



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 ρόλος του υποδοχέα της αντιγονεκτίνης στην κυτταρική διείσδυση του τροφοβλαστικού ιστού

Γεωργία Στάθη
Βιοχημικός & Βιοτεχνολόγος

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπουσα: Δρ Τσέζου Ασπασία

Συνεπιβλέποντες: Δρ Μεσσήνης Ιωάννης

Δρ Ζιντζαράς Ηλίας

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ο ρόλος του υποδοχέα της αντιπυονεκτίνης στην κυτταρική διείσδυση του τροφοβλαστικού ιστού

Στάθη Γεωργία

A.M. : 06031380

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2013-2014 στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος με τίτλο «Βιολογία της Αναπαραγωγής» του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της καθηγήτριας Ιατρικής Γενετικής κας Τσέζου Ασπασίας.

Επιβλέπουσα: Δρ Τσέζου Ασπασία

Συνεπιβλέποντες: Δρ Μεσσήνης Ιωάννης

Δρ Ζιντζαράς Ηλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους μου συμπαραστάθηκαν στην υλοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Κατ' αρχήν, ευχαριστώ την κ. Ασπασία Τσέζου για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής της ομάδας και για την καθοδήγηση που μου προσέφερε στην πορεία αυτής της εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συνεπιβλέποντες κ. Ιωάννη Μεσσήνη και κ. Ηλία Ζιντζαρά για τη συμβολή και την πολύτιμη βοήθεια τους στη διεκπεραίωση της διπλωματικής εργασίας. Ακόμη, ευχαριστώ τον κ. Αντώνιο Γκαρα, Λέκτορα Μαιευτικής και Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την εξασφάλιση των δειγμάτων τροφοβλαστικού ιστού για την εκπόνηση την συγκεκριμένης μελέτης. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής και συγκεκριμένα στην διδακτορικό Παπαθανασίου Ιωάννα και στις υποψήφιες διδάκτορες Κωστοπούλου Φωτεινή και Μουρμούρα Ευανθία για τις χρήσιμες συμβουλές τους, την άψογη συνεργασία και τη δημιουργία ευχάριστου κλίματος στην ερευνητική ομάδα. Τέλος, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και την αδελφή μου για την υλική και ηθική στήριξη που μου παρέχουν όλα αυτά τα χρόνια.

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Εισαγωγή.....	8
Διαφοροποίηση της τροφοβλάστης.....	8
Ανάπτυξη των χοριακών λαχνών	11
Ο ώριμος πλακούντας.....	14
Η αντιπυονεκτίνη.....	15
Η δομή της αντιπυονεκτίνης	15
Οι υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης.....	17
Η αντιπυονεκτίνη στην αναπαραγωγή.....	18
Ο ρόλος της αντιπυονεκτίνης στην εμφύτευση εμβρύου & στη λειτουργία του πλακούντα.....	20
Πώς επηρεάζει η αντιπυονεκτίνη την εμβρυϊκή ανάπτυξη	23
Η αντιπυονεκτίνη και η Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	24
Αντιπυονεκτίνη & Μεταγωγικά μονοπάτια.....	25
Σκοπός	31
Υλικά & Μέθοδοι.....	32
Δειγματοληψία χοριακών λαχνών (Chorionic villus sampling/CVS)	32
Καλλιέργεια χοριακών λαχνών	32
Ανακαλλιέργεια κυττάρων	34
Κατάψυξη κυττάρων	34
Απόψυξη κυττάρων.....	35
Προετοιμασία κυττάρων (Starvation)	35
Επίδραση με Αντιπυονεκτίνη	36

Απομόνωση RNA κυττάρων	37
Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA	37
Γονίδιο Αναφοράς GAPDH	38
Real time PCR	39
Απομόνωση πρωτεϊνών	45
Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε mg/ml με τη μέθοδο Bradford	45
Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS PAGE)	46
Μεταφορά σε μεμβράνη - Transfer	47
Ανοσοαποτύπωση κατά Western	47
Αποτελέσματα	50
Συζήτηση	53
Βιβλιογραφία.....	54

Περίληψη

Εισαγωγή Η αντιπυονεκτίνη, μία ορμόνη που εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό έχει κεντρικές και περιφερικές δράσεις. Ενεργώντας μέσω του εγκεφάλου, είναι ο σύνδεσμος του λιπώδους ιστού με το αναπαραγωγικό σύστημα. Η αντιπυονεκτίνη ασκεί τις δράσεις της συνδεδεμένη με δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς, τον AdipoR1 και AdipoR2. Δρουν σε υποθάλαμο, υπόφυση, ωοθήκη, ενδομήτριο, πλακούντα, έμβρυο και μητέρα. Πρόσφατες έρευνες έχουν αποκαλύψει το ρόλο της αντιπυονεκτίνης στην εμφύτευση και κυτταρική διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, εμπλέκεται στην παθογένεση αρκετών γυναικολογικών παθήσεων.

Σκοπός Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι διερεύνηση του ρόλου των υποδοχέων της αντιπυονεκτίνης στην κυτταρική διείσδυση της τροφοβλάστης.

Σχεδιασμός Στην παρούσα εργασία, ελήφθησαν 3 δείγματα από προγεννητικό έλεγχο λήψης τροφοβλάστης από φυσιολογικές γυναίκες 32-35 ετών. Για την εξακρίβωση του ρόλου των υποδοχέων της, καλλιεργήθηκαν τα τροφοβλαστικά κύτταρα υπό την επίδραση αντιπυονεκτίνης και έγινε ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του AdipoR1 και του AdipoR2 με τη μέθοδο της Real time PCR και στη συνέχεια ανίχνευση της MMP-9 με τη χρήση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

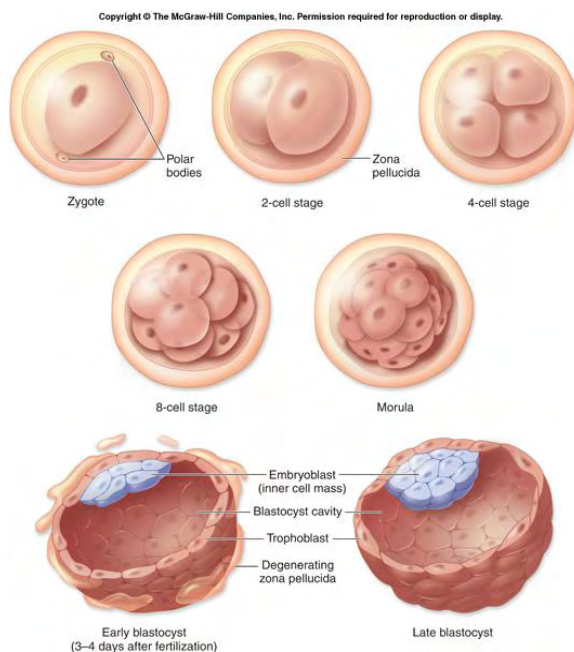
Αποτελέσματα Μετά από χορήγηση 250ng/ml αντιπυονεκτίνης για 24 και 48 ώρες, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2. Μετά από χορήγηση 250ng/ml αντιπυονεκτίνης για 48 ώρες, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MMP-9.

Συμπεράσματα Η αντιπυονεκτίνη μέσω των υποδοχέων της ασκεί τις δράσεις στα τροφοβλαστικά κύτταρα, και μπορεί να εμπλέκονται στην κυτταρική διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Εισαγωγή

Η πλακουντοποίηση είναι η πρώτη απόδειξη της εμβρυικής διαφοροποίησης και οργανογενετικής ικανότητας. Ολοκληρώνεται σε δύο φάσεις: **α.** προσκόλληση του εμβρύου στη μήτρα και **β.** δημιουργία στενής εμβρυομητρικής αιμάτωσης κατά τρόπο που να διευκολύνεται η ανταλλαγή αερίων και χημικών ουσιών. Αυτές οι λειτουργίες προϋποθέτουν ότι εμβρυικά πλακουντιακά κύτταρα (τροφοβλάστες) λαμβάνουν ένα διεισδυτικό φαινότυπο. Στα θηλαστικά τα οποία σχηματίζουν ένα αιμοχοριακό πλακούντα, εμβρυικοί τροφοβλάστες έρχονται σε απευθείας επαφή με το μητρικό αίμα. Έτσι, η πλακουντοποίηση εξασφαλίζει τη μοναδική αυτή ανάγκη για στενή συνεργασία και άμεση κυτταρική επαφή μεταξύ δύο ανοσολογικά διαφορετικών οργανισμών.

Διαφοροποίηση της τροφοβλάστης



Η συνένωση των δύο αρχέγονων γεννητικών κυττάρων δημιουργεί το **ζυγωτό**. Η πρώτη μιτωτική διαίρεση του πυρήνα του ζυγωτού καταλήγει στο σχηματισμό δύο βλαστομεριδίων. Μέσα στις σάλπιγγες το γονιμοποιημένο ωάριο υφίσταται διαδοχικές διαιρέσεις για τρεις ημέρες σχηματίζοντας προοδευτικά μικρότερα βλαστομερίδια και αυξάνοντας έτσι τον αριθμό των κυττάρων μέχρι τον σχηματισμό της **βλαστοκύστης**. Στη βλαστοκύστη διακρίνουμε δύο πόλους. Ο

ένας πόλος προβάλλει μέσα στη μητρική κοιλότητα και αποτελεί την έσω κυτταρική μάζα, την **εμβρυοβλάστη** που μελλοντικά θα δώσουν γέννηση στο έμβρυο, τον ομφάλιο λώρο και το άμνιο και ένα έξω πόλο που αποτελεί το τοίχωμα της βλαστοκύστης, το **τροφοεκτόδερμα**, που αποτελεί ουσιαστικά τον πρόδρομο των εμβρυικών μεμβρανών και του πλακούντα. Το τροφοεκτόδερμα, αμέσως μετά την εμφύτευση του στο ενδομήτριο καλείτε τροφοβλάστη. (Benaitreau et al 2010)

Το πιο δύσκολο ίσως έργο για τη βλαστοκύστη η οποία στην κυριολεξία επιπλέει είναι να «αγκυροβολήσει» στο ενδομήτριο. Η θέση της έσω κυτταρικής μάζας καθορίζει ποια τροφοβλαστικά κύτταρα (πολικά) θα συμμετέχουν στη διαδικασία της εμφύτευσης.

Η εμφύτευση της βλαστοκύστης συμβαίνει σε συγκεκριμένη φάση του εμμηνορρυσιακού κύκλου, το «παράθυρο εμφύτευσης», όπου το ενδομήτριο έχει πάρει την ιστολογική μορφή φθαρτού και έχει πάχος 5mm. Είναι λογικό να υποθέσουμε ότι η περίοδος που αρχίζει αρκετές ημέρες μετά την ωορρηξία και τελειώνει αρκετές ημέρες πριν από την έμμηνο ρύση περιλαμβάνει το παράθυρο της εμφύτευσης. (Tabibzadeh et al 1998) Ουσιαστικά η φυσιολογική εμφύτευση είναι αποτέλεσμα ισορροπίας ανάμεσα στους παράγοντες που εκκρίνονται από τα τροφοβλαστικά κύτταρα και το ενδομήτριο. Τα πολικά τροφοβλαστικά κύτταρα παρουσιάζουν εξαιρετική ικανότητα διείσδυσης. Όταν έρχονται σε επαφή με το ενδομήτριο παράγουν όσο το δυνατόν λιγότερη hCG και διαφοροποιούνται σε κύτταρα με ικανότητες αγκυροβόλησης τα οποία παράγουν ιστολυτικά ένζυμα. Από τη μεριά του, το ενδομήτριο ελέγχει την εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων εκκρίνοντας κυτταροκίνες και αναστολείς πρωτεασών. (Knobil, Encyclopedia of reproduction, 2004)

Μετά την ολοκλήρωση της εμφύτευσης, την όγδοη ημέρα, τα κύτταρα της τροφοβλάστης διαφοροποιούνται περαιτέρω μέσω δυο οδών:

a) στο εξωλαχνικό μονοπάτι, (extravillous throphoblast –EVT), τα κύτταρα της τροφοβλάστης διαφοροποιούνται σε **κυτταροτροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη αποτελεί το πρωταρχικό, ενεργό μιτωτικά κύτταρο, το οποίο πολλαπλασιάζεται συνεχώς και διαφοροποιείται προς συγκυτιοτροφοβλάστη.**

Έχει επεκτατικό φαινότυπο, ανάλογα με τους μητρικούς ιστούς που διηθεί, διακρίνονται σε δύο υποκατηγορίες:

i) ενδιάμεση τροφοβλάστη, η οποία μεταναστεύει και διεισδύει στο μητρικό στρώμα του φθαρτού και στο επιπολής μυομήτριο. (Pijnenborg et al 1981, 1983a)

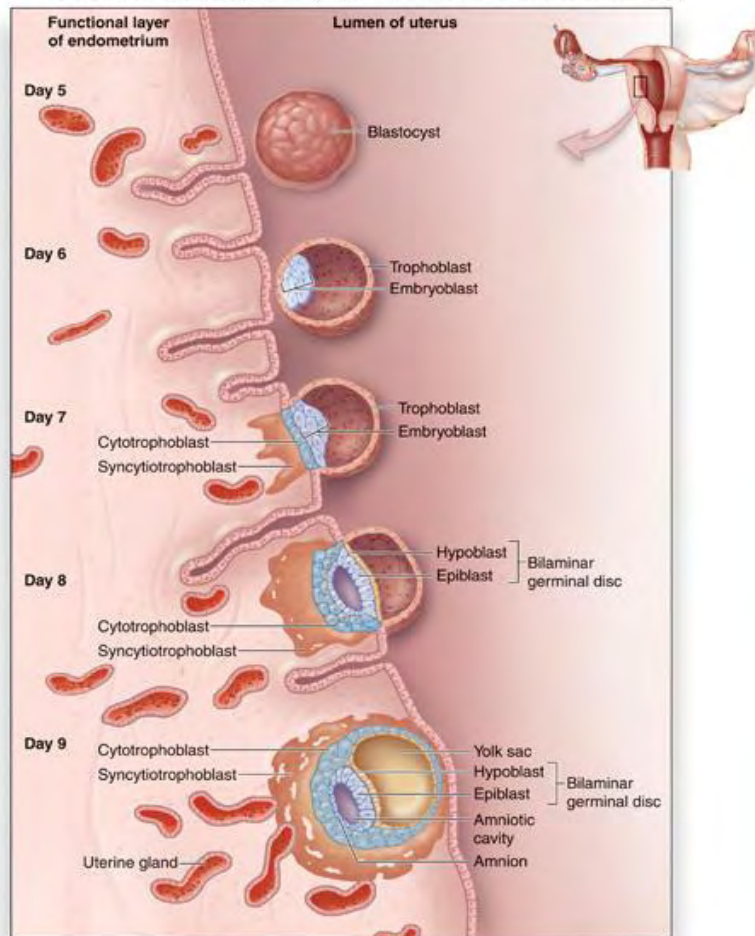
ii) ενδοαγγειακή τροφοβλάστη, η οποία διατρυπά τον αυλό των σπειροειδών αρτηριών, όπου αντικαθιστά το ενδοθήλιο και καταστρέφει το μέσο ελαστικό και μυϊκό

χιτώνα του αρτηριακού τοιχώματος. (Cunningham et al 2005b, Pijnenborg et al 1983b)

στο **λαχνωτό μονοπάτι**, τα κύτταρα της τροφοβλάστης συγχωνεύονται σε ένα εξωτερικό πολυπύρρηνο συγκύτιο, τη **συγκυτιοτροφοβλάστη**. Το συγκύτιο δεν έχει ξεχωριστά κύτταρα παρά μόνο ένα συνεχόμενο συγκυτιακό στρώμα, άμορφο, χωρίς κυτταρικά όρια, οι πυρήνες διαφέρουν σε σχήμα και μέγεθος. Το συγκύτιο αναγεννάτε μέσω ενός αποπτωτικού μηχανισμού. Τα αποπτωτικά κύτταρα συμπυκνώνονται σε συγκυτιακούς κόμβους, οι οποίοι εξωθούνται στον μεσολάχιο χώρο. (Huppertz et al, 1999)

Η συγκυτιοτροφοβλάστη επιτρέπει τη διήθηση ολόκληρου του κυήματος μέσα στο ενδομήτριο από την έκτη κιόλας ημέρα μετά τη σύλληψη. Αυξάνεται και διαβρώνει με δακτυλιοειδείς συμπαγείς προεκβολές το ενδομήτριο έως την 7η-8η ημέρα μετά τη σύλληψη. (Benirschke et al 2006) Αυτό το κατορθώνει με την έκκριση διαφόρων ιστολυτικών ενζύμων και εκκρίνοντας παράγοντες που προκαλούν απόπτωση στα επιθηλιακά κύτταρα του ενδομητρίου. Με απόπτωση αυτών των κυττάρων του στρώματος της μήτρας δημιουργούνται κενά μέσω των οποίων η βλαστοκύστη διεισδύει περαιτέρω στο ενδομήτριο. (Gauster et al., 2009)

Στη συνέχεια, καθώς επεκτείνεται η συγκυτιοτροφοβλάστη διαπερνά το βασικό φθαρτό και εισβάλλει περαιτέρω στο στρώμα της μήτρας, προκειμένου το έμβρυο να ενσωματωθεί στο ενδομήτριο. Επιπλέον, η συγκυτιοτροφοβλάστη δημιουργεί τις χοριακές λάχνες του πλακούντα με κύριες λειτουργίες τη μεταφορά οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών μεταξύ της μητέρας και του εμβρύου. (Loke et al 1995).



Εικόνα 2: Διαδικασία εμφύτευσης βλαστοκύστης.

Ανάπτυξη των χοριακών λαχνών

Κατά τη διάρκεια των δυο πρώτων εβδομάδων της κύησης σχηματίζονται μεταξύ συγκυτιοτροφοβλαστών και ενδομητρίου κόλποι αίματος που περιβάλλουν τις αναπτυσσόμενες συγκυτιοτροφοβλάστες. Παράλληλα η κύτταροτροφοβλάστη πολλαπλασιάζεται τοπικά και σχηματίζει προεκβολές (αποφυάδες) που εισχωρούν στην συγκυτιοτροφοβλάστη. Οι αποφυάδες εισχωρούν στο ενδομήτριο και έλκουν το έμβρυο στο εσωτερικό του ενδομητρίου.

Την 11^η – 13^η ημέρα οι προεκβολές της κύτταροτροφοβλάστης βλαστάνουν μέσα στον αυλό των αγγείων που είναι γεμάτος με αίμα και καλύπτονται από μια στιβάδα συγκυτιοτροφοβλάστης δίδοντας γένεση στις πρωτογενείς λάχνες.

Μέχρι τη 14^η ή 15^η μέρα υπάρχουν μόνο φλεβώδεις μητρικοί κόλποι και μητρικό αρτηριακό αίμα δεν εισέρχεται στο μεσολάχινο χώρο.

Τη 16^η ημέρα μετά την εμφύτευση, το εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα που βρίσκεται σε στενή σχέση με την κυτταροτροφοβλάστη εισχωρεί στο κέντρο των πρωτογενών λαχνών και σχηματίζονται οι δευτερογενείς λάχνες.

Κατά τη 17^η μέρα τα εμβρυϊκά αγγεία είναι λειτουργικά και η πλακουντιακή κυκλοφορία εγκαθίσταται.

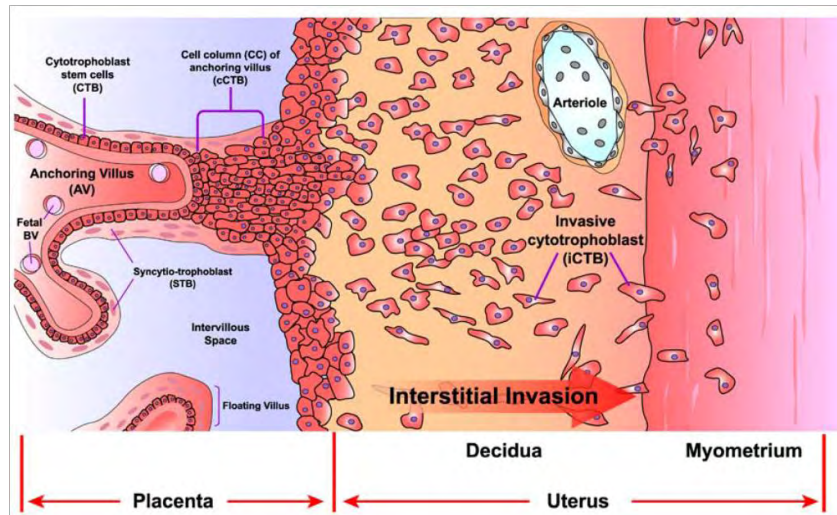
Την 21η ημέρα μετά την εμφύτευση σχηματίζονται οι τριτογενείς λάχνες οι οποίες περιέχουν διαφοροποιημένα αιμοφόρα αγγεία μέσα στο μεσόδερμα. (Cunningham et al 2005b, Κίττας et al 1997)

Συγκεκριμένα, το τελικό άκρο, η κορυφή μίας λάχνης, αποτελείται εσωτερικά από μια συμπαγή μάζα κυτταροτροφοβλάστης (cytotrophoblast cell column) και πάνω από αυτήν από μια λεπτή στοιβάδα συγκυτιοτροφοβλάστης. Περαιτέρω ανάπτυξη της κορυφής των λαχνών γίνεται κάτω από συνθήκες υποξίας του τοπικού περιβάλλοντος. Η κυτταροτροφοβλάστη επεκτείνεται προς την στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης. Τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα της λάχνης προοδευτικά εισχωρούν στην στοιβάδα της συγκυτιοτροφοβλάστης μέχρι να την διαπεράσουν και να φθάσουν στο ενδομήτριο της μητέρας. Όταν φθάσουν στο ενδομήτριο της μητέρας (βασικό φθαρτό) τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα της μίας λάχνης ενώνονται με τα παρακείμενα των άλλων λαχνών που έχουν φθάσει εκεί και σχηματίζουν ένα λεπτό κυτταροτροφοβλαστικό κάλυμμα (κέλυφος). Το εξωτερικό κυτταροτροφοβλαστικό κέλυφος, την στοιβάδα της τροφοβλάστης, η οποία βρίσκεται στο όριο μεταξύ εμβρυϊκού και μητρικού στοιχείου του πλακούντα. Μέσω του κυτταροτροφοβλαστικού κελύφους το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα που είναι το λαχνωτό χόριο προσκολλάται στο μητρικό τμήμα του πλακούντα που είναι ο βασικός φθαρτός.

Οι λάχνες που δίδουν γένεση στις προεκβολές της κυτταροτροφοβλάστης, από ανατομικής άποψης, διακρίνονται σε **α)** στελεχιακές και **β)** λάχνες αγκυροβολίας (Anchoring villus). Μέσω των λάχνων αγκυροβολίας γίνεται η προσκόλληση μεταξύ των ιστών μητέρας και εμβρύου, εκτείνονται από το χοριακό πέταλο μέχρι και το βασικό φθαρτό. Η πλειοψηφία των στελεχιακών λαχνών δεν εκτείνονται μέχρι το φθαρτό, αλλά είναι ελεύθερες. Οι χώροι μεταξύ των ελεύθερων λαχνών ονομάζονται

μεσολάχνιοι χώροι και σε αυτούς καταλήγουν οι σπειροειδείς αρτηρίες. (Cunningham et al 2005b, Κίττας et al 1997).

Κάθε μια στελεχιακή λάχνη με τις διακλαδώσεις της σχηματίζει μια κοτυληδόνα (De Swiet et al 2007). Κάθε κοτυληδόνα αιματώνεται από ένα απλό στελεχιακό κλάδο της χοριακής αρτηρίας όπως επίσης και από μια φλέβα.



Εικόνα 3: Σχηματική αναπαράσταση της εξέλιξης του ανθρώπινου πλακούντα στο πρώτο τρίμηνο κύησης.

Ο σκοπός της διήθησης της τροφοβλάστης στις σπειροειδείς αρτηρίες του ανθρώπινου πλακούντα είναι να αυξηθεί η αιματική ροή η οποία είναι απαραίτητη για την ομαλή εξέλιξη της κύησης. Δηλαδή, οι μυώδεις, με λεπτό τοίχωμα σπειροειδείς αρτηρίες μετατρέπονται σε πλαδαρά, σακοειδή μητροπλακουντιακά αγγεία, τα οποία διαστέλλονται παθητικά για να εξυπηρετήσουν την αυξημένη ροή αίματος.

Το τελικό στάδιο διαφοροποίησης των τροφοβλαστικών κυττάρων είναι τα πολυπύρρηνα γιγαντοκύτταρα (placental bed giant cells-GC), που παρατηρούνται στην θέση εμφύτευσης, ειδικά του τελειόμηνου πλακούντα, τα οποία είναι πολυπλοειδικά (4N-8N) δίχως ικανότητα πλέον διήθησης. Οπότε ο σχηματισμός τους πιθανόν αναπαριστά έναν μηχανισμό ο οποίος αποτρέπει τη βαθύτερη διείσδυση στο τοίχωμα της μήτρας. (Moffet et al 2002)

Η αντιγονεκτίνη πιστεύεται ότι ασκεί αξιοσημείωτη δράση στην την αναπαραγωγή και συγκεκριμένα στις διαδικασίες εμφύτευσης του εμβρύου.

Ο ώριμος πλακούντας

Ο πλακούντας εμφανίζει δύο επιφάνειες 1) την μητρική επιφάνεια προς τα έξω, δηλαδή προς το μωμήτριο 2) την εμβρυική επιφάνεια προς τα έσω, δηλαδή προς το έμβρυο.

Η μητρική επιφάνεια διαιρείται εκ των έξω προς τα έσω σε α) βασική στιβάδα β) σπογγώδη στιβάδα και γ) τη συμπαγή στιβάδα. Οι τρεις αυτές στιβάδες αποτελούν το βασικό φθαρτό. Φθαρτός είναι η λειτουργική στοιβάδα του ενδομητρίου. Κάτω από την επίδραση της προγεστερόνης που εκκρίνεται από το ωχρό σωματίο μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης τα κύτταρα του στρώματος του ενδομητρίου μετατρέπονται σε μεταβολικά ενεργά κύτταρα που λέγονται κύτταρα φθαρτού. Η μητρική επιφάνεια του πλακούντα διαιρείται σε ανώμαλους λοβούς από διαφραγμάτια.

Η εμβρυϊκή επιφάνεια αποτελείται εκ των έσω προς τα έξω από το άμνιο, το χόριο και τις λάχνες. Η συνένωση του αμνίου με το χόριο σχηματίζει τον χοριοαμνιακό υμένα, ο οποίος προκαλεί απόφραξη της χοριακής κοιλότητας. Η έσω επιφάνεια του πλακούντα συνδέεται με το έμβρυο με τον ομφάλιο λώρο. Στο τέλος της κύησης ο ώριμος πλακούντας έχει σχήμα δίσκου, σύσταση μαλακή και σπογγώδη, βάρος 500-600 gr και πάχος 3-4cm. Η συνολική του επιφάνεια ανέρχεται σε 14 m² και αρδεύεται από ένα τριχοειδικό αγγειακό δίκτυο συνολικού μήκους 50km. (Λώλης, Γυναικολογία και Μαιευτική, 2004)

Η αντιπονεκτίνη

Μία από τις λιποκυτταροκίνες που είναι στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος ενός μεγάλου αριθμού μελετών, τα τελευταία χρόνια, είναι η αντιπονεκτίνη. Η αντιπονεκτίνη, μία ορμόνη που εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό και έχει κεντρικές και περιφερικές δράσεις, εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης, τον μεταβολισμό της γλυκόζης και επιπλέον έχει φανεί ότι επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας και ινσουλίνου αντίστασης. Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι έχει πολλαπλές δραστηριότητες όπως αντι-φλεγμονώδη, αντί-αγγειογόνο, αντι-αθηροσκληρωτική και αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση σε διάφορους τύπους κυττάρων. (Yamauchi et al 2003) (Tilg et al 2006) Πρόκειται για μια πρωτεΐνη 30 kDa, η οποία κλωνοποιήθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '90 από τέσσερις ανεξάρτητες ερευνητικές ομάδες, οι οποίες χρησιμοποίησαν διαφορετικές μεθόδους. (Scherer et al 1995)

Παρά το γεγονός ότι η ονομασία «αντιπονεκτίνη» έχει επικρατήσει, η πρωτεΐνη καλείται και AdipoQ ή apM1. Επίσης, η πρωτεΐνη που αντιστοιχεί στο cDNA της αντιπονεκτίνης που απομονώθηκε από ποντίκια ονομάστηκε Acrp30 (adipocyte complement-related protein) (Scherer et al 1995) και αντίστοιχα στους ανθρώπους η αντιπονεκτίνη απομονώθηκε από το πλάσμα ως πρωτεΐνη που δεσμεύεται στη ζελατίνη (gelatin binding protein – GBP28). (Navako et al 1996)

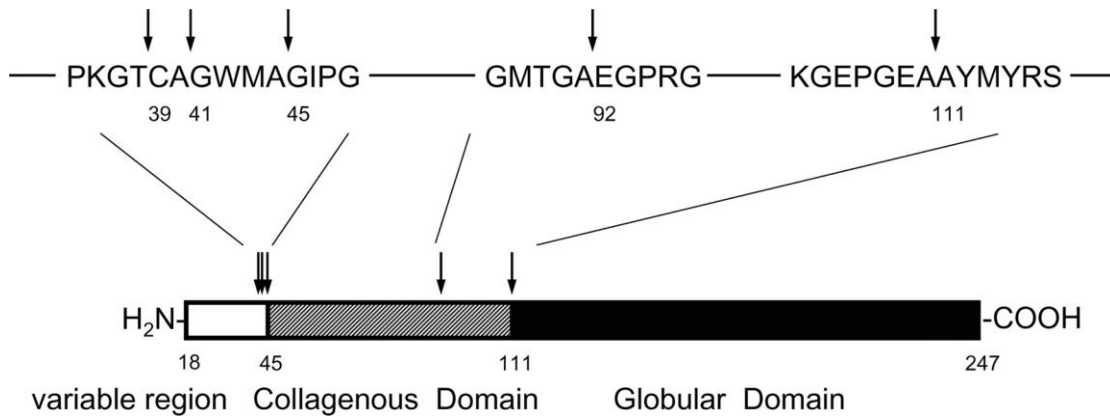
Η δομή της αντιπονεκτίνης

Το γονίδιο της ανθρώπινης αντιπονεκτίνης, αποτελείται από 3 εξώνια και 2 ιντρόνια, εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 3q27 και κωδικοποιεί μια εκκρινόμενη πρωτεΐνη 28kDa και 244 αμινοξέων. (Chandran et al 2003)

Αποτελείται από τέσσερις διακριτές περιοχές: μία αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία, μια μεταβλητή περιοχή, μια περιοχή ομοιάζουσα με το κολλαγόνο (ουρά) και μια καρβοξυτελική σφαιρική περιοχή (κεφαλή).

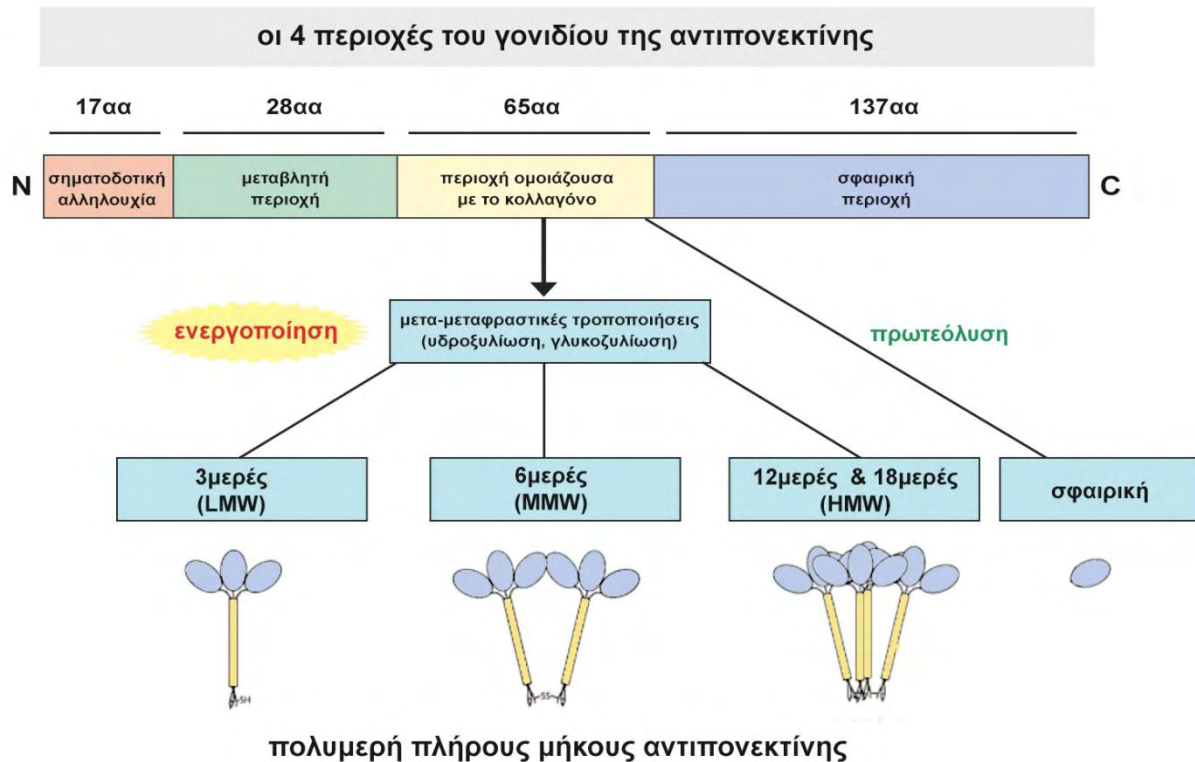
Η αντιπονεκτίνη εμφανίζει σημαντική δομική ομολογία με τον παράγοντα C1q του συμπληρώματος και τους τύπους VIII και X του κολλαγόνου (Ahima et al 2006), ενώ η τριτοταγής δομή της προσομοιάζει με αυτή της σφαιρικής περιοχής του TNF-α [20] (Kadowaki et al 2005).

Από την πλήρη μορφή της αντιπυονεκτίνης (full-length adiponectin) μπορεί να προκύψει, μετά από πρωτεολυτική διάσπαση, ένα μικρότερο πολυπεπτίδιο, η σφαιρική αντιπυονεκτίνη (globular adiponectin). Παρά το γεγονός ότι δεν έχει πλήρως αποσαφηνισθεί, φαίνεται ότι οι θέσεις πρωτεολυτικής διάσπασης της αντιπυονεκτίνης εντοπίζονται σε κατάλοιπα αμινοξέων της κολλαγονικής περιοχής (εικόνα 3) και η λευκοκυτταρική ελαστάση είναι ένα από τα υποψήφια ένζυμα που διαμεσολαβούν την πρωτεόλυση του μορίου. (Waki H, 2005)



Εικόνα 4: Το γονίδιο της αντιπυονεκτίνης αποτελείται από 3 εξώνια και 2 ιντρόνια καλύπτοντας μία περιοχή 16kb. Οι θέσεις πρωτεολυτικής διάσπασης της αντιπυονεκτίνης από την λευκοκυτταρική ελαστάση (Waki H, 2005).

Απαντάται σε πολυμερή. Τριμερές, χαμηλού μοριακού βάρους (LMW). Εξαμερές αποτελούμενο από δύο τριμερή συνδεδεμένα με δισουλφιδικό δεσμό (MMW). Δωδεκαμερές και δεκαοχταμερές, υψηλού μοριακού βάρους (HMW). (Kadowaki et al 2006, Yamauchi et al 2003) Η HMW μορφή της αντιπυονεκτίνης φαίνεται να είναι πιο δραστική βιολογικά σε σχέση με την LMW. (Pajvani et al 2003)



Εικόνα 5: Δομή της αντιπονεκτίνης. Η πλήρους μήκους αντιπονεκτίνης απαιτεί μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις για να αποκτήσει τη δραστική μορφή της (π.χ. υδροξυλίωση και γλυκοζυλίωση).

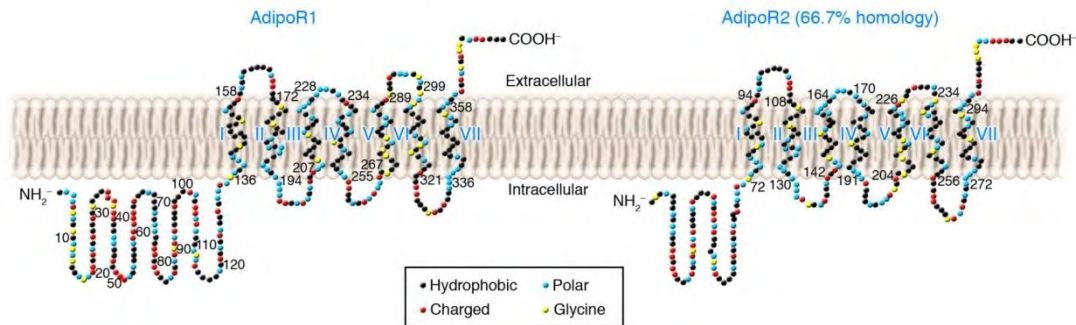
Η αντιπονεκτίνη εκφράζεται από τα λιποκύτταρα σαν πλήρους μήκους (full-length) κλάσμα καθώς και σαν σφαιρικό. Το LMW ολιγομερές θεωρείται η επικρατούσα μορφή στην αιματική κυκλοφορία (Rajvani et al 2004), όπου η αντιπονεκτίνη κυκλοφορεί σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξεως των 1.9–17.0 μg/ml (Wong et al 2004), ποσό το οποίο αναλογεί σε περίπου 0.05% της ολικής πρωτεΐνης του πλάσματος (Chandran et al 2003). Η σηματοδοτική ισχύς της αντιπονεκτίνης έχει συνδεθεί με τα υψηλά μοριακού βάρους πολυμερή και με μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις, όπως η γλυκοζυλίωση και υδροξυλίωση (Ahima et al 2006).

Οι γυναίκες έχουν υψηλότερα επίπεδα αντιπονεκτίνης σε σχέση με τους άνδρες, ανεξάρτητα από τη μάζα ή την κατανομή του λιπώδους ιστού. (Cnop et al 2003)

Οι υποδοχείς της αντιπονεκτίνης

Η αντιπονεκτίνη ασκεί τις δράσεις της συνδεδεμένη με δύο διαμεμβρανικούς υποδοχείς, τον AdipoR1 και AdipoR2 (εικόνα 5), οι οποίοι εμφανίζουν δομική ομολογία σε ποσοστό 67%. Οι AdipoR1 και AdipoR2 είναι μέλη της οικογένειας των υποδοχέων προγεστερόνης ADIPOQ. Michalakis Οι δύο υποδοχείς έχουν επτά

διαμεμβρανικές περιοχές, αλλά είναι δομικά και λειτουργικά διαφορετικοί από τους υποδοχείς που συνδέονται με G πρωτεΐνες (G protein coupled receptors/ GPCRs), δεδομένου ότι το αμινοτελικό άκρο είναι ενδοκυττάριο και το καρβοξυτελικό είναι εξωκυττάριο. (Yamauchi et al 2003)



Εικόνα 6: Δομή των υποδοχέων AdipoR1 και AdipoR2.

Αυτοί οι υποδοχείς έχουν εντοπιστεί σε ιστούς σε όλο το σώμα, συμπεριλαμβανομένου του κεντρικού νευρικού συστήματος. Ο AdipoR1 είναι ο υποδοχέας που δεσμεύεται με υψηλή χημική συγγένεια με τη σφαιρική αντιπυονεκτίνη και με χαμηλή με την πλήρους μήκους και εκφράζεται παντού. Ενώ ο AdipoR2 είναι ο υποδοχέας που έχει μεγαλύτερη χημική συγγένεια με την πλήρους μήκους (full-length) αντιπυονεκτίνη και εκφράζεται κυρίως στο ήπαρ. (Yamauchi et al 2003) (Ahima et al 2006)

Ένας ακόμη υποδοχέας της αντιπυονεκτίνης, η T-καντερίνη, έχει περιγραφεί προσφάτως [31 Hug], αλλά δεν εκφράζεται σε ανθρώπινη τροφοβλάστη (Benaitreau et al 2009). Η T-καντχερίνη (T-cadherin) παράγεται από το ενδοθήλιο και τα λεία μυϊκά κύτταρα, δεσμεύει την αντιπυονεκτίνη και ενδεχομένως δρα τροποποιητικά στην κινητική του μορίου, αλλά είναι αβέβαιο το αν διαμεσολαβεί στη μεταγωγή σήματος. Ορισμένα στοιχεία υποδηλώνουν ότι στον υποδοχέα T-καντερίνης μπορούν να δεσμεύονται οι εξαμερείς και οι HMW μορφές αντιπυονεκτίνης αλλά όχι οι μονομερείς σφαιρικές και τριμερείς μορφές. (Ahima et al 2006)

Η αντιπυονεκτίνη στην αναπαραγωγή

Υπόφυση: Οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στην υπόφυση του ανθρώπου, υποδηλώνοντας τοπική ρύθμιση του κεντρικού αναπαραγωγικού ενδοκρινικού άξονα με την αντιπυονεκτίνη (Psilopanagioti et al 2008). Η αντιπυονεκτίνη ρυθμίζει την έκκριση ορμονών και τη γονιδιακή έκφραση σε δύο ενδοκρινείς κυτταρικούς τύπους

της υπόφυσης που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή: στα σωματοτροφικά και στα γοναδοτροφά κύτταρα. Η αντιπυονεκτίνη αναστέλλει την απελευθέρωση της LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη), της GH (αυξητική ορμόνη) καθώς και της GnRH, μέσω φωσφορυλίωσης της AMPK, αλλά δεν έχει καμία επίδραση στα επίπεδα της FSH. (Wen et al 2008) (Lu et al 2008)

Αν και προηγούμενες μελέτες (Spranger et al 2006) ανέφεραν ότι η αντιπυονεκτίνη δεν διασχίζει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό, επόμενες μελέτες (Psilopanagioti et al 2008) έδειξαν ότι οι AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στο τοξοειδή και πλευρικό πυρήνα του υποθαλάμου.

Υποθάλαμος: Η αντιπυονεκτίνη αναστέλλει την έκκριση της ωξυτοκίνης, η οποία ως γνωστόν δρα στις λείες μυϊκές ίνες της μήτρας κυρίως προς το τέλος του τοκετού, κατά τη φάση της εξώθησης, ενισχύοντας τη συχνότητα και την ένταση των μυϊκών συσπάσεων του μυομητρίου. Σε παχύσαρκα άτομα του πληθυσμού αυξημένα επίπεδα ωξυτοκίνης. (Hoyda et al 2007) Επιπλέον, η αντιπυονεκτίνη διεγείρει την έκφραση των υποδοχέων GHRH-R και GHS-R, οι οποίοι είναι οι δύο κύριοι διεγερτικοί υποδοχείς ανάπτυξης στα σωματοτρόφα (Rodrigues-Pacheco et al 2007). Στον GH secretagogue –R, προσδένετε η γαστρεντερική ορμόνη γκρελίνη, που αυξάνει την άμεση κατανάλωση τροφής (πείνα).

Ωοθήκες: Οι επιδράσεις των αντιπυονεκτίνων στη διαδικασία της ωορρηξίας και της ωοθηκικής στεροειδογένεσης δεν έχουν μελετηθεί εκτενώς (Mitchell et al 2005). Στην ωοθήκη του ανθρώπου, έχει εντοπιστεί η έκφραση των υποδοχέων AdipoR1/AdipoR2, καθώς και των PPARs και AMPK (κύριοι μεσολαβητές αντιπυονεκτίνης) (Campos et al 2007). Οι υποδοχείς AdipoR1/AdipoR2 ήταν παρόντες σε κύτταρα θήκης και κοκκιώδη κύτταρα, και μέσω της σύνδεσης της αντιπυονεκτίνης προκαλούσαν την αύξηση της παραγωγής της προγεστερόνης και των οιστρογόνων E2 από τον ινσουλίνο εξαρτώμενο αυξητικό παράγοντα I (IGF) (Chabrolle et al 2007). Η σχέση της αντιπυονεκτίνης με την ινσουλίνη ή τον IGF-I υποδηλώνει τον ινσουλίνο-ευαίσθητο ρόλο της.

Η χορήγηση τεστοστερόνης προκαλεί μείωση της αντιπυονεκτίνης στο αίμα σε ποντίκια και ανθρώπους (Nishizawa et al 2002). Επιπλέον μειώνει τη στεροειδογένεση στα κύτταρα θήκης. Ωστόσο, δεν επηρεάζει τον ινσουλίνο-επαγόμενο πολλαπλασιασμό των κυττάρων θήκης στα μεγάλα ωοθυλάκια ούτε τη

λειτουργία κοκκιωδών κυττάρων. Επιπλέον, η LH βρέθηκε να αυξάνει το mRNA του AdipoR2 σε κύτταρα της θήκης, αλλά όχι στα κοκκιώδη κύτταρα (Lagaly et al 2008).

Επιπλέον γνωρίζουμε ότι, η παχυσαρκία και η αντίσταση στην ινσουλίνη συνοδεύονται από μείωση της SHBG και αύξηση του δείκτη ελεύθερων ανδρογόνων. (Ehrmann et al 2005)

Αντιπυονεκτίνη & Σύνδρομο Πολυκυστικών Ωοθηκών

Το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) χαρακτηρίζεται από την παρουσία κλινικής ή βιοχημικής υπερανδρογοναιμίας, χρόνια ανωορρηξία και πολυκυστικές ωοθήκες (Carmina et al 2004) και συνδέεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη, οπότε είναι λογικό να υποθέσουμε ότι τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης θα είναι χαμηλά σε γυναίκες με PCOS. Η μέτρηση της αντιπυονεκτίνης σε έναν ασθενή με PCOS δεν ενδείκνυται ως διαγνωστικός δείκτης.

Αντιπυονεκτίνη & Προεκλαμψία

Ανάμεσα στους παράγοντες προδιάθεσης για την εκδήλωση της υπέρτασικής νόσου της κύησης είναι η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης. Η προεκλαμψία παρουσιάζει χαμηλά επίπεδα αντιπυονεκτίνης, ειδικά κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου (D'Anna et al 2006). Δεν έχει ακόμα βρεθεί αξιόλογη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων αντιπυονεκτίνης στην προεκλαμψία με την παχυσαρκία, τον διαβήτη κύησης, τον δείκτη μάζας σώματος (BMI) ή κάποιο γενετικό παράγοντα.

Ο ρόλος της αντιπυονεκτίνης στην εμφύτευση εμβρύου & στη λειτουργία του πλακούντα

Η εγκαθίδρυση της εγκυμοσύνης εξαρτάται από 3 κρίσιμα γεγονότα: απόθεση, προσκόλληση και ενσωμάτωση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Και οι δύο υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 είναι παρόντες στο ενδομήτριο και τον πλακούντα.

Ενδομήτριο: Μελέτες έχουν δείξει ότι οι υποδοχείς AdipoR1 και AdipoR2 εκφράζονται στο ενδομήτριο, το αδενικό επιθήλιο του ανθρώπου και σε στρωματικούς ινοβλάστες. (Takemura et al 2006) Είναι ενδιαφέρον ότι τα επίπεδα μεταγραφής ήταν υψηλότερα κατά τη διάρκεια της μέσο-ωχρινικής φάσης του κύκλου, η οποία αντιστοιχεί στην περίοδο εμφύτευσης. Στα επιθηλιακά και στα στρωματικά κύτταρα η αντιπυονεκτίνη δρα μέσω φωσφορυλίωσης της AMPK. Αυτά τα ευρήματα

υποδηλώνουν ότι οι ομοιοστατικές και αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις της αντιπυονεκτίνης μπορούν να επηρεάσουν την εμφύτευση στο ενδομήτριο. Μετά από σύγκριση, της έκφρασης της αντιπυονεκτίνης και των υποδοχέων της στο ενδομήτριο κατά τη διάρκεια του παραθύρου της εμφύτευσης, ανάμεσα σε γυναίκες με επαναλαμβανόμενες αποτυχημένες εμφυτεύσεις και σε γόνιμες γυναίκες (control), βρέθηκε ότι η έκφραση των AdipoR1 και AdipoR2 μειώθηκε στις πρώτες. (Dos Santos et al 2012) Επίσης, τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στο πλάσμα ασθενών με ενδομητρίωση και καρκίνο του ενδομητρίου είναι πολύ μειωμένα. (Michalakis et al 2010) Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι μια μεταβολή στην έκφραση της αντιπυονεκτίνης ή/και των υποδοχέων της μπορεί να εμπλέκονται στην ενδομητρία δεκτικότητα της μήτρας. (Dos Santos et al 2012) Επιπλέον, η απορρύθμιση της έκφρασης αυτού του συστήματος έχει συσχετιστεί με ορισμένες παθολογικές καταστάσεις που συνδέονται με αποβολή ή κακή εμφύτευση. (Kim et al 2011) Παράλληλα, βρέθηκε ότι έμβρυα με ενδομήτρια καθυστέρηση ανάπτυξης (IUGR) προσαρμόζουν το μεταβολισμό τους, παράγοντας την HMW αντιπυονεκτίνη, έτσι ώστε να αποκτήσει το σώμα τους ευαισθησία στην ινσουλίνη προετοιμάζοντάς τη νεογνική του ανάπτυξη. Με τα δεδομένα αυτά, το προφίλ έκφρασης των AdipoR1 και AdipoR2 θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα νέος παράγοντας για την πρόβλεψη της αποτυχίας εμφύτευσης.

Πλακούντας: Ο πλακούντας στον άνθρωπο διαπιστώθηκε ότι εκφράζει όλες τις γνωστές κυτοκίνες. Οι κυτοκίνες παράγονται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων του πλακούντα: τα κύτταρα Hofbauer, τα κύτταρα τροφοβλάστης, και τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα. (Zavalza-Gomez et al 2008) Η τροφοβλάστη και ο πλακούντας αποτελούν τοπικές πηγές έκκρισης αντιπυονεκτίνης. Οι υποδοχείς αντιπυονεκτίνης είναι παρόντες στον ανθρώπινο πλακούντα. (Chen et al 2003) Να σημειωθεί, ότι η απελευθέρωση κυτοκίνης από πλακούντα συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης. (Lappas et al 2005)

Η αντιπυονεκτίνη θεωρείται ως ρυθμιστής της ανάπτυξης του πλακούντα ασκώντας αντιπολλαπλασιαστικά αποτελέσματα σε τροφοβλαστικά κύτταρα. Όπως είπαμε, κατά τη ανάπτυξη του πλακούντα, κύτταρα τροφοβλάστης διαφοροποιούνται σε 2 τύπους κυττάρων με ξεχωριστές ιδιότητες. Οι συγκυτιοτροφοβλάστες ασκούν επιδράσεις στο ενδοκρινικό σύστημα, ενώ οι κυτταροτροφοβλάστες εμφανίζουν

ιδιότητες εισβολής και πολλαπλασιασμού, προκειμένου να διασφαλιστεί η επιτυχής εμφύτευση. Ωστόσο, σε αντίθεση με τα καρκινικά κύτταρα, αυτές οι πολλαπλασιαστικές ικανότητες και οι ικανότητες εισβολής των κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων ελέγχονται και ρυθμίζονται για να εξασφαλιστεί η επιτυχής εμφύτευση. (Benaitreau et al 2009) Αμφότεροι οι υποδοχείς αντιπυονεκτίνης βρέθηκαν να εκφράζονται σε απομονωθέντα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα από ανθρώπινο πλακούντα και σε καλλιέργεια από ανθρώπινα πρωτογενή κύτταρα τροφοβλάστης. Αλλά μόνο η έκφραση του AdipoR2, και όχι του AdipoR1, έχει αποδειχθεί σε κυτταροτροφοβλάστες και συγκυτιοτροφοβλάστες. Έτσι, ο πλακούντας μπορεί να είναι στόχος της μητρικής αντιπυονεκτίνης για τη ρύθμιση του πλακουντιακού περιβάλλοντος. (McDonald et al 2009)

Κυρίως, η πλήρους μήκους αντιπυονεκτίνη αναστέλλει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης σε πρωτογενή ανθρώπινα κύτταρα της τροφοβλάστης, που έρχεται σε αντίθεση με την ινσουλίνο-ευαίσθητη δράση της στο ήπαρ και τους μύες. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική έκφραση των APPL1/APPL2 στους διάφορους ιστούς. (Castellucci et al 2000) Η σφαιρική αντιπυονεκτίνη μειώνει το πλακουντιακό γαλακτογόνο, τις γοναδοτροπίνες στο χόριο, και τη προγεστερόνη σε κύτταρα τροφοβλάστης. (McDonald et al 2009)

Έρευνες αποκάλυψαν ότι, η δράση της αντιπυονεκτίνης στον ανθρώπινο πλακούντα διαφέρει στα διάφορα στάδια ανάπτυξης της κύησης. Στο πρώτο τρίμηνο κύησης, η αντιπυονεκτίνη συμμετέχει στην επέκταση (εισβολή) της κυτταροτροφοβλάστης και στη διαμόρφωση του συγκυτίου. Αυτό το επιτυγχάνει:

- a) ενεργοποιώντας τις μεταλλοπρωτεϊνάσες MMP2 και MMP9 που εμπλέκονται στην εισβολή της κυτταροτροφοβλάστης,
- b) αυξάνοντας την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) που παράγεται από τον πλακούντα και προάγει τη μετανάστευση και την εισβολή της τροφοβλάστης αλλά δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό. (Prast et al 2008)
- c) αυξάνοντας δύο τροφοβλαστικούς δείκτες διαφοροποίησης, τη λεπτίνη και τη συγκυτίνη-2 που προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της τροφοβλάστης, την επιβίωση και την εισβολή. (Schulz et al 2004, Cauzac et al 2003, Magarinos et al 2007 Castellucci et al 2000)

Αντιθέτως, στους τελευταίους μήνες της κύησης, η αντιπυονεκτίνη αναστέλλει τη συγκυτιοποίηση. Συγκεκριμένα, μειώνει την ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), το πλακουντιακό γαλακτογόνο και ένζυμα της στεροειδογένεσης (P-450 αρωματάση).

Επιπλέον, βρέθηκε ότι η αντιπυονεκτίνη στον ομφάλιο λώρο αυξάνει με την ηλικία της κύησης, φθάνοντας στο τέλος της κύησης σε 20 φορές υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το πρώτο τρίμηνο. Η συγκέντρωση της αντιπυονεκτίνης στο αίμα της μητέρας έχει συσχετιστεί θετικά με το πάχος του πλακούντα.

Πώς επηρεάζει η αντιπυονεκτίνη την εμβρυϊκή ανάπτυξη

Δεδομένου ότι η αντιπυονεκτίνη εμπλέκεται στη κατανομή του λίπους και την αντίσταση στην ινσουλίνη, θέτει το ζήτημα των επιπέδων αντιπυονεκτίνης στο έμβρυο. Η συγκέντρωση της αντιπυονεκτίνης της μητέρας είναι σημαντικά χαμηλότερη από τις συγκεντρώσεις αντιπυονεκτίνης στο ομφαλοπλακουντιακό αίμα, γεγονός που υποδηλώνει μια εμβρυϊκή πηγή της ορμόνης. (Mazaki-Toni et al 2005) Στο εμβρυϊκό πλάσμα κυκλοφορούν οι αντιπυονεκτίνες HMW και LMW. (Pinar et al 2008) Η αντιπυονεκτίνη, επίσης, ανιχνεύθηκε σε αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα εμβρυϊκών οργάνων, συμπεριλαμβανομένων των σκελετικών μυών, των νεφρών και του εγκεφάλου.

Η αντιπυονεκτίνη στον ομφάλιο λώρο συσχετίστηκε θετικά με το βάρος του εμβρύου και τη εμβρυοπλακουντιακή αναλογία βάρους. (Kadowaki et al 2006, Sivan et al 2003, Kotani et al 2004) Μια μελέτη έχει δείξει ότι τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε δυσανάλογα μεγάλα νεογνά, γεγονός που υποδηλώνει ένα αρνητικό μηχανισμό feedback μεταξύ του λιπώδους ιστού και της αντιπυονεκτίνης. (Mazaki-Toni et al 2007) Επιπλέον, η μακροχρόνια παρακολούθηση των παιδιών αυτών, έδειξε μια πιο έντονη αύξηση του σωματικού βάρους κατά τη διάρκεια των πρώτων 6 μηνών της ζωής τους, καθώς και αυξημένο BMI και παχυσαρκία στην ηλικία των 3. (Mantzoros et al 2009)

Η ανάπτυξη του εμβρύου μπορεί να επηρεαστεί από ανεπιθύμητους παράγοντες κατά τη διάρκεια της κύησης, οι οποίοι έχουν ως αποτέλεσμα το έμβρυο να εμφανίσει διάφορες ασθένειες στη μετέπειτα ζωή του, όπως αντίσταση στην ινσουλίνη και σχετιζόμενες μεταβολικές νόσους. (Chen et al 2003, Chen et al 2004) Η ανάπτυξη

του εμβρύου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ικανότητα του πλακούντα να μεταφέρει αμινοξέα. Οι μεταφορείς θρεπτικών συστατικών διεγείρονται από την ινσουλίνη και τον IGF-II. Η αντιπυονεκτίνη συσχετίζεται αρνητικά με το IGF-II σε νεογνά. Σε κυήσεις όπου η αντιπυονεκτίνη ήταν σε μη φυσιολογικά επίπεδα, παρατηρήθηκε αναστολή της μεταφοράς αμινοξέων κάτι που έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη του εμβρύου. (Jones et al 2010) Επιπλέον, η αντιπυονεκτίνη μπορεί να συμμετέχει σε μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για τις ανοσολογικές μεταβολές που μεταδίδονται στο έμβρυο.

Η αντιπυονεκτίνη και η Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή

Με βάση το ότι η αντιπυονεκτίνη μειώνεται όσο αυξάνονται τα οιστρογόνα και αυξάνεται από τη hCG, μελετήθηκε κατά πόσο τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης είχαν μεταβληθεί σε γυναίκες που υποβάλλονται σε υποβοηθούμενη αναπαραγωγή. Σε αυτή τη μελέτη, οι ερευνητές παρακολούθησαν 52 γυναίκες κατά τη διάρκεια ενός κύκλου IVF και βρήκαν μια μείωση στα επίπεδα αντιπυονεκτίνης από την ημέρα 0 (βασική γραμμή) προς την ημέρα της ένεσης hCG. Η μείωση αυτή εξηγείται εν μέρει από τα υψηλά επίπεδα E2, αν και τα επίπεδα E2 την ημέρα της ένεσης hCG δεν συσχετίζεται με τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης. Αντιθέτως, μετα-hCG επίπεδα αντιπυονεκτίνης έδειξε μια επακόλουθη αύξηση, η οποία με τη σειρά της συσχετίζεται με αυξημένα επίπεδα της P μετά τη μεταφορά, πιθανώς εξηγείται από συσσώρευση λιπιδίων και την επακόλουθη παραγωγή P λόγω της αντιπυονεκτίνης. (Liu et al 2006)

Σύμφωνα με αυτές τις παρατηρήσεις, τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης βρέθηκαν να είναι υψηλότερα σε 9 από τις 32 γυναίκες που συμμετείχαν στην IVF-ICSI που έμειναν έγκυες, σε σύγκριση με τα χαμηλότερα επίπεδα κυκλοφορούντων σε ανεπιτυχείς κύκλους. Τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης ήταν υψηλότερα μεταξύ της ομάδας με την επιτυχή κύηση κατά την ημέρα της ωοληψίας καθώς και τις προηγούμενες 3 ημέρες. Είναι ενδιαφέρον ότι, η αντιπυονεκτίνη ήταν αυξημένη στην ομάδα με την επιτυχή έκβαση, παρότι δεν υπάρχει καμία διαφορά κατά την έναρξη της διέγερσης των ωοθηκών. Επιπλέον, στην ίδια μελέτη, η αντιπυονεκτίνη ήταν παρόν στο υγρό του ωοθυλακίου, αλλά τα επίπεδα δεν συσχετίστηκαν με τα ποσοστά γονιμοποίησης ή τη δοσολογία γοναδοτροπίνης. Οι συγγραφείς εικάζουν ότι επειδή τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στο θυλακίωδες υγρό διέφεραν σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης βλαστομεριδίου, τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης μπορεί να έχουν προγνωστική αξία.

(Bersinger et al 2006) Μια δεύτερη μελέτη ασθενών-μαρτύρων 56 γυναικών διαπίστωσαν ότι τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης την ημέρα πριν από τη χορήγηση γοναδοτροπινών σχετίζεται με τον αριθμό των ωοκυττάρων και ότι τα επίπεδα της αντιπυονεκτίνης ήταν υψηλότερα στις γυναίκες που συνέλαβαν. (Liu et al 2005) Ανεξάρτητα από τον αριθμό των ωοκυττάρων που λαμβάνονται ή τα επίπεδα των οιστρογόνων, τα επίπεδα αντιπυονεκτίνης στο θυλακικό υγρό βρέθηκαν να είναι υψηλότερα στις γυναίκες που έλαβαν ανασυνδυασμένη LH, πιθανώς σχετίζονται με τη μείωση ανδρογόνων και την αυξημένη ευαισθησία στην ινσουλίνη. (Gutman et al 2008) Επίσης, οι υποδοχείς αντιπυονεκτίνης βρέθηκαν να είναι παρόντες σε ανθρώπινα κύτταρα κοκκιωδών, προωθώντας μια αύξηση της P και E2 τοπικά σε κοκκιώδη κύτταρα, (Chabrolle et al 2008) και AdipoR1 και AdipoR2 βρέθηκε να ρυθμίζεται από κατεργασία hCG σε αρουραίους. (Chabrolle et al 2007) Ο μηχανισμός που ευθύνεται για την βελτιωμένη έκβαση της κύησης θα μπορούσε να ενισχυθεί ανάπτυξη των ωοκυττάρων (παρατηρήθηκαν σε έμβρυα χοίρων, ενδεχομένως, μέσω ενός ανασταλτικού μονοπατιού ενεργοποιείται από τη μιτογόνο κινάση [MAPK]), με ένα θετικό αποτέλεσμα επί της μειωτικής ωρίμανσης και ένα αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης του εμβρύου στο στάδιο βλαστοκύστης. (Chappaz et al 2008)

Αντιπυονεκτίνη & Μεταγωγικά μονοπάτια

Η αντιπυονεκτίνη διεγείρει την οξειδωση των λιπαρών οξέων, καταστέλλει την ηπατική γλυκονογένεση και αναστέλλει την προσκόλληση των μονοκυττάρων, την δημιουργία αφρωδών μακροφάγων, τον πολλαπλασιασμό και την μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων των αγγείων (Kadowaki et al 2006).

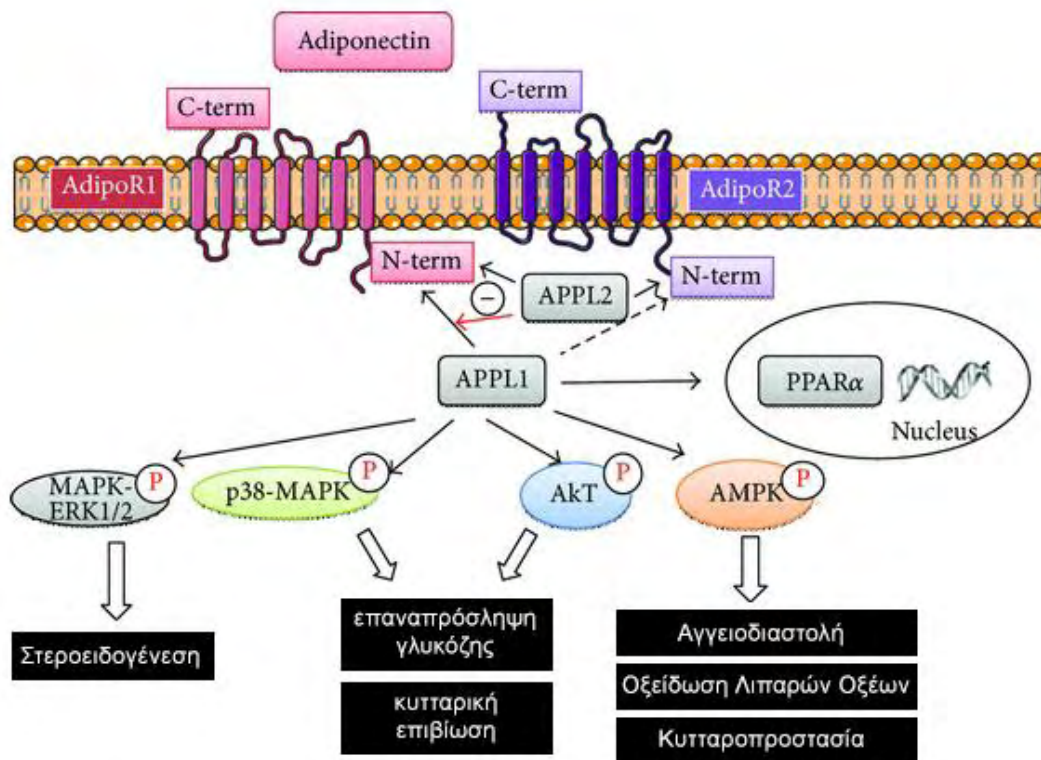
Οι δύο υποδοχείς της αντιπυονεκτίνης έχουν κάπως διαφορετικά μοτίβα έκφρασης και συγγένεια με διαφορετικού τύπου προσδέτες, καθώς επίσης φαίνεται να εμπλέκονται και σε ξεχωριστά σηματοδοτικά μονοπάτια μέσα στα κύτταρα. Το κλάσμα πλήρους μήκους της αντιπυονεκτίνης δρα μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεϊνικής κινάσης του AMP ενεργοποιώντας την στο ήπαρ και στους μύες, ενώ το σφαιρικό κλάσμα δρα με τον ίδιο τρόπο στους μύες. Η δράση της επιτυγχάνεται μέσω των δύο διαφορετικών υποδοχέων (AdipoR1, AdipoR2). Αποσιώπηση του adipoR1 μειώνει την ικανότητα σύνδεσης της σφαιρικής αντιπυονεκτίνης ενώ αποσιώπηση του adipoR2 μειώνει δραστικά την ικανότητα σύνδεσης της αντιπυονεκτίνης πλήρους μήκους. Οι δύο

υποδοχείς δεν φαίνετε να συνδέονται με G-πρωτεΐνες αφού σε πειράματα υπερέκφρασης τους δε φαίνετε να επηρεάζονται το cAMP, το cGMP και τα ενδοκυτταρά επίπεδα ασβεστίου. (Mao et al 2006)

Η AMPK ενεργοποιείται μόλις μειωθεί στο κύτταρο ο λόγος ATP/AMP και τότε, αφενός ενεργοποιεί καταβολικά μονοπάτια, όπως γλυκόλυση και οξειδωση λιπαρών οξέων και αφετέρου εμποδίζει τα αναβολικά μονοπάτια, όπως η λιπογένεση και η σύνθεση χοληστερόλης.

Προεπεξεργασία κυττάρων χονδροσάρκωματος με αναστολείς AMPK [Ara A ή ένωση C] φαίνεται να μειώνουν α) την επαγόμενη από αντιπονεκτίνη κυτταρική μετανάστευση και β) τη μεσολαβούμενη από αντιπονεκτίνη, αυξημένη έκφραση $\alpha 2\beta 1$ ιντεγκρίνης. Ως εκ τούτου, ο AMPK $\alpha 1$ και ο AMPK $\alpha 2$ εμπλέκονται, στην επαγόμενη από αντιπονεκτίνη, μετανάστευση και στην έκφραση ιντεγκρινών σε χονδροσάρκωματα. (Yung-Cheng Chiu et al 2009)

Οι δύο υποδοχείς φαίνεται να ενεργοποιούν τους PPAR α (peroxisome proliferator activated receptor alpha), AMPK, και p38 MAPK. Στα μυοκύτταρα, μέσω αυτών των μονοπατιών γίνεται η επαναπρόσληψη γλυκόζης και η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Στα ηπατοκύτταρα, μέσω αυτών των μονοπατιών γίνεται η οξείδωση των λιπαρών οξέων. Η αντιπονεκτίνη μειώνει τη γλυκόζη στο πλάσμα του αίματος καθώς και μόρια που συμμετέχουν στη γλυκονογέννηση. (Mao et al 2006)



Εικόνα 7: Μεταγωγή σήματος των υποδοχών της αντιπονεκτίνης.

Παρόλο που το μονοπάτι σηματοδότησης μέσω της AMPK θεωρείται ο πρωτεύων μηχανισμός ενίσχυσης σήματος της αντιπονεκτίνης, υπάρχουν μελέτες που η AMPK δεν φαίνεται να ανταποκρίνεται μετά από χορήγηση αντιπονεκτίνης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ενεργοποιείται το μονοπάτι της μιτογόνο κινάσης πρωτεΐνης, ERK1/2 (Maillard et al 2010, Chabrolle et al 2009, Lee et al 2008).

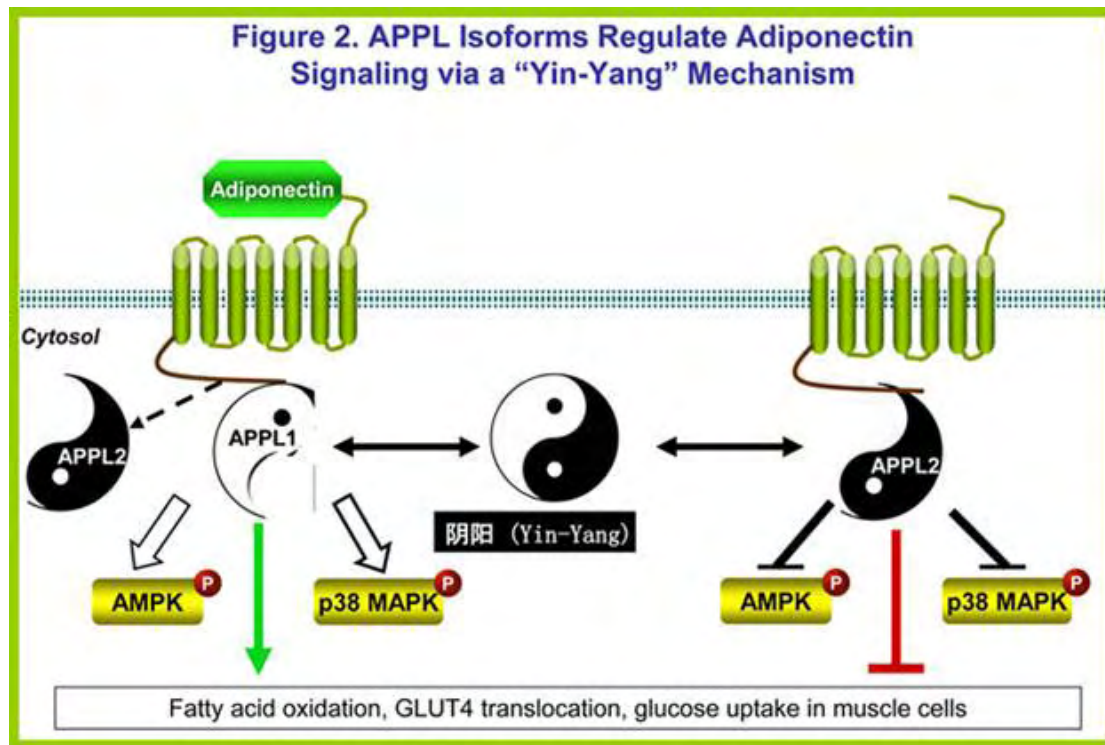
Η αντιπονεκτίνη φαίνεται επίσης να πυροδοτεί και άλλα ενδοκυτταρικά μονοπάτια μέσω διαφόρων σηματοδοτικών μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένου του καταρράκτη σηματοδότησης της ινσουλίνης, της c-Jun-N-terminal kinase (JNK), της phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), της Janus kinase/Signal Transducers και Activators of Transcription (JAK/STAT) και του NFκB. Επίσης, η αντιπονεκτίνη ενεργοποιεί την Akt, επίσης γνωστή ως πρωτεΐνη κινάση B (PKB), η οποία είναι μια ειδική κινάση σερίνης/θρεονίνης που παίζει καθοριστικό ρόλο σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο μεταβολισμός της γλυκόζης, η κυτταρική προστασία, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η μεταγραφή και η μετανάστευση των κυττάρων. Η Akt θα μπορούσε επίσης να ενεργοποιεί τον Nf-κB μέσω ρύθμισης της IκB κινάσης (IKK), με αποτέλεσμα τη μεταγραφή γονιδίων προ-επιβίωσης. (Coore et al 2008,

Haugen and Drevon et al 2007, Yamauchi et al 2003a, Chabrolle et al 2009, Faissner et al 2006)

Επίσης, η αλληλεπίδραση του APPL1 με τον adiporR1 παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγωγή σήματος της αντιπυονεκτίνης μέσω των μονοπατιών AMPK και p38 MAPK. (Mao et al., 2006). Ο APPL1 ενεργοποιεί το σηματοδοτικό μονοπάτι του υποδοχέα της αντιπυονεκτίνης ακόμη και όταν οι υποδοχείς δεν ενεργοποιούν άμεσα τον AMPK. Αναστολή του APPL1, μειώνει την ικανότητα της αντιπυονεκτίνης να ενεργοποιεί την ERK1/2 σε κύτταρα τύπου HEK293 (Lee et al 2008). Σε σκελετικά μυοκύτταρα, ο APPL1 επηρεάζει τη μεταφορά γλυκόζης μέσω της αλληλεπίδρασης με την GTPase Rab5 και σχετίζεται με τη ρύθμιση του μονοπατιού της Akt που διεγείρεται από την ινσουλίνη (Hosch et al 2006).

Ο APPL2, μία ισομορφή του APPL1, είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού της αντιπυονεκτίνης. (Wang et al 2009)

Ο APPL2 συνδέεται με τον υποδοχέα της αντιπυονεκτίνης στη κυτταρική μεμβράνη, ενώ ο APPL1 εντοπίζεται στο κυτοσόλιο. Όταν η αντιπυονεκτίνη συνδέεται με τον υποδοχέα της, η θέση των δύο πρωτεϊνών αλλάζει, έτσι ώστε ο APPL1 να συνδεθεί με τον υποδοχέα της αντιπυονεκτίνης και να ενισχύσει το σηματοδοτικό μονοπάτι της. (Wang et al 2009)



Εικόνα 8: Οι APPL1 / APPL2 ισόμορφες λειτουργούν μεταξύ τους ως ένα ολοκληρωμένο «Yin-Yang» στη σηματοδότηση της αντιπονεκτίνης.

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι η κινάση σερίνης/θρεονίνης 11 (STK11 ή LKB1) και η κινάση ασβέστιου/καλμοδουλίνης-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση (CaMKK) μεσολαβεί στις επιδράσεις της αντιπονεκτίνης ανοδικά του AMPK. (Fujii et al 2006)

Η διείσδυση των κυττάρων στην εξωκυττάρια ουσία και στους ιστούς απαιτεί αυξημένη κυτταρική κινητικότητα και ρυθμίζεται από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας. Ο διεισδυτικός αυτός φαινότυπος συνδέεται με την αύξηση των σηματοδοτικών συμπλόκων v-Src-FAK στα διεισδυτοπόδια (invasion podia), τα οποία είναι κυτταρικές προεκτάσεις πλούσιες σε ιντεργκρίνες και μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMP), και χρησιμεύουν στη καταστροφή του φράγματος της βασικής μεμβράνης διευκολύνοντας τη διείσδυση των κυττάρων. Πολλά από τα ένζυμα, που σχετίζονται με την αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας και την κυτταρική διήθηση, εμφανίζουν στους υποκινητές τους αλληλουχίες πρόσδεσης για τον NF-κB με σημαντικότερους εκπροσώπους το u-PA (urokinase-type plasminogen activator) και τις MMP-2, MMP-9. (Aggarwal et al 2004)

Σε κύτταρα χονδροσαρκώματος η έκφραση των υποδοχέων AdipoR έχει συνδεθεί με το μεταστατικό φαινότυπο των κυττάρων αυτών. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού

AdipoR/AMPK/p38, είναι απαραίτητη για τη σύνδεση του NF-κB στο DNA προκειμένου να γίνει η μετανάστευση και η εισβολή των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων. (Yung-Cheng Chiu et al 2009)Λειτουργώντας ως διμερές, ο NF-κB, μεταφέρεται στον πυρήνα και συνδέεται στο DNA, ρυθμίζοντας την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων μεταφέροντας πληροφορίες που φθάνουν στον πυρήνα προερχόμενες από κυτοκίνες, αυξητικούς παράγοντες, μόρια προσκόλλησης ή άλλα μιτογόνα ερεθίσματα. Συγκεκριμένα, η φωσφορυλίωση της FAK οδηγεί στη στρατολόγηση της Src στα διεισδυτοπόδια. Η FAK-Src ενεργοποιεί τη JNK (μέσω φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης σκαλωσιάς JSAP1 ή μέσω του μονοπατιού p130CAS/CRK/DOCK/Rac/JNK). Στη συνέχεια, η JNK είτε φωσφορυλιώνει την παξιλλίνη(Sr178) οδηγώντας σε αλλαγές του κυτταροσκελετού είτε επάγει τη μεταγραφή των γονιδίων των μεταλλοπρωτεϊνών MMP2, MMP9. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η μετανάστευση του καρκίνου μπορεί να συμβεί μέσω ενεργοποίησης του υποδοχέα της ιντεγκρίνης α2β1 από την αντιπυονεκτίνη.

Αρνητικός ρυθμιστής της λειτουργίας του NF-κB είναι η ομάδα των πρωτεϊνών IκB, οι οποίες δεσμεύουν τον NF-κB, αυξάνουν τη συσσώρευσή του στο κυτταρόπλασμα και παρεμποδίζουν τη δράση του στον πυρήνα. Θετικοί ρυθμιστές του NF-κB αποτελούν οι κινάσες των IκB (IKK), οι οποίες φωσφορυλιώνοντας τις IκB επάγουν την αποδόμησή τους από το σύστημα της ουβικουΐτινης και σε συνέπεια απελευθερώνεται ο NF-κB. Με τη δράση τους αυτή αυξάνεται η συγκέντρωση του NF-κB στον πυρήνα. (Kim et al 2006) Είναι σαφές ότι η αυξημένη έκφραση του NF-κB διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην έκκριση ενζύμων που διασπούν την εξωκυττάρια ουσία. (Tsunoda et al 2005)

Σκοπός

Αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η καλλιέργεια τροφοβλαστικών κυττάρων υπό την επίδραση αντιπυονεκτίνης για 24 ώρες και 48 ώρες και ο ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του AdipoR1 και του AdipoR2 με τη μέθοδο της Real time PCR με σκοπό την εύρεση ρόλου των υποδοχέων της αντιπυονεκτίνης στην κυτταρική διείσδυση της τροφοβλάστης.

Υλικά & Μέθοδοι

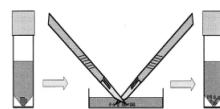
Δειγματοληψία χοριακών λαχνών (Chorionic villus sampling/CVS)

Εξετάστηκαν 3 δείγματα από προγεννητικό έλεγχο λήψης τροφοβλάστης (CVS) από φυσιολογικές γυναίκες 32-35 ετών, οι οποίες βρίσκονταν στο 1ο τρίμηνο κύησης (11η-13η εβδομάδα). Κατά τη δειγματοληψία χοριακών λαχνών αναρροφάται τροφοβλαστικός ιστός, από την περιοχή των λαχνών του χορίου, διατραχηλικά ή διακοιλιακά. Οι λάχνες που λαμβάνονται για προγεννητική διάγνωση είναι οι τριτογενείς, προέρχονται από το λαχνικό χόριο και αποτελούνται από μεσεγχυματικό πυρήνα, κυτταροτροφοβλάστη και ένα εξωτερικό στρώμα συγκυτιοτροφοβλάστης. Η λήψη του δείγματος έγινε από ειδικό κλινικό.

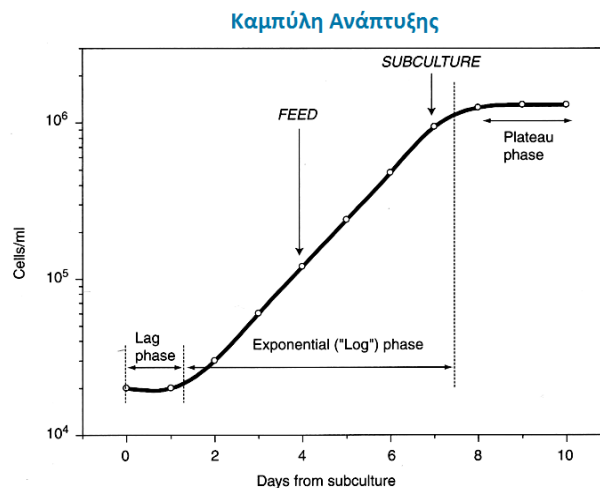
Καλλιέργεια χοριακών λαχνών

Τα δείγματα παραλαμβάνονται σε σωλήνες Universal που περιέχουν θρεπτικό υλικό για επεξεργασία στο εργαστήριο. Όλοι οι απαραίτητοι χειρισμοί πραγματοποιούνται μέσα σε θάλαμο κάθετης νηματικής ροής για αποφυγή μολύνσεων. Τα δείγματα, συνήθως, περιέχουν τόσο χοριακές λάχνες όσο και μητρικό ιστό. Στόχος είναι να καθαριστεί το δείγμα διεξοδικά και να απομακρυνθεί ο μητρικός ιστός έτσι ώστε να αποφευχθούν τα διαγνωστικά λάθη.

1. Ο καθαρισμός του δείγματος από τα πήγματα γίνεται σε τριβλίο Petri με 1-3ml PBS ισοτονικό(χωρίς αντιβιοτικά)
2. Μετά τον καθαρισμό οι ιστοί τοποθετούνται σε τριβλία Petri και κόβονται σε πολύ μικρά κομμάτια. Αυτό συμβαίνει γιατί έχει βρεθεί ότι τα περισσότερα κύτταρα αναπτύσσονται από το μεσεγχυματικό πυρήνα της λάχνης. Με το κόψιμο της λάχνης απομακρύνονται τα εξωτερικά στρώματα της τροφοβλάστης και αποκαλύπτεται ο μεσεγχυματικός πυρήνας



3. Μεταφορά σε falcon και αναμονή έως ότου καθιζάνουν
4. Αφαίρεση του υπερκειμένου
5. Προσθήκη 1-2ml κολλαγενάση και 1-2ml θρυψίνη και έπειτα παραμονή στον κλίβανο (Heraus Instruments, 37 °C, 5% CO₂) για περίπου 1 ώρα με ανοιχτό καπάκι. Στο διάστημα ανακινούμε κάθε 15min
6. Προσθήκη καλλιεργητικού μέσου DMEM/F1-12 (10% ορό εμβρύου βοός FBS, 1% πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη-P/S, 5% L-γλουταμίνη) προκειμένου να ανασταλεί η δράση των ενζύμων
7. Φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7min
8. Αφαίρεση του υπερκειμένου
9. Προσθήκη 1ml καλλιεργητικού μέσου στο ίζημα και παράλληλα μηχανικές κινήσεις χρησιμοποιώντας σύριγγα ινσουλίνης ώστε να απελευθερωθούν τα κύτταρα
10. Προσθήκη περίπου 6ml καλλιεργητικού μέσου ξεπλένοντας παράλληλα τα τοιχώματα του falcon
11. Φυγοκέντρηση στις 1300rpm για 10min
12. Αφαίρεση υπερκειμένου. Χτύπημα του falcon για να σπάσει το ίζημα και προσθήκη 3-4ml θρεπτικού
13. Μεταφορά σε φλάσκα των 25cm² εφόσον προηγουμένως έχει ξεπλυθεί με θρεπτικό
14. Παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο => η καλλιέργεια έχει κύτταρα
15. Επώαση στον κλίβανο και έλεγχος κάθε 2-3 ημέρες. Όπου ελέγχετε η πυκνότητα των κυττάρων που προσκόλλησαν στη φλάσκα, το χρώμα του θρεπτικού υλικού και η ενδεχόμενη επιμόλυνση. Τα κύτταρα αναπτύσσονται, πολλαπλασιάζονται και καλύπτουν την επιφάνεια που τους προσφέρεται. Όταν καλυφθεί η επιφάνεια τα κύτταρα ακουμπούν μεταξύ τους και σταματά η ανάπτυξη (αναστολή επαφής). Αφού οι καλλιέργειες έχουν αναπτυχθεί ικανοποιητικά και τα κύτταρα καλύψουν το 80% περίπου της φλάσκας (8-10 ημέρες μετά τον εμβολιασμό) γίνεται ανακαλλιέργεια.



Εικόνα 9: Καμπύλη ανάπτυξης

Ανακαλλιέργεια κυττάρων

1. Απομάκρυνση του περιεχομένου της φλάσκας
2. Πλύση των κυττάρων με 4-5ml PBS (χωρίς Ca^{2+} , Mg^{2+})
3. Προσθήκη 1-1,5ml θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $5\% \text{CO}_2$) για 2-5min. Η θρυψίνη διαχωρίζει τα κύτταρα μεταξύ τους και τα ξεκολλάει από την επιφάνεια της φλάσκας. «Χτύπημα» της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και έλεγχος στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
4. Προσθήκη καλλιεργητικού μέσου με ορό για την απενεργοποίηση της θρυψίνης
5. Μεταφορά των κυττάρων σε falcon (έλεγχος της φλάσκας αν έχουν μείνει κύτταρα)
6. Φυγοκέντρηση στις 1700rpm για 7min
7. Αφαίρεση υπερκειμένου(πρώτα τις φυσαλίδες) και «χτύπημα» του falcon για να σπάσει το ίζημα
8. Προσθήκη 5ml καλλιεργητικού μέσου στο falcon
9. Καινούργια φλάσκα: ξέπλυμα με καλλιεργητικό μέσο και μεταφορά του υλικού από το falcon στη φλάσκα. Επειδή, δεν υπήρχαν πολλά κύτταρα δεν έγινε μοίρασμα σε περισσότερες φλάσκες

Κατάψυξη κυττάρων

1. Απομάκρυνση του περιεχομένου της φλάσκας

2. Πλύση των κυττάρων με 4-5ml PBS (χωρίς Ca²⁺,Mg²⁺)
3. Προσθήκη 1-1,5ml θρυψίνης και επώαση στον κλίβανο (37 °C, 5% CO₂) για 2-5min. Η θρυψίνη διαχωρίζει τα κύτταρα μεταξύ τους και τα ξεκολλάει από την επιφάνεια της φλάσκας. «Χτύπημα» της φλάσκας για να ξεκολλήσουν τα κύτταρα και έλεγχος στο ανάστροφο μικροσκόπιο.
4. Προσθήκη καλλιεργητικού μέσου με ορό για την απενεργοποίηση της θρυψίνης
5. Μεταφορά των κυττάρων σε falcon (έλεγχος έλεγχος της φλάσκας αν έχουν μείνει κύτταρα)
6. Φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 5min
7. Αφαίρεση υπερκειμένου(πρώτα τις φυσαλίδες) και πλύση με 5ml PBS
8. Φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 5min
9. Προσθήκη 2ml μείγματος (30% FBS(fetal bovine serum), 10% DMSO (dimethyl sulfoxide), 60% καλλιεργητικό υλικό χωρίς ορό)
10. Μεταφορά σε φιαλίδιο κατάψυξης και τοποθέτηση στους -20 °C για περίπου 4 ώρες και στη συνέχεια στους -80°C για περίπου μία εβδομάδα και τέλος στους -150 °C

Απόψυξη κυττάρων

1. Τοποθέτηση κρυοφιαλιδίων σε υδατόλουτρο στους 37 °C μέχρι να αρχίσουν να ρευστοποιούνται τα δείγματα και μεταφορά σε falcon με 2ml καλλιεργητικού μέσου (ενώ έχουν ακόμα πάγο)
2. Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5min
3. Αφαίρεση υπερκειμένου
4. Προσθήκη καλλιεργητικού μέσου στα falcon
5. Ανάδευση με πιπέτα
6. Μεταφορά σε φλάσκες (25ml) και αποθήκευση στον κλίβανο

Προετοιμασία κυττάρων (Starvation)

1. Τα κύτταρα από τη φλάσκα μοιράζονται σε 6 wells
2. Αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου και προσθήκη 2ml καλλιεργητικού μέσου (πενικιλίνη-στρεπτομυκίνη)

Επίδραση με Αντιπυονεκτίνη

1. Μετά από 24h,
2. Αφαίρεση του καλλιεργητικού μέσου
3. Ξέπλυμα με 2ml PBS και απομάκρυνσή του
4. Τα πηγαδάκια χωρίζονται σε 3 κατηγορίες:
5. Control / Επίδραση στις 24h / Επίδραση στις 48h
6. Control πηγαδάκια: προσθήκη 2ml καλλιεργητικού μέσου
7. Επίδραση με Αντιπυονεκτίνη πηγαδάκια: προσθήκη 2ml καλλιεργητικού μέσου και 5μl αντιπυονεκτίνης. Τελική συγκέντρωση 250ng/ml
8. Επώαση στον κλίβανο για 24h
9. Αφαίρεση καλλιεργητικού μέσου
10. Ξέπλυμα με 2ml PBS και απομάκρυνσή του

RNA

- Προσθήκη 500μl Trizol και συνεχείς μηχανικές κινήσεις (αναρρόφηση-απόρριψη) με τη χρήση πιπέτας ώστε να αποκολληθούν και να σπάσουν τα κύτταρα
- Μεταφορά των κυττάρων σε eppendorf(2ml) και αποθήκευση στους -80°C
- Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τις 48h.

Πρωτεΐνη

- Προσθήκη 500μl θρυψίνης (αποκόλληση των κυττάρων) και συνεχείς μηχανικές κινήσεις (αναρρόφηση- απόρριψη) με τη χρήση πιπέτας και επώαση στον κλίβανο για 10min
- Μεταφορά των κυττάρων falcon με 2ml καλλιεργητικό μέσο (καταστολή θρυψίνης) και φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5min
- Αφαίρεση καλλιεργητικού μέσου και προσθήκη 5ml PBS. Φυγοκέντρηση στις 2000rpm για 5min
- Αφαίρεση PBS και γυρίζουμε τα falcon ανάποδα για να στεγνώσουν καλά
- Μεταφορά των κυττάρων σε falcon και αποθήκευση στους -80°C

Απομόνωση RNA κυττάρων

1. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υδατόλουτρο(25°C) για 5min
2. Προσθήκη 100μl χλωροφόρμιο προκειμένου να γίνει η αποδιάταξη των πρωτεϊνών
3. Ανάδευση των eppendorf για 15sec και τοποθέτηση στο υδατόλουτρο(25oC) για 3-10min
4. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 15min στους 4 oC. Δημιουργία 3 φάσεων: η υπερκείμενη υδατική φάση και η μεσόφαση περιέχουν το RNA ενώ η υποκείμενη φάση περιέχει φαινόλη/χλωροφόρμιο
5. Μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούργιο eppendorf και προσθήκη 0,25ml ισοπροπυλικής αλκοόλης προκειμένου να γίνει η κατακρήμνιση του RNA
6. Τοποθέτηση δειγμάτων σε πάγο για 5-15 min
7. Φυγοκέντρηση στις 12000rpm για 10min στους 4 oC
8. Αφαίρεση του υπερκειμένου
9. Έκπλυση των δειγμάτων με 500μl αιθανόλης (75%), vortex και φυγοκέντρηση στις 7500rpm για 8min στους 4 °C] x2
10. Αφαίρεση του υπερκειμένου και τοποθέτηση των δειγμάτων στο ψυγείο στους 40C με ανοιχτά καπάκια, έως ότου εξατμιστεί η ισοπροπυλική αλκοόλη
11. Αραίωση των δειγμάτων σε 30μl RNA-free water
12. Τοποθέτηση δειγμάτων σε υδατόλουτρο(55 °C) για 10min και έπειτα ανάδευση
13. Ανάδευση και αποθήκευση στους -80 °C
14. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% για την επιβεβαίωση του RNA

Σύνθεση του συμπληρωματικού DNA

cDNA1

1. Σύνθεση του cDNA από το απομονωθέν RNA των δειγμάτων, με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Υλικά για κάθε δείγμα: 2μl random primers, 2μl RNA και 11μl ddH₂O
2. PCR για 10min

3. Τοποθέτηση δειγμάτων σε πάγο για 5 min

cDNA2

1. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 10,5μl mix διαλύματος αντίδρασης. Υλικά για κάθε δείγμα: 4μl Sx buffer, 2μl MgCl₂, 2μl dNTPs, 2μl DTT, 0,5μl SSIII
2. PCR για 1h

Γονίδιο Αναφοράς GAPDH

Έγινε PCR του cDNA για το γονίδιο GAPDH. Η αφυδρογονάση της 3-φωσφορική γλυκεραλδεύδης - Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) κατέχει σημαντικό ρόλο σε βασικές καταβολικές διαδικασίες του κυττάρου και κατά συνέπεια, δεν αποτελεί έκπληξη πως έχει παρατηρηθεί μια σχετικά σταθερή έκφρασή της στους περισσότερους ιστούς και κύτταρα, ανεξάρτητα από εξωτερικές παραμέτρους. Συνεπώς έχει χαρακτηριστεί ως διαχειριστικό γονίδιο (housekeeping gene) και χρησιμοποιείται ως εσωτερικό γονίδιο αναφοράς σε ποσοτικές μελέτες γονιδιακής έκφρασης.

Υλικά για κάθε δείγμα: 12,5μl Bioline MyTaq HS mix (x2), 0,5μl Primer F, 0,5μl Primer R, 8,5μl ddH₂O, 2μl cDNA δείγματος

Primer F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT

Primer R: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

Η αντίδραση PCR διεξήχθη σε 35 κύκλους, μετά από αρχική αποδιάταξη (denaturation) του εκμαγείου cDNA στους 95°C για 15min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 94°C για 10min, υβριδοποίηση (annealing) των εκκινητών στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 60°C για 1min και σύνθεση – επέκταση (extension) νέων αλύσεων DNA με τη δράση της Taq πολυμεράσης στους 72°C για 30sec. Η τελική φάση επιμήκυνσης μετά τη συμπλήρωση των 35 κύκλων, διαρκούσε 10min στους 72°C.

Real time PCR

Αρχή της μεθόδου

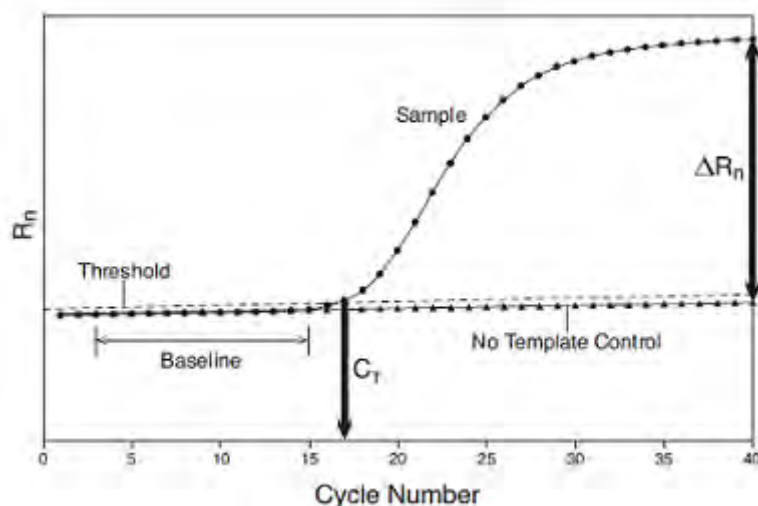
Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την πρόσδεση των εκκινητών και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης.

Στη Real-Time PCR, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η

γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_t είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή C_t τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος.



Εικόνα 1: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής C_t , ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real-Time PCR: τα μη ειδικά και τα ειδικά

συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών. Στην πρώτη περίπτωση ανήκει η χρωστική SYBRgreen, την οποία και χρησιμοποιήσαμε στη παρούσα πειραματική μελέτη.

Μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης (SYBR green)

Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλινο μόριο DNA (dsDNA). Μια τέτοια ευρέως χρησιμοποιούμενη χρωστική είναι η SYBR green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρόλα αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση

των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

Μέθοδοι ποσοτικής μελέτης με real-time PCR

Σε μια τυπική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, το υπόστρωμα διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο. Επειδή όμως χρειάζονται αρκετοί κύκλοι πριν παραχθεί ανιχνεύσιμο προϊόν, η καμπύλη του σήματος φθορισμού έναντι του αριθμού κύκλων αρχικά είναι σιγμοειδής, ενώ αργότερα, όταν η συγκέντρωση του προϊόντος είναι πλέον πολύ μεγάλη επέρχεται κορεσμός και η καμπύλη μεταπίπτει σε πλατώ. Το σημείο της καμπύλης στο οποίο το ποσό του φθορισμού είναι εμφανώς πάνω από το θόρυβο (συνήθως ένας λογάριθμος πάνω από την καμπύλη του θορύβου) λέγεται κατώφλι αύξησης (threshold cycle ή Ct) και χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Όσα περισσότερα είναι τα αντίγραφα της αλληλουχίας-στόχου στο αρχικά προστιθέμενο mRNA τόσο νωρίτερα γίνεται ανιχνεύσιμη, επομένως έχει και χαμηλότερο Ct.

Το προϊόν της PCR μπορεί να μετρηθεί με απόλυτες και σχετικές μεθόδους, όπως προαναφέρθηκε. Στην περίπτωση της real-time PCR, για την απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιούμε καμπύλη αναφοράς. Η καμπύλη αυτή δημιουργείται αυτόματα από το λογισμικό του μηχανήματος μετά το τέλος της αντίδρασης. Η πρότυπη αλληλουχία μπορεί να είναι πλασμιδιακό DNA ή άλλη μορφή DNA ή RNA που φέρει την αλληλουχία-στόχο. Η μάζα της μετράται με φασματοφωτόμετρο και εφόσον είναι γνωστό το μοριακό της βάρος η μάζα μετατρέπεται σε αριθμό μεταγράφων. Η καμπύλη αναφοράς μπορεί να χρησιμοποιηθεί και χωρίς να είναι γνωστή η πραγματική συγκέντρωση της πρότυπης αλληλουχίας για ημιποσοτική, σχετική μελέτη δειγμάτων.

Σχετική ποσοτικοποίηση

Στη περίπτωση της σχετικής ποσοτικοποίησης, οι αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου-στόχου, προσδιορίζονται σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα ενός παράλληλα ενισχυόμενου γονιδίου-ελέγχου (internal control), για την εξομάλυνση τυχόν διαφορών στην αρχική ποσότητα cDNA και για την πιστοποίηση της επιτυχίας της αντίδρασης. Το ιδανικό γονίδιο αναφοράς θα πρέπει να έχει σταθερή έκφραση στους διάφορους ιστούς του οργανισμού, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και θα πρέπει να παραμένει ανεπηρέαστο από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης θα πρέπει να εκφράζεται αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήσαμε στη παρούσα πειραματική μελέτη ήταν το GAPDH.

Επιπλέον, πραγματοποιείται σύγκριση των C_T τιμών των δειγμάτων προς ανάλυση με τις αντίστοιχες τιμές ενός δείγματος-αναφοράς. Οι τιμές C_T του γονιδίου-στόχου, τόσο των δειγμάτων προς εξέταση όσο και του δείγματος-αναφοράς, κανονικοποιούνται ως προς τις αντίστοιχες τιμές του ενδογενούς γονιδίου-ελέγχου. Η κανονικοποίηση ως προς το ενδογενές γονίδιο απαιτείται για τη διόρθωση των πιθανών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, οι οποίες οφείλονται σε διαφορετική συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (cDNA) ή σε διαφορές στην αποδοτικότητα της αντίδρασης ενίσχυσης.

Η μέθοδος σχετικής ποσοτικοποίησης χαρακτηρίζεται μαθηματικά από την εξίσωση $2^{-\Delta\Delta C_T}$,

όπου $\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T[\text{δείγματος}]} - \Delta C_{T[\text{αναφοράς}]}$. Η $\Delta C_{T[\text{δείγματος}]}$

είναι η κανονικοποιημένη τιμή C_T για κάθε δείγμα, ως προς την αντίστοιχη τιμή του ενδογενούς γονιδίου, ενώ η τιμή $\Delta C_{T[\text{αναφοράς}]}$ είναι αντίστοιχα η κανονικοποιημένη τιμή C_T για το γονίδιο αναφοράς.

Εξ' ορισμού, για το δείγμα αναφοράς ισχύει ότι $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^0 = 1$, οπότε η διαφορά στην έκφραση του γονιδίου στόχου στο δείγμα αναφοράς σε σχέση με τον εαυτό του ισούται με 1. Οι αντίστοιχες εξισώσεις για τα υπόλοιπα δείγματα δείχνουν πόσες φορές είναι αυξημένη ή μειωμένη η γονιδιακή έκφραση του γονιδίου-στόχου, στα δείγματα αυτά, σε σχέση με το δείγμα αναφοράς.

Υλικά της Real-Time PCR

Στην παρούσα πειραματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση two-step RT-PCR. Αυτό σημαίνει ότι προηγήθηκε σε ξεχωριστό στάδιο η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA και στη συνέχεια το παραγόμενο cDNA χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για την αντίδραση της Real-Time PCR. Για να μειωθεί όσο το δυνατόν περισσότερο το σφάλμα που προκύπτει από διαφορές στην απόδοση της αντίδρασης, όλα τα δείγματα cDNA παρασκευάστηκαν μαζί χρησιμοποιώντας τα ίδια αντιδραστήρια και τοποθετήθηκαν ταυτόχρονα στην ίδια συσκευή. Για να προσδιοριστεί η επαναληψιμότητα της αντίδρασης, κάθε δείγμα «έτρεξε» εις τριπλούν. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου (NTC), δείγματα στα οποία αντί για cDNA προστέθηκε μόνο το master mix για κάθε γονίδιο.

Αρχικά προετοιμάζεται το master mix για κάθε ζεύγος εκκινητών. Αυτό περιλαμβάνει το ζεύγος των δύο εκκινητών (15μl Primer F, 15μl Primer R), 150μl SYBR Green Master Mix και 30μl ddH₂O.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε ειδικά πλαστικά 96 θέσεων. Σε κάθε θέση προστίθενται 7μl από το master mix και 3μl δείγματος cDNA από τις αντίστοιχες κυτταρικές σειρές.

AdipoR1

Primer F: TCGGACTTTTTCCAAACTGG

Primer R: CCACAATGATGGCAGAAATG

AdipoR2

Primer F: CATGAGTGGGTGACAGGATG

Primer R: GGGATGCCAGGAAGTAATCA

Όταν ετοιμαστεί το plate, αυτό επικαλύπτεται με διαφανή μεμβράνη MicroAmp Optical Adhesive film PCR compatible DNA/RNA RNase free της Applied Biosystems. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του plate για 3-4 λεπτά ώστε να κατακαθίσει τυχόν δείγμα που έχει μείνει στα τοιχώματα.

Στη συνέχεια, ενεργοποιείται η έναρξη των αντιδράσεων. Συνολικά, πραγματοποιούνται 45 κύκλοι ενίσχυσης, μετά από αρχική αποδιάταξη

(denaturation) του εκμαγείου cDNA στους 95°C για 10min. Κάθε κύκλος περιελάμβανε αποδιάταξη στους 95°C για 15min, υβριδοποίηση (annealing) των εκκινήτων στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στους 60°C για 30sec και σύνθεση – επέκταση (extension) νέων αλύσων DNA στους 72°C για 30sec. Η τελική φάση επιμήκυνσης μετά τη συμπλήρωση των 45 κύκλων, διαρκούσε 10min στους 72°C.

Απομόνωση πρωτεϊνών

Τοποθέτηση των falcon σε υδατόλουτρο στους 37 °C μέχρι να αρχίσουν να ρευστοποιούνται τα δείγματα. Προσθήκη 5ml PBS στα falcon και φυγοκέντρηση στις 1800rpm για 5min. Αφαίρεση υπερκειμένου και προσθήκη **100μl RIPA buffer**, το οποίο σπάει τη κυτταρική μεμβράνη και **10μl inhibitors πρωτεασών**. Γίνετε μεταφορά σε erpendorf και διατήρηση στο πάγο για πάγο για 30min. Παράλληλα, vortex ανά 10min. Φυγοκέντρηση στις 3000rpm για 15min και μεταφορά του υπερκειμένου σε erpendorf. Αποθήκευση στους -80°C.

Προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε mg/ml με τη μέθοδο Bradford

Η μέθοδος Bradford βασίζεται στην παρατήρηση ότι η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 σε όξινες συνθήκες απορροφά στα 465 nm όταν είναι μόνη της στο διάλυμα και η απορρόφηση αυτή μετατοπίζεται στα 595nm όταν είναι προσδεμένη σε πρωτεΐνη. Οι ιοντικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις της χρωστικής με την πρωτεΐνη δημιουργούν μια σταθερή ιονική μορφή της χρωστικής που απορροφά στα 595nm. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη διότι ο συντελεστής απορρόφησης του συμπλέγματος πρωτεΐνης-χρωστικής είναι σταθερός σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων. Απλά για κάθε περιοχή (χαμηλή ή υψηλή συγκέντρωση) πρέπει να γίνει διαφορετική καμπύλη αναφοράς.

Η χρωστική μπορεί να υπάρχει σε τρεις μορφές: την κατιονική, την ουδέτερη και την ανιονική μορφή. Οι μορφές αυτές έχουν διαφορετικό χρώμα και, ως εκ τούτου, απορροφούν σε διαφορετικό μήκος κύματος.

Κατιονική μορφή	Ουδέτερη μορφή	Ανιονική μορφή
Κόκκινο χρώμα	Πράσινο χρώμα	Μπλέ χρώμα
470nm	650nm	595nm

- Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 5μl πρωτεΐνης και 450μl χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 σε κάθε πηγάδι και έγινε επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, έγινε φωτομέτρηση στα 595 nm. Με τη βοήθεια διαλυμάτων αλβουμίνης ορού βοός (BSA) γνωστών συγκεντρώσεων, κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη από την οποία υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε πρωτεΐνη.

Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS PAGE)

Μετά την απομόνωση και ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών ακολούθησε η αποδιάταξη τους μέσω της PCR και στη συνέχεια έγινε ηλεκτροφόρηση. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε ήταν αυτή της ασυνεχούς ηλεκτροφόρησης σε πήγματα πολυακρυλαμιδίου παρουσία SDS, όπως περιγράφηκε από τον Laemmli (Laemmli, 1970). Ο ανιονικός παράγοντας SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, απελευθερώνει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συνδέεται με αυτές ανάλογα με το μοριακό τους βάρος (MB), εξουδετερώνοντας το φορτίο των πρωτεϊνών και καθιστώντας αυτές αρνητικές. Στο συγκεκριμένο είδος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ως μέσο διαχωρισμού το ακρυλαμίδιο, το οποίο δημιουργεί τρισδιάστατα πολυμερή δίκτυα σε μια ευρεία κλίμακα. Το πήκτωμα (gel) σχηματίζεται με πολυμερισμό των μονομερών ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στη δημιουργία αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Μαζί με τα δείγματα φορτώθηκε και ladder (μάρτυρας με γνωστά μοριακά μεγέθη). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 200V και 120mA για 1h.

Κάθε δείγμα είχε τελικό όγκο 24μl και περιείχε:

sample buffer + reducing buffer = 4μl

πρωτεΐνη (συγκέντρωση 15μg/ml / απορρόφηση) + ddH₂O = 20μl

Μεταφορά σε μεμβράνη - Transfer

- Προετοιμασία μεμβράνης : κόβουμε τη μεμβράνη στις διαστάσεις του πηκτώματος. Τοποθετούμε τη μεμβράνη στη μεθανόλη για 1-2 min, σε διάλυμα μεταφοράς (Transfer Buffer) για περίπου 5 min.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ακολουθεί ηλεκτρομεταφορά των πολυπεπτιδίων σε μεμβράνη PVDF. Σημαδεύουμε το πήκτωμα προκειμένου να γνωρίζουμε τη σειρά τοποθέτησης των δειγμάτων.
- Τοποθετούμε στη συσκευή μεταφοράς τα παρακάτω με τη σειρά που αναφέρεται: (αρνητικός πόλος) 3 σφουγγάρια – 2 χαρτιά whatman - πήκτωμα - μεμβράνη - 2 χαρτιά whatman – 3 σφουγγάρια (θετικός πόλος).
- Η μεταφορά επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής έντασης και γίνεται σε ειδική συσκευή με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Συνολικά για την συσκευή που χρησιμοποιήθηκε, εφαρμόσαμε περίπου 30V και 220mA.
- Πραγματοποιούμε ένα ξέπλυμα με PBS-Tween 0,15%.
- Τοποθετούμε τη μεμβράνη, υπό ανάδευση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σε διάλυμα για 1 ώρα, το οποίο περιείχε άπαχο γάλα σε μορφή σκόνης 2,5gr διαλυμένο σε 5ml TBS-Tween 1x. Αυτό έγινε με σκοπό την κάλυψη (blocking) των ελεύθερων θέσεων δέσμευσης της μεμβράνης, ώστε να αποφευχθεί η μη-ειδική δέσμευση των αντισωμάτων που θα χρησιμοποιούνταν στα επόμενα πειραματικά στάδια.

Ανοσοαποτύπωση κατά Western

Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται προκειμένου να γίνει εκλεκτική ανίχνευση μιας πρωτεΐνης-αντιγόνου, με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων που έχουν παρασκευαστεί για το συγκεκριμένο αντιγόνο. Οι πρωτεΐνες που μεταφέρονται στις μεμβράνες, δεσμεύονται μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων,

διατηρώντας τις αντιγονικές τους ιδιότητες και έτσι διευκολύνεται η αναγνώρισή τους από τα αντισώματα. Η μεμβράνη επωάζεται με το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης που πρόκειται να ανιχνευτεί και στη συνέχεια με δεύτερο αντίσωμα έναντι της Fc περιοχής του πρώτου αντισώματος. Στο δεύτερο αντίσωμα έχει ομοιοπολικά συνδεθεί ένζυμο (υπεροξειδάση), με τη δράση του οποίου με χημειοφωταύγεια παίρνουμε σήμα στο σημείο που βρίσκεται η πρωτεΐνη που μας ενδιαφέρει.

Πορεία

1. Πραγματοποιούμε 1 ξέπλυμα στη μεμβράνη με PBS-Tween.
2. Προσθέτουμε το πρώτο αντίσωμα Goat polyclonal σε αναλογία 1:100 σε PBS-Tween με 2,5gr γάλα για δυο ώρες υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Πραγματοποιούμε 3 δεκάλεπτα ξεπλύματα με PBS-Tween υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Μετά από την ολονύκτια επώαση, προσθέτουμε το δεύτερο αντίσωμα HRP-RaG σε PBS-Tween με 2,5gr γάλα για μια ώρα υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Ακολουθούν 3 δεκάλεπτα ξεπλύματα με PBS-Tween υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.

Πρωτογενή αντισώματα:

MMP-9	GAPDH
Dilution 1:100	Dilution 1:1000
Goat polyclonal	Mouse monoclonal
Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz Biotechnology

Δευτερογενή αντισώματα:

MMP-9	GAPDH
Dilution 1:10000	Dilution 1:10000
HRP-RaG	HRP-RaG
Invitrogen	Invitrogen

Εν συνεχεία, έγινε ανίχνευση του εκπεμπόμενου σήματος σε φωτογραφικό φιλμ με τη χρήση των διαλύματων Peroxidase Solution και Luminol/Enhancer Solution σε ίσους όγκους (1:1). Η ανίχνευση βασίζεται στο φαινόμενο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Πιο συγκεκριμένα, η αποτύπωση του σήματος στηρίζεται στο γεγονός ότι το δευτερογενές αντίσωμα φέρει προσδεδωμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης, το οποίο με την επίδραση διαλύματος H_2O_2 σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την αντίδραση του luminol. Η μέγιστη εκπομπή φωτονίων λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος 428 nm και παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 5-20 λεπτά μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με έκθεση σε φωτογραφικό φιλμ, ευαίσθητο στο μπλε φως. Ο χρόνος έκθεσης του φιλμ εξαρτάται από την ένταση και την ποιότητα του σήματος.

Με το τέλος της ηλεκτρομεταφοράς, η μεμβράνη χρωματίστηκε με χρωστική Ponceau S, προκειμένου να διαπιστωθεί η πλήρης μεταφορά των πρωτεϊνών από το πηγμα διαχωρισμού στη μεμβράνη. Ακολούθησαν διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης με διάλυμα TBS-Tween (20mM Tris- HCl, pH7,4, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) μέχρι να αποχρωματιστεί πλήρως.

Αποτελέσματα

Επίδραση της αντιπυονεκτίνης (RNB systems) στην επαγωγή των υποδοχέων της AdipoR1 και AdipoR2 και MM-9 σε τροφοβλαστικά κύτταρα.

Για την εξακρίβωση του ρόλου των υποδοχέων της αντιπυονεκτίνης στην κυτταρική διείσδυση της τροφοβλάστης, καλλιεργήθηκαν τροφοβλαστικά κύτταρα υπό την επίδραση αντιπυονεκτίνης συγκέντρωσης 250ng/ml για 24h και 48h.

1^ο στάδιο:

Πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των mRNA μεταγράφων των γονιδίων του AdipoR1 και του AdipoR2 με τη χρήση της Real time PCR.

Υπολογίστηκε για κάθε δείγμα το $2^{-\Delta\Delta CT}$ και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσες τιμές στον πίνακα 1 και πίνακα 2.

Πίνακας 1: Σύγκριση δειγμάτων με επίδραση αντιπυονεκτίνης σε σχέση με μάρτυρες (controls), ως προς την παραγωγή του AdipoR1.

Control AdipoR1	προσθήκη αντιπυονεκτίνης (24 ώρες)	προσθήκη αντιπυονεκτίνης (48 ώρες)
0,743	2,237	9,364

Πίνακας 2: Σύγκριση δειγμάτων με επίδραση αντιπυονεκτίνης σε σχέση με μάρτυρες (controls), ως προς την παραγωγή του AdipoR2.

Control AdipoR2	προσθήκη αντιπυονεκτίνης (24 ώρες)	προσθήκη αντιπυονεκτίνης (48 ώρες)
0,756	1,554	4,685

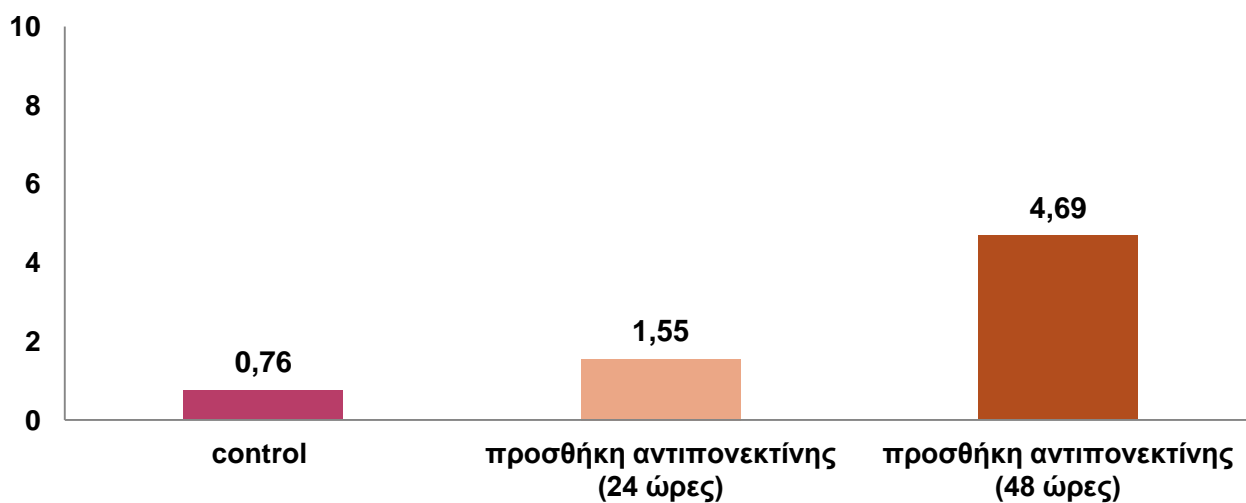
Σύμφωνα με τους πίνακες 1 και 2 παρατηρήθηκε αύξηση των AdipoR1 και AdipoR2 μετά από 24h και 48h.

AdipoR1



Διάγραμμα 1: Η αντιπυονεκτίνη 250ng/ml προκαλεί αύξηση του υποδοχέα AdipoR1 μετά από 24 και 48 ώρες.

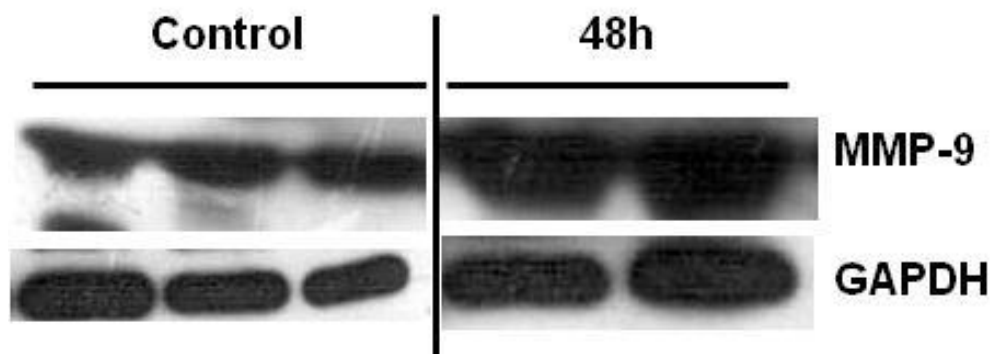
AdipoR2



Διάγραμμα 2: Η αντιπυονεκτίνη 250ng/ml προκαλεί αύξηση του υποδοχέα AdipoR2 μετά από 24 και 48 ώρες.

2^ο στάδιο

Ανίχνευση της MMP-9 με τη χρήση της ανοσοαποτύπωσης κατά Western.



Χορήγηση 250ng/ml αντιπυονεκτίνης για 48 ώρες προκάλεσε αύξηση της έκφρασης της πρωτεΐνης MMP-9, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της κυτταρικής διείσδυσης.

Συζήτηση

Η αντιπυονεκτίνη, μία ορμόνη που εκκρίνεται από τον λιπώδη ιστό και έχει κεντρικές και περιφερικές δράσεις, εμπλέκεται στη ρύθμιση της ενεργειακής ομοιόστασης, τον μεταβολισμό της γλυκόζης και επιπλέον έχει φανεί ότι επηρεάζει τον κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας και ινσουλίνου αντίστασης. Πρόσφατα δεδομένα θέλουν η αντιπυονεκτίνη να ασκεί τις δράσεις της μέσω των υποδοχέων *adipoR1* και *adipoR2* και να επηρεάζει την κυτταρική διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων σε δύο φάσεις: **α.** προσκόλληση του εμβρύου στη μήτρα και **β.** μετανάστευση των τροφοβλαστικών κυττάρων κατά τρόπο που να διευκολύνεται η πλακουντιακή ανάπτυξη.

Στην παρούσα μελέτη ξεκίνησε μία προσπάθεια να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ των υποδοχέων της αντιπυονεκτίνης στις διεργασίες εμφύτευσης και κυτταρικής διείσδυσης των τροφοβλαστικών κυττάρων. Στα πειράματά μας καταδείχθηκε αύξηση στην έκφραση των υποδοχέων *AdipoR1* και *AdipoR2* και αύξηση της *MM-9* έπειτα από επίδραση με αντιπυονεκτίνη 250ng/ml για 24 και 48 ώρες. Τα στοιχεία αυτά υποδηλώνουν ότι η αντιπυονεκτίνη μέσω των υποδοχέων της ασκεί τις δράσεις στα τροφοβλαστικά κύτταρα, και μπορεί να εμπλέκονται στην κυτταρική διείσδυση των τροφοβλαστικών κυττάρων.

Κρίνεται απαραίτητη η συνέχιση των συγκεκριμένων πειραμάτων καθώς και η δημιουργία πειραμάτων που να διαπιστώνουν την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών και των υποδοχέων τους που εμπλέκονται στο ρυθμιζόμενο από αντιπυονεκτίνη μονοπάτι κυτταρικής διείσδυσης με μεθόδους όπως το western blotting και η RT-PCR.

Βιβλιογραφία

- Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor- κ B: the enemy within. *Cancer cell*, 6(3), 203-208.
- Ahima, R. S. (2006). Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity*, 14(S8), 242S-249S.
- Baker PN, Campbell S, LeeC. Disorders of Placentation. editor Obstetrics by Ten Teachers. 18th ed. UK: Hodder Arnold; 2006. p. 156-170.
- Benaitreau, D., Dieudonné, M. N., Dos Santos, E., Leneveu, M. C., de Mazancourt, P., & Pecquery, R. (2009). Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biology of reproduction*,80(6), 1107-1114.
- Benaitreau, D., Dos Santos, E., Leneveu, M. C., Alfaidy, N., Feige, J. J., de Mazancourt, P., & Dieudonné, M. N. (2010). Effects of adiponectin on human trophoblast invasion. *Journal of Endocrinology*, 207(1), 45-53.
- Bersinger NA, Birkhauser MH, Wunder DM. Adiponectin as a marker of success in inracyttoplasmic sperm injection/embryo transfer cycles. *Gynecol Endocrinol*. 2006; 22:479–83. [PubMed: 17071530]
- Bub, J. D., Miyazaki, T., & Iwamoto, Y. (2006). Adiponectin as a growth inhibitor in prostate cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*,340(4), 1158-1166.
- Campos, D. B., Palin, M. F., Bordignon, V., & Murphy, B. D. (2007). The 'beneficial' adipokines in reproduction and fertility. *International Journal of Obesity*, 32(2), 223-231.
- Carmina, E. N. R. I. C. O. (2004). Diagnosis of polycystic ovary syndrome: from NIH criteria to ESHRE-ASRM guidelines. *Minerva ginecologica*, 56(1), 1-6.
- Castellucci, M. R. A. R. V. D. R. D. S. P., De Matteis, R., Meisser, A., Canello, R., Monsurro, V., Islami, D., ... & Bischof, P. (2000). Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Molecular Human Reproduction*, 6(10), 951-958.
- Caüzac, M., Czuba, D., Girard, J., & Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Transduction of leptin growth signals in placental cells is independent of JAK-STAT activation. *Placenta*, 24(4), 378-384.
- Chabrolle C, Tosca L, Dupont J. Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotropin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction*. 2007; 133:719–31. [PubMed: 17504916]
- Chabrolle C, Tosca L, Rame C, Lecomte P, Royere D, Dupont J. Adiponectin increase insulin-like growth factor I–induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2008; 92:1988–96. [PubMed: 19081562]

- Chabrolle, C., Tosca, L., Ramé, C., Lecomte, P., Royère, D., & Dupont, J. (2009). Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertility and sterility*, 92(6), 1988-1996.
- Chandran, M., Phillips, S. A., Ciaraldi, T., & Henry, R. R. (2003). Adiponectin: more than just another fat cell hormone?. *Diabetes care*, 26(8), 2442-2450.
- Chappaz E, Albornoz MS, Campos D, Che L, Palin MF, Murphy BD, et al. Adiponectin enhances in vitro development of swine embryos. *Domest Anim Endocrinol*. 2008; 35:198–207. [PubMed: 18638663]
- Chen, L., & Nyomba, B. L. G. (2003). Glucose intolerance and resistin expression in rat offspring exposed to ethanol in utero: modulation by postnatal high-fat diet. *Endocrinology*, 144(2), 500-508.
- Chen, L., Zhang, T., & Nyomba, B. G. (2004). Insulin resistance of gluconeogenic pathways in neonatal rats after prenatal ethanol exposure. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(3), R554-R559.
- Chen, J., Tan, B., Karteris, E., Zervou, S., Digby, J., Hillhouse, E. W., ... & Randeve, H. S. (2006). Secretion of adiponectin by human placenta: differential modulation of adiponectin and its receptors by cytokines. *Diabetologia*, 49(6), 1292-1302.
- Chiu, Yung-Cheng, et al. "Involvement of AdipoR receptor in adiponectin-induced motility and $\alpha 2\beta 1$ integrin upregulation in human chondrosarcoma cells." *Carcinogenesis* 30.10 (2009): 1651-1659.
- Cnop, M., Havel, P. J., Utzschneider, K. M., Carr, D. B., Sinha, M. K., Boyko, E. J., ... & Kahn, S. E. (2003). Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia*, 46(4), 459-469.
- Coope A, Milanski M, Araújo EP, et al. (2008) AdipoR1 mediates the anorexigenic and insulin/leptin-like actions of adiponectin in the hypothalamus. *FEBS Lett*, **582**, 1471-6.
- D'Anna, R., Baviera, G., Corrado, F., Giordano, D., De Vivo, A., Nicocia, G., & Di Benedetto, A. (2006). Adiponectin and insulin resistance in early-and late-onset pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 113(11), 1264-1269.
- Dieudonne, M. N., Bussiere, M., Dos Santos, E., Leneuve, M. C., Giudicelli, Y., & Pecquery, R. (2006). Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(1), 271-279.
- Dos Santos, E., Serazin, V., Morvan, C., Torre, A., Wainer, R., de Mazancourt, P., & Dieudonné, M. N. (2012). Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertility and sterility*, 97(3), 771-778.

Dos Santos, E., Serazin, V., Morvan, C., Torre, A., Wainer, R., de Mazancourt, P., & Dieudonné, M. N. (2012). Adiponectin and leptin systems in human endometrium during window of implantation. *Fertility and sterility*, *97*(3), 771-778.

Ehrmann, D. A. (2005). Polycystic ovary syndrome. *New England Journal of Medicine*, *352*(12), 1223-1236.

Faissner A, Heck N, Dobbertin A, Garwood J (2006). "DSD-1-Proteoglycan/Phosphacan and receptor protein tyrosine phosphatase-beta isoforms during development and regeneration of neural tissues". *Adv. Exp. Med. Biol.* **557**: 25–53, Figure 2: regulation of NF- κ B. doi:10.1007/0-387-30128-3_3. PMID 16955703

Fujii N, Jessen N, Goodyear LJ (2006) AMP-activated protein kinase and the regulation of glucose transport. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **291**, E867-877.

Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., & Huppertz, B. (2009). Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta*, *30*, 49-54.

Gutman G, Barak V, Maslovitz S, Amit A, Lessing JB, Geva E. Recombinant luteinizing hormone induces increased production of ovarian follicular adiponectin in vivo: implications for enhanced insulin sensitivity. *Fertil Steril*. 2008; *91*:1837–41. [PubMed: 18440519]

Haugen F, Drevon CA (2007) Activation of Nuclear Factor- κ B by High Molecular Weight and Globular Adiponectin. *Endocrinology*, **148**, 5478-86.

Hosch SE, Olefsky JM, Kim JJ (2006) APPLIED mechanics: Uncovering how adiponectin modulates insulin action. *Cell Metab*, **4**, 5-6.

Hoyda, T. D., Fry, M., Ahima, R. S., & Ferguson, A. V. (2007). Adiponectin selectively inhibits oxytocin neurons of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of physiology*, *585*(3), 805-816.

Hug, C., Wang, J., Ahmad, N. S., Bogan, J. S., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(28), 10308-10313.

Huppertz, B., Frank, H. G., Reister, F., Korr, H., & Kaufmann, P. (1999). Apoptosis cascade progresses during turnover of human trophoblast: analysis of villous cytotrophoblast and syncytial fragments in vitro. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *79*(12), 1687-1702.

Jones, H. N., Jansson, T., & Powell, T. L. (2010). Full-length adiponectin attenuates insulin signaling and inhibits insulin-stimulated amino acid transport in human primary trophoblast cells. *Diabetes*, *59*(5), 1161-1170.

Kadowaki, T., & Yamauchi, T. (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocrine reviews*, *26*(3), 439-451.

Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1784-1792.

Kim, H. J., Hawke, N., & Baldwin, A. S. (2006). NF- κ B and IKK as therapeutic targets in cancer. *Cell Death & Differentiation*, 13(5), 738-747.

Kim, S. T., Marquard, K., Stephens, S., Louden, E., Allsworth, J., & Moley, K. H. (2011). Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus. *Human reproduction*, 26(1), 82-95.

Κίπτας Χ, Αντωνάκopoulos. Ο πλακούντας και οι εμβρυικοί υμένες. Γ, εκδότες. Έγχρωμη κλινική εμβρυολογία. 1η έκδ. Αθήνα: Πασχαλίδης; 1997 p.79-104.

Kotani, Y., Yokota, I., Kitamura, S., Matsuda, J., Naito, E., & Kuroda, Y. (2004). Plasma adiponectin levels in newborns are higher than those in adults and positively correlated with birth weight. *Clinical endocrinology*, 61(4), 418-423.

Knobil Ernst and D. Neil Jimmy , 2004. Encyclopedia of reproduction

Lagaly, D. V., Aad, P. Y., Grado-Ahuir, J. A., Hulse, L. B., & Spicer, L. J. (2008). Role of adiponectin in regulating ovarian theca and granulosa cell function. *Molecular and cellular endocrinology*, 284(1), 38-45.

Lappas, M., Yee, K., Permezel, M., & Rice, G. E. (2005). Release and regulation of leptin, resistin and adiponectin from human placenta, fetal membranes, and maternal adipose tissue and skeletal muscle from normal and gestational diabetes mellitus-complicated pregnancies. *Journal of endocrinology*, 186(3), 457-465.

Lee M-H, Klein RL, El-Shewy HM, Luttrell DK, Luttrell LM (2008) The Adiponectin Receptors AdipoR1 and AdipoR2 Activate ERK1/2 through a Src/Ras-Dependent Pathway and Stimulate Cell Growth. *Biochemistry*, 47, 11682-11692.

Liu YH, Tsai EM, Wu LC, Chen SY, Chang YH, Jong SB, et al. Higher basal adiponectin levels are associated with better ovarian response to gonadotropin stimulation during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest*. 2005; 60:167–70. [PubMed: 15990441]

Liu YH, Tsai EM, Chen YL, Chen HS, Chen YC, Wu LC, et al. Serum adiponectin levels increase after human chorionic gonadotropin treatment during in vitro fertilization. *Gynecol Obstet Invest*. 2006; 62:61–5. [PubMed: 16557025]

Lu, M., Tang, Q., Olefsky, J. M., & Mellon, P. L. Webster nJ, 2008 Adiponectin activates adenosine monophosphate activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbetaT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol*, 22, 760-771.

Lyall, F. (2002). The human placental bed revisited. *Placenta*, 23(8), 555-562.

Kadowaki, K., Waguri, M., Nakanishi, I., Miyashita, Y., Nakayama, M., Suehara, N., ... & Fujita, T. (2006). Adiponectin concentration in umbilical cord serum is positively associated

with the weight ratio of fetus to placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91(12), 5090-5094.

Magariños, M. P., Sánchez-Margalet, V., Kotler, M., Calvo, J. C., & Varone, C. L. (2007). Leptin promotes cell proliferation and survival of trophoblastic cells. *Biology of reproduction*, 76(2), 203-210.

Maillard V, Uzbekova S, Guignot F, et al. (2010) Effect of adiponectin on bovine granulosa cell steroidogenesis, oocyte maturation and embryo development. *Reprod Biol Endocrinol*, 8, 23.

Μαμόπουλος και συν. 2003, Duda και συν. 1996

Mantzoros, C. S., Rifas-Shiman, S. L., Williams, C. J., Fargnoli, J. L., Kelesidis, T., & Gillman, M. W. (2009). Cord blood leptin and adiponectin as predictors of adiposity in children at 3 years of age: a prospective cohort study. *Pediatrics*, 123(2), 682-689.

Mao X, Kikani CK, Riojas RA, et al. (2006) APPL1 binds to adiponectin receptors and mediates adiponectin signalling and function. *Nat Cell Biol*, 8, 516-523.

Mazaki-Tovi, S., Kanety, H., Pariente, C., Hemi, R., Schiff, E., & Sivan, E. (2005). Cord blood adiponectin in large-for-gestational age newborns. *American journal of obstetrics and gynecology*, 193(3), 1238-1242.

Mazaki-Tovi, S., Kanety, H., Pariente, C., Hemi, R., Efraty, Y., Schiff, E., ... & Sivan, E. (2007). Determining the source of fetal adiponectin. *The Journal of reproductive medicine*, 52(9), 774-778.

McDonald, E. A., & Wolfe, M. W. (2009). Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology*, 150(9), 4358-4365.

Michalakis, K. G., & Segars, J. H. (2010). The role of adiponectin in reproduction: from polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertility and sterility*, 94(6), 1949-1957.

Mitchell, M., Armstrong, D. T., Robker, R. L., & Norman, R. J. (2005). Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction*, 130(5), 583-597.

Miyazaki, T., Bub, J. D., Uzuki, M., & Iwamoto, Y. (2005). Adiponectin activates c-Jun NH₂-terminal kinase and inhibits signal transducer and activator of transcription 3. *Biochemical and biophysical research communications*, 333(1), 79-87.

Moffett-King, A. (2002). Natural killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 2(9), 656-663.

Murphy, C. R. (2004). Uterine receptivity and the plasma membrane transformation. *Cell research*, 14(4), 259-267.

Nakano, Y., Tobe, T., Choi-Miura, N. H., Mazda, T., & Tomita, M. (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of biochemistry*, 120(4), 803-812.

Naicker, T., Khedun, S. M., Moodley, J., & Pijnenborg, R. (2003). Quantitative analysis of trophoblast invasion in preeclampsia. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 82(8), 722-729.

Nishizawa, H., Shimomura, I., Kishida, K., Maeda, N., Kuriyama, H., Nagaretani, H., ... & Matsuzawa, Y. (2002). Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes*, 51(9), 2734-2741.

Pajvani, U. B., Du, X., Combs, T. P., Berg, A. H., Rajala, M. W., Schulthess, T., ... & Scherer, P. E. (2003). Structure-function studies of the adipocyte-secreted hormone Acrp30/adiponectin Implications for metabolic regulation and bioactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 9073-9085.

Pajvani, U. B., Hawkins, M., Combs, T. P., Rajala, M. W., Doebber, T., Berger, J. P., ... & Scherer, P. E. (2004). Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(13), 12152-12162.

Pijnenborg, R. (1994). Trophoblast invasion. *Reprod Med Rev*, 3, 53-73.

Pijnenborg, R., Bland, J. M., Robertson, W. B., & Brosens, I. (1983). Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 4(4), 397-413.

Pinar, H., Basu, S., Hotmire, K., Laffineuse, L., Presley, L., Carpenter, M., ... & Hauguel-de Mouzon, S. (2008). High molecular mass multimer complexes and vascular expression contribute to high adiponectin in the fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 93(7), 2885-2890.

Prast, J., Saleh, L., Husslein, H., Sonderegger, S., Helmer, H., & Knofler, M. (2008). Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology*, 149(3), 979-987.

Psilopanagioti, A., Papadaki, H., Kranioti, E. F., Alexandrides, T. K., & Varakis, J. N. (2008). Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*, 89(1), 38-47.

Rodriguez-Pacheco, F., Martinez-Fuentes, A. J., Tovar, S., Pinilla, L., Tena-Sempere, M., Dieguez, C., ... & Malagon, M. M. (2007). Regulation of pituitary cell function by adiponectin. *Endocrinology*, 148(1), 401-410.

Schulz, L. C., & Widmaier, E. P. (2004). The effect of leptin on mouse trophoblast cell invasion. *Biology of reproduction*, 71(6), 1963-1967.

- Sivan, E., Mazaki-Tovi, S., Pariente, C., Efraty, Y., Schiff, E., Hemi, R., & Kanety, H. (2003). Adiponectin in human cord blood: relation to fetal birth weight and gender. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(12), 5656-5660.
- Scherer, P. E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G., & Lodish, H. F. (1995). A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26746-26749.
- Spranger, J., Verma, S., Göhring, I., Bobbert, T., Seifert, J., Sindler, A. L., ... & Banks, W. A. (2006). Adiponectin does not cross the blood-brain barrier but modifies cytokine expression of brain endothelial cells. *Diabetes*, 55(1), 141-147.
- Takemura, Y., Osuga, Y., Yamauchi, T., Kobayashi, M., Harada, M., Hirata, T., ... & Taketani, Y. (2006). Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*, 147(7), 3203-3210.
- Tabibzadeh, S. (1998) Molecular control of the implantation window *Hum. Reprod. Update* 4,465-471
- Tilg, H., & Moschen, A. R. (2006). Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 6(10), 772-783.
- Tsunoda, K., Kitange, G., Anda, T., Shabani, H. K., Kaminogo, M., Shibata, S., & Nagata, I. (2005). Expression of the constitutively activated RelA/NF- κ B in human astrocytic tumors and the in vitro implication in the regulation of urokinase-type plasminogen activator, migration, and invasion. *Brain tumor pathology*, 22(2), 79-87.
- Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., ... & Kadowaki, T. (2005). Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*, 146(2), 790-796.
- Wang C, Xin X, Xiang R, et al. (2009) Yin-Yang Regulation of Adiponectin Signaling by APPL Isoforms in Muscle Cells. *J Biol Chem*, **284**, 31608-15.
- Weiwei, T., Haiyan, Y., Juan, C., Xiaodong, W., Weibo, C., & Rong, Z. (2009). Expressions of adiponectin receptors in placenta and their correlation with preeclampsia. *Reproductive Sciences*, 16(7), 676-684.
- Wen, J. P., Lv, W. S., Yang, J., Nie, A. F., Cheng, X. B., Yang, Y., ... & Ning, G. (2008). Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1-7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochemical and biophysical research communications*, 371(4), 756-761.
- White DE, Kurpios NA, Zuo D, Hassell JA, Blaess S, Mueller U, Muller WJ. (2004) Targeted disruption of beta1-integrin in a transgenic mouse model of human breast cancer reveals an essential role in mammary tumor induction. *Cancer Cell*, 6(2), 159-170.

Wong, G. W., Wang, J., Hug, C., Tsao, T. S., & Lodish, H. F. (2004). A family of Acrp30/adiponectin structural and functional paralogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(28), 10302-10307.

Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., ... & Kadowaki, T. (2003). Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423(6941), 762-769.

Yamauchi, T., Hara, K., Kubota, N., Terauchi, Y., Tobe, K., Froguel, P., ... & Kadowaki, T. (2003). Dual roles of adiponectin/Acrp30 in vivo as an anti-diabetic and anti-atherogenic adipokine. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 3(4), 243-253.

Zavalza-Gómez, A. B., Anaya-Prado, R., Rincón-Sánchez, A. R., & Mora-Martínez, J. M. (2008). Adipokines and insulin resistance during pregnancy. *Diabetes research and clinical practice*, 80(1), 8-15.

Πηγές εικόνων

εικόνα 1:

εικόνα 2:

εικόνα 3: McDonald, E. A., & Wolfe, M. W. (2009). Adiponectin attenuation of endocrine function within human term trophoblast cells. *Endocrinology*, 150(9), 4358-4365.

εικόνα 4: Waki, H., Yamauchi, T., Kamon, J., Kita, S., Ito, Y., Hada, Y., & Kadowaki, T. (2005). Generation of globular fragment of adiponectin by leukocyte elastase secreted by monocytic cell line THP-1. *Endocrinology*, 146(2), 790-796.

εικόνα 5: Goldstein, B. J., Scalia, R. G., & Ma, X. L. (2009). Protective vascular and myocardial effects of adiponectin. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, 6(1), 27-35.

εικόνα 6: Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., & Tobe, K. (2006). Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of clinical investigation*, 116(7), 1784-1792.

εικόνα 7: Reverchon, M., Ramé, C., Bertoldo, M., & Dupont, J. (2014). Adipokines and the Female Reproductive Tract. *International journal of endocrinology*, 2014.

εικόνα 8: Wang, C., Xin, X., Xiang, R., Ramos, F. J., Liu, M., Lee, H. J., ... & Dong, L. Q. (2009). Yin-Yang regulation of adiponectin signaling by APPL isoforms in muscle cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(46), 31608-31615.

εικόνα 9: Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 72-76.

εικόνα 10: cgs.hku.hk