσίδα μόνο μετά από υπόλειμμα ασπαρτικού οξέος. Οι κασπάσες υπάρχουν στο κυτταρόπλασμα υπό τη μορφή προ-ενζύμων. Ο ρόλος των κασπασών είναι να διακόπτουν την επικοινωνία με τα γειτονικά κύτταρα, να ξαναοργανώνουν τον κυτταροσκελετό και να σταματούν την επιδιόρθωση του DNA. Ακόμα οι κασπάσες αποδιοργανώνουν τις λαμίνες και στέλνουν μηνύματα για φαγοκυττάρωση. Τέλος, ενεργοποιούν πρωτείνες-στόχους για την οριστική παύση του μεταβολισμού.

Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί 11 κασπάσες. Οι κασπάσες διακρίνονται σε αυτές που προκαλούν την έναρξη (initiator) της αποπτωτικής διαδικασίας και σε αυτές που πυροδοτούν ή εκτελούν (effector or executioner) την αποπτωτική διαδικασία. Οι κασπάσες έναρξης είναι οι κασπάσες -2, -8, -9 και -10, ενώ οι κασπάσες πυροδότησης είναι οι -3, -6, -7. Οι κασπάσες -4 και -5 εκφράζονται σε μερικές περιπτώσεις λευκοδερμίας φαίνεται να σχετίζονται με αυτοάνοσα νοσήματα και δεν ταξινομούνται στις κασπάσες έναρξης ή πυροδότησης και σε συνδυασμό με την κασπάση 1, εμπλέκονται στην ωρίμανση των κυτοκινών. Η κασπάση 14 βρέθηκε να εμπλέκεται στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των κυττάρων της επιδερμίδας.

Η έναρξη της απόπτωσης πραγματοποιείται με την ενεργή κασπάση, η οποία διαμέσου πρωτεολυτικών γεγονότων ενεργοποιεί τις κασπάσες τελεστές, οι οποίες με τη σειρά τους πρωτεολύουν πρωτεΐνες στόχους (Fischet et al., 2003). Ανάλογα με το ερέθισμα, η απόπτωση ξεκινάει από ένα ή δύο γνωστά μονοπάτια: το μιτοχονδριακό ή εσωτερικό μονοπάτι και το εξωτερικό μονοπάτι όπου μεσολαβούν οι υποδοχείς θανάτου. Στο εξωτερικό μονοπάτι προηγείται η ενεργοποίηση του υποδοχέα για τη μεταγωγή σήματος, εκ των οποίων οι πιο γνωστοί είναι ο υποδοχέας του παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-R), ο FAS (CD95) και TRAIL-R1/TRAILR2 (Cheng et al., 1994). Και οι δύο είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που στην κυτταροπλασματική τους περιοχή φέρουν ένα τμήμα που είναι απαραίτητο για την μεταγωγή του αποπτωτικού σήματος (apoptotic signal). Η σύνδεση του συνδέτη με τον υποδοχέα από τη μια ενεργοποιεί τον υποδοχέα και από την άλλη προκαλεί τη σύνδεση των ενεργητικών κασπασών, την προ-κασπάση-8 και -10 (Muzio et al., 1996, Wang et al., 2001). Η διαδικασία υποβοηθείται από πρωτεϊνικά μόρια, γνωστά ως “προσαρμοστές” που είναι συγκεκριμένοι για κάθε υποδοχέα και οι πιο γνωστοί είναι ο TRADD (TNF-

associated domain) και ο FADD (FAS-activated death domain) (Chinnaiyan et al., 1996). Στο σύμπλοκο αυτό η προ-κασπάση-8 μετατρέπεται σε ενεργό κασπάση-8 μέσω αυτοπρωτεόλυσης. Η ενεργή μορφή της κασπάσης-8 μετακινείται στο κυτοσόλιο και πρωτεολύει πρωτεΐνες στόχους, εκ των οποίων οι σπουδαιότερες είναι η προκασπάση-3 και η Bid (η οποία ανήκει στην μεγάλη οικογένεια των Bcl-2 πρωτεϊνών). Η κασπάση 8 διασπά την Bid, προκαλώντας την μετακίνηση της στα μιτοχόνδρια και ενεργοποιώντας το εσωτερικό μονοπάτι (Li et al., 1998). Η προσκόλληση της στις εξωτερικές μεμβράνες των μιτοχονδρίων προκαλεί τη μετακίνηση του κυτοχρώματος c και επεμβαίνει στην τοπολογία της αποπτωτικής πρωτεΐνης Bax. Το κυτόχρωμα c με τη σειρά του συνδέεται ισχυρά με την κυτταροπλασματική πρωτεΐνη Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1), προκαλώντας την ενεργοποίησή της. Η διαδικασία πραγματοποιείται με κατανάλωση ενέργειας, ATP και έχει ως αποτέλεσμα την αποκάλυψη θέσεων σύνδεσης με την προ-κασπάση 9. Το παραπάνω τριμερές, δηλαδή το cyt c / Apaf-1 / προ-κασπάση-9 συγκροτούν το αποπτόσωμα (Li et al., 1997). Από το αποπτόσωμα η προ-κασπάση-9 μετατρέπεται σε ενεργό κασπάση-9 η οποία αναγνωρίζει και ενεργοποιεί τις κασπάσες-3,-6,-7 (Hirata et al., 1998).

Οι κασπάσες πυροδότησης διασπούν μια ποικιλία ζωικών κυτταρικών πρωτεϊνών, συμπεριλαμβανομένου επιδιορθωτικές DNA πολυμεράσες, πυρηνικές λαμίνες και κυτοσκελετικές πρωτεΐνες (Fischer et al., 2003). Εξάλλου, ο πυρηνικός αναστολέας της απόπτωσης (ICAD) διασπάται από τις κασπάσες πυροδότησης, το DNA κόβεται σε τμήματα μεγέθους 200kb (Enari et al., 1998) και τελικά καταλήγει σε απόπτωση.



Εικόνα 11: Το εσωτερικό και εξωτερικό μονοπάτι της απόπτωσης (Shawn et al., 2005)

2.4.1 Ο ρόλος των κασπάσων στη διαφοροποίηση της τροφοβλάστης

Οι εναρκτήριες κασπάσες -8 και -10 ενεργοποιούνται σε ένα υποσύνολο διαφοροποιημένων κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων, που πιθανώς προορίζονται για τη σύντηξη των συγκυτίων (Huppertz et al., 1999). Σε αντίθεση οι κασπάσες πυροδότησης -3, -6 και -7 εκφράζονται μόνο στις ανενεργές τους μορφές στη κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα (Burton et al., 2003).

Η εναρκτήρια κασπάση 8 ενεργοποιείται λόγω της αλληλεπίδρασης υποδοχέα-προσδέματος (TNF-α πρόσδεμα και TNF-R1 υποδοχέα) (Yui et al., 1996, Huppertz et al., 1999). Η κυτοκίνη TNF-α είναι ικανή να επάγει την απόπτωση σε απομονωμένα τροφοβλαστικά κύτταρα in vitro (Yui et al., 1994, Reister et al., 2001). Ο κρίσιμος ρόλος της κασπάσης 8 στην προετοιμασία της κυτταροτροφοβλάστης για σύντηξη των συγκυτίων καταδείχτηκε το 2004 από Black et al, που έδειξε ότι η καταστολή του αναστολέα της έκφρασης και ενεργοποίησης της κασπάσης 8 εμπόδισε την σύντηξη των συγκυτίων, με αποτέλεσμα τη συσσώρευση μονοκυτταρικών στιβάδων

κυτταροτροφοβλάστης. Προσπάθειες για απομόνωση κυτταροτροφοβλάστης αναπόφευκτα οδηγεί σε μίγμα από κυτταροτροφοβλαστικά και θραύσματα από συγκυτιοτροφοβλαστικά κύτταρα (Huppertz et al., 1999, Guilbert et al., 2002).

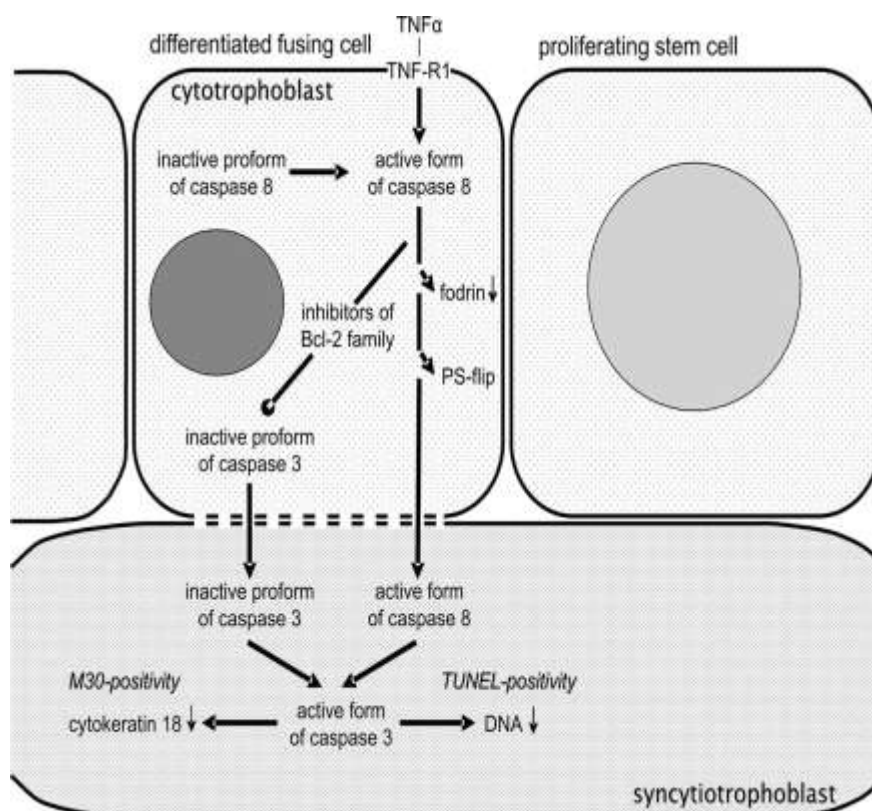
Η ενεργοποίηση της κασπάσης 8 οδηγεί σε διάσπαση πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, όπως α -fodrin, και στην ανακατανομή των φωσφολιπιδίων από το εσωτερικό προς το εξωτερικό της πλασματικής μεμβράνης, που ονομάζεται PS-flip (Huppertz et al., 1999). Στην συνέχεια ενεργοποιείται το μονοπάτι PKA που οδηγεί σε ενεργοποίηση του μεταφραστικού παράγοντα GCM1, ο οποίος με τη σειρά του αυξάνει την έκφραση της πρωτεΐνης σύντηξης syncytin 1. Η α -fodrin σε συνδυασμό με την ανακατανομή των φωσφολιπιδίων και της πρωτεΐνης σύντηξης καταλήγουν στο σχηματισμό του πόρου σύντηξης ανάμεσα στην κυτταροτροφοβλάστη και συγκυτιοτροφοβλάστη. Κατά τη διάρκεια της σύντηξης μεταφέρεται στη συγκυτιοτροφοβλάστη οι ενεργές κασπάσες -8, -3, καθώς και πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και άλλα οργανίδια (Huppertz et Gauster 2011). Συνήθως, ο καταρράκτης της απόπτωσης έχει σαν αποτέλεσμα τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο περίπου μέσα σε 24 ώρες. Όμως, στη συγκυτιοτροφοβλάστη οι πυρήνες παραμένουν βιώσιμοι για μερικές βδομάδες (Huppertz et al., 2006).

Οι ανενεργές προμορφές της κασπάσης 8 φαίνεται να είναι παρούσες μόνο στην κυτταροτροφοβλαστική στιβάδα. Η ενεργή κασπάση 8 που ενσωματώνεται στην συγκυτιοτροφοβλάστη μέσω των συγκυτίων συγχώνευσης ίσως εξαντλεί τις ανενεργές ισομορφές μέσα στα συγκύτια και έτσι αποφεύγεται η περαιτέρω αυτοκατάλυση της κασπάσης. Σε τροφοβλάστες αρχικού τριμήνου φάνηκε ότι τα στάδια της διαφοροποίησης σχετίζονται με την δραστηριότητα των κασπασών (Yusuf et al., 2002). Σε λιγότερο διαφοροποιημένη (μονοκύτταρη) τροφοβλάστη η δραστηριότητα των κασπασών -3, -6, -9 αυξάνονται σημαντικά σε σύγκριση με περισσότερο διαφοροποιημένα (πολυπύρρηνα) κύτταρα (Yusuf et al., 2002). Επομένως, ειδικοί μηχανισμοί μέσα στη συγκυτιοτροφοβλάστη ίσως αναστέλλουν τις ενεργές κασπάσες αλλά επίσης ενεργοποιούν τις επόμενες πρωτεΐνες.

Οι υποψήφιες πρωτεΐνες είναι μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών Bcl-2 που ίσως συμμετέχουν στην ρύθμιση της προόδου του καταρράκτη της απόπτωσης στην συγκυτιοτροφοβλάστη. Αντι-αποπτωτικές πρωτεΐνες όπως Bcl-2 και Mcl-1 έχουν

περιγράφει ότι εκφράζονται στην συγκυτιοτροφοβλάστη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης (Sakuragi et al., 1994). Έτσι, η συγκυτιοτροφοβλάστη ίσως χρησιμοποιεί αντι-αποπτωτικά μέλη της Bcl-2 οικογένειας για να καταστείλει την δραστηριότητα των κασπασών μετά την ενσωμάτωση της ενεργής κασπάσης 8 κατά τη σύντηξη των συγκυτίων.

Η ενεργή κασπάση 8 ίσως αναστέλλεται άμεσα από αναστολείς όπως η c-Flip (cellular FLICE inhibitory protein). Η c-Flip ενεργεί άμεσα και προσδένει την κασπάση 8, οδηγώντας στην ενεργοποίηση ή αναστολή της πρωτεάσης (Chang et al., 2002). Η c-Flip εκφράζεται στις κυτταρικές σειρές BeWo, Jeg-3, Jar (Dash et al., 2007, Ka et al., 2006, Rajashekhar et al., 2003), και συνεντοπίζεται στα ίδια κύτταρα με την κασπάση 8 καθώς και στη τροφοβλαστική στιβάδα. Όμως, η c-Flip είναι παρούσα σε συγκεκριμένες θέσεις, καθώς, ίσως σε εκείνες τις θέσεις έγινε η σύντηξη (Ka et al., 2006).



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση του καταρράκτη της απόπτωσης σε τροφοβλαστικές λάχνες (Huppertz et al., 2006)

Η διαδικασία της σύντηξης ενσωματώνει κυτταροπλασματικά συστατικά, πυρήνες καθώς και τα υλικά από το καταρράκτη της απόπτωσης από τη κυττοτροφοβλάστη στη συγκυτιοτροφοβλάστη. Όπως προαναφέρθηκε, στις πρωτείνες περιλαμβάνονται αντι-αποπτωτικά ένζυμα και έτσι εξηγείται γιατί καθυστερεί η απόπτωση της συγκυτιοτροφοβλάστης. Έχει παρατηρηθεί ότι ένας πυρήνας από τροφοβλαστικά κύτταρα παραμένει στη συγκυτιοτροφοβλάστη για περίπου 3-4 εβδομάδες μετά τη σύντηξη (Huppertz et al., 1998, 2002).

Κάποια στιγμή το μονοπάτι της απόπτωσης ενεργοποιείται ξανά μετά από αρκετές εβδομάδες αλλά οι μηχανισμοί πυροδότησης είναι ακόμα άγνωστοι. Η συγκυτιοτροφοβλάστη ίσως παραμένει σε λανθάνουσα φάση της απόπτωσης, επειδή οι γερασμένοι πυρήνες που προήρθαν από τη σύντηξη πακετάρονται σε αποπτωτικά σωμάτια. Οι πυρήνες των συγκυτίων που ενσωματώνονται στη συγκυτιοτροφοβλάστη είναι μεγάλοι, ωοειδείς και πλούσιοι σε ευχρωματίνη. Μετά τη σύντηξη οι πυρήνες μικραίνουν και πυκνώνουν. Τελικά, εμφανίζονται πυκνά συσσωματώματα της χρωματίνης κάτω από τη πυρηνική μεμβράνη (Huppertz et al., 1998, Nelson et al., 1996, Mayhew et al., 1999). Επιπλέον, άλλα οργανίδια όπως το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, τα πολυσώματα, και τα μιτοχόνδρια μειώνονται (Benirschke et Kaufmann 2000).

Τελικά, οι κασπάσες πυροδότησης όπως η κασπάση -3 και -6 είναι ενεργές σε συγκεκριμένες θέσεις της συγκυτιοτροφοβλάστης, οδηγώντας στη διάσπαση και υποβάθμιση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Huppertz et al., 1998, 1999). Τα στάδια της απόπτωσης στη συγκυτιοτροφοβλάστη είναι αυστηρά ρυθμισμένα τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Δηλαδή, παρά την είσοδο της κυτταροτροφοβλάστης σε συγκύτια χωρίς πλευρικά σύνορα, η ενεργοποίηση της κασπάσης 3 και η εξέλιξη προς πυρηνική απόπτωση περιορίζεται σε διακριτές περιοχές που τελικά εξελίσσονται σε αποπτωτικά σωμάτια. Υπό κανονικές συνθήκες, τα εκφυλιστικά αποτελέσματα, όπως η αποικοδόμηση του DNA (TUNEL positivity) και η αποικοδόμηση των κυτταροκερατίνων ινιδίων (effector caspase-dependent cytokeratin 18 neo-epitope formation-M30 reactivity) περιορίζεται σε συγκεκριμένες περιοχές και δεν κατανέμονται σε άλλες περιοχές (Black et al., 2004, Kadyrov et al., 2001, Huppertz et al., 2003). Η αποικοδόμηση του κυτταροσκελετού σε τμήματα της συγκυτιοτροφοβλάστης μπορεί να είναι υπεύθυνη για τη μειωμένη αγκύρωση των

ηλικιωμένων συγκυτιακών πυρήνων. Αυτοί οι πυρήνες φαίνεται να κινούνται προς τις άκρες των λαχνών και να συσσωρεύονται σε αποπτωτικά σωματίδια. Η τελική εκδήλωση του καταρράκτη της απόπτωσης στο εσωτερικό της συγκυτιοτροφοβλάστης είναι το πακετάρισμα των παλιών και αργά αποπτωτικών πυρήνων σε προεξοχές της κορυφαίας μεμβράνης της συγκυτιοτροφοβλάστης, που ονομάζεται συγκυτιακοί κόμβοι. Στην πολυπύρηνη στιβάδα ο σχηματισμός συγκυτιακών κόμβων αποτελεί το τελευταίο στάδιο της απόπτωσης (Huppertz et al., 1998, Nelson et al., 2006, Mayhew et al., 1999). Τέλος, τα αποπτωτικά σωματίδια απελευθερώνονται από την πλασματική μεμβράνη της συγκυτιοτροφοβλάστης και εξωθούνται στη μητρική κυκλοφορία.

ΣΚΟΠΟΣ

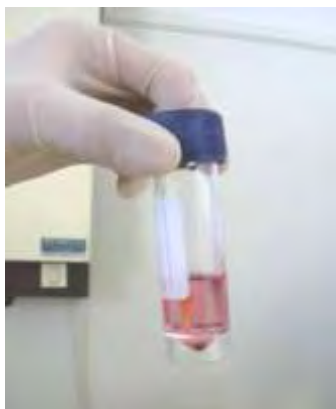
Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτέλεσε η διερεύνηση του ρόλου της Αντιγονεκτίνης στη διαφοροποίηση του τροφοβλαστικού ιστού. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε το αποπτωτικό μονοπάτι μέσω της δραστηριότητας της κασπάσης 3 σε τροφοβλαστικά κύτταρα 11^{ης}-13^{ης} εβδομάδας κύησης.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ελήφθησαν από γυναίκες φυσιολογικής κύησης που υπεβλήθησαν σε λήψη χοριακών λαχνών 11^{ης}-13^{ης} εβδομάδα κύησης στη Γυναικολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Έγινε καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων από τις χοριακές λάχνες και μετά από επίδραση με Αντιγονεκτίνη έγινε απομόνωση ολικού πρωτεϊνικού εκχυλίσματος. Στη μελέτη τελικά συμπεριλήφθηκαν 4 δείγματα χοριακών λαχνών.

Το βιολογικό υλικό που καλλιεργείται προέρχεται από βιοψία. Τοποθετείται σε μπουκαλάκι με θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται στο εργαστήριο για επεξεργασία. Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα προκύπτουν από δείγμα χοριακών λαχνών τροφοβλάστης την 11^η-13^η εβδομάδα κύησης. Η καλλιέργεια τροφοβλαστικού ιστού γίνεται συνήθως την ίδια ημέρα της λήψης ή την επόμενη.



Εικόνα 13: Βιοψία χοριακών λαχνών

Η καλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε επωαστικό κλίβανο (Heraus Instruments), ο οποίος παρέχει σταθερή θερμοκρασία 37° C, κατάλληλες συνθήκες υγρασίας και εμπλουτισμένη ατμόσφαιρα με 5% CO₂. Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε ειδικό αποστειρωμένο χώρο και όλοι οι χειρισμοί των κυττάρων έγιναν μέσα σε εστία κάθετης νηματικής ροής προς αποφυγή εξωτερικών μολύνσεων. Η παρατήρηση των κυττάρων έγινε σε μικροσκόπιο ανάστροφης φάσης (Axiovert S100, Zeiss).

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ:

ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ

1. Σε τρυβλίο Petri με 1-3ml PBS διαχωρίζω τις λάχνες από τα πήγματα και τις μεταφέρω σε 15αρι falcon που περιέχει PBS.
2. Περιμένω να καθιζάνουν οι λάχνες και αφαιρώ το υπερκείμενο.

ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΙΣΤΟΥ

1. Στο ίζημα των λαχνών προσθέτω 1-2 ml κολλαγενάση και 1-2 ml θρυψίνη και επωάζω στον κλίβανο για μια ώρα (κάθε τόσο ανακινώ το falcon).
2. Μετά την επώαση μπλοκάρω τη δράση των ενζύμων με θρεπτικό DMEM και φυγοκεντρώ στα 1700 rpm για 7min.

3. Αφαιρώ το υπερκείμενο και προσθέτω 1ml θρεπτικό στο ίζημα
4. Με τη χρήση σύριγγας ινσουλίνης και πράσινης βελόνες περνάω το εναιώρημα μέσα από τη σύριγγα για τουλάχιστον 20 φορές
5. Φυγοκεντρώ στα 800rpm για 10 λεπτά
6. Αφαιρώ το υπερκείμενο και προσθέτω θρεπτικό αναδιαλύοντας το ίζημα
7. Το καλλιεργώ σε T25 φλάσκα
8. Ανακαλλιέργεια όταν τα κύτταρα φθάσουν σε σύγκλιση 80%

4.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΡΟΦΟΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Μετά την απομόνωση των τροφοβλαστικών κυττάρων, καλλιεργούμε τα κύτταρα σε φλάσκες T25. Η ανακαλλιέργεια των τροφοβλαστικών κυττάρων γινόταν κάθε 7-10 ημέρες περίπου, ανάλογα με το μέγεθος του αρχικού ιστού και τον αριθμό των κυττάρων που απομονώνονταν, όταν τα κύτταρα είχαν αυξήσει τον πληθυσμό τους και είχαν καλύψει όλη την επιφάνεια της φλάσκας. Μετά από 3 έως 5 ανακαλλιέργειες γινόταν κατάψυξη των κυττάρων για μελλοντική χρήση.



Εικόνα 14: Καλλιέργεια Τροφοβλαστικών κυττάρων

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Αφαιρώ το θρεπτικό υλικό από τη φλάσκα και ξεπλένω τη φλάσκα με PBS
2. Αφαιρώ το PBS και προσθέτω θρυψίνη (1-2 ml) να καλύπτεται η επιφάνεια της φλάσκας και τοποθετώ στον κλίβανο για 5 λεπτά-χτυπώ δυνατά τη φλάσκα για να αποκολληθούν τα κύτταρα.
3. Μπλοκάρω τη θρυψίνη με θρεπτικό
4. Φυγοκεντρώ στα 2000rpm για 5 λεπτά

5. Αφαιρώ το υπερκείμενο προσθέτω θρεπτικό και τα καλλιεργώ σε μεγαλύτερη φλάσκα

4.3. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΖΩΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα αξιολογήθηκαν για τη ζωτικότητα τους πριν υποβληθούν σε φαινοτυπικό έλεγχο. Τα κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη χρήση θρυψίνης (Biochrome) και επώαση στους 37°C για 5-7 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρωση στα 1700 rpm για 7 λεπτά, το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα μετρήθηκαν σε αντικειμενοφόρο Newbauer με τη χρωστική μπλε του τρυπανίου, όπου μπλε βάφονται τα νεκρά κύτταρα.

4.4 ΚΑΤΑΨΥΞΗ ΚΑΙ ΑΠΟΨΥΞΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Για την κατάψυξη των κυττάρων, τα κύτταρα τοποθετούνται σε ειδικό κρυοφιαλίδιο σε συγκέντρωση 4-5 x 10⁶/ml θρεπτικού υλικού το οποίο περιέχει 10% Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich) και 30% FBS χωρίς προσθήκη αντιβιοτικών. Το DMSO συντελεί στην αργή ψύξη των κυττάρων και του θρεπτικού υλικού, αποφεύγοντας τη δημιουργία κρυστάλλων που θα κατέστρεφαν την κυτταρική μεμβράνη. Η κατάψυξη των κυττάρων γίνεται σταδιακά. Αρχικά το κρυοφιαλίδιο τοποθετείται στους -20° C για 4 ώρες, κατόπιν στους -80° C για 24ώρες και τελικά στους -150° C.

Σε αντίθεση με την σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων, η απόψυξή τους γίνεται γρήγορα με την τοποθέτηση του κρυοφιαλιδίου σε υδατόλουτρο στους 37° C και άμεση μεταφορά του περιεχομένου του φιαλιδίου σε σωληνάριο των 15ml το οποίο περιέχει 5ml πλήρες θρεπτικό υλικό. Το σωληνάριο φυγοκεντρείται για 5 λεπτά, το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10ml πλήρους θρεπτικού υλικού και τοποθετούνται σε φλάσκα των 25ml και στη συνέχεια στον επωαστικό κλίβανο.

4.5 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕ ΑΝΤΙΠΟΝΕΚΤΙΝΗ ΣΤΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η τελευταία ανακαλλιέργεια των κυττάρων γίνεται σε 6-well και όταν καλύψουν την επιφάνεια των well ξεκινάμε την επίδραση με αντιγονεκτίνη. Την πρώτη μέρα απομακρύνουμε το πλήρες θρεπτικό υλικό από τα well, ξεπλένουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και προσθέτουμε σκέτο θρεπτικό υλικό χωρίς FBS. Η διαδικασία ονομάζεται starvation. Αφήνουμε τα κύτταρα στον κλίβανο 37° C, 5% CO₂ για μία ημέρα. Την δεύτερη ημέρα απομακρύνουμε το σκέτο θρεπτικό υλικό και κάνουμε την επίδραση με την ορμόνη Αντιγονεκτίνη. Έχουμε το control που περιέχει σκέτο θρεπτικό υλικό και για τα υπόλοιπα υπολογίζουμε την ποσότητα της Αντιγονεκτίνης που απαιτείται για κάθε συγκέντρωση από 25ng/ml, 250ng/ml, 500ng/ml. Αφήνουμε την Αντιγονεκτίνη στα κύτταρα για 24, 48, 72 ώρες και μετά το πέρας των ωρών απομακρύνουμε τα κύτταρα για περαιτέρω επεξεργασία.

4.6 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό με την αντιγονεκτίνη από τα κύτταρα, ξεπλένουμε με ρυθμιστικό διάλυμα PBS και προσθέτουμε θρυψίνη ώστε να αποκολληθούν τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας. Απενεργοποιούμε τη δράση της με θρεπτικό υλικό και φυγοκεντρούμε στις 2000 στροφές για 5 λεπτά. Επαναδιαλυτοποιούμε το ίζημα με ρυθμιστικό διάλυμα και ξαναφυγοκεντρούμε στις ίδιες στροφές. Στο ίζημα προσθέτουμε αναστολείς πρωτεασών για να εμποδίσουν τις πρωτεάσες να αποικοδομήσουν τις πρωτεΐνες και διάλυμα λύσης κυττάρων (RIPA buffer) για να σπάσουν οι κυτταρικές μεμβράνες και να απελευθερωθούν οι πρωτεΐνες των κυττάρων.

Το διάλυμα λύσης αποτελείται από:

- Tris –HCl 1M, pH=8
- EDTA 0,5M
- NaCl 1M
- Γλυκερόλη 100%
- Triton X-100 100%
- Δις απεσταγμένο νερό

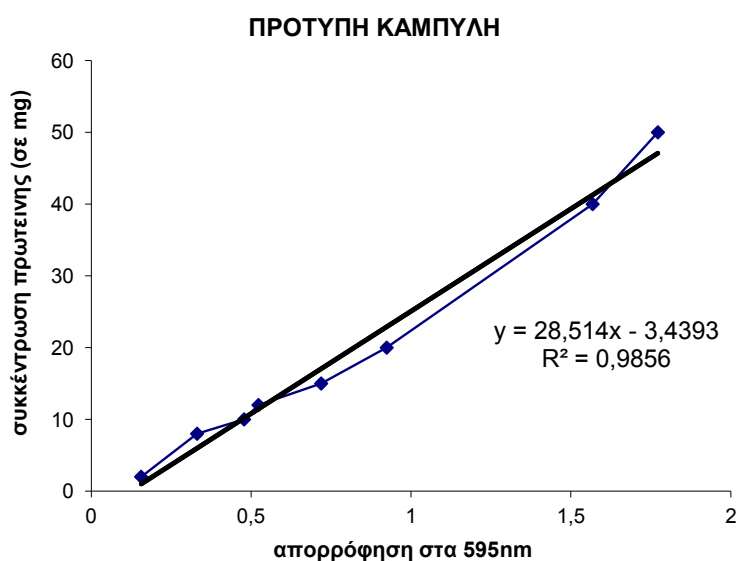
ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

1. Συλλογή κυττάρων από τα 6-well
2. Προστίθεται 6μL αναστολείς πρωτεασών και 60μL διαλύματος λύσης και επαναδιάλυση του ιζήματος.

3. Ακολουθεί μηχανική ανάδευση σε vortex που εναλλάσσεται με δεκάλεπτη παραμονή των δειγμάτων στον πάγο, για 40 λεπτά συνολικά και φυγοκέντρωση στις 13000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
4. Μεταφορά υπερκειμένου σε νέο σωληνάριο
5. Ακολουθεί φωτομέτρηση για τον έλεγχο της πρωτεϊνικής ποσότητας

4.7 BRADFORD PROTEIN ASSAY

Ο υπολογισμός της ποσότητας των πρωτεϊνών που απομονώθηκαν έγινε με τη χρήση Bio-Rad Protein Assay. Συγκεκριμένα, ο υπολογισμός έγινε με τη μέθοδο Bradford, κατά την οποία μια χρωστική (Coomassie Brilliant Blue G-250), όταν δεσμευτεί σε μια πρωτεΐνη αλλάζει το μέγιστο απορρόφησης από τα 460nm στα 595nm. Καταρχήν, δημιουργήθηκε μια πρότυπη καμπύλη συσχέτισης τιμών απορρόφησης με πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις, με τη χρήση δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, ποσότητες από 1μg έως 20μg αλβουμίνης του ορού βόως (Bovine Serum Albumine-BSA) διαλύθηκαν σε 800μl dH₂O. Κατόπιν, προστέθηκαν 200μl χρωστικής, το μίγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, αναδεύτηκε ήπια αρκετές φορές, μεταφέρθηκε σε κυβέττα και φωτομετρήθηκε στα 595 nm (BECKMAN DU520). Από τις τιμές των απορροφήσεων των διαφόρων συγκεντρώσεων κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη.



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών.

Όσον αφορά στις πρωτεΐνες άγνωστης συγκέντρωσης, ποσότητα 5μl από το διάλυμα προστέθηκε σε 495μl διαλύματος Bradford και ακολούθησε η παραπάνω διαδικασία. Οι τιμές απορρόφησης που προέκυψαν συγκρίθηκαν με την πρότυπη καμπύλη και βρέθηκε η συγκέντρωση σε πρωτεΐνη των απομονωθέντων δειγμάτων.

4.8 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ-SDS

Η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στο φαινόμενο ότι ένα μόριο με καθαρό φορτίο, όπως πρωτεΐνες, DNA, RNA, θα μετακινηθεί σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα μετακίνησης (u) μίας πρωτεΐνης (ή κάθε μορίου) σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, εξαρτάται από την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου (E), το καθαρό φορτίο της πρωτεΐνης (z) και τον συντελεστή τριβής (f):

$$u = Ez/f$$

Η σταθερά τριβής εξαρτάται από τη μάζα και το σχήμα του μορίου που μετακινείται, καθώς και από την πυκνότητα του μέσου. Ο ηλεκτροστατικός διαχωρισμός γίνεται σχεδόν πάντα σε πηκτή και όχι σε υγρό, κυρίως για δύο λόγους. Καταρχήν η πηκτή καταστρέφει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας – απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον, η πηκτή λειτουργεί σαν μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς μορίων. Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής κινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή με διαφορετικές ταχύτητες. Οι πηκτές πολυακρυλαμιδίου είναι προτιμότερες για ηλεκτροφόρηση, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις, ενώ οι πόροι της πηκτής μπορούν εύκολα να ρυθμιστούν, επιλέγοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις ακρυλαμιδίου και μεθυλενοδισακρυλαμιδίου, στον πολυμερισμό για τον σχηματισμό της πηκτής.

Σε μία ηλεκτροφόρηση πολυακρυλαμιδίου κάτω από αποδιατακτικές συνθήκες, οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κυρίως βάσει του μοριακού τους βάρους. Το

δωδεκακυλοθειϊκό (SDS) είναι ένα ανιοντικό απορρυπαντικό που καταστρέφει τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μιας φυσικής πρωτεΐνης. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις κυρίες αλυσίδες σε αναλογία ενός μορίου SDS ανά 2 αμινοξέα, που δίνει στο σύμπλοκο του SDS με την αποδιαταγμένη πρωτεΐνη ένα μεγάλο φορτίο, περίπου ανάλογο με τη μάζα της. Το αρνητικό φορτίο που αποκτάται με τη δέσμευση του SDS είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερο απ' ό,τι το αρχικό φορτίο της φυσικής πρωτεΐνης, επομένως αυτό το αρχικό φορτίο καθίσταται αμελητέο. Η μετακίνηση γίνεται σε λεπτή κατακόρυφη στιβάδα και με αυτόν τον τρόπο ηλεκτροφόρησης η μετακίνηση των περισσότερων πολυπεπτιδικών αλυσίδων κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι απολύτως ανάλογη με το λογάριθμο της μάζας τους.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών έγινε με ηλεκτροφόρηση μιας διάστασης σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου-SDS.

- Πριν την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα προετοιμάζονται με την προσθήκη 5μl διαλύματος χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης (Sample Buffer, Invitrogen) και 2 μl αναγωγικού διαλύματος (Reducing buffer, Invitrogen) σε όγκο δείγματος που αντιστοιχεί σε 25μg πρωτεΐνης. Το διάλυμα της χρωστικής βοηθάει στην ανίχνευση των πρωτεϊνών κατά τον διαχωρισμό τους στην πηκτή. Το διάλυμα αυτό είναι αδρανές και δεν επηρεάζει το διαχωρισμό των πρωτεϊνών. Το αναγωγικό διάλυμα έχει την ιδιότητα να ανάγει τη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης (μετατρέπει τους δισουλφιδικούς δεσμούς σε ελεύθερες σουλφιδρικές ομάδες). Συνεπώς οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται μόνο βάση του μοριακού τους βάρους. Το SDS που υπάρχει στην πηκτή μεταδίδει στις πρωτεΐνες καθαρό θετικό φορτίο και έτσι κατευθύνονται από το πάνω μέρος της συσκευής προς τον αρνητικά φορτισμένο κάτω πόλο.
- Ακολουθεί αποδιάταξη των πρωτεϊνών με θέρμανση για 5 λεπτά στους 95°C
- Στη συνέχεια τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή. Στην αριστερή άκρη της πηκτής φορτώνεται μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών (Precision plus Protein Standards, Bio-Rad).
- Παράλληλα με τη θέρμανση των δειγμάτων προετοιμάζουμε το διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Nu Page Mes Running Buffer, Invitrogen) που θα τοποθετηθεί στη συσκευή. Το διάλυμα ηλεκτροφόρησης δημιουργεί ένα πρότυπο μετακίνησης

των πρωτεϊνών. Η οξείδωση των πρωτεϊνών εμποδίζεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικού (Nu Page antioxidant, Invitrogen).

- Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση στα 200V για 30-40 λεπτά.
- Στη διάρκεια αυτή προετοιμάζονται τα διαλύματα και τα υλικά για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών (Western blot).



Εικόνα 15: Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτη πολυακρυλαμιδίου

4.9. ΑΝΟΣΟΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΜΕ ΤΕΧΝΙΚΗ WESTERN BLOT

Η ανοσοαποτύπωση βασίζεται στη μεταφορά των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών σε μία ειδική επιφάνεια και στην ανίχνευση των επιλεγμένων πρωτεϊνών με τη χρήση ειδικού αντισώματος. Η επιφάνεια αυτή είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και επιτρέπει στις πρωτεΐνες να αντιδράσουν με το αντίσωμα. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται αναγνωρίζει την πρωτεΐνη σαν αντιγόνο και δεσμεύεται σε αυτή. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος στην επιφάνεια μπορεί να ανιχνευτεί με την προσθήκη δεύτερου αντισώματος ειδικού για το πρώτο (anti rabbit 1:7000). Μία ραδιενεργός σήμανση του δεύτερου αντισώματος δημιουργεί μία σκοτεινή γραμμή σε φιλμ ακτίνων X (αυτοραδιόγραμμα).

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδας (horseradish peroxidase, HRP) και η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημιοφωταύγειας (enhanced chemiluminescence, ECL)

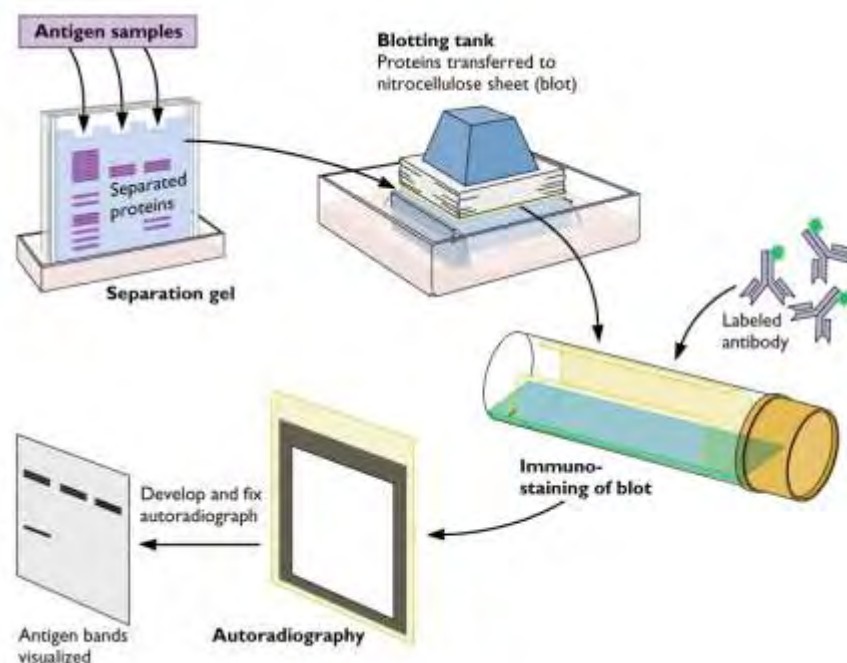
Μετά την ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών απομακρύνεται η πηκτή από τη θήκη της προσεκτικά και ακολουθεί η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη.

Αναλυτικότερα:

- Διάλυμα μεταφοράς (Nu Page Transfer Buffer, Invitrogen)
 - Φύλλο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης (Amersham) επωάζεται σε διάλυμα μεταφοράς.
 - χαρτί Whitman (Bioline) τοποθετείται σε διάλυμα μεταφοράς.
-
- Κατασκευάζεται στιβάδα με: 2 χαρτιά Whitman → μεμβράνη → πηκτή → 2 χαρτιά Whitman
 - Τοποθέτηση στο κουτί Xcell Blot Module (Invitrogen)
 - Το κουτί που περιέχει τη στιβάδα με την πηκτή τοποθετείται στη συσκευή Xcell Surelock με διάλυμα μεταφοράς στη μέση και δις απεσταγμένο νερό γύρω-γύρω.
 - Ακολουθεί μεταφορά για 30min στα 15Volt και 210mA
 - Αφού τελειώσει η μεταφορά των περιεχομένων της πηκτής στη μεμβράνη, αφαίρεση της μεμβράνης και χρώση με διάλυμα Ponceau S (Sigma) μέχρι να εμφανιστούν οι πρωτεΐνες με κόκκινο χρώμα, για να διαπιστωθεί η ισοφόρτωση των δειγμάτων και η επιτυχής μεταφορά των πρωτεϊνών στη μεμβράνη.
 - Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα πλύσης TBS που περιέχει PBS και 1% Tween-20 (BioRad) για 10 λεπτά και επανάληψη του σταδίου άλλες 2 φορές.
 - Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα κορεσμού 5% (Blotting Grade Blocker, BioRad) ολονύκτια στους 4°C για τον κορεσμό των θέσεων δέσμευσης πρωτεϊνών της μεμβράνης από τις πρωτεΐνες του γάλακτος ώστε να αποφευχθούν μη εξειδικευμένες αλληλεπιδράσεις του αντισώματος με τη μεμβράνη και κατόπιν έκπλυση 3 φορές με TBS για 10min.
 - Αμέσως μετά η μεμβράνη επωάζεται ολονύκτια στους 4°C με το εκάστοτε αντίσωμα στην κατάλληλη αραιώση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση στους 4°C
 - Απομάκρυνση του πρώτου αντισώματος και έκπλυση της μεμβράνης με TBS 3 φορές για 10min, έτσι ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια του πρώτου αντισώματος

- Επώαση της μεμβράνης με δεύτερο αντίσωμα, συζευγμένο με υπεροξειδάση, που αναγνωρίζει και προσδένεται στο πρώτο αντίσωμα, στην κατάλληλη αραίωση σε PBS-0,1% Tween 20 με 5% γάλα σε σκόνη υπό συνεχή ανάδευση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου.
- Απομάκρυνση του δεύτερου αντισώματος και έκπλυση 3 φορές με TBS για 10min.
- Η ανίχνευση γίνεται με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Για την εμφάνιση των πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Η μεμβράνη επώαστηκε για 5 λεπτά σε Super Signal (διάλυμα λουμινόλης). Η συζευγμένη με το δεύτερο αντίσωμα υπεροξειδάση αντιδρά με το υπεροξείδιο δημιουργώντας ρίζες υπεροξειδίου, οι οποίες αντιδρούν με τον ενισχυτή της χημειοφωταύγειας κουμαρικό οξύ δημιουργώντας ρίζες κουμαρικού οξέος. Αυτές με τη σειρά τους οξειδώνουν της λουμινόλη σε 3-αμινο-φθαλικό, ουσία η οποία εκπέμπει φως. Στη συνέχεια η μεμβράνη καλύφθηκε με διαφανή μεμβράνη και ακολούθησε έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL (Amersham). Το φιλμ εμφανίστηκε με τα αντιδραστήρια εμφάνισης (3 sec επώαση στο διάλυμα ανάπτυξης (Kodak), 3 sec στο διάλυμα σταθεροποίησης (Kodak) και 3 sec σε νερό.

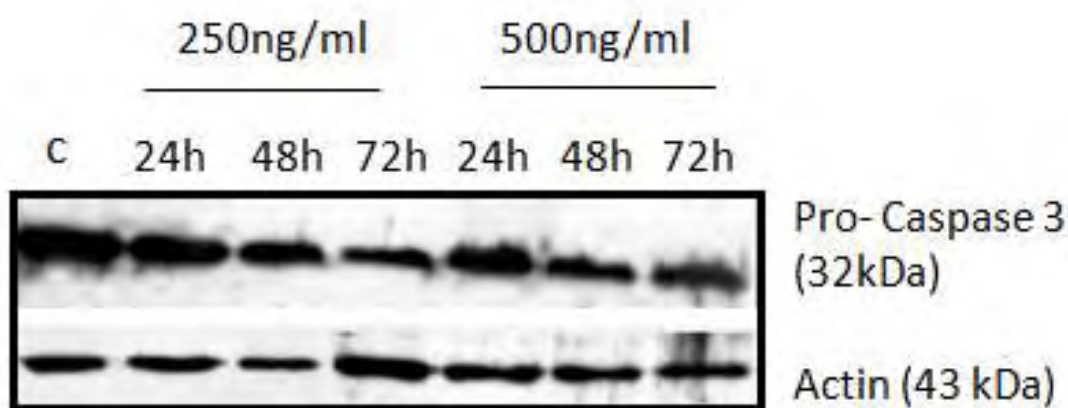


Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής Western blot

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των αποτελεσμάτων που προέκυψε από την ανοσοαποτύπωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος Scion Image. Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί μία διαδικασία ποσοτικοποίησης, κατά την οποία συγκρίνει τη σχετική ένταση διαφορετικών ζωνών πάνω σε μία σαρωμένη εικόνα του φιλμ. Συνεπώς, τα φιλμ σαρώθηκαν και προσδιορίστηκε η ένταση των ζωνών πάνω στην εικόνα για όλες τις πρωτεΐνες ενδιαφέροντος.

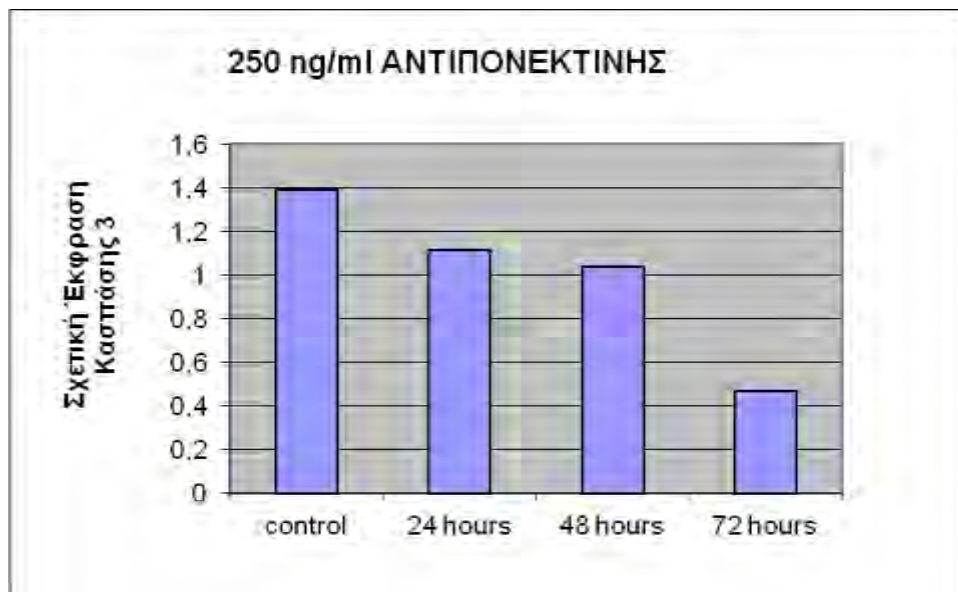
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν χρονοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων της κασπάσης 3 σε περισσότερο διαφοροποιημένα τροφοβλαστικά κύτταρα, σε σύγκριση με λιγότερο διαφοροποιημένα σε συγκεντρώσεις αντιγονεκτίνης 250 ng/ml και 500ng/ml. Όταν έγινε επίδραση με σταθερή συγκέντρωση αντιγονεκτίνης 250ng/ml παρατηρούμε μείωση της έκφρασης της κασπάσης 3 ανάλογα με τον χρόνο 24, 48 και 72 ώρες, σε σύγκριση με το control, καλλιεργημένα κύτταρα χωρίς αντιγονεκτίνη. Ομοίως, παρατηρούμε το ίδιο στην επίδραση των τροφοβλαστικών κυττάρων με συγκέντρωση αντιγονεκτίνης 500ng/ml. Τα στοιχεία που είχαμε ήταν ενθαρρυντικά αλλά απαιτούν περισσότερη μελέτη για να ελέγξουμε τη διαφορά που είχαμε στα επίπεδα της κασπάσης 3 σε περισσότερα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού.

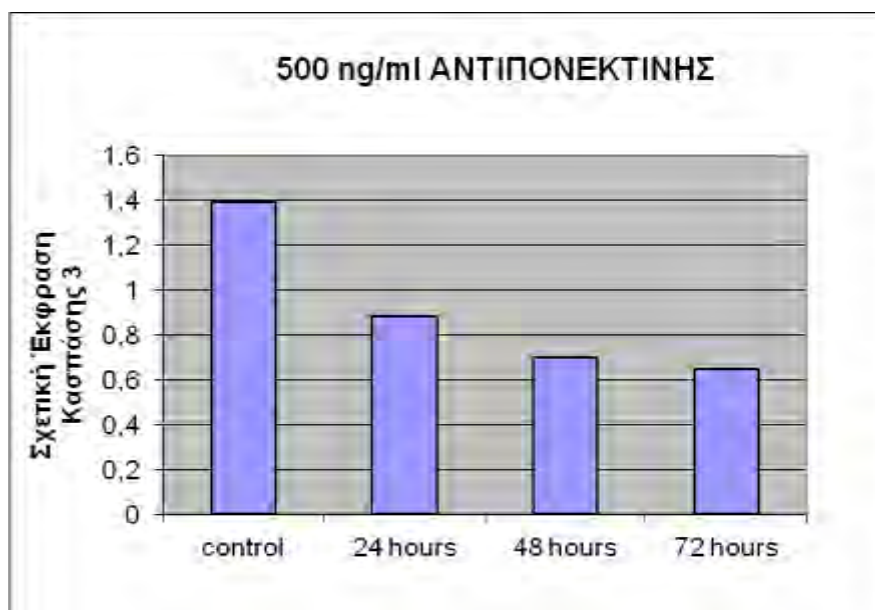


Εικόνα 17: Ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της κασπάσης 3 και β-actin σε δείγματα τροφοβλαστικών κυττάρων. Ο αριθμός δεξιά δηλώνει τη μοριακή μάζα του ενζύμου.

Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων για 250ng/ml και 500ng/ml συγκέντρωση αντιπνεκτίνης σε σύγκριση με το χρόνο φαίνεται στα παρακάτω διαγράμματα.



Εικόνα 18: Σχετική έκφραση της κασπάσης 3 μετά από επίδραση 250ng/ml αντιπνεκτίνης σε σύγκριση με το χρόνο.



Εικόνα 19: Σχετική έκφραση της κασπάσης 3 μετά από επίδραση 500ng/ml αντιπνεκτίνης σε σύγκριση με το χρόνο.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στις τροφοβλαστικές λάχνες και στη διεισδυτική εξωλαχνική κυτταροτροφοβλάστη, η απόπτωση είναι μια φυσιολογική διαδικασία στον κύκλο του κυττάρου. Το φαινόμενο της απόπτωσης εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα που πλέον δεν λειτουργούν σωστά, μπορούν να εξαλειφτούν χωρίς να προκαλέσουν τοπική φλεγμονώδη αντίδραση από τη μητέρα. Ακόμα η απόπτωση σχετίζεται και με τη διαφοροποίηση κυττάρων της τροφοβλάστης.

Η σύντηξη των συγκυτίων της κυτταροτροφοβλάστης με την υπερκείμενη συγκυτιοτροφοβλάστη πρέπει να πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια όλης της εγκυμοσύνης και να ελέγχεται αυστηρά. Η συνεχής εκροή φρέσκων κυτταροπλασματικών υλικών διασφαλίζει τη διατήρηση της πολυπύρηνης συγκυτιοτροφοβλάστης και με αυτόν τον τρόπο διατηρείται ο πλακουντιακός φραγμός. Διάφοροι παράγοντες έχουν προταθεί ότι είναι σημαντικοί κατά τη τροφοβλαστική σύντηξη, όπως κυτοκίνες, λιποκίνες, ορμόνες, πρωτεϊνικές κινάσες και μεταγραφικοί παράγοντες.

Πρόσφατα έχει αποδειχτεί ότι η αντιγονεκτίνη ασκεί αντιμιτωτική δράση στα τροφοβλαστικά κύτταρα (Benaitreau et al., 2009, 2010) και προωθεί τη σύντηξη μεταξύ κυτταροτροφοβλαστικών και συγκυτιοτροφοβλαστικών κυττάρων. Η διαδικασία της σύντηξης συνδέεται με τον καταρράχτη της απόπτωσης στα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα (Huppertz et Kingdom 2004), ιδίως με την συμμετοχή της εναρκτήριας κασπάσης 8, της εκτελεστικής κασπάσης 3 και της κασπάσης 14 (White et al., 2009, Black et al., 2004, Huppertz et al., 1999, Yusuf et al., 2002). Η αντιγονεκτίνη έχει περιγραφεί ως παράγοντας που επάγει την απόπτωση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους και διερευνήθηκε αν η δράση της στην διαφοροποίηση μεσολαβείτε από την κασπάση 3.

Μετά από πειράματα σε τροφοβλαστικά κύτταρα (11^η-13^η εβδομάδας κύησης), καταλήξαμε ότι η κυτταροτροφοβλάστη παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστηριότητα της κασπάσης 3 σε σύγκριση με πιο διαφοροποιημένα συγκύτια. Συγκεκριμένα μετά από την επίδραση 250ng/ml και 500ng/ml αντιγονεκτίνης σε τροφοβλαστικά κύτταρα,

παρατηρήσαμε χρονοεξαρτώμενη μείωση της κασπάσης 3 σε 24, 48 και 72 ώρες. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε ότι η αντιγονεκτίνη ενισχύει τη διαφοροποίηση των τροφοβλαστικών κυττάρων, μειώνοντας την έκφραση της κασπάσης 3 και συμμετέχει στο λειτουργικό σχηματισμό της συγκυτιοτροφοβλάστης.

Εν κατακλείδι, είναι απαραίτητο να γίνουν περαιτέρω μελέτες ώστε να διερευνηθεί ο τρόπος που επηρεάζει η αντιγονεκτίνη τις κασπάσες -8 και -14 και στη διερεύνηση του μηχανισμού της απόπτωσης στους αναστολείς Bcl, c-Flip και στο cAMP, σε περισσότερα δείγματα τροφοβλαστικών ιστών.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aboagye-Mathiesen G, Laugesen J, Zdravkovic M, Ebbesen P. Isolation and characterization of human placental trophoblast subpopulation from first trimester chorionic villi. Clin Diagn Lab Immunol 1996, 3, 14-22

Adler RR, Ng AK, Rote NS (1995) Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR. Biol Reprod 53:905–910

Baczyk D, Dunk C, Huppertz B, Maxwell C, Giannoulas D, Reister F, et al. Bi-potential behavior of cytotrophoblasts in first trimester chorionic villi. Placenta 2005

Baczyk D, Satkunaratnam A, Nait-Oumesmar B et al (2004) Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. Placenta 25:553–559

Baczyk D, Drewlo S, Proctor L et al (2009) Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. Cell Death Differ 16:719–727

Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 4th ed. New York: Springer; 2000. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta. 4th ed. New York: Springer; 2000

Benaitreau D, Dieudonne MN, Dos Santos E, Leneveu MC, Mazancourt P, Pecquery R: Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. Biol Reprod 2009, 80(6):1107-1114.

Benaitreau, D., Dos Santos, E., Leneveu, M. C., Alfaidy, N., Feige, J. J., de Mazancourt, P., Pecquery, R., and Dieudonn_e, M. N. (2010) Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. J. Endocrinol. 207,45–53.

Benaitreau D, Dos Santos E, Leneveu MC, Mazancourt P, Pecquery R, Dieudonne MN: Adiponectin promotes syncytialisation of BeWo cell line and primary trophoblast cells. Reproductive Biology and Endocrinology 2010, 8:128

Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R (2006) Pathology of the human placenta, 5th edn. Springer, New York, NY

Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE 2001 The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7:947–953

Bevers EM, Williamson PL (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* 584:2724–2730

Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004;11:90-8.

Boyd JD, Hamilton WJ. The human placenta. Cambridge: Heffer and Sons; 1970. Huppertz B , Gauster M : Trophoblast Fusion. *Cell Fusion in Health and Disease, Advances in Experimental Medicine and Biology* 713, DOI 10.1007/978-94-007-0763-4_6,

Burton GJ, Skepper JN, Hempstock J, Cindrova T, Jones CJ, Jauniaux E. A reappraisal of the contrasting morphological appearances of villous cytotrophoblast cells during early human pregnancy; evidence for both apoptosis and primary necrosis. *Placenta* 2003;24:297-305.

Caminos, J.E., Nogueiras, R., Gallego, R., Bravo, S., Tovar, S., Garcí'a- Caballero, T., Casanueva, F. F., and Die'guez, C. (2005) Expression and regulation of adiponectin and receptor in human and rat placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 4276–4286

Campos, D.B., Palin, M.F., Bordinon, V., and Murphy, B.D. (2008) The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *Int. J. Obes. (Lond)*. 32, 223–231.

Ceddia, R.B., Somwar, R., Maida, A., Fang, X., Bikopoulos, G., and Sweeney, G. (2005) Globular adiponectin increases GLUT4 translocation and glucose uptake but reduces glycogen synthesis in rat skeletal muscle cells. *Diabetologia* 48, 132–139.

Chang DW, Xing Z, Pan Y et al (2002) C-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95- mediated apoptosis. *Embo J* 21:3704–3714

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD 1994 Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263:1759–1762

Chen, J., Tan, B., Karteris, E., Zervou, S., Digby, J., Hillhouse, E. W., Vatish, M., and Randeva, H. S. (2006) Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia* 49, 1292–1302.

Chen CP, Chen LF, Yang SR et al (2008) Functional characterization of the human placental fusogenic membrane protein syncytin 2. *Biol Reprod* 79:815–823

Chinnaiyan AM, Tepper CG, Seldin MF, O'Rourke K, Kischkel FC, Hellbardt S, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM 1996 FADD/ MORT1 is a common mediator of CD95 (Fas/APO-1) and tumor necrosis factor receptor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 271:4961–4965

Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L 2001 Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108:1875–1881

Conde, J., Scotece, M., Gomez, R., Lopez, V., Gomez-Reino, J. J., Lago, F., and Gualillo, O. (2011) Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors* 37, 413–420.

Cong L, Gasser J, Zhao J, Yang B, Li F, Zhao AZ: Human adiponectin inhibits cell growth and induces apoptosis in human endometrial carcinoma cells, HEC-1-A and RL95 2. *Endocr Relat Cancer* 2007, 14(3):713-720.

Coppack, S.W. (2001) Proinflammatory cytokines and adipose tissue. *Proc. Nutr. Soc.* 60, 349–356.

Coppola A, Marfella R, Coppola L, Tagliamonte E, Fontana D, Liguori E, Cirillo T, Cafiero M, Natale S, Astarita C. :Effect of weight loss on coronary circulation and adiponectin levels in obese women. *Int J Cardiol.* 2009 May 29;134(3):414-6.

Corbetta, S., Bulfamante, G., Cortelazzi, D., Barresi, V., Cetin, I., Mantovani, G., Bondioni, S., Beck-Peccoz, P., and Spada, A. (2005) Adiponectin expression in human fetal tissues during mid- and late gestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90, 2397–2402.

Cross, J. C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani M., and Adamson, S. L. (2002) Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 187, 207–212.

Cseh, K., Baranyi, E., Melczer, Z., Kaszas, E., Palik, E., and Winkler, G.

(2004) Plasma adiponectin and pregnancy-induced insulin resistance. *Diabetes Care*. 27, 274–275.

Dafopoulos K, Sourlas D, Kallitsaris A, Pournaras S, Messinis IE : Blood ghrelin, resistin, and adiponectin concentrations during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*. 2009 Oct;92(4):1389-94.

Daoud G, Amyot M, Rassart E et al (2005) ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol* 566:409–423

Das M, Xu B, Lin L et al (2004) Phosphatidylserine efflux and intercellular fusion in a BeWO model of human villous cytotrophoblast. *Placenta* 25:396-407

Dash PR, McCormick J, Thomson MJ et al (2007) Fas ligand-induced apoptosis is regulated by nitric oxide through the inhibition of fas receptor clustering and the nitrosylation of protein kinase cepsilon. *Exp Cell Res* 313: 3421–3431

Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R: Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 345(1):271-279.

Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991,7:663-698

Elshoreva, H. (2011) Serum adiponectin levels are significantly reduced during the second half of normal pregnancy. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* 38, 211–213.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S 1998 A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50

Esnault C, Priet S, Ribet D et al (2008) A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirusderived, human syncytin-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17532–17537

Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K 2003 Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10:76–100

Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, Bihain BE, Lodish HF 2001 Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:2005–2010

Gavrila, C. K., Peng, J. L., Chan, J. E., Mietus, A. L., Goldberger, C. S., and Mantzoros. (2003). Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 2838–2843.

Guilbert LJ, Winkler-Lowen B, Sherburne R, Rote NS, Li H, Morrish DW. Preparation and functional characterization of villous cytotrophoblasts free of syncytial fragments. *Placenta* 2002;23:175-83.

Hada Y, Yamauchi T, Waki H, Tsuchida A, Hara K, Yago H, Miyazaki O, Ebinuma H, Kadowaki T.: Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. - *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 May 4;356(2):487-93

Henson M., Swan, K., and O'Neil, J. (1998) Expression of placental leptin and leptin receptor transcripts in early pregnancy and at term. *Obstet. Gynecol.* 92, 1020–1028.

Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M 1998 Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 187:587–600

Hu E, Liang P, Spiegelman BM 1996 AdipoQ is a novel adipose specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 271:10697–10703,15-16

Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao TS, Lodish HF 2004 T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10308–10313

Hubrecht, A. A. W.(1899). Studies on mammalian embryology. *J Microb. Sci.*30,283-404

Huppertz B, Frank HG, Kingdom JC, Reister F, Kaufmann P. Villous cytotrophoblast regulation of the syncytial apoptotic cascade in the human placenta. *Histochem Cell Biol* 1998;110:495-508.

Huppertz B, Frank HG, Reister F, Kingdom J, Korr H, Kaufmann P. Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Lab Invest* 1999;79:1687-702.

Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. The apoptosis cascade—morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anat Embryol* 1999;200:1-18.

Huppertz B, Kaufmann P, Kingdom J. Trophoblast turnover in health and disease. *Fetal Maternal Med Rev* 2002;13:103-18.

Huppertz B, Kingdom J, Caniggia I, Desoye G, Black S, Korr H, et al. Hypoxia favours necrotic versus apoptotic shedding of placental syncytiotrophoblast into the maternal circulation. *Placenta* 2003;24:181-90.

Huppertz B, Kingdom JC: Apoptosis in the trophoblast—role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc Gynecol Investig* 2004, 11(6):353-362.

Huppertz B, Kadyrov M, Kingdom J: Apoptosis and its role in the trophoblast *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (2006) 195, 29–39

Huppertz B and Gauster M. Trophoblast fusion. (2011) *Cell fusion in health and disease*. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ: The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus – a review. *Placenta* 2003, 24(Suppl A):86-93.

Jones, H. N., Jansson, T., and Powell, T. L. (2010). Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes* 59,1161–1170.

Ka H, Hunt JS (2006) FLICE-inhibitory protein: expression in early and late gestation human placentas. *Placenta* 27:626–634

Kadyrov M, Kaufmann P, Huppertz B. Expression of a cytokeratin 18 neo-epitope is a specific marker for trophoblast apoptosis in human placenta. *Placenta* 2001;22:44-8.

- Kadowaki, T. and Yamauchi, T. (2005) Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr. Rev.* 26, 439–451.
- Kajantie, E., Hytinen, T., Hovi, P., and Andersson, S. (2004) Cord plasma adiponectin: a 20-fold rise between 24 weeks gestation and term. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 4031–4036.
- Kajantie, E., Kaaja, R., Ylikorkala, O., Andersson, S., and Laivuori, H. (2005) Adiponectin concentrations in maternal serum: elevated in preeclampsia but unrelated to insulin sensitivity. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 12, 433–439.
- Kaufmann P, Black S, Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol Reprod* 2003;69:1-7.
- Keryer G, Alsat E, Tasken K, Evain-Brion D: Cyclic AMP-dependent protein kinases and human trophoblast cell differentiation in vitro. *J Cell Sci* 1998, 111:995-1004.
- Kotani, Y., Yokota, I., Kitamura, S., Matsuda, J., Naito, E., and Kuroda, Y. (2004) Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 61, 418 -423.
- Knerr I, Schubert SW, Wich C et al (2005) Stimulation of GCMA and syncytin via cAMP mediated PKA signaling in human trophoblastic cells under normoxic and hypoxic conditions. *FEBS Lett* 579:3991–3998
- Lappas, M., Permezel, M., and Rice, G.E. (2005) Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor-kappaB, peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology* 146, 3334–3342.
- Lindsay, R.S., Walker, J.D., Havel, P.J., Hamilton, B.A., Calder, A.A., Johnstone, F.D.; Scottish Multicentre Study of Diabetes Pregnancy. (2003). Adiponectin is present in cord blood but is unrelated to birthweight. *Diabetes Care* 26, 2244–2249.
- Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J 1998 Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94:491–501

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X 1997 Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489

Locksley RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis. In: *Apoptosis: the Molecular Basis of Cell Death*, Tomei LD, Cope FO, eds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1991:47-60

Luo J, Field SJ, Lee JY, Engelman JA, Cantley LC. The p85 regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase down-regulates IRS-1 signaling via the formation of a sequestration complex. *J Cell Biol* 2005;170:455–464

Lyden TW, Ng AK, Rote NS (1993) Modulation of phosphatidylserine epitope expression by BeWO cells during forskolin treatment. *Placenta* 14:177–186

Malassine A, Blaise S, Handschuh K et al (2007) Expression of the fusogenic HERV-FRD env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28:185–191

Malassine A, Frendo JL, Blaise S et al (2008) Human endogenous retrovirus-FRD envelope protein (syncytin 2) expression in normal and trisomy 21-affected placenta. *Retrovirology* 5:6

Maeda K, Okubo K., Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K 1996 cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221:286–289

Malassine A, Blaise S, Handschuh K et al (2007) Expression of the fusogenic HERV-FRD env glycoprotein (syncytin 2) in human placenta is restricted to villous cytotrophoblastic cells. *Placenta* 28:185–191

Mantzoros, C., Petridou, E., Alexe, D.M., Skalkidou, A., Dessypris, N., Papathoma, E., Salvanos, H., Shetty, G., Gavrilas, A., Kedikoglou, S., Chrousos, G., and Trichopoulos D. (2004) Serum adiponectin concentrations in relation to maternal and perinatal characteristics in newborn. *Eur. J. Endocrinol.* 151, 741–746.

Masuzaki, H., Ogawa, Y., Sagawa, N., Hosoda, K., Matsumoto, T., Mise, H., Nishimura, H., Yoshimasa, Y., Tanaka, I., Mori, T., and Nakao, K. (1997) Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat. Med.* 3, 1029–1113.

Matsuzawa Y 2000 Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway. *Circulation* 102:1296–1301

Mayhew TM, Leach L, McGee R, Ismail WW, Myklebust R, Lammiman MJ. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta* 1999;20:407-22.

Mazaki-Tovi, S., Kanety, H., Pariente, C., Hemi, R., Wiser, A., Schiff, E., and Sivan, E. (2007). Maternal serum adiponectin levels during human pregnancy. *J. Perinatol.* 27, 77–81.

McDonald EA, Wolfe MW: Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology* 2009, 150(9):4358-4365

McDonald, E. A. and Wolfe M. W. (2011) The pro-inflammatory role of adiponectin at the maternal–fetal interface. *Am. J. Reprod. Immunol.* 66, 128–136.

McEwan, M., Lins, J., Munro, S. K., Vincent, Z. L., Ponnampalam, A. P., and Mitchell, M. D. (2009) Cytokine regulation during the formation of the fetal–maternal interface: focus on cell–cell adhesion and remodeling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factors Rev.* 20, 241–249.

Meller M, Qiu C, Vadachkoria S, Abetew DF, Luthy DA, Williams MA. Changes in placental adipocytokine gene expression associated with gestational diabetes mellitus. *PhysRes* 2006;55:501–512

Midgley AR, Pierce GB Jr, Deneau GA et al (1963) Morphogenesis of syncytiotrophoblast in vivo: an autoradiographic demonstration. *Science* 141:349–350

Min X, Lemon B, Tang J, Liu Q, Zhang R, Walker N, Li Y, Wang Z.: Crystal structure of a single-chain trimer of human adiponectin globular domain. *FEBS Lett.* 2012 Mar 23;586(6):912-7.

Mitchell, M., Armstrong, D.T., Robker, R.L., and Norman, R.J. (2005) Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction.* 130, 583–597.

Miyazaki T, Bub JD, Uzuki M, Iwamoto Y.: Adiponectin activates c-Jun NH2-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 22;333(1):79-87.

Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM 1996 FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817– 827

Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M 1996 Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma *JBiochem(Tokyo)*120:803–812

Nelson DM. Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* 1996;17:387-91.

Oshima, K., Nampei, A., Matsuda, M., Iwaki, M., Fukuhara, A., Hashimoto, J., Yoshikawa, H., and Shimomura, I. (2005) Adiponectin increases bone mass by suppress osteoclast and activatin osteoblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 520–526.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Okamoto Y, Maeda K, Kuriyama H, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y: Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMPdependent pathway. *Circulation*2000,102(11):1296-1301.

Panigel M (1993) The origin and structure of extraembryonic tissues. In: Redman C, Sargent I, Starkey P, (eds) *The human placenta*. Blackwell Scientific Publications, London.

Paradisi, G., Ianniello, F., Tomei, C., Bracaglia, M., Carducci, B., Gualano, M.R, La Torre, G., Banci, M., and Caruso. (2010) A. Longitudinal changes of adiponectin, carbohydrate and lipid metabolism in pregnant women at high risk for gestational diabetes. *Gynecol. Endocrinol.* 26, 539–545.

Pijnenborg R, Bland JM, Robertson WB, Dixon G, Brosens I. The pattern of interstitial trophoblastic invasion of the myometrium in early human pregnancy. *Placenta* 1981;2:303-16.

Pinar, H., Basu, S., Hotmire, K., Laffineuse, L., Presley, L., Carpenter, M., Catalano, P.M., and Hauguel-de Mouzon, S. (2008) High molecular mass multimer complexes and vascular expression contribute to high adiponectin in the fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93,2885–2890.

Potgens AJ, Schmitz U, Bose P, Versmold A, Kaufmann P, Frank HG. Mechanisms of syncytial fusion: a review. *Placenta* 2002; 23(Suppl A):S107-13.

Aplin JD. Implantation, trophoblast differentiation and haemochorial placentation: mechanistic evidence in vivo and in vitro. *J Cell Sci* 1991;99:681-92.

Rajashekhar G, Loganath A, Roy AC et al (2003) Resistance to fas-mediated cell death in BeWO and NJG choriocarcinoma cell lines: implications in immune privilege. *Gynecol Oncol* 91:89–100.

Reister F, Frank HG, Kingdom JCP, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, et al. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest* 2001;81:1143-52.

Reynolds, L. P. and Redmer, D. A. (2001) Angiogenesis in the placenta. *Biol. Reprod.* 64, 1033–1040.

Richart R (1961) Studies of placental morphogenesis. I. Radioautographic studies of human placenta utilizing tritiated thymidine. *Proc Soc Exp Biol Med* 106:829–831

Rote NS, Wei BR, Xu C et al (2010) Caspase 8 and human villous cytotrophoblast differentiation. *Placenta* 31:89–96

Saito S, Sakai M. Th1/ Th2 balance in preeclampsia. *J Reprod Immunol* 2003, 59, 161-173.

Sakuragi N, Matsuo H, Coukos G et al (1994) Differentiation-dependent expression of the BCL-2 proto-oncogene in the human trophoblast lineage. *J Soc Gynecol Investig* 1:164–172

Senaris, R., Garcia-Caballero, T., Casabiell, X., Gallego, R., Castro, R., Considine, R., Dieguez, C., and Casanueva, F.F. (1997) Synthesis of leptin in human placenta. *Endocrinology* 138, 4501–4504.

Silvia D'Ippolito, Tersigni C, Scambia G, Simone N: Adipokines, an adipose tissue and placental product with biological functions during pregnancy (2012) *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 38- 1, 14–23

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF 1995 A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 270:26746–26749

Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, Kobayashi M, Harada M, Hirata T, Morimoto C, Hirota Y, Yoshino O, Koga K, Yano T, Kadowaki T, Taketani Y.: Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*. 2006 Jul;147(7):3203-10.

Tilg, H. and Moschen, A.R. (2006) Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 772–783.

Tschritter, O., Fritsche, A., Thamer, C., Haap, M., Shirkavand, F., Rahe, S., Staiger, H., Maerker, E., Haring, H., and Stumvoll, M. (2003) Plasma adiponectin concentrations predict insulin sensitivity of both glucose and lipid metabolism. *Diabetes* 52, 239–243.

Vargas A, Moreau J, Landry S et al (2009) Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol* 392:301–318

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ 2001 Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13884–13888

Weiwei, T., Haiyan, T., Juan, C., Xiaodong, W., Weibo, C., and Rong, Z. (2009) Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia. *Reprod. Sci.* 16, 676–684.

Weyer, C., Funahashi, T., Tanaka, S., Hotta, K., Matsuzawa, Y., Pratley, R.E., and Tataranni, P.A. (2001) Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 1930–1935.

White L, Dharmarajan A, Charles A: Caspase-14: a new player in cytotrophoblast differentiation. *Reprod Biomed Online* 2007, 14(3):300-307.

Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T 2001 The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med* 7:941–946

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R., and Kadowaki, T. (2003) Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature* 423, 762–769.

Yu C, Shen K, Lin M et al (2002) GCMa regulates the syncytin-mediated trophoblastic fusion. *J Biol Chem* 277:50062–50068

Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ. Cytotoxicity of tumour necrosis factor- α and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta* 1994;15:819-35.

Yui J, Hemmings D, Garcia-Lloret M, Guilbert LJ. Expression of the human p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in primary villous trophoblasts and their role in cytotoxic signal transduction. *Biol Reprod* 1996;55:400-9.

Yura, S, Sagawa, N., Itoh, H., Kakui, K., Nuamah, M.A., Korita, D., Takemura, M., and Fujii, S. (2003) Resistin is expressed in the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88,1394–1397.

Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y et al (2002) Trophoblast differentiation modulates the activity of caspases in primary cultures of term human trophoblasts. *Pediatr Res* 52:411–415

Zavalza-Gomez, A. B., Anaya-Prado, R., Rincón-Sánchez, A. R., and Mora-Martínez, J. M. (2008) Adipokines and insulin resistance during pregnancy. *Diab. Res. Clin. Pract.* 80,8–15

ABSTRACT

Background: In human pregnancy, a correct placentation depends on trophoblast proliferation, differentiation, migration and invasion. These processes are highly regulated by placental hormones, growth factors and cytokines. Recently, it has been shown that adiponectin, an adipokine, has anti-proliferative effects on trophoblastic cells, promote trophoblast differentiation and has been described as a pro-apoptotic factor. The process of syncytialization is linked to the early stages of the apoptotic cascade within cytotrophoblast cells. Caspases are cysteine proteases that cleave cellular components to affect the apoptotic cascade. We hypothesized that cultured cytotrophoblasts exhibit a higher activity of caspases when compared with syncytiotrophoblasts.

Methods: Using western analysis, we demonstrated that the caspase 3 is expressed in cytotrophoblasts cultured for 24h, 48h, and also in trophoblasts cultured 72 h when syncytiotrophoblasts have formed.

Results: Importantly, we found that adiponectin progressively reduce the activity of caspase 3 in trophoblasts cultured 24h, 48h and 72 h, compared with untreated cells.

Conclusion: The cytotrophoblasts exhibit a higher activity of caspase 3 when compared with the more differentiated syncytium. Adiponectin enhances the differentiation process of trophoblast cells and could thus be involved in functional syncytiotrophoblast formation.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ την κυρία Τσέζου Ασπασία που με εμπιστεύτηκε για την ανάθεση αυτής της εργασίας, για τις γνώσεις που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές της. Ευχαριστώ τον κύριο Μεσσήνη Ιωάννη, υπεύθυνο καθηγητή του μεταπτυχιακού προγράμματος που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω βιβλιογραφική και πειραματική εργασία. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Γκαρά Αντώνιο, γυναικολόγο της Γυναικολογικής Κλινικής ΠΠΓΝΑ για τα δείγματα τροφοβλαστικού ιστού που μου έδωσε για την εκπόνηση της πτυχιακής εργασίας. Επίσης, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη διδακτορική φοιτήτρια Παπαθανασίου Ιωάννα και στις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Παλιανοπούλου Μαρία, Παπαγεωργίου Ελένη του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Βιολογίας και στη διδακτορική φοιτήτρια Κατσιάνη Ελένη του εργαστηρίου Μητέρας-Παιδιού. Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια και στους φίλους μου που με στήριξαν και με υποστηρίζουν.