ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Έκφραση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε πλακούντες εγκύων με προεκλαμψία

ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ

Βιολόγος

Ηράκλειο 2015

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Δημήτριος Α Σπαντίδος, Καθηγητής

Τσατσάνης Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Ματαλλιωτάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλη Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής

Δημήτριος Α Σπαντίδος, Καθηγητής

Τσατσάνης Χρήστος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ιωάννης Ματαλλιωτάκης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Τσατσάκης Αριστείδης, Καθηγητής

Ζώρας Οδυσσέας, Καθηγητής

Σουρβίνος Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ρελάκης Κων/νος, Αναπληρωτής Καθηγητής

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Ιατρικό Τμήμα της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Κρήτης δε σημαίνει και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα. (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 1

ABSTRACT 7

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή 11

1.1. Προεκλαμψία 11

1.2. Πλακούντας 16

1.3. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch 19

1.4. Δομή των γονιδίων Notch και των συνδετών τους 20

1.5. Ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch 23

2. Οδηγές σκέψεις-υπόθεση-ερωτήματα 27

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. Μέθοδοι και Υλικά

3.1. Συλλογή δειγμάτων 32

3.2. Διάγνωση προεκλαμψίας-κριτήρια επιλογής δειγμάτων 33

3.3. Εκχύλιση RNA από ιστούς 33

3.4. Αντιστροφή Μεταγραφή-Παρασκευή cDNA 34

3.5. Εκχύλιση πρωτεϊνών 34

3.6. Προσδιορισμός της ποσότητας πρωτεΐνης 35

3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR) 35

3.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE) 39

3.9. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Blot) 40

3.10. Στατιστική ανάλυση 41

3.11. Υλικά 42

4. Αποτελέσματα

4.1. Κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ομάδων μελέτης **45**

4.2. Τα επίπεδα mRNA των μελετώμενων γονιδίων **47**

4.3. Τα επίπεδα πρωτεΐνης στα δείγματα προεκλαμψίας και στα φυσιολογικά δείγματα **49**

4.4. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων της έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων και πρωτεϊνών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων προεκλαμψίας **51**

4.5. Μοτίβο συνέκφρασης των μελετώμενων γονιδίων **53**

5. Συζήτηση **56**

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ **61**

~ Ευχαριστίες ~

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους ανθρώπους που με βοήθησαν να φτάσω ως εδώ..

Αρχικά, ευχαριστώ πολύ τον Καθηγητή μου κ. Δημήτριο Σπαντίδο, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω αυτή τη διατριβή και να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον βιολογικό- ιατρικό θέμα.

Πολλά ευχαριστώ θέλω να πω στον Καθηγητή μου κ. Αριστείδη Τσατσάκη που με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριο του ως επιστημονικό συνεργάτη καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης του διδακτορικού μου και για την ηθική και υλική συμπαράσταση του όλα αυτά τα χρόνια.

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελής επιτροπής: Τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Χρήστο Τσατσάνη, τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Ματαλλιωτάκη, τον Καθηγητή κ. Οδυσσέα Ζώρα, τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Γεώργιο Σουρβίνο και τον Αναπλ. Καθηγητή Ρελάκη Κων/νο, για την αξιολόγηση της διατριβής αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ χρωστάω στον κ. Σταύρο Σηφάκη, Μαιευτήρα Γυναικολόγο, τεως Δ/ντη ΕΣΥ Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής Παν/μιου Κρήτης, που ήταν από τους βασικότερους συντελεστές και συνοδοιπόρους στην επίτευξη αυτού του διδακτορικού. Είμαι ευγνώμων για την αμέριστη υποστήριξη του.

Αμέσως μετά θα ήθελα να ευχαριστήσω την Ειρήνη Νεοφύτου, την Κατερίνα Κουβίδη, την Κατερίνα Μπερδιάκη και την Μαρία Μπουραντά, για τις χρήσιμες υποδείξεις τους κατά τα χρόνια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Ευχαριστώ τον Νίκο Σουλιτζή για την βοήθεια του στην στατιστική επεξεργασία των πειραματικών αποτελεσμάτων αλλά και στην συγγραφή του επιστημονικού άρθρου της διατριβής μου.

Πολλά ευχαριστώ θέλω να πω σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου Τοξικολογίας για τις ευχάριστες ώρες δουλειάς καθημερινά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Εμμανουέλα και στην Έμη μου για την συνεχή συμπαράσταση και στήριξη τους.. Από τα βάθη της καρδιάς μου, ευχαριστώ τους γονείς μου και τον αδερφό μου, που κάνουν τα πάντα για να προοδεύω με τιμή και αξιοπρέπεια. Τέλος, το μεγαλύτερο ευχαριστώ είναι για τον Νικόλα μου, που πάντα είναι δίπλα μου και με βοηθά με το δικό του ξεχωριστό τρόπο..

Στην οικογένεια μου...

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός του προτεινόμενου ερευνητικού έργου ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση της έκφρασης των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, στην παθοφυσιολογία και αιτιοπαθογένεια της προεκλαμψίας.

Η προεκλαμψία εμφανίζεται στο 3-5% των κυήσεων και μπορεί να έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία της μητέρας και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Πρόκειται για μία νόσο που χαρακτηρίζεται από αύξηση της αρτηριακής πίεσης μετά την 20η εβδομάδα της κύησης σε συνδυασμό με πρωτεϊνουρία ή/και οίδημα. Παρόλο που καταστάσεις όπως παχυσαρκία, χρόνια υπέρταση, διαταραχές πηκτικότητας, ανοσολογικά αίτια, γενετική προδιάθεση, διαιτητικές ανεπάρκειες ή καταχρήσεις φαίνεται να αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες και έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση της νόσου, οι μοριακοί μηχανισμοί και άλλα υποκείμενα αίτια που σχετίζονται με την παθοφυσιολογία της νόσου παραμένουν υπό διερεύνηση. Σύμφωνα με τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει ότι υπάρχει μία αλληλοεπικάλυψη με τους αντίστοιχους παράγοντες εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για νόσο που επιδρά στη παθοφυσιολογία του ενδοθηλίου των αγγείων. Επιπλέον, γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία, ειδικά και στη δεύτερη κύηση, εμφανίζουν επίσης υψηλοτέρα ποσοστά εμφάνισης καρδιοαγγειακών νοσημάτων στην μετέπειτα ζωή τους.

Οι πρωτεΐνες Notch (Notch-1 έως Notch-4) είναι μία οικογένεια ενδομεμβρανικών υποδοχέων οι οποίες δομικά και λειτουργικά παραμένουν συντηρημένες κατά την εξέλιξη. Ενεργοποιούνται από τους συνδέτες τους Delta (DLL-1,-3,-4) και Jagged/Serrate (Jagged-1,-2). Η σύνδεση του Notch με τον συνδέτη του οδηγεί σε πρωτεόλυση του υποδοχέα Notch από το ένζυμο γ-secretase. Το ενδοκυττάριο μέρος του Notch (Notch Intracellular Domain- NICD)

μεταναστεύει στον πυρήνα, όπου αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη RBP-Jκ. Στη συνέχεια το σύμπλοκο αυτό προσδένεται στο DNA και επάγει την έκφραση των γονιδίων στόχων του μονοπατιού Notch. Είναι ήδη γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch έχει την ικανότητα να επηρεάζει την τύχη των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αλλάζουν την έκφραση γονιδίων στόχων.

Μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες κατά την εξέλιξη μιας κύησης είναι η φυσιολογική δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, που ξεκινάει με τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στο ενδομήτριο, ενώ στη συνέχεια ολοκληρώνεται με τη συνένωση με τα μητριαία σπειροειδή αγγεία. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής απαιτούνται δομικές αλλαγές τόσο στο ενδοθήλιο του ενδομητρίου που υποδέχεται την κυτταροτροφοβλάστη, όσο και στα μυϊκά κυρίως τοιχώματα των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών με σκοπό τη δημιουργία των χοριακών λαχνών. Κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου πλακούντα τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω δυο μεγάλων μονοπατιών. Το villous pathway κατά το οποίο τα τροφοβλαστικά κύτταρα συγχωνεύονται για να σχηματιστούν τα συνκυτιοτροφοβλαστικά. Το extravillous pathway όπου τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται α) σε interstitial extravillous trophoblasts τα οποία εισβάλλουν στο φθαρτό και σε ένα τμήμα του μυομητρίου ή β) σε edovascular extravillous trophobalsts (EVTs) τα οποία διαμορφώνουν την μητρική αγγειογένεση. Τα δυο αυτά στάδια διαφοροποίησης ελέγχονται σχεδόν εξολοκλήρου από την ένταση του οξυγόνου, μεταγραφικούς παράγοντες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα σηματοδοτικά μόρια. Ανώμαλη πλακουντοποίηση και συγκεκριμένα περιορισμένη εμφύτευση των τροφοβλαστικών κυττάρων στη μήτρα και αποτυχία του σχηματισμού των μητρικών αγγείων, θεωρείται ότι οδηγούν σε προεκλαμψία.

Μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch εκφράζονται στον πλακούντα και παίζουν σημαντικό ρόλο στις παραπάνω αναπτυξιακές διαδικασίες. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ελέγχει την εμβρυική αγγειογένεση και την ανάπτυξη του μητρικού κυκλοφορικού συστήματος.

Στον τελειόμηνο ανθρώπινο πλακούντα, ο υποδοχέας Notch-2 και ο συνδέτης Jagged-2 συμμετέχουν στην αγγειογένεση. Εξάλειψη του Notch-2 σε ποντίκια είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αιμάτωσης του πλακούντα και της αρτηριακής διείσδυσης των τροφοβαστικών κυττάρων. Τα παραπάνω προτείνουν μια πιθανή σχέση ανάμεσα στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και την προεκλαμψία. Το ενδοκυττάριο μέρος του υποδοχέα Notch (NICD) ενεργοποιεί τη μεταγραφή πολλών γονιδίων στόχων με σημαντικότερα μεταξύ αυτών τα Hey-1 και Hey-2, τα οποία είναι απαραίτητα για την αγγειακή ανάπτυξη. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται κατά τη δημιουργία του αγγειακού συστήματος, στην καρδιά, στα ενδοθηλιακά κύτταρα αλλά και στον πλακούντα. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι απενεργοποίηση των γονιδίων αυτών οδηγεί σε ανεπάρκεια των αγγείων του πλακούντα.

Στην παρούσα μελέτη πλακουντιακός ιστός έχει συλλεχθεί από 20 κυήσεις που εμφάνισαν προεκλαμψία και από 20 κυήσεις με ομαλή πορεία της εγκυμοσύνης. Η παρουσία προεκλαμψίας επιβεβαιώθηκε με κλινικό-εργαστηριακά και υπερηχογραφικά κριτήρια, ενώ αποκλείστηκαν οι περιπτώσεις προεκλαμψίας που αποδίδονται σε συγκεκριμένη νοσολογική οντότητα (θρομβοφιλία, ανοσολογικά και γενετικά αίτια, λοιμώξεις κ.ά). Για τον προσδιορισμό της έκφρασης των υπό εξέταση γονιδίων (Notch1-4; DLL-1,-3,-4; Jagged-1,-2; Hey-1,-2) έγινε αρχικά εξαγωγή εκχυλίσματος RNA, σύνθεση cDNA και στη συνέχεια Real-Time PCR, ενώ για τον προσδιορισμό της ποσότητας του ενδοκυττάριου τμήματος των υποδοχέων Notch (NICD1-4) έγινε εκχύλιση πρωτεϊνών από τους ιστούς και στη συνέχεια Western blot με κατάλληλα αντισώματα για την κάθε πρωτεΐνη. Η ανάλυση για την εξαγωγή στατιστικής σημαντικότητας μεταξύ των υπό εξέταση δεικτών και των κλινικών παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των κατάλληλων στατιστικών δοκιμασιών (Chi-square, KruskalWallis, Spearman rank correlation, κ.α.) του λογισμικού πακέτου SPSS.

Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι οι υποδοχείς Notch-1 και Notch-4 αλλά και ο συνδέτης Dll-1 δεν εκφράζονται στους πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία ή με φυσιολογική

εγκυμοσύνη. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη στην οποία δεν βρέθηκε έκφραση της πρωτεΐνης Notch-1 στα τροφοβλαστικά κύτταρα του πλακούντα γυναικών με προεκλαμψία αλλά και με φυσιολογική κύηση, ενώ τα επίπεδα της πρωτεΐνης Notch-4 ήταν αρκετά μειωμένα στα εξωλαχνιακά τροφοβλαστικά κύτταρα. Ωστόσο, άλλες μελέτες έδειξαν ότι το Notch-1 και το Notch-4 εκφράζονται στον πλακούντα. Κάποιες από τις πιθανές εξηγήσεις για τις διαφοροποιήσεις αυτές είναι οι διαφορετικές πειραματικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην κάθε μελέτη αλλά και το τμήμα του ιστού που αναλύθηκε αφού η έκφραση του μονοπατιού Notch αλλάζει καθώς τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται. Ωστόσο, τα υπόλοιπα οκτώ γονίδια παρουσίασαν σημαντική μείωση έκφρασης σε γονιδιακό επίπεδο στα δείγματα προεκλαμψίας σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Επιπλέον, το ενδοκυττάριο μέρος των υποδοχέων Notch-2 (NICD-2) και Notch-3 (NICD-3) ήταν υποεκφρασμένο σε επίπεδο πρωτεΐνης στα παθολογικά δείγματα, σε σχέση με τα φυσιολογικά. Το αποτέλεσμα αυτό επαληθεύεται από τα μειωμένα επίπεδα mRNA των υποδοχέων Notch-2 και Notch-3 στα δείγματα προεκλαμψίας. Προηγούμενη μελέτη έδειξε σημαντική μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνών Notch-2 και Jag-2 σε ανθρώπινους τελειόμηνους πλακούντες γυναικών που εμφάνισαν ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη ή υπέρταση κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους, σε σχέση με τις φυσιολογικές κυήσεις. Επιπλέον, τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι τα γονίδια στόχοι Hey-1 και Hey-2 είχαν μειωμένη έκφραση mRNA στα δείγματα προεκλαμψίας σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Η μειωμένη αυτή έκφραση πιθανόν να οφείλεται στη συνολικά μειωμένη έκφραση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch, ως μηχανισμός επαγωγής τους. Περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε σημαντικές στατιστικά συσχετίσεις μεταξύ των πλακουντιακών επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης και συγκεκριμένων παθολογικών παραμέτρων στις περιπτώσεις προεκλαμψίας. Ιδιαίτερο εύρημα ήταν η μη έκφραση του υποδοχέα Notch-3 στις εγκύους εκείνες που κάπνιζαν και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σχέση με εκείνες που το έκοψαν. Στις περιπτώσεις με προεκλαμψία και βάρος νεογνού μικρότερο από την 5η εκατοστιαία θέση παρατηρήσαμε υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης του NICD-3 και υψηλότερα επίπεδα mRNA

του Dll-3 συγκρινόμενα με εκείνες τις περιπτώσεις προεκλαμψίας με βάρος νεογνού μεγαλύτερο από την 5η εκατοστιαία θέση. Ένα άλλο εύρημα ήταν ότι η έκφραση του γονιδίου στόχος Hey-2 στους πλακούντες από τις εγκυμοσύνες με προεκλαμψία που ο τοκετός έγινε με καισαρική τομή ήταν αυξημένη συγκρινόμενη με τις περιπτώσεις του κολπικού τοκετού. Επιπλέον, το Hey-2 είχε αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις γυναίκες με προεκλαμψία οι οποίες ήταν πρωτότοκες συγκρινόμενες με αυτές που γέννησαν το δεύτερο ή το τρίτο παιδί τους. Στη συνέχεια, ελέγξαμε το μοτίβο συνέκφρασης των ανωτέρω οκτώ γονιδίων σε συνδυασμό ζευγών. Στα φυσιολογικά δείγματα πλακούντα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το Notch-3 έχει θετική συσχέτιση με το Notch-2. Ο υποδοχέας Dll-4 έχει θετική συσχέτιση με τους υποδοχείς Notch-2 και Notch-3 και με τους συνδέτες Jagged-1, Jagged-2 και Dll-3. Ο υποδοχέας Jagged-1 είχε θετική συσχέτιση με τον Notch-3 και με τον Jagged-1. Το γονίδιο στόχος Hey-1 συσχετιζόταν θετικά με τους συνδέτες Jagged-1, Jagged-2 και Dll-4. Τελος, το Hey2 δεν συνεκφραζόταν με κανένα από τα άλλα μόρια όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης. Στους πλακούντες των γυναικών με προεκλαμψία παρατηρήσαμε περισσότερες και διαφορετικές συνεκφράσεις ανάμεσα στα μελετώμενα γονίδια σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα, οι θετικές συσχετίσεις του υποδοχέα Notch-3 με τον Notch-2 και του συνδέτη Dll-4 με τον Jagged-1 χάθηκαν στα δείγματα με προεκλαμψία. Επιπλέον, οι συνδέτες Jagged-1 και Jagged-2 δεν συνεκφράζονταν με τον υποδοχέα Notch-3 αλλά με τον Notch-2. Το Hey-1 σχετιζόταν επιπλέον με τα Notch-2 και Dll-3, και το Hey-2 είχε θετική συσχέτιση και με τα υπόλοιπα 7 γονίδια. Η διαφορετική αλληλεπίδραση του Hey-2 με τα υπόλοιπα μόρια του μονοπατιού Notch στους πλακούντες προεκλαμψιας σε σχέση ε τους φυσιολογικούς, θα μπορούσε να δείξει ότι παίζει έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην εξέλιξη της προεκλαμψίας, ένα συμπέρασμα που απιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

Τα ευρήματα μας αποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί σημαντικό μέρος της παθογένειας αυτής της επιπλοκής της εγκυμοσύνης. Παρ'όλα αυτά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τους υποδοχείς Notch, τους συνδέτες τους και τα γονίδια

στόχους τους, ώστε να προσδιοριστεί κατά πόσο ένα ή περισσότερα μέλη του σηματοδοτικού αυτού μηχανισμού θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση της προεκλαμψίας ή για νέες προληπτικές και θεραπευτικές στρατηγικές.

ABSTRACT

Preeclampsia (PE) affects 3-5% of all pregnancies worldwide and is a major cause of maternal mortality and morbidity. PE is a co nsequence of diverse pathological processes involving impaired implantation, endothelial dysfunction and systemic inflammation, and it is characterized by hypertension and proteinuria during pregnancy.

The Notch signaling pathway is an evolutionarily conserved intercellular signaling mechanism, which is involved in cell fate decisions and pattern formation during development. NOTCH1-4 receptors are single-pass transmembrane proteins that are activated by Delta (DLL1,-3,-4) and Jagged/Serrate (JAG1,-2) ligands. Each of these proteins shows cell-type- and tissue-specific expression during development. This ligand-receptor interaction leads to the proteolytic cleavage and release of the NOTCH intracellular domain (NICD), which translocates to the nucleus, where it interacts with the DNA with the help of transcription factor RBPJK, inducing the expression of numerous target genes. Members of the Notch signaling pathway have been detected in the developing placenta, where they play an important role in placentation.

NICD activates the transcription of several target genes, most notably the HEY1 and HEY2 genes, which are required for vascular development. These genes are expressed in the developing cardiovascular system, including the heart, endothelial cells and vascular smooth muscles, as well as in the placental labyrinth, while in mice Hey1 is additionally expressed in some trophoblast cells in the ectoplacental cone. Knockout of any of these genes leads to placental vascular deficiencies and to early embryonic lethality, due to major vascular and cardiac defects.

The aim of this study was to investigate the expression of receptors NOTCH1,-2,-3,-4, ligands DLL1,-3,-4, JAG1,-2 and target genes HEY1,-2 in placental tissue samples from 20 late preterm or term pregnancies complicated by PE versus 20 normal pregnancies. mRNA levels of the studied molecules were measured by quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR), while the

protein expression of the intracellular domain of NOTCH2 (NICD2) and NOTCH3 (NICD3) was measured by Western Blot (WB).

qRT-PCR analysis revealed that NOTCH1, NOTCH4 and DLL1 were not expressed in the placenta. Possible explanations regarding expression variations between our study and previous ones are the different experimental procedures used, since we measured expression with qRT-PCR while those studies used either Western Blot or immunohistochemistry, the different ethnic background of the study populations, and the temporal and spatial heterogeneity of the placental structures, since it is believed that CTBs alter the expression of Notch receptors and ligands as they differentiate.

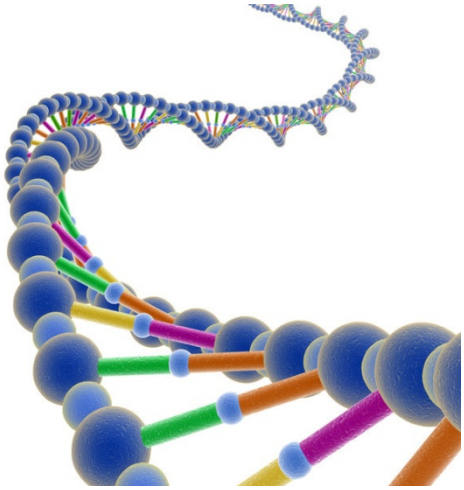
On the contrary, NOTCH2, NOTCH3, DLL3, DLL4, JAG1, JAG2, HEY1 and HEY2 mRNA levels were downregulated in PE samples vs. controls ($p<0.01$). WB confirmed that NICD2 ($p=0.014$) and NICD3 ($p<0.001$) protein levels were also lower in PE specimens. Statistical analysis revealed several significant associations: of NOTCH3 mRNA expression with smoking during pregnancy ($p=0.029$), of NICD3 protein levels ($p=0.028$) and DLL3 mRNA levels ($p=0.041$) with birth weight centile, and of HEY2 transcript levels with parity ($p=0.034$) and mode of delivery ($p=0.028$).

The main strength of our research is that it is the first study to concurrently measure the mRNA levels of all key Notch signaling pathway molecules, and especially target genes HEY1 and HEY2, whose expression in human placenta have never been studied before, and to determine the associations between them. Study limitations include the fact that our research was conducted only on late preterm and term placentas, and therefore we were not able to measure the expression of the Notch pathway molecules during the earlier stages of pregnancy, and that our samples were whole tissue homogenates and not micro-dissected, which means that the measured expression of the Notch signaling pathway genes was their average expression among the various placenta cell types and not their expression in each cell type individually. Evidently, these limitations could also explain the differences between our results and those of some previously

conducted studies. Another potential limitation would be the differences in gestation period (shorter in PE cases), mode of delivery (since elective caesarean sections were more common in PE samples than in controls) and smoking status (since more women with PE smoked) between the two groups, which could introduce a possible bias in the results. However, since univariate analysis, with the aforementioned parameters as co-factors, found that the differences in the expression of all studied genes between PE cases and controls retained their statistical significance, our findings cannot be attributed to sampling bias, but are linked to PE pathophysiology.

Our findings, that receptors NOTCH2,-3, ligands DLL3,-4 and JAG1,-2 and target genes HEY1,-2 are downregulated in PE-complicated late preterm and term placentas, provide evidence that the Notch signaling pathway is associated with this pregnancy complication (visual depiction of the pathway in Fig. 4). Further research regarding the function of Notch receptors, ligands and target genes in the placenta is required in order to elucidate their role in PE pathogenesis and to determine whether one or more of these genes could be used as biomarkers for the early detection of PE, or for new preventive and therapeutic strategies.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



1. Εισαγωγή

1.1. Προεκλαμψία

Η προεκλαμψία αποτελεί χαρακτηριστική πάθηση της ανθρώπινης εγκυμοσύνης, όπως και οι αποβολές της κύησης. Σε άλλα θηλαστικά οι παραπάνω διαταραχές είναι εξαιρετικά σπάνιες. Νεότερες αντιλήψεις αναφέρουν ότι η προεκλαμψία φαίνεται να σχετίζεται με ανεπαρκή διήθηση της τροφοβλάστης στη μήτρα, η οποία προκαλεί ενεργοποίηση και βλάβη του ενδοθηλίου, με αποτέλεσμα τη στένωση των σπειροειδών αρτηριών. Η γενεσιουργός αιτία της κατάστασης αυτής παραμένει άγνωστη (1).

Η υπέρταση στην εγκυμοσύνη είναι συχνότατη διαταραχή, είτε ως χρόνια υπέρταση είτε ως πρώτη εκδήλωση συνήθως μετά την 20η εβδομάδα κύησης και έχει συχνότητα εμφάνισης σε πρωτότοκος γυναίκες σε ποσοστό 3-5%. Η υπέρταση μπορεί να αφορά μία ήπια αύξηση της αρτηριακής πίεσης ή μία σοβαρή υπέρταση με συνοδά συμπτώματα από άλλα συστήματα, οπότε πρόκειται για προεκλαμψία, εκλαμψία ή ακόμα και σύνδρομο HELLP (αιμόλυση – αύξηση ηπατικών ενζύμων – πτώση αιμοπεταλίων). Ενώ υπερτασική νόσο στην κύηση μπορεί να αναπτύξουν πολλές γυναίκες, ένα ποσοστό αυτών, ίσως και 50%, θα προχωρήσει σε προεκλαμψία (2).

Για τη διάγνωση της προεκλαμψίας σύμφωνα με τον ACOG (American College of Obstetrics and Gynecology) χρειάζεται αύξηση της συστολικής πίεσης άνω των 140 mmHg ή της διαστολικής άνω των 90 mmHg σε τουλάχιστον δύο μετρήσεις με διαφορά 6 ωρών και ανεύρεση λευκωμάτων στα ούρα 24ώρου μεγαλύτερη των 300mg. Το τρίτο κριτήριο διάγνωσης της

προεκλαμψίας είναι το οίδημα το οποίο δεν θεωρείται πλέον αξιόπιστο κριτήριο διότι είναι σύνηθες φαινόμενο κατά την φυσιολογική εγκυμοσύνη και επιπλέον σχεδόν το 1/3 των ασθενών με προεκλαμψία δεν αναπτύσσουν οίδημα (3,4). Συμπτώματα συνοδά της νόσου μπορεί να αποτελούν η ολιγουρία (‹500 ml ούρων το 24ώρο), η έντονη κεφαλαλγία, οι διαταραχές της όρασης, το πνευμονικό οίδημα με ή χωρίς κυάνωση, το άλγος στο επιγάστριο, η θρομβοπενία, η επηρεασμένη ηπατική λειτουργία και σύνδρομο HELLP (5). Συχνά, αποτέλεσμα της προεκλαμψίας μπορεί να είναι και η ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (ΕΥΑ). Η γέννηση ενός νεογνού με υπολειπόμενη ενδομήτρια ανάπτυξη (ΥΕΑ) υποδηλώνει ένα μικρό για την ηλικία κύησης νεογνό, το βάρος και οι σωματομετρικοί δείκτες του οποίου να είναι κάτω από την 10η ή ακόμα και την 3η εκατοστιαία θέση για την ηλικία κύησης (6-8) Ανάλογα με το μέγεθος της υπέρτασης και της λευκωματουρίας η προεκλαμψία μπορεί να είναι ήπια έως και σοβαρή, πριν μεταπέσει σε εκλαμψία. Η εκλαμψία είναι σοβαρή και σπάνια (1%) επιπλοκή - εξέλιξη της προεκλαμψίας με κύριο χαρακτηριστικό την εμφάνιση επιληπτικών κρίσεων (grand-male) λόγω υπερτασικής εγκεφαλοπάθειας.

Η συνηθέστερη εκδήλωση της νόσου εμφανίζεται μετά την 20η εβδομάδα με υπέρταση και λευκωματουρία. Περιπτώσεις με εμφάνιση συμπτωμάτων νωρίτερα της 20ης εβδομάδας κύησης παραπέμπουν σε μύλη κύηση ή υδρωπικό πλακούντα (9,10). Επίσης μπορεί να εκδηλωθεί προεκλαμψία και όψιμα, μετά τον τοκετό και πριν περάσουν τέσσερις εβδομάδες από αυτόν (10). Παράγοντες επιβαρυντικοί για την εξέλιξη της εγκυμοσύνης είναι η εμφάνιση της προεκλαμψίας νωρίτερα της 33ης εβδομάδας, η βαρύτητα της νόσου με υψηλή πίεση (>160 mmHg) και έντονη λευκωματουρία (>500 mg/24ώρο), η ποιότητα αντιμετώπισης και η ύπαρξη ή όχι παθολογικού ιστορικού (11). Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες επιπλοκές της προεκλαμψίας που αφορούν στη μητέρα και στο έμβρυο, ενώ στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας. Τα 2/3 των περιπτώσεων προεκλαμψίας εκδηλώνονται στην πρώτη κύηση, αφού σε επόμενη εγκυμοσύνη η μητέρα έχει

απευαισθητοποιηθεί απέναντι στο έμβρυο και στο γενετικό υλικό του πατέρα οπότε προφυλάσσεται ανοσολογικά για τις επόμενες κυήσεις όταν είναι από τον ίδιο σύντροφο (12).

Σύμφωνα με τους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης προεκλαμψίας θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει ότι υπάρχει μία αλληλοεπικάλυψη με τους αντίστοιχους παράγοντες εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι πρόκειται για νόσο που επιδρά στη παθοφυσιολογία του ενδοθηλίου των αγγείων. Επιπλέον, γυναίκες που εμφανίζουν προεκλαμψία, ειδικά και στη δεύτερη κύηση, εμφανίζουν επίσης υψηλοτέρα ποσοστά εμφάνισης καρδιοαγγειακών νοσημάτων στην μετέπειτα ζωή τους (11).

Η ακριβής αιτιολογία της προεκλαμψίας δεν είναι ξεκάθαρη όμως το επικρατέστερο μοντέλο είναι αυτό των δυο σταδίων. Σύμφωνα με αυτό υπάρχει μια αρχική αλλαγή από την αρχή της σύλληψης και επηρεάζεται από γενετικά και περιβαλλοντολογικά αίτια (ηλικία και υγεία μητέρας, γενετικές ανωμαλίες ζυγωτού, λοιμώξεις κ.α.), η οποία οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης διαφόρων φλεγμονωδών παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για την ομαλή εμφύτευση, διείσδυση και πλακουντοποίηση. Η παραπάνω αλλαγή λόγο της πολυπαραγοντικής της εξάρτησης μπορεί να μην καταφέρει να δημιουργήσει τις απαραίτητες συνθήκες για σωστή πλακουντοποίηση και να οδηγήσει στην ελλιπή δυνατότητα διάχυσης των απαραίτητων ουσιών ανταλλαγής μεταξύ μητρικής και εμβρυικής κυκλοφορίας. Έτσι περνάμε στο δεύτερο στάδιο, κατά το οποίο ο σχηματισμένος πια, αλλά ανεπαρκής πλακούντας, σε μία προσπάθεια αντιρρόπησης της μειωμένης αιματικής παροχής, εκκρίνει μία σειρά παραγόντων που επιδρούν στο ενδοθήλιο των αγγείων της μητέρας με σκοπό τη διάταση και την αύξηση της διαπερατότητάς τους. Ανάλογα τώρα με τα ιδιοσυγκρασιακά χαρακτηριστικά της κάθε γυναίκας, το επιπλέον στρες που δέχονται τα αγγεία της, σε άλλες περιπτώσεις μπορεί να είναι ανεκτό χωρίς καθόλου ή με ήπια συμπτώματα, ενώ σε άλλες να δίνει σοβαρά συμπτώματα με εκδήλωση προεκλαμψίας. Επίσης, η αλλαγή που προσπαθεί να επιφέρει ο πλακούντας στα μητρικά αγγεία μπορεί να έχει επιτυχή κατάληξη όσον αφορά τη θρέψη του εμβρύου και το έμβρυο να αναπτύσσεται κανονικά. Μπορεί όμως από την άλλη πλευρά, να αποτύχει να αυξήσει στο επιθυμητό την αιματική ροή στην

εμβρυοπλακουντιακή μονάδα και να οδηγήσει το έμβρυο σε υπολειπόμενη ανάπτυξη, εξέλιξη που συμβαίνει στο 1/3 των κυήσεων με προεκλαμψία (13). Σχήμα 1

Πίνακας 1. Οι σημαντικότερες επιπλοκές της προεκλαμψίας που αφορούν στη μητέρα και στο έμβρυο.

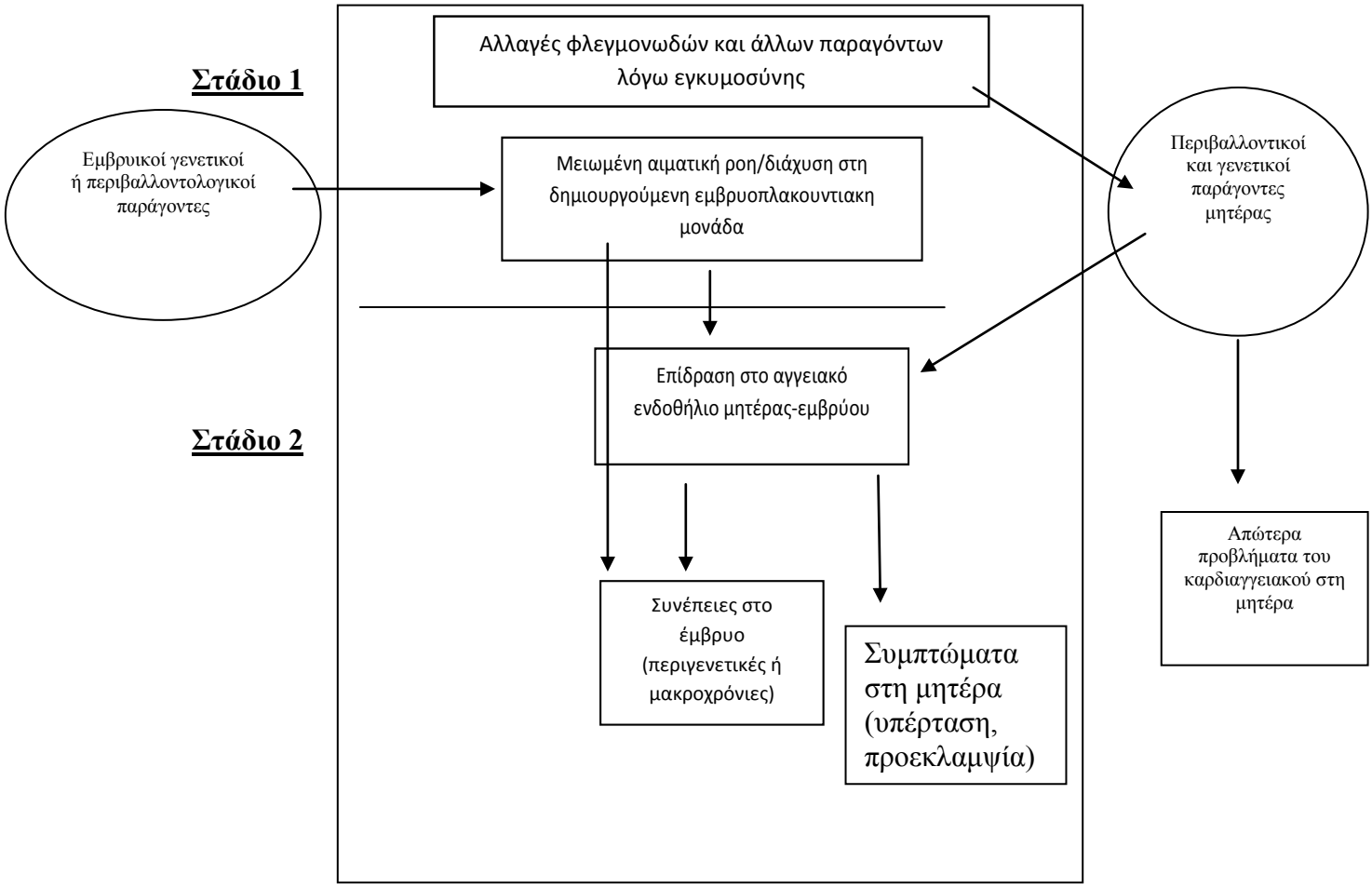
Επιπλοκές μητέρας	Επιπλοκές εμβρύου
Σύνδρομο HELLP/ διάχυτη ενδοαγγειακή πήξη (10-20%)	Πρόωρος τοκετός (15-67%)
Πνευμονικό οίδημα (2-5%)	ΕΥΑ (10-25%)
Οξεία νεφρική ανεπάρκεια (1-5%)	Θάνατος (1-2%)
Αποκόλληση πλακούντα (1-4%)	Μακροπρόθεσμα καρδιαγγειακά προβλήματα
Εκλαμψία (<1%)	Νευρολογική συνδρομή λόγω υποξίας (<1%)
Ηπατική ανεπάρκεια ή αιμορραγία (<1%)	
Μακροπρόθεσμη καρδιαγγειακή νοσηρότητα	

Πίνακας 2. Παράγοντες που σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της προεκλαμψίας. (14)

Περιορισμένη έκθεση στο σπέρμα του πατέρα – αλλαγή συντρόφου (νέος πατέρας)	Κύηση μετά από δωρεά σπέρματος, ωοκυττάρου ή εμβρύου
Συστηματικά νοσήματα κολλαγόνου	Ιστορικό θρομβοφιλίας
Πολύ μικρή ή πολύ μεγάλη ηλικία μητέρας	Λοιμώξεις της μητέρας
Πολύδυμη κύηση	Παχυσαρκία – ανθεκτικότητα στην ινσουλίνη
Ιστορικό προεκλαμψίας	Χαμηλό βάρος γέννησης μητέρας
Χρόνια υπέρταση ή νεφρική νόσος	Ιστορικό σακχαρώδους διαβήτη
Οικογενειακό ιστορικό προεκλαμψίας	Υδρωπικός πλακούντας
Μαύρη φυλή	Υπερομοκυστεϊναιμία

Σχήμα 1.

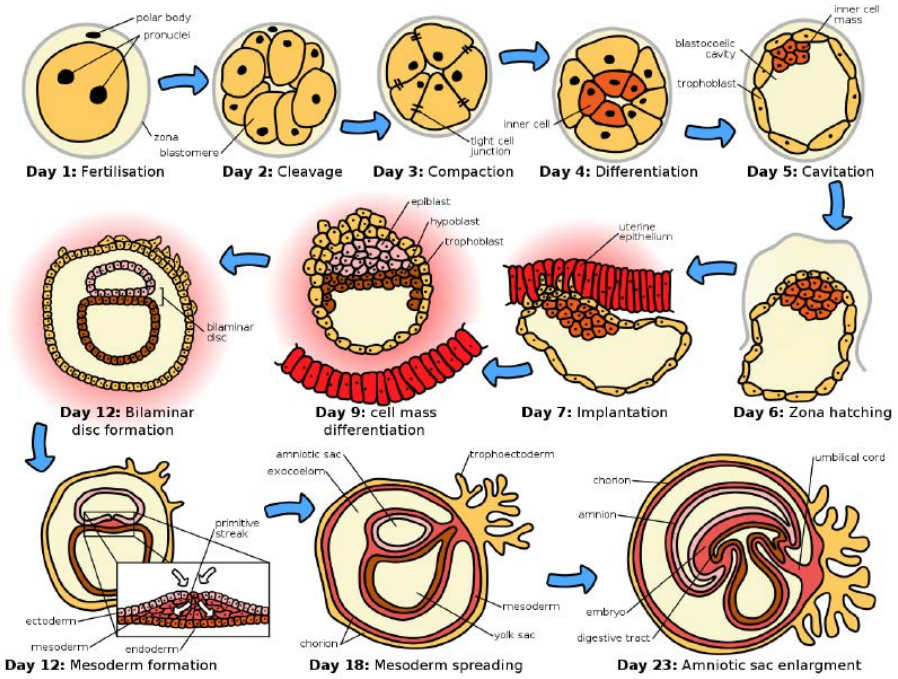
Μοντέλο 2 σταδίων παθοφυσιολογίας της προεκλαμψίας σύμφωνα με τις νεότερες αντιλήψεις [15]



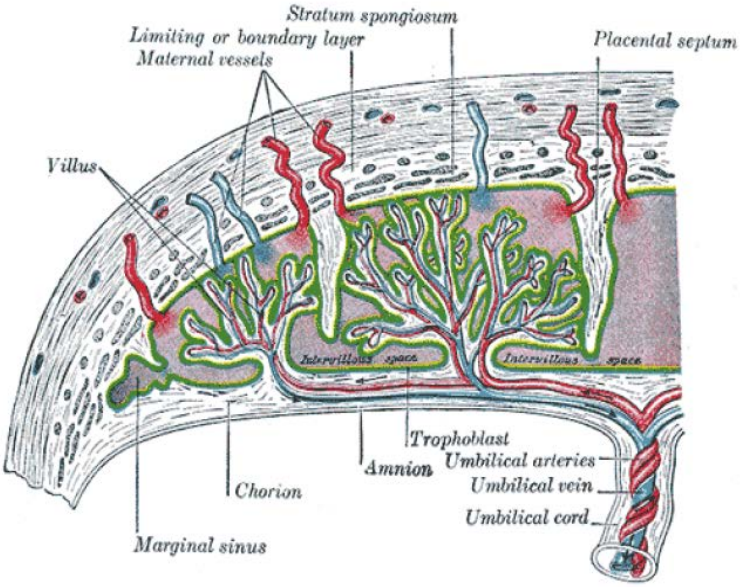
1.2. Πλακούντας

Ο πλακούντας είναι ένα παροδικό όργανο που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης με σκοπό να στηρίξει την αύξηση και την ανάπτυξη του εμβρύου. Ο ώριμος τελειόμηνος πλακούντας του ανθρώπου είναι ένα δισκοειδούς σχήματος όργανο, στρογγυλός ή υποστρόγγυλος και σπάνια σε ανώμαλα σχήματα, όπως δίλοβος πλακούντας, περικεχαρακωμένος, ζωνοειδής κ.α (16). Η μέση μέγιστη διάμετρος του δίσκου του τελειόμηνου πλακούντα είναι 22 εκατοστά, το μέγιστο πάχος στο κέντρο του δίσκου 2,5 εκατοστά και το μέσο βάρος 470 γραμμάρια, μεγέθη με σημαντικού βαθμού διακυμάνσεις καθώς εξαρτώνται από πολλούς παράγοντες. Η διαδικασία και το είδος του τοκετού, η απολίνωσης του ομφάλιου λώρου και το διάστημα που μεσολαβεί από την στιγμή της υστεροτοκίας έως την μέτρηση προκαλούν σημαντικές αλλοιώσεις των ανωτέρω μεγεθών (17,18). Παρόλα αυτά και με βάση μελέτες, το βάρος του πλακούντα στις 20 εβδομάδες κύησης δεν πρέπει να ξεπερνά τα 150 γραμμάρια, στις 30 εβδομάδες τα 375 γραμμάρια και στις 40 εβδομάδες τα 600 γραμμάρια (19). Εξωτερικά ο πλακούντας εμφανίζει δύο επιφάνειες, την έσω ή εμβρυική επιφάνεια, την έξω ή μητριαία επιφάνεια και μία περιφέρεια (20). Η εμβρυική (αμνιονική ή χοριονική) επιφάνεια του πλακούντα, αντικρίζει την αμνιακή κοιλότητα επαλειφόμενη από το άμνιο, είναι επίπεδη, λεία και στιλπνή, ενώ εμφανίζει σε έκκεντρη συνήθως θέση την πρόσφυση του ομφαλίου λώρου (21). Τα εμβρυικά αγγεία διακλαδίζονται ακτινοειδώς από το σημείο πρόσφυσης του λώρου, και εξαπλώνονται σε όλη την εμβρυική επιφάνεια του πλακούντα. Κατά μήκος της περιμέτρου του δακτυλίου η περιφέρεια του πλακούντα λεπτύνεται και συνάπτεται με τους υπόλοιπους υμένες του εμβρύου, που αποτελούνται από το άμνιο και το χόριο, στους οποίους προσκολλάται προοδευτικά και ο θυλακοειδήςή ανεστραμμένος φθαρτός και ο γνήσιος ή τοιχωματικός. Από την χοριονική επιφάνεια όπως αναφέρθηκε εκφύεται ο ομφάλιος λώρος. Ο ομφάλιος λώρος του

τελειόμηνου πλακούντα, έχει κατά μέσο όρο διάμετρο 1-2 εκατοστά καιμήκος 55 έως 60 εκατοστά και χαρακτηρίζεται από 2,1 περιελίξεις ανά 10 εκατοστά, με φορά αντίθετη αυτής των δεικτών του ρολογιού (22). Στον ομφάλιο λώρο παρατηρούνται τόσο στον τελειόμηνο πλακούντα αλλά και κατά την μεγαλύτερη διάρκεια της κύησης, δύο αρτηρίες και μία φλέβα. Αρχικά υπάρχει και δεύτερη φλέβα, η οποία όμως υποστρέφει κατά την διάρκεια του δεύτερου μήνα της κύησης. Η έξω επιφάνεια του πλακούντα (βασικό πέταλο ή μητριαία επιφάνεια) συνάπτεται με το τοίχωμα της μήτρας. Ουσιαστικά φανερώνεται μόνο κατά το διαχωρισμό του πλακούντα από το σώμα της μήτρας (21). Η όψη του είναι σπογγώδης, αιμόφυρτη και η χροιά βαθυέρυθρη με κιτρινόφαιες εστιακά εναποθέσεις που αντιστοιχούν σε ινική, λόγω της διαδικασίας αποκόλλησης. Χωρίζεται με διασταυρούμενες αύλακες σε 10-40 πολύγωνες και υπόκυρτες περιοχές, που λέγονται κοτυληδόνες (λοβοί ή λοβίδια) και αντιστοιχούν σε καταδύσεις του βασικού πετάλου προς τον μεσολάχνιο χώρο, όπου και σχηματίζουν τα διαφράγματα του πλακούντα. Από το κέντρο κάθε κοτυληδόνας αναδύονται οι μητροπλακούντιες φλέβες, ενώ στις αύλακες εισδύουν οι μητροπλακούντιες αρτηρίες. Όλος ο χώρος ανάμεσα στις δύο επιφάνειες (χοριονικό και βασικό πέταλο) καταλαμβάνεται από το λαχνωτό χόριο, το εμβρυικό στοιχείο του πλακούντα (23), το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με το μητρικό αίμα, που κυκλοφορεί στον μεσολάχνιο χώρο. Οι λάχνες διαφοροποιούνται ανάλογα με την ηλικία κύησης και διακρίνονται στις μεσεγχυματογενείς, τις στελεχιαίες, τις ενδιάμεσες ανώριμες και ώριμες και στις τελικές. Ο ώριμος πλακούντας διαθέτει 40-60 περίπου λαχνωτά δέντρα ή εμβρυικές κοτυληδόνες, τα οποία μαζί με τις αντίστοιχες μοίρες του μεσολάχνιου χώρου είναι γνωστά ως πλακούντια. Ένα έως τρία λαχνωτά δέντρα αντιστοιχούν σε κάθε μία κοτυληδόνα της μητριαίας επιφάνειας (21). Τα πλακούντια αποτελούν τις εμβρυομητρικές μονάδες κυκλοφορίας, αφού σε αυτά εκβάλλουν τα στόμια των συνολικά 100-150 σπειροειδών μητριαίων αρτηριών που αιματώνουν τη θέση εμφύτευσης.



Σχηματική απεικόνιση της εμφύτευσης (πηγή Wikipedia)



Εικόνα σε διατομή των βασικών δομών του πλακούντα (πηγή Wikipedia)

1.3. ΤΟ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΙΚΟ ΜΟΝΟΠΑΤΙ NOTCH

Γενικά

Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αναγνωρίστηκε γενετικά από τον Morgan το 1917 στη μεταλλαγμένη μύγα Drosophila melanogaster και είναι από τους σημαντικότερους μοριακούς μηχανισμούς ο οποίος συμμετέχει στον πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση των κυττάρων των οργανισμών. Ο υποδοχέας Notch είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας ο οποίος πήρε το όνομα του από τον χαρακτηριστικό φαινότυπο που προκαλεί η μερική έλλειψη λειτουργίας του, η οποία χαρακτηρίζεται από «εγκοπές-Notch» στην άκρη των φτερών του ενήλικου εντόμου Drosophila (24). Η σημασία του υποδοχέα Notch στη διαφοροποίηση-οργανογένεση αποδείχτηκε από πειραματική μελέτη του Poulson το 1940 όπου παρατήρησε ότι κύτταρα γενετικά προκαθορισμένα να γίνουν επιδερμικά μετά από μετάλλαξη του γονιδίου του υποδοχέα Notch έγιναν νευρικά (24). Λόγο αυτών των ευρημάτων ο υποδοχέας Notch αναφερόταν στη βιβλιογραφία ως «νευρογενές» γονίδιο αφού η διπλή μετάλλαξη του προκαλούσε υπερπαραγωγή νευρικών κυττάρων σε βάρος των επιθηλιακών, δηλαδή «νευρογόνο φαινότυπο» σε έμβρυα (25). Οι υποδοχείς Notch έχουν βρεθεί σε μια τεράστια ποικιλία οργανισμών, από νηματοειδή μέχρι θηλαστικά (26). Ο υποδοχέας Notch είναι μια μεγάλη διαμεμβρανική πρωτεΐνη απλής διέλευσης που δρα τόσο στην κυτταρική επιφάνεια ώστε να δέχεται σήματα από το εξωτερικό περιβάλλον και τα γειτονικά κύτταρα όσο και στον πυρήνα για να συντονίζει την έκφραση γονιδίων (27). Το γονίδιο του υποδοχέα Notch ανήκει στην οικογένεια γονιδίων του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα και κωδικοποιεί διαμεμβρανικές πρωτεΐνες μεγέθους 300kDa, με ποικίλο αριθμό αλληλουχιών επιδερμικού αυξητικού παράγοντα πλούσιων σε κυστεΐνη στην εξωτερική του επιφάνεια. Μολονότι μόνο μια μοναδική Notch πρωτεΐνη και δυο συνδέτες (Delta και Serrate) είναι παρόντα στην Drosophila στα θηλαστικά

όπως στα ποντίκια και στον άνθρωπο υπάρχουν 4 Notch πρωτεΐνες (NOTCH 1-4) και 5 συνδέτες οι Delta-like-1,-3,-4 (DLL1, DLL3, DLL4) και οι Jagged 1 και 2 (JAG1 και JAG2) οι οποίοι είναι Ser-παρόμοιοι συνδέτες (28). Το γονίδιο του υποδοχέα Notch εκφράζεται σε ένα πλήθος ιστών τόσο στους εμβρυϊκούς όσο και σε ενήλικους οργανισμούς δείχνοντας έτσι ότι το γονίδιο αυτό συμμετέχει σε ένα πολλαπλό σηματοδοτικό σύστημα. Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch μελετήθηκε κυρίως στη Drosophila επειδή στο έντομο αυτό ανιχνεύονται μόνο ένας υποδοχέας Notch και δυο σύνδεσμοι του, οι Delta και Serrate. Για το λόγο αυτό ήταν ευκολότερο να πραγματοποιηθούν ερευνητικά πειράματα και να μελετηθεί η συμμετοχή του υποδοχέα Notch στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση (24).

1.4. Δομή των γονιδίων Notch και των συνδετών τους

Τα γονίδια των πρωτεϊνών Notch εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα. Το Notch-1 εντοπίζεται στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 9, στη θέση 9q34.3 και έχει μήκος 52kb. Περιέχει 45 εξώνια και 34 ιντρόνια. Υπάρχουν 4 πιθανοί εναλλακτικοί υποκινητές, 4 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια (non overlapping alternative last exons) και 4 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Από τη μεταγραφή προκύπτουν 7 διαφορετικά μετάγραφα (mRNAs), τα 6 λόγο εναλλακτικής συρραφής των εξωνίων τα οποία είναι δυνατόν να κωδικοποιούν 6 ισομορφές Notch-1. Η μια από αυτές έχει πλήρη δομή (αμινοτελική και καρβοξυτελική περιοχή), τέσσερις έχουν πλήρες μόνο το καρβοξυτελικό άκρο και μια κανένα από τα δύο. Το μεγαλύτερο μετάγραφο μεγέθους 9309 bp που προκύπτει από μεταγραφή 34 εξωνίων κωδικοποιεί πρωτεΐνη 2555 αμινοξέων με πλήρη δομή και μοριακό βάρος 300kDa (29).

Το γονίδιο Notch-2 εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 1, στη θέση 1p13-p11 καλύπτοντας μήκος 158Kb. Περιέχει 57 εξώνια και 41 ιντρόνια. Υπάρχουν 2 πιθανοί

εναλλακτικοί υποκινητές, 6 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 9 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Δεκαπέντε είναι τα προϊόντα μεταγραφής, 9 εκ των οποίων είναι αποτέλεσμα εναλλακτικής συρραφής των εξωνίων. Από το σύνολο των 15 mRNAs, 11 (8 spliced variants and 3 unspliced) κωδικοποιούν αντίστοιχα και 11 ισομορφές Notch 2 (good proteins). Το μεγαλύτερο μετάγραφο μεγέθους 11465 bp που προκύπτει από μεταγραφή 34 εξωνίων κωδικοποιεί πρωτεΐνη 2565 αμινοξέων με πλήρη δομή και μοριακό βάρος 300 kDa (30).

Το Notch-3 εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 19, στη θέση 19p13.2-p13.1 καλύπτοντας μήκος 42 Kb. Περιλαμβάνει 42 εξώνια και 34 ιντρόνια ενώ έχουν ανευρεθεί 2 πιθανοί εναλλακτικοί υποκινητές, 3 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 3 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Από τα 6 διαφορετικά mRNAs με τα 5 να είναι λόγο εναλλακτικής συρραφής μόνο το ένα κωδικοποιεί πρωτεΐνη πλήρους δομής. Αυτό έχει μέγεθος 8668 bp προκύπτει από 33 εξώνια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 2347 αμινοξέων μοριακού βάρους 250 kDa (31).

Τέλος το Notch-4 γονίδιο που εντοπίζεται στο μικρό βραχίονα του χρωμοσώματος 6, στη θέση 6p21.3 έχει μήκος 33 Kb και περιέχει 68 εξώνια και 41 ιντρόνια. Έχουν ανευρεθεί 6 πιθανοί εναλλακτικοί υποκινητές 6 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 6 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενιλίωσης. Από τα 16 διαφορετικά μετάγραφα με τα 14 λόγο εναλλακτικής συρραφής τα 7 κωδικοποιούν πρωτεΐνες με πλήρη N-τελικά και C-τελικά τμήματα. Το μεγαλύτερο με 6744 bp προέρχεται από 30 εξώνια και κωδικοποιεί πρωτεΐνη 2003 αμινοξέων μοριακού βάρους 210 kDa (32).

Αναφορικά με τους συνδέτες το γονίδιο jag-1 βρίσκεται στο χρωμόσωμα 20p12.1-p11.23 καταλαμβάνοντας μήκος 36 kb. Περιέχει συνολικά 45 σταθερά και εναλλακτικά εξώνια και 28 ιντρόνια, 6 πιθανούς εναλλακτικούς υποκινητές, 5 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 7 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενιλίωσης. Από τα 11 πιθανά μετάγραφα 6 κωδικοποιούν πλήρεις πρωτεΐνες με το μεγαλύτερο από αυτά (6049 bp) προϊόν 26 εξωνίων να δίνει πρωτεΐνη αποτελούμενη από 1218 αμινοξέα μοριακού βάρους 39 kDa (33).

Το γονίδιο jag-2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 14, στη θέση 14q32.33 και καταλαμβάνει μήκος 40 kb. Περιλαμβάνει συνολικά 56 σταθερά και εναλλακτικά εξώνια, 38 ιντρόνια, 3 πιθανούς εναλλακτικούς υποκινητές , 4 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 8 εναλλακτικέςθέσεις πολυαδενιλίωσης. Προϊόνταμεταγραφής είναι 13 διαφορετικά mRNAs τα οποίακωδικοποιούν για 11 JAG2 ισομορφές, 7 από τις οποίες πλήρους δομής. Το μεγαλύτερο mRNA μεγέθους 5833 bp προκύπτει από μεταγραφή 26 εξωνίων και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί προβλέπεται να αποτελείται από 1372 αμινοξέα μοριακού βάρους 146 kDa (34).

Το γονίδιο του συνδέτη Delta like-1 (Dll-1) εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 6 στη θέση 6q27 και έχει μήκος 24 kb. Περιέχει συνολικά 25 σταθερά και εναλλακτικά εξώνια, 11 ιντρόνια, 5 πιθανούς εναλλακτικούς υποκινητές, 3 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξωνια και 4 εναλλακτικές θέσεις πολυαδενιλίωσης. Από το σύνολο των 7 μεταγράφων, όλα αποτέλεσμα εναλλακτικής συρραφής, προκύπτουν τελικά 6 ισομορφές, οι 5 πλήρους δομή και 1 με πλήρες μόνο το C-τελικό άκρο. Το μεγαλύτερο mRNA μεγέθους 3786 bp προκύπτει από μεταγραφή 11 εξωνίων και η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί αποτελείται από 723 αμινοξέα μοριακού βάρους 78 kDa (35).

Το γονίδιο Dll-3 βρίσκεται στο ίδιο χρωμόσωμα με το γονίδιο του Notch3 υποδοχέα, στη θέση 19q13 και είναι μήκους 10 kb. Περιλαμβάνει συνολικά 20 σταθερά και εναλλακτικά εξώνια, 10 ιντρόνια, 1 υποκινητή, 22 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια και 3 θέσεις πολυαδενυλίωσης. Από μεταγραφή προκύπτουν 6 mRNAs που κωδικοποιούν 5 ισομορφές από τις τις οποίες οι 2 είναι μόνο πλήρους δομής. Δυο είναι τα κυριότερα μετάγραφα. Το μεγαλύτερο μετάγραφο μεγέθους 2407 bp, προϊόν 8 εξωνίων κωδικοποιεί πρωτεΐνη 618 αμινοξέων μοριακού βάρους 64 kDa (36) και το μετάγραφο μεγέθους 2019 bp προϊόν 9 εξωνίων που κωδικοποιεί πρωτεΐνη 587 αμινοξέων μοριακού βάρους 61 kDa.

Τέλος στο χρωμόσωμα 15 βρίσκεται το γονίδιο του συνδέτη Dll-4 στη θέση 15q14 που έχει περίπου ίδιο μήκος με το Dll-3 (10kb). Περιέχει συνολικά 14 σταθερά και εναλλακτικά εξώνια, 10 ιντρόνια, 2 πιθανούς εναλλακτικούς υποκινητές και 2 μη επικαλυπτόμενα τελικά εξώνια. Τρία είναι τα μετάγραφα που μπορούν να προκύψουν, τα οποία κωδικοποιούν 2 ισομορφές πλήρους

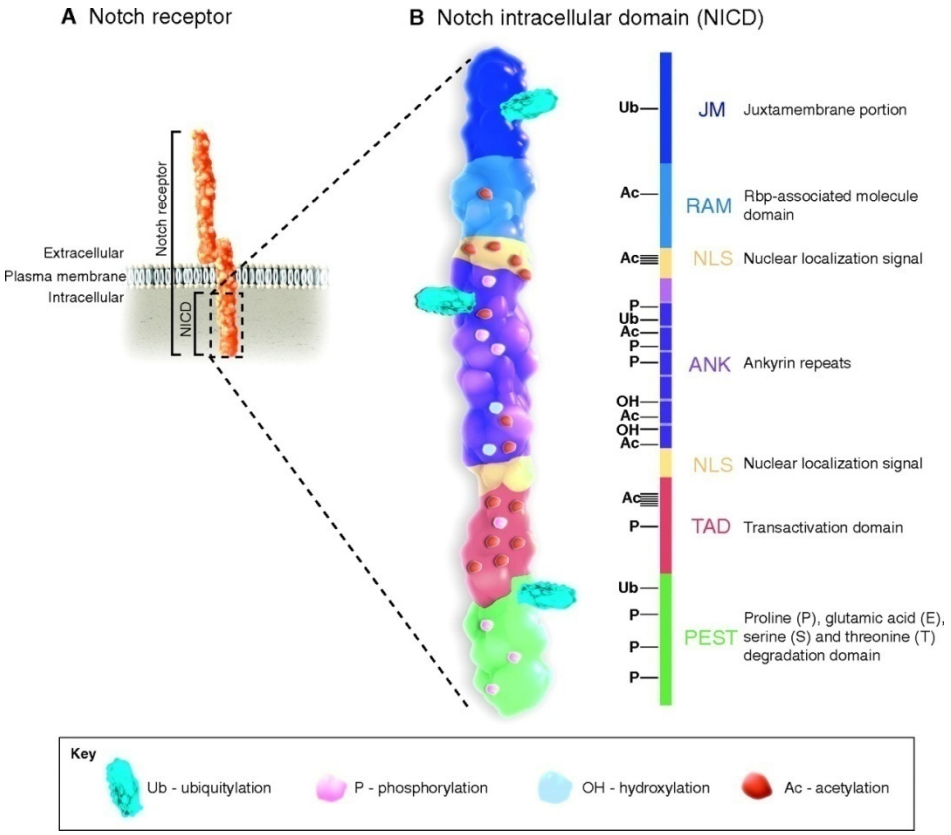
δομής. Το μεγαλύτερο από αυτά (3419 bp) που προκύπτει από 11 εξώνια κωδικοποιεί πρωτεΐνη 685 αμινοξέων με μοριακό βάρος 75 kDa (37).

1.5. Ενεργοποίηση του υποδοχέα Notch

Ένα κύτταρο στην εξωτερική του επιφάνεια μπορεί να έχει και το σύνδεσμο Delta/Serrate και τον υποδοχέα Notch. Το κύτταρο αντιδρώντας σε εξωτερικά και εσωτερικά ερεθίσματα, συμμετέχει κάθε φορά είτε με τον υποδοχέα είτε με τον σύνδεσμο του. Το κύτταρο-αποστολέας του σήματος έχει στην επιφάνεια του το σύνδεσμο, ενώ το κύτταρο δέκτης διαθέτει τον υποδοχέα. Η επικοινωνία αυτών των μορίων επιτελείται διάμεσο των αλληλουχιών EGF, που βρίσκονται στην εξωτερική επιφάνεια του υποδοχέα Notch και οι οποίες συνδέονται με τις αντίστοιχες αλληλουχίες EGF του συνδέσμου με τη συμμετοχή της γλυκοτρανσφεράσης Fringe. Από τις EGF αλληλουχίες φαίνεται ότι μόνο οι 11 και 12 συμμετέχουν στη σύνδεση υποδοχέα-συνδέσμου (38). Χωρίς τη γλυκοτρανσφεράση Fringe που γλυκοζυλιώνει τις αλληλουχίες EGF συνδέσμου και υποδοχέα δε μπορεί να συμβεί σύνδεση μεταξύ τους (39).

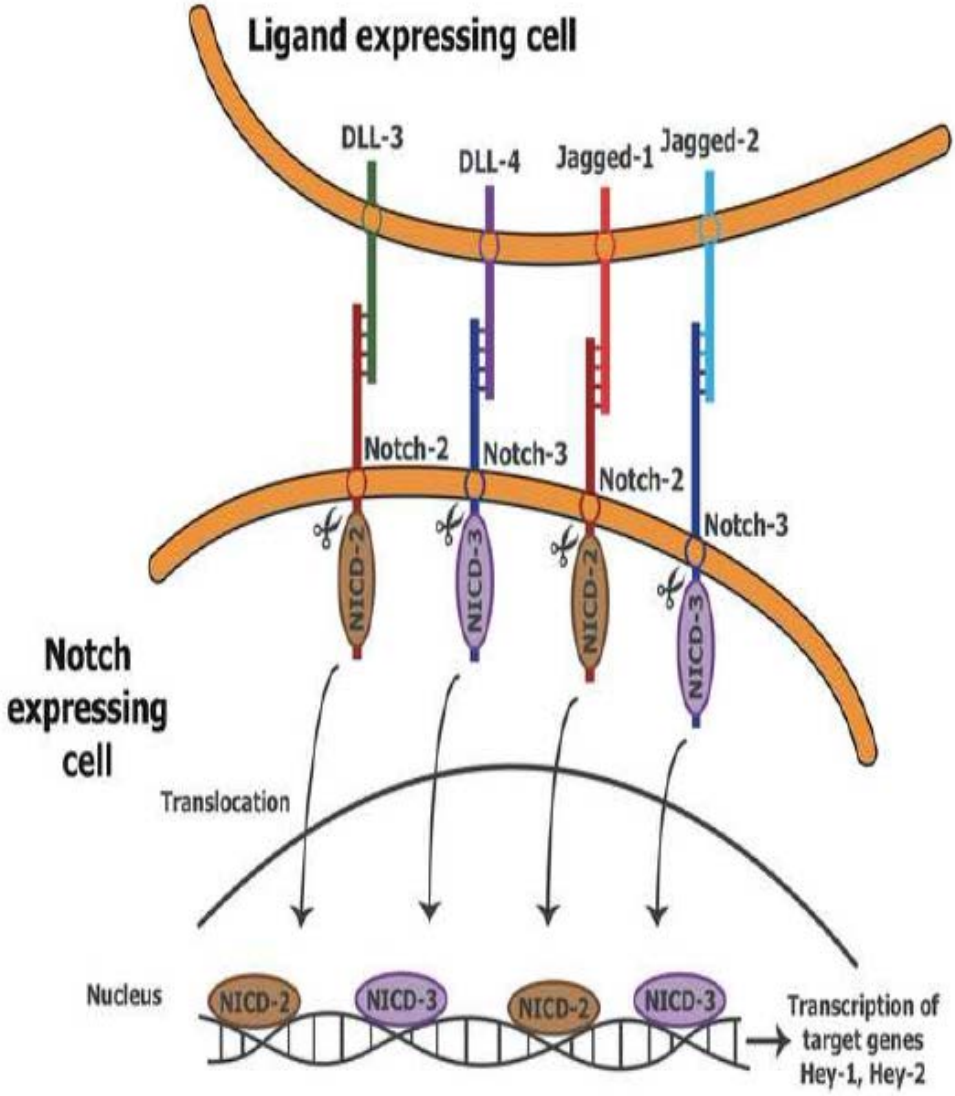
Ο υποδοχέας βρίσκεται σε ανενεργή μορφή στο κυτταρόπλασμα. Η ενεργοποίηση όμως του συνδέσμου εξωκυτταρικά έχει σαν αποτέλεσμα την ενδοκύττωση του υποδοχέα Notch (40) και το διαχωρισμό στο σύστημα Golgi από μια κονβερτάση τους φιουρίνης (Furine-like convertase) (24) και την απελευθέρωση του S1 τμήματος του υποδοχέα Notch. Προκύπτει έτσι ένας λειτουργικός ετεροδιμερής υποδοχέας με δυο μεμβρανικά τμήματα S2 και S3 ο οποίος μετακινείται στην επιφάνεια του κυττάρου. Το S2 τμήμα αποκόπτεται από τον υποδοχέα Notch μέσω της μεταλλοπρωτεΐνάσης TACE στα σπονδυλωτά (Kuzbanian πρωτεΐνη στα ασπόνδυλα) (24) με επακόλουθο την απελευθέρωση του εξωκυτταρικού τμήματος του υποδοχέα Notch (Εικόνα 1 Α). Το παραμένων τμήμα του υποδοχέα Notch διακρίνεται στο διαμεμβρανικό τμήμα

S3 και το ενδοκυτταρικό τμήμα του υποδοχέα Notch ($Notch^{intra}$) τα οποία διαχωρίζονται με την επίδραση της γ-σεκρετάσης (γ-secretase) (Εκόνα 1 B). Η λειτουργική γ-σεκρετάση αποτελείται από 4 κύρια διαμεμβρανικά συστατικά: πρεσινιλίνη, νικαστρίνη, Aph1 και Pen2. Η πρεσινιλίνη είναι μια ασπαρτυλοπρωτεάση που η δυσλειτουργία της σχετίζεται με την ανώμαλη διάσπαση του β-αμυλοειδούς στη νόσο Αλτσχάιμερ (27).



Εικόνα 1 A,B (41).

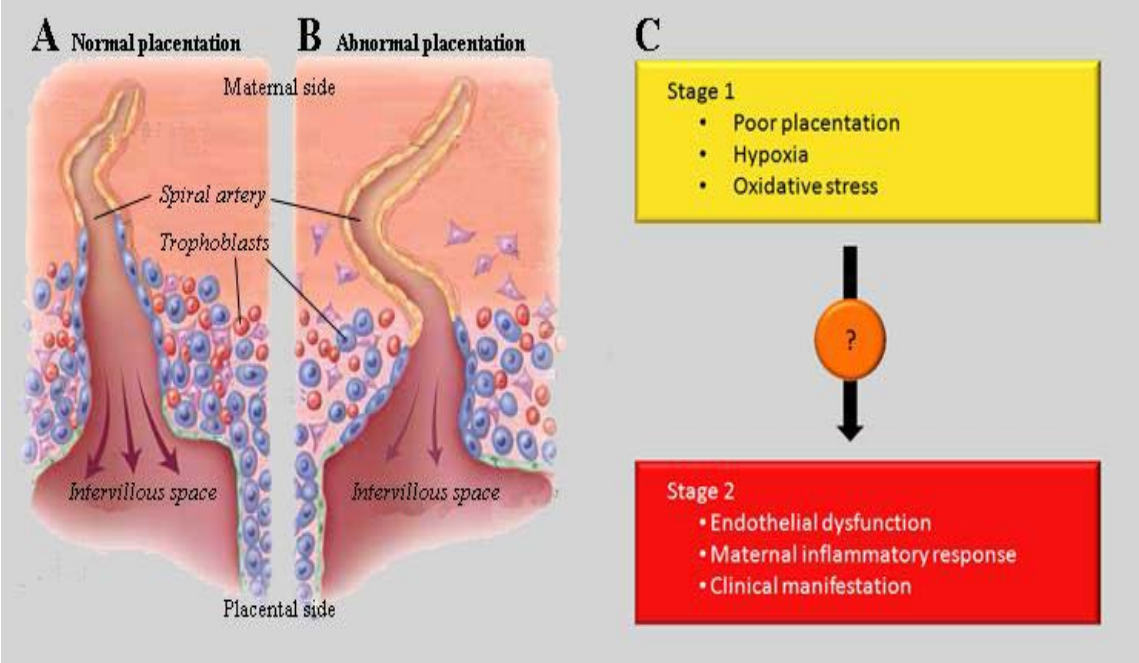
Στη συνέχεια το Notch^{intra} μετακινείται στον πυρήνα του κυττάρου και ενεργοποιεί το σύστημα CSL (CSL complex). Οι CSL είναι πρωτεΐνες που συνδέονται ειδικά με το DNA (42) δηλαδή είναι ουσιαστικά παράγοντες μεταγραφής (43). Συγκεκριμένα το Notch^{intra} (μέσω του RAM τμήματος κυρίως αν και οι αλληλουχίες ANK μπορούν επίσης να συνδεθούν με το CBF1) στον πυρήνα του κυττάρου δεσμεύεται από τον κατασταλτικό παράγοντα μεταγραφής CBF1/RBPJk και ενεργοποιεί τα γονίδια HES και HEY (Hairy and Enhancer of Split) τα ανθρώπινα ομόλογα γονίδια με το Enhancer of Split που ανευρίσκονται στη Drosophila (24). Πρέπει να σημειωθεί ότι σε κανονικές συνθήκες το CBF1 αλληλεπιδρά με το Co-R σύμπλεγμα και το προκύπτον μόριο δρα ως καταστολέας της μεταγραφής. Όταν όμως το Notch^{intra} μέσω των RAM και ANK τμημάτων του συνδεθεί με το CBF1 μετατρέπει το CBF1/CoR από καταστολέα σε ενεργοποιητή της μεταγραφής. Ο μηχανισμός διαμέσου του οποίου η καταστολή μεταγραφής μετατρέπεται σε ενεργοποίηση όταν εμφανίσει το Notch^{intra} δεν είναι καλά κατανοητός (25). Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι τα ενεργοποιημένα γονίδια HEY τα οποία είναι τα κατεξοχήν γονίδια-στόχος του υποδοχέα Notch μπορεί με τη σειρά τους να δράσουν σαν αυξητικοί παράγοντες μεταγραφής για άλλα γονίδια όπως είναι για παράδειγμα οι bHLH πρωτεΐνες (basic Helix-Loop-Helix) (24,25), Εικόνα 2.



Εικόνα 2. Η σύνδεση του υποδοχέα Notch-2 ή Notch-3 και του συνδέσμου DLL-3 ή DLL-4 ή Jagged-1 ή Jagged-2, έχει σαν αποτέλεσμα τη διάσπαση του υποδοχέα και την είσοδο του ενδοκυτταρικού του τμήματος (NICD-2 ή NICD-3, αντίστοιχα) στον πυρήνα του κυττάρου. Εκεί συνδέεται με το σύμπλεγμα Co-R/CLS που μέχρι τότε διατηρούσε σε καταστολή τη μεταγραφή. Τα συνδεδεμένα μόρια ενεργοποιούν μαζί την έναρξη τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων Hey-1 και Hey-2.

2. Οδηγές σκέψεις- υπόθεση- ερωτήματα

Είναι γνωστό ότι μία από τις σημαντικότερες διαδικασίες κατά την εξέλιξη μιας κύησης είναι η φυσιολογική δημιουργία της εμβρυοπλακουντιακής μονάδας, που ξεκινάει με τη διείσδυση της κυτταροτροφοβλάστης στο ενδομήτριο και ολοκληρώνεται με τη δημιουργία των χοριακών λαχνών (44,45). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, απαιτείται η δομική αλλαγή τόσο του ενδομητρίου που υποδέχεται την κυτταροτροφοβλάστη, όσο και αλλαγές του ενδοθηλίου των μητριαίων σπειροειδών αρτηριών, ώστε να δημιουργηθούν οι χοριακές λάχνες. Έτσι το τοίχωμα των αγγείων που βρίσκεται προς την πλευρά του εμβρύου αντικαθίσταται από τροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη σε αυτή τη διαδικασία μεταπίπτει από ένα εκφραστικό μοντέλο μορίων επιθηλιακής εξειδίκευσης σε ένα μοντέλο μορίων προσκόλλησης που είναι πιο κοντά σε αυτό των ενδοθηλιακών κυττάρων (46). Κατά την ανάπτυξη του ανθρώπινου πλακούντα τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται μέσω δυο μεγάλων μονοπατιών. Το villous pathway κατά το οποίο τα τροφοβλαστικά κύτταρα συγχωνεύονται για να σχηματιστούν τα συνκυτιοτροφοβλαστικά. Το extravillous pathway όπου τα τροφοβλαστικά κύτταρα διαφοροποιούνται α) σε interstitial extravillous trophoblasts τα οποία εισβάλλουν στο φθαρτό και σε ένα τμήμα του μυομητρίου ή β) σε edovascular extravillous trophobalsts (EVTs) τα οποία διαμορφώνουν την μητρική αγγειογένεση. Τα δυο αυτά στάδια διαφοροποίησης ελέγχονται σχεδόν εξολοκλήρου από την ένταση του οξυγόνου, μεταγραφικούς παράγοντες, ορμόνες, αυξητικούς παράγοντες και άλλα σηματοδοτικά μόρια. Ανώμαλη πλακουντοποίηση και συγκεκριμένα περιορισμένη εμφύτευση των τροφοβλατικών κυττάρων στη μήτρα και αποτυχία του σχηματισμού των μητρικών αγγείων, θεωρείται ότι προκαλούν προεκλαμψία.



Σχηματισμός των μητρικών αγγείων. Α) Κατά τη φυσιολογική πλακουντοποίηση τα τροφοβλαστικά κύτταρα εισχωρούν βαθιά μέσα στο ενδομήτριο. Β) Στην προεκλαμψία η πλακουντοποίηση είναι ανώμαλη και τα τροφοβλαστικά κύτταρα δεν εισχωρούν τόσο βαθιά όσο στη φυσιολογική πλακουντοποίηση προκαλώντας μειωμένη ροη αίματος. C) Τα δυο στάδια προεκλαμψίας προτείνουν ότι ξεκινά με ανώμαλη πλακουντοποίηση οδηγώντας σε υποξία και οξειδωτικό στρες τον πλακούντα. Το δεύτερο στάδιο αφορά την πρόκληση φλεγμονής και ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας (47).

Μέλη του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch έχουν εντοπιστεί στον αναπτυσσόμενο πλακούντα, όπου παίζουν σπουδαίο ρόλο στη πλακουντοποίηση (48). Το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch ελέγχει την εμβρυική αγγειογένεση και την ανάπτυξη του μητρικού κυκλοφορικού συστήματος. Στον τελειόμηνο ανθρώπινο πλακούντα, ο υποδοχέας Notch-2 και ο συνδέτης Jagged-2 συμμετέχουν στην αγγειογένεση (49). Εξάλειψη του Notch-2 σε ποντίκια είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση της αιμάτωσης του πλακούντα και της αρτηριακής διείσδυσης των τροφοβαστικών κυττάρων (50). Το ενδοκυττάριο μέρος του υποδοχέα Notch (NICD) ενεργοποιεί τη μεταγραφή

πολλών γονιδίων στόχων με σημαντικότερα μεταξύ αυτών τα Hey-1 και Hey-2, τα οποία είναι απαραίτητα για την αγγειακή ανάπτυξη. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται κατά τη δημιουργία του αγγειακού συστήματος, στην καρδιά, στα ενδοθηλιακά κύτταρα (24,51) αλλά και στον πλακούντα. Απενεργοποίηση των γονιδίων αυτών οδηγεί σε ανεπάρκεια των αγγείων του πλακούντα (52). Τα παραπάνω προτείνουν μια πιθανή σχέση ανάμεσα στο σηματοδοτικό μονοπάτι Notch και την προεκλαμψία.

Ο παθοφυσιολογικός μηχανισμός της προεκλαμψίας παραμένει λιγότερο ή περισσότερο άγνωστος και συνεπώς οι διαγνωστικές και θεραπευτικές δυνατότητες είναι περιορισμένες. Είναι γνωστό ότι η προεκλαμψία αποτελεί μια νοσολογική οντότητα πολυπαραγοντικής αιτιολογίας και συχνά δεν αναγνωρίζεται η υποκείμενη αιτιοπαθογένεια ή είναι δυσχερής η διαφοροδιαγνωστική προσπέλαση. Πέρα όμως από τη διαγνωστική και διαφοροδιαγνωστική αξία, τα ευρήματα της μελέτης αυτής θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν στην παροχή γενετικής συμβουλευτικής και στη σχεδιαζόμενη μαιευτική παρακολούθηση στις επόμενες κυήσεις των γυναικών εκείνων που εκδήλωσαν προεκλαμψία. Τέλος, ανάλογα και με τα ευρήματα των στατιστικών συσχετίσεων που θα γίνουν, τα συμπεράσματα της ερευνητικής αυτής προσπάθειας πιθανά να αποκτήσουν ένα προβλεπτικό ή προγνωστικό ρόλο για την εκτίμηση του κινδύνου επανεμφάνισης προεκλαμψίας ή για τη βαρύτητά τους αντίστοιχα σε επόμενη εγκυμοσύνη.

Με γνώμονα τις παραπάνω διαπιστώσεις προκύπτουν μία σειρά ερωτημάτων που οδήγησαν στην εκπόνηση όλης αυτής της προσπάθειας και που κάποια απαντήθηκαν και για άλλα τέθηκαν οι βάσεις για να απαντηθούν. Κάποια από αυτά τα ερωτήματα στην αρχική σχεδίαση του ερευνητικού πρωτοκόλλου διατυπώνονταν επιγραμματικά ως εξής:

1. Ποιες είναι οι βασικές διαφορές στην πλακουντιακή έκφραση και λειτουργία των μελών του μονοπατιού Notch (Notch-1,-2,-3,-4, DLL-1,-3,-4, Jagged-1,-2 και NICD) στις φυσιολογικές και παθολογικές κυήσεις?

2. Γίνεται η επαγωγή των γονιδίων Hey-1,-2 από το Notch με τον ίδιο τρόπο σε φυσιολογικές και σε παθολογικές κυήσεις?
3. Υπάρχει συσχέτιση της πλακουντιακής έκφρασης των υπό μελέτη μορίων με τα κλινικά, επιδημιολογικά χαρακτηριστικά της προεκλαμψίας ?
4. Μπορεί το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης έγκαιρης διάγνωσης/πρόβλεψης ενδεχόμενης προεκλαμψίας και πιθανό στόχο φαρμακευτικής της αντιμετώπισης?

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

3.1. Συλλογή Δειγμάτων

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από την Μαιευτική – Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου του Ηρακλείου. Πλακούντες συλλέχθηκαν από 20 κυήσεις που εμφάνισαν προεκλαμψία και από 20 κυήσεις με ομαλή πορεία (απουσία στοιχείων προεκλαμψίας & γέννηση υγιών ικανοποιητικού βάρους για την ηλικία κύησης νεογνών). Τα δείγματα που συλλέγονταν ήταν 6 βιοψίες του βασικού πετάλου του πλακούντα, έτσι ώστε να περιέχεται βασικός φθαρτός και λαχνωτό χόριο, χωρίς όμως το χοριονικό ή αμνιακό πέταλο. Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους φυλάσσονται σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την επεξεργασία τους. Έγινε καταγραφή όλων των επιμέρους δημογραφικών και κλινικών στοιχείων, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα, όπου αποτυπώνεται ο μέσος όρος ή ο αριθμός κάθε παραμέτρου για κάθε ομάδα δειγμάτων.

	Φυσιολογικές	Προεκλαμψία
Αριθμός εγκύων	20	**20**
Ηλικία μητέρας (έτη)	29,9	**29**
ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος)	22,3	**26,1**
Πρόσληψη βάρους μητέρας (kg)	14,8	**9**
Διάρκεια κύησης (εβδομάδες)	38,8	**36,5**
Αριθμός τόκων (1^{ος}/ >1)	11/9	**13/7**
Βάρος γέννησης νεογνού (gr)	3150	**2315**
Φύλλο νεογνού (Α / Θ)	7/13	**4/16**
Κάπνισμα (Ναι/Οχι)	3/17	**13/7**
Κολπικός τοκετός/Καισαρική τομή	3/1	**13/4**
Κάπνισμα κατά την κύηση (Ναι/Οχι)	**1/19**	**4/16**

3.2. Διάγνωση προεκλαμψίας – κριτήρια επιλογής δειγμάτων

Ως προεκλαμψία θεωρήσαμε όλες τις περιπτώσεις που η έγκυος εμφάνισε υπέρταση, οίδημα των άκρων και λευκωματουρία, σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες.

Εγκυμοσύνες με προϋπάρχουσες παθολογίες, λοιμώξεις προγεννητικής σημαντικότητας όπως TORCH (τοξόπλασμα, συγγενή σύφιλη, ερυθρά, κυτταρομεγαλοϊό και ερπητοϊό) και με διαπιστωμένη χρήση ουσιών αποκλείσθηκαν από τη μελέτη. Επιπρόσθετα, όλες οι περιπτώσεις όπου στα νεογνά ανιχνεύτηκε χρωμοσωμική ή συγγενής βλάβη αποκλείσθηκαν από τη μελέτη. Τέλος, ως φυσιολογικοί πλακούντες για μάρτυρες στις μετρήσεις μας, θεωρήθηκαν οι προερχόμενοι από εγκυμοσύνες με βάρος νεογνού πάνω από την 10η εκατοστιαία θέση, κανένα σημείο ή σημάδι παθολογίας στη διάρκεια της κύησης και διάρκεια εγκυμοσύνης πάνω από 37 εβδομάδες. Καισαρική τομή ή φυσιολογικός τοκετός δεν αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού κανενός δείγματος.

3.3. Εκχύλιση RNA από ιστούς

Σε όλους τους ιστούς έγινε εκχύλιση ολικού RNA με τη χρήση του πρωτοκόλλου του TRIzol (Invitrogen). 100mg από τα δείγματα των ιστών ομογενοποιούνται σε διάλυμα 1ml του TRIzol και το RNA εκχυλίζεται με την προσθήκη χλωροφορμίου και φυγοκέντρηση, κατακρημνίζεται με τη χρήση ισοπροπανόλης, ξεπλένεται με απόλυτη αιθανόλη και επαναδιαλύεται σε 30- 50 μl DEPC (diethylpyrocarbonate) treated H2O. Ακολούθησε έλεγχος της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του RNA με φωτομέτρηση. Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του, ενώ ο λόγος 260nm/280nm δίνει την καθαρότητά του (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών ή DNA). Λόγοι από 1.8 έως 2.0 θεωρούνται ιδανικοί για το RNA.

3.4. Αντίστροφη Μεταγραφή – Παρασκευή cDNA

2,5 μg RNA από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA, με τη χρήση 50 ng τυχαίων εκκινητών (random hexamers) και του kit της αντίστροφης Primer Script RT reagent kit (Takara, Japan). Αρχικά το RNA μαζί με τους τυχαίους εκκινητές θερμαίνονται στους 65°C για 5 λεπτά ώστε να αποδιαταχθούν οι δευτεροταγείς δομές. Στη συνέχεια προστίθενται τα διαλύματα του kit (5x Primer Script Buffer, 20 units RNase Inhibitor and 200 units Primer Script RTase), ώστε να προκύψει συνολικός όγκος 10μl, ξαναεπωάζονται τα δείγματα για 10 λεπτά στους 30°C και η αντίστροφη μεταγραφή τελείται στους 50°C για 50 λεπτά. Η αντίδραση τερματίζεται με την απενεργοποίηση του ενζύμου θερμαίνοντας τα δείγματα στους 95°C για 5 λεπτά. Το cDNA αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι τη χρήση του.

3.5. Εκχύλιση πρωτεϊνών

Σε όλους τους ιστούς πραγματοποιήθηκε εκχύλιση πρωτεϊνών με τη χρήση του T-PER (tissue protein extraction reagent - Pierce) και χρήση Halt Protease Inhibitor (Thermo Scientific). Εναλλακτικά σε κάποια δείγματα, πραγματοποιήθηκε συνέχεια του πρωτοκόλλου εκχύλισης του RNA από το TRIzol ώστε να υπάρχει εξοικονόμηση ιστών. Για τη διαδικασία αυτή, προσθέτουμε απόλυτη αιθανόλη στο υπόλοιπο του δείγματος, φυγοκεντρούμε, συλλέγουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε ισοπροπανόλη. Φυγοκεντρούμε ξανά και ξεπλένουμε τρεις φορές την πρωτεϊνική πελέτα με διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης σε 95% αιθανόλη και μία φορά με απόλυτη αιθανόλη. Η επαναδιάλυση της πελέτας γίνεται σε διάλυμα 1% SDS.

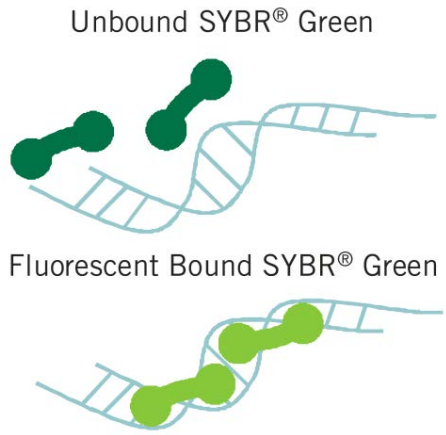
3.6. Προσδιορισμός της ποσότητας πρωτεΐνης

Η μέθοδος προσδιορισμού της ποσότητας των πρωτεϊνών κατά Bradford στηρίζεται στη μέτρηση της απορρόφησης της πρωτεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα 1x PBS στα 595nm με τη χρήση κατάλληλης χρωστικής, 74 γνωστής ως διάλυμα Bradford. Αρχικά πραγματοποιείται μέτρηση της απορρόφησης στα 595nm πρότυπων διαλυμάτων βόειου αλβουμίνης (BSA) γνωστής συγκέντρωσης: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20 μg/μl, και από τα αποτελέσματα κατασκευάζεται πρότυπη καμπύλη της απορρόφησης ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της αλβουμίνης (μg/μl). Υπολογίζεται η εξίσωση που διέπει την πρότυπη καμπύλη που είναι της μορφής: y=ax+b. Ακολουθεί φωτομέτρηση στο ίδιο μήκος κύματος των δειγμάτων πρωτεΐνης εις διπλούν και υπολογισμός της μέσης τιμής απορρόφησης κάθε δείγματος. Με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς υπολογίζεται η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε κάθε δείγμα.

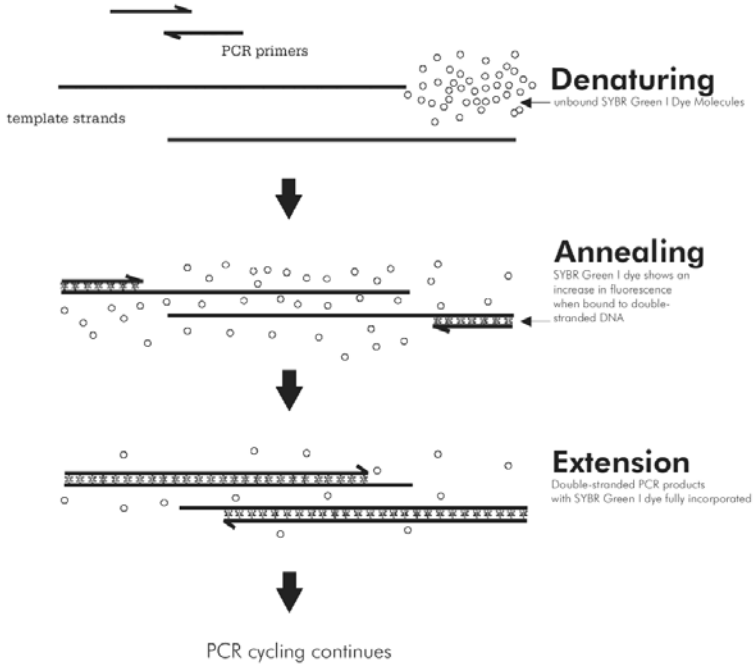
3.7. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time PCR)

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της έκφρασης του mRNA των γονιδίων, αντικαθιστώντας τη λιγότερο αξιόπιστη και χαμηλότερης ευαισθησίας και ακρίβειας μέθοδο της RT-PCR. Χρησιμοποιούνται κυρίως δύο χημείες, αυτή της SYBR Green I και των ιχνηθετών Taqman (Taqman probes), που απεικονίζονται και στο τέλος της παραγράφου, κάθε μία με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματά της. Η χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative Real-Time PCR) έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της παλαιότερης ημι-ποσοτικής RT-PCR μεθόδου. Κατά πρώτο και κύριο λόγο τα αποτελέσματά της είναι πιο αξιόπιστα, καθώς η ποσοτικοποίηση δεν πραγματοποιείται κατά τους τελευταίους κύκλους της αντίδρασης της PCR, όπου διάφοροι ανασταλτικοί παράγοντες (διμερή εκκινητών, εξάντληση του Mg2+ και των dNTPs, απώλεια ενζυμικής ενεργότητας της πολυμεράσης) μπορούν να τροποποιήσουν τη δημιουργία του PCR προϊόντος,

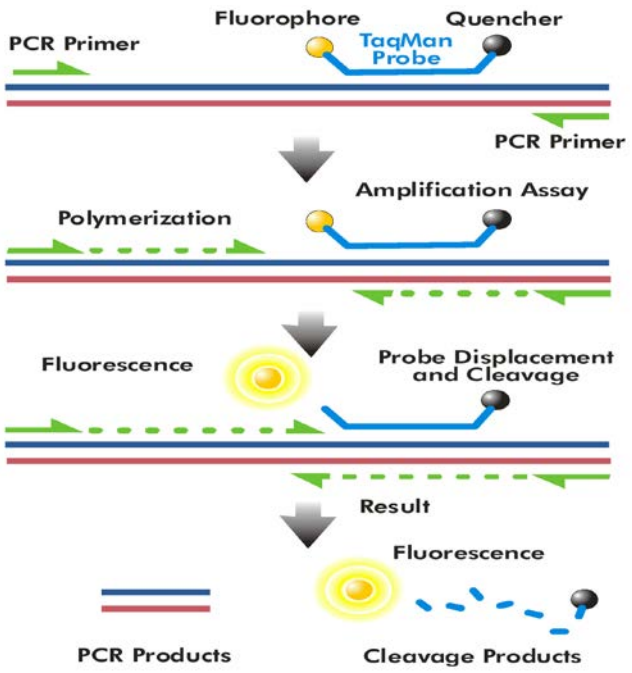
αλλά κατά τους αρχικούς κύκλους της ποσοτικοποίησης, όπου τέτοιοι περιορισμοί δεν ισχύουν. Επιπλέον, στην RT-QPCR η συλλογή των δεδομένων γίνεται με λέιζερ, το οποίο είναι σαφώς πιο ευαίσθητο από το βρωμιούχο αιθίδιο ή τον Ag+, απεικονιστικά υλικά που χρησιμοποιούνται για την εμφάνιση των προϊόντων στις κλασσικές PCR. Εξοικονομεί επίσης χρόνο, καθώς η όλη διαδικασία κρατάει λίγο περισσότερο από μια απλή PCR, ενώ η ημι-ποσοτική PCR απαιτεί την ανάλυση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου, διαδικασίες χρονοβόρες. Η ποσοτικοποίηση των δεδομένων γίνεται συνήθως αυτόματα στην Real-Time PCR από το λογισμικό του μηχανήματος, και δεν απαιτεί τη χρήση λογισμικού επεξεργασίας εικόνων, που και είναι ακριβά, αλλά και το μεγαλύτερο μέρος της δουλειάς γίνεται χειροκίνητα, κάτι που χρειάζονται οι παλαιές τεχνικές ποσοτικοποίησης. Υπάρχουν και μερικά μειονεκτήματα. Είναι πιο δαπανηρή τεχνική (μία παρενέργεια της αυξημένης ευαισθησίας του συστήματος), καθώς απαιτεί βελτιστοποιημένα υλικά. Οι αναλύσεις γίνονται σε τριπλέτες, κάτι που αυξάνει το κόστος δραματικά (περισσότερα PCR master mixes και επιπλέον kit αντίστροφης μεταγραφής, το οποίο σημαίνει ότι τα δείγματα ιστών, τα οποία συνήθως είναι η περιουσία ενός εργαστηρίου, εξαντλούνται πιο γρήγορα). Άλλα μειονεκτήματα είναι το υψηλό κόστος συντήρησης, εξαιτίας εξαρτημάτων υψηλής τεχνολογίας που διαθέτει, όπως το λέιζερ, και το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της ποσοτικοποίησης δε βλέπει κανείς τα προϊόντα της PCR, ώστε να ξέρει κατά πόσο οι καμπύλες ποσοτικοποίησης είναι οι σωστές και δεν έχουν προέλθει από διμερή εκκινητών ή πάρα- προϊόντων. Αυτό απαιτεί, τουλάχιστον στα αρχικά πειράματα, την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της Real-Time PCR με την ανάλυσή τους σε πήκτωμα αγαρόζης ή ακρυλαμιδίου.



Η δεσμευμένη στο δίκλωνο μόριο DNA χρωστική SYBR Green I φθορίζει 1000 φορές περισσότερο από την κυκλοφορούσα ελεύθερη στο διάλυμα.



Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I.



Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου με τη χρήση ιχνηθετών της χημείας Taqman. Οι ιχνηθέτες αυτοί βασίζονται στην ιδιότητα της Taq DNA πολυμεράσης να δρα και ως 5'-3' εξωνουκλεάση, αποκόπτοντας τους κατά τη διάρκεια της υβριδοποίησης με τη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο, ελευθερώνοντας τη φθορίζουσα ουσία.

Ο προσδιορισμός της έκφρασης του mRNA των γονιδίων που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή έγινε με ποσοτικό τρόπο με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-Time QuantitativePolymeraseChainReaction ή RT-QPCR). Ως γονίδιο ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της ακτίνης. Η ανίχνευση των σχηματιζόμενων προϊόντων έγινε με τη χρήση του kit Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix. Αρχικά έγινε προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών της PCR (συγκέντρωση εκκινητών και θερμοκρασία πρόσδεσής τους στο cDNA). Το τελικό PCR για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ήταν: 10μl Briliant SYBR Green QPCR Master Mix, 0,6μl primers γονιδίου στόχου, 0,6μl primers γονιδίου αναφοράς

(ακτίνη) και 100ng (1μl) cDNA του κάθε δείγματος σε τελικό όγκο 20μl. Οι αντιδράσεις για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου στόχου και της ακτίνης έγιναν σε διαφορετικά 96-well plates. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στο Mx3000 Real-Time Thermal Cycler (Stratagene) με το κατάλληλο πρόγραμμα: αρχική θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C για 10 λεπτά για την αποδιάταξη τους και την ενεργοποίηση της hot-start πολυμεράσης, 40 κύκλοι με θέρμανση στους 95°C για 30sec, αναδιάταξη των εκκινητών (annealing) στους 60°C για 30sec και πολυμερισμός (extension) στους 72°C για 30sec. Μετά το πέρας των κύκλων του πολυμερισμού, τα δείγματα υποβλήθηκαν σε σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας τους (0.2°C/sec) από τους 55°C στους 95°C ώστε να προσδιοριστεί η καμπύλη αποδιάταξης τους (Melting curve). Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων, έγινε ανάλυση ενδεικτικά κάποιων δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%, χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο και φωτογράφηση των PCR προϊόντων κάτω από υπεριώδες φως (UV).

Για κάθε δείγμα έγινε ο προσδιορισμός της σχετικής ποσότητας τόσο του γονιδίου στόχου όσο και της ακτίνης και υπολογίστηκε ο λόγος τους. Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέσος όρος των λόγων για τα φυσιολογικά δείγματα και με βάση αυτή την τιμή πραγματοποιήθηκε η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων προεκλαμψίας. Αναλογίες δειγμάτων παθολογικών προς τα φυσιολογικά δείγματα μεγαλύτερες από 2 θεωρήθηκαν ως υπερέκφραση του γονιδίου στόχου, ενώ μικρότερες του 0.5 θεωρήθηκαν ως υποέκφραση.

3.8. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών (SDS-PAGE)

Τα δείγματα πρωτεϊνών ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 10% SDS-PAGE (29:1 ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο). Χρησιμοποιήθηκαν 25 μg πρωτεΐνης κάθε δείγματος τα οποία αναμίχθηκαν με το διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης και αποδιατάχθηκαν με βρασμό στους 95°C για 5-10 λεπτά και ταχεία ψύξη σε πάγο. Το διάλυμα φόρτωσης- αποδιάταξης

περιλαμβάνει μερκαπτοαιθανόλη και SDS ως αποδιατακτικούς παράγοντες των πρωτεϊνών, και κυανό της βρωμοφαινόλης ως χρωστική που κάνει ορατές τις πρωτεΐνες κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφήρησης στο πήκτωμα. Το πήκτωμα αποτελείται από δύο διακριτά τμήματα: α) το πήκτωμα διαχωρισμού των πρωτεϊνών (separating ή resolving gel) και β) το πήκτωμα επιστοίβαξης των πρωτεϊνών (stacking gel) που εξασφαλίζει την ομοιόμορφη εισαγωγή όλης της ποσότητας των δειγμάτων στο πήκτωμα διαχωρισμού.

3.9. Ανοσοαποτύπωσηκατά Western (Western Blot)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τη μεταφορά των πρωτεϊνών από το πήκτωμα σε μεμβράνη τύπου PVDF με τη βοήθεια ειδικής συσκευής, σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών. Η αρχή λειτουργίας της συσκευής είναι πολύ απλή: διοχετεύεται ηλεκτρικό ρεύμα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μεταφέρονται οι πρωτεΐνες (αρνητικά φορτισμένες) από το πήκτωμα στη μεμβράνη. Ακολουθεί δέσμευση των ελεύθερων πρωτεΐνης περιοχών της μεμβράνης (blocking), μέσω επώασης της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, με διάλυμα 5% (w/v) αποβουτυρωμένου γάλατος (σε σκόνη) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS 1×. Κατόπιν η μεμβράνη εκπλένεται από την περίσσεια του διαλύματος blocking με διάλυμα TBS-T (Tris buffer saline, 1% Tween 20) 3 φορές, για διάστημα 10 λεπτών κάθε φορά. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα του πρώτου αντισώματος κατάλληλης αραίωσης σε διάλυμα TBS που περιέχει 5% (w/v) BSA (AlbumineBovine, Sigma) και επώαση της μεμβράνης στους 4°C κατά τη διάρκεια της νύχτας. Ακολουθούν εκπλύσεις του αντισώματος όπως και προηγουμένως, και προσθήκη του δεύτερου αντισώματος σε κατάλληλη αραίωση, που είναι συζευγμένο με το ένζυμο HRP (υπεροξειδάση του ραπανιού) και επώαση της μεμβράνης για μια ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η μεμβράνη στη συνέχεια εκπλένεται όπως και προηγουμένως, και

αφού έρθει σε επαφή για 1-3 λεπτά με το διάλυμα εμφάνισης ECL, εκτίθεται σε φωτογραφικό φιλμ όπου αποτυπώνεται η εκπομπή χημειοφωταύγειας από τις πρωτεΐνες.

Μετά την εμφάνιση των φιλμ στο μηχάνημα της Kodak τα φιλμ σαρώνονται σε έναν ψηφιακό σαρωτή εικόνας (Agfa Snap-Scan 1212u). Η ενοποιημένη πυκνότητα των ζωνών (πυκνότητα ζώνης προϊόντος-πυκνότητα ζώνης υποβάθρου) χρησιμοποιήθηκε ως ποσοτική παράμετρος και υπολογίστηκε με ανάλυση ψηφιακής εικόνας (AlphaImager, AlphaInnotech). Ο λόγος της ενοποιημένης πυκνότητας της κάθε πρωτεΐνης διαιρεμένος με αυτόν της β-ακτίνης, χρησιμοποιήθηκε για τον ημι-ποσοτικό καθορισμό των αποτελεσμάτων.

3.10. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.5 . Τα στατιστικά τεστ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Chi-square, Fisher’s exact, Student’s T, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H, Spearman’s rho και Kaplan Meier. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε όταν $P<0.05$.

3.11. Υλικά

Διαλύματα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών: TRIzol
- (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- dH2O κατεργασμένο με DEPC (Invitrogen)
- 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS
- Reagent A: Tris-base (10mM), Sucrose (320mM), MgCl2•6H2O (5mM),
- Triton-X-100 (1% v/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%
- Reagent B: Tris-base (400mM), NaCl (150mM), EDTA (60mM), SDS
- (1% w/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%. Το SDS
- προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος.
- T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce)
- Halt Protease Inhibitor Single-Use Coctail (ThermoScientific)

Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα φόρτωσης-αποδιάταξης πρωτεϊνών 3×: 0.2 M Tris.HCl, 6%
- SDS, 6% μερκαπτοαιθανόλη, 15% γλυκερόλη και 0.03 % κυανούν της
- Βρωμοφαινόλης
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος διαχωρισμού πρωτεϊνών (separating or
- resolving gel buffer): 1.5 M Tris.HCl, 4% SDS (w/v), pH 8.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα πηκτώματος επιστοίβαξης πρωτεϊνών (stacking gel
- buffer): 1M Tris.HCl, 1.6% SDS (w/v), pH 6.8
- Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών 10×: 0.25mM Tris base,
- 1.92mM γλυκίνη, 1% SDS (w/v), pH 8.3
- Ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς πρωτεϊνών στη μεμβράνη (transfer
- buffer) 1×: 0.025mM Tris base, 0.192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη, pH
- 8.3
- Διάλυμα έκπλυσης μεμβρανών ανοσοαποτύπωσης: TBS, 0.1% Tween (v/v)
- Διάλυμα χημειοφωταυγούς ανίχνευσης πρωτεϊνών (ELC): ChemiLucent
- Western blot detection system (Chemicon)

Αντιδραστήρια για cDNA και rt-PCR

- AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis kit
- (Takara, Japan)
- Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene)

Εκκινητές για τη RT-PCR

Γονίδιο	Ζεύγος εκκινητών
NOTCH-1	CAG CCT CAA CAT CCC CTA CAA G GCA GCC CAC GAA GAA CAG AA
NOTCH-2	GTG GAT GGG GTC AAC ACT TAC A CAC TCC AGC CGT TGA CAC ATA C
NOTCH-3	TGG CGC CTC TTC AAC AAC A ATC CCA GCC GCA CTC CTC
NOTCH-4	TGC CTC TGC CCC TCT GGT TGG CCT TGT CTT TCT GGT CCT
DLL-1	GGG AGC GTG GGG AGA AAG T CAG CCT GGA TAG CGG ATA CAC T
DLL-3	GCC CGT CCT CTG CTA CCA C GTC ACC CCG CTC ACC TCA C
DLL-4	TGC GAG AAG AAA GTG GAC AGG CGT GGG CG CAA GGG TTA
JAGGED-1	TGC CGTTGC AGA AGT AAG AGT T TCC GCA GGC ACC AGT AGA A
JAGGED-2	TCG TCG TCA TCC CCT TCC A CTC GAT CAG CAG CTC CTC ATT C
HEY-1	GCA TAC GGC AGG AGG GAA A CTG GGA AGC GTA GTT GTT GAG AT
HEY-2	GCG TCG GGA TCG GAT AAA TAA CAA GAG CGT GTG CGT CAA AGT A
β-Actin	CGG CAT CGT CAC CAA CTG GGC ACA CGC AGC TCA TTG

Αντισώματα

Αντίσωμα	Εταιρεία
Rabbit monoclonal Notch-2	Cell Signaling (mAb 5732)
Rabbit monoclonal Notch-3	Cell Signaling (mAb 5276)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	Cell Signaling (mAb 7074)
Mouse anti-actin antibody	Chemicon (mab 1501)

Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Υλικό	Εταιρεία	Υλικό	Εταιρεία
Αγαρόζη	Invitrogen	Tween 20	Sigma
Αιθανόλη	Merck	Χλωροφθόρμιο	Fluka
Ακρυλαμίδιο	BDH	Υδροχλωρικό οξύ	BDH
SDS	BDH	Φαινόλη	BDH
TEMED	Sigma	EDTA	BDH
Tris base	BDH	Ισοποροπανόλη	BDH
Βρωμιουχο αιθίδιο	BDH	Κιτρικό νάτριο	BDH
CAPS	Sigma	Υδροχλωρική γουανιδίνη	BDH
Μεθανόλη	Fluka		

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ομάδων μελέτης

Στον πίνακα φαίνονται τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δυο ομάδων της μελέτης. Όπως ήταν αναμενόμενο οι γυναίκες με προεκλαμψία πήραν λιγότερο βάρος κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης τους σε σχέση με αυτές που είχαν φυσιολογική κύηση ($p=0.015$). Η ηλικία κύησης ήταν επίσης μικρότερη κατά δυο εβδομάδες ($p=0.012$) και τα μωρά που γεννηθήκαν από τις γυναίκες με προεκλαμψία ζύγιζαν 800g λιγότερο από αυτά που γεννήθηκαν από τις γυναίκες που είχαν φυσιολογική κύηση ($p<0.001$). Επιπρόσθετα, εξαιτίας του υψηλού κινδύνου κατά την εγκυμοσύνη των γυναικών με προεκλαμψία υποβλήθηκαν σε καισαρική σε σχέση με τις γυναίκες που είχαν φυσιολογική κύηση ($p=0.025$). επιπλέον οι γυναίκες που εμφάνισαν προεκλαμψία κατά την κύηση ήταν καπνίστριες περισσότερο πριν την εγκυμοσύνη τους σε σχέση με αυτές που είχαν φυσιολογική κύηση ($p=0.001$).

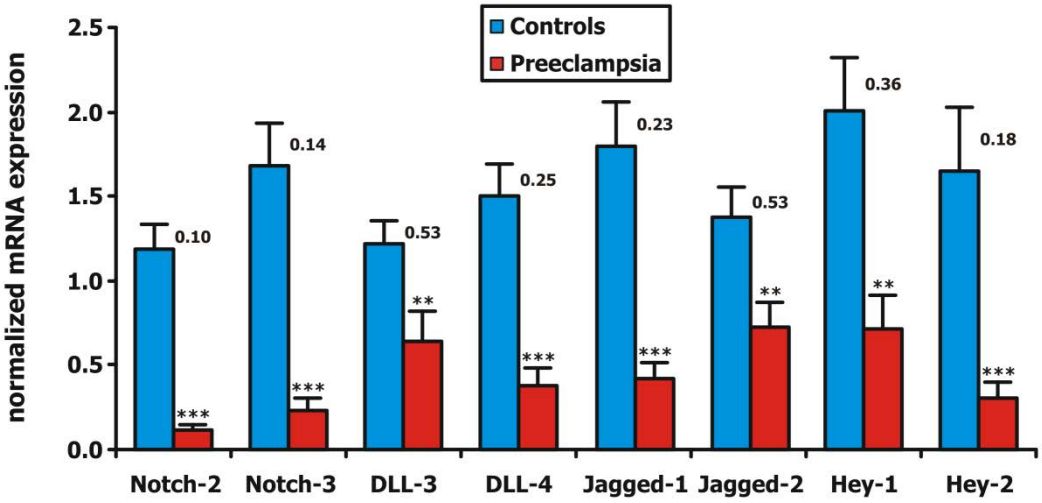
	Preeclampsia pregnancies (%)	Normal pregnancies (%)	*P*-value
Cases, n	20	20	
Maternal age (mean±SD, years)	29.0±4.7	29.9±4.6	0.52[a]
BMI (mean±SD)	26.1±8.1	22.3±2.5	0.12[b]
Maternal weight gain (mean±SD, Kg)	9.0±6.4	14.8±7.9	**0.015[a]**
Gestational age at delivery (mean±SD, wks)	36.5±3.2	38.8±2.0	**0.012[b]**
Birth weight (mean±SD, gr)	2315±674	3150±498	**<0.001[a]**
Mode of delivery			**0.025[c]**
Vaginal (%)	8 (40.0)	15 (75.0)	
Caesarean section (%)	12 (60.0)	5 (25.0)	
Parity			0.52[c]
Nulliparous (%)	13 (65.0)	11 (55.0)	
Multiparous (%)	7 (35.0)	9 (45.0)	
Child gender			0.29[c]
Male (%)	4 (20.0)	7 (35.0)	
Female (%)	16 (80.0)	13 (65.0)	
Smoking			**0.001[c]**
Yes (%)	13 (65.0)	3 (15.0)	
No (%)	7 (35.0)	17 (85.0)	
Smoking during pregnancy			0.34[d]
Yes (%)	4 (20.0)	1 (5.0)	
No (%)	16 (80.0)	19 (95.0)	

Στην πρώτη φάση των πειραμάτων είχε ολοκληρωθεί η συλλογή 20 παθολογικών (πλακούντες από εγκυμοσύνες με προεκλαμψία) και 20 φυσιολογικών δειγμάτων, ενώ είχαν στανταριστεί οι συνθήκες και οι αλληλουχίες των εκκινητών για 11 γονίδια (NOTCH-1, NOTCH-2, NOTCH-3, NOTCH-4, DLL-1, DLL-3, DLL-4, JAGGED-1, JAGGED-2, HEY-1 και HEY-2).

4.2. Επίπεδα mRNA των μελετώμενων γονιδίων

Τα αποτελέσματα από τις αναλύσεις με qRT-PCR απεικονίζονται στο παρακάτω διάγραμμα και στο πίνακα. Για τους υποδοχείς Notch-1, Notch-4 και για τον συνδέτη Dll-1 δεν υπήρχε έκφραση στον πλακούντα των γυναικών με προεκλαμψία αλλά ούτε στον πλακούντα των γυναικών που είχαν φυσιολογική κύηση. Ωστόσο οι υποδοχείς Notch-2 και Notch-3, οι συνδέτες Dll-3, Dll-4, Jagged-1 και Jagged-2 αλλά και τα γονίδια στόχοι Hey-1 και Hey-2 είχαν μειωμένα επίπεδα έκφρασης mRNA στα παθολογικά δείγματα με έναν μέσο όρο έκφρασης ο οποίος κυμαίνοντας από 10% έως 53% της έκφρασης των ίδιων γονιδίων στα φυσιολογικά δείγματα πλακούντα ($p<0.01$ σε όλες τις περιπτώσεις).

Στο γράφημα και στον πίνακα που ακολουθούν, απεικονίζεται η σχετική έκφραση του mRNA του κάθε γονιδίου στα παθολογικά και στα φυσιολογικά δείγματα. Είναι φανερό ότι υπάρχει μείωση της έκφρασης και στα 8 μελετώμενα γονίδια.



Gene	Preeclampsia Placentas	Normal Placentas	P-value*	fold-change
mRNA				
Notch-2	0.12 ± 0.03	1.18 ± 0.15	**<0.001**	0.10
Notch-3	0.23 ± 0.07	1.68 ± 0.25	**<0.001**	0.14
DLL-3	0.64 ± 0.17	1.22 ± 0.13	**0.002**	0.53
DLL-4	0.38 ± 0.11	1.51 ± 0.19	**<0.001**	0.25
Jagged-1	0.42 ± 0.10	1.80 ± 0.26	**<0.001**	0.23
Jagged-2	0.73 ± 0.14	1.38 ± 0.17	**0.008**	0.53
Hey-1	0.72 ± 0.20	2.01 ± 0.31	**0.001**	0.36
Hey-2	**0.31 ± 0.09**	**1.65 ± 0.37**	<0.001	0.18

Ωστόσο, τα μελετώμενα γονίδια δεν υποεκφραζόταν σε όλα τα παθολογικά δείγματα, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα. Συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά, η έκφραση του mRNA των Notch-2 και Notch-3 εμφάνισε μείωση στο 100% (20/20) και στο 90% (18/20) των δειγμάτων με προεκλαμψία, αντίστοιχα. Ομοίως, η mRNA έκφραση των Dll-3, Jagged-1, Jagged-2, Hey-1 και Hey-2 εμφάνισε μείωση στο 70% (14/20), στο 80% (26/20), στο 50% (10/20), στο 75% (15/20) και στο 85% (17/20) των παθολογικών δειγμάτων, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αναλυτικά απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα και στην εικόνα που ακολουθεί.

Gene	Overexpression (%)	Normal expression (%)	Reduced expression (%)
mRNA			
Notch-2	0/20 (0)	0/20 (0)	20/20 (100)
Notch-3	0/20 (0)	2/20 (10)	18/20 (90)
DLL-3	1/20 (5)	5/20 (25)	14/20 (70)
DLL-4	0/20 (0)	4/20 (20)	16/20 (80)
Jagged-1	0/20 (0)	4/20 (20)	16/20 (80)
Jagged-2	0/20 (0)	10/20 (50)	10/20 (50)
Hey-1	0/20 (0)	5/20 (25)	15/20 (75)
Hey-2	0/20 (0)	3/20 (15)	17/20 (85)

Sample	Notch-2	Notch-3	DLL-3	DLL-4	Jagged-1	Jagged-2	Hey-1	Hey-2
1								
2								
3								
4						—		
5								
6						—		
7								
8		—						
9					—	—	—	
10			—	—		—		
11								—
12			—	—		—		
13			—	—	—	—	—	
14								
15								
16						—	—	
17					—	—	—	—
18		—	—	—	—	—	—	—
19						—		
20			—					

Αναλυτική απεικόνιση κάθε δείγματος (PE), όπου καταδεικνύεται με κόκκινο φόντο η υποέκφραση, με μπλέ η υπερέκφραση και με λευκό η σταθερή έκφραση σε σχέση με τα φυσιολογικά.

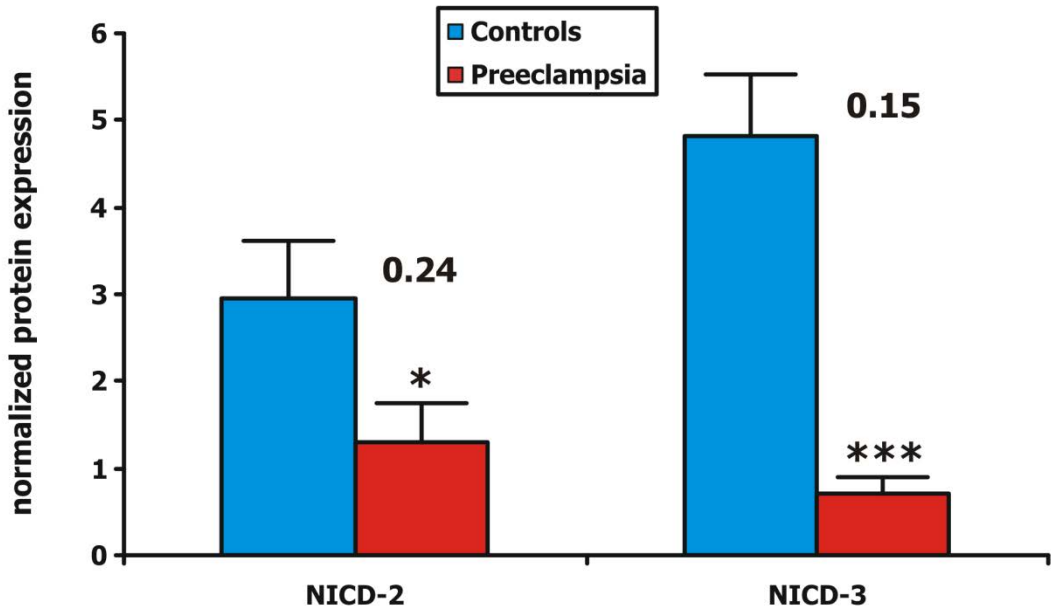
4.3. Επίπεδα πρωτεΐνης στα δείγματα προεκλαμψίας και στα φυσιολογικά δείγματα

Στη συνέχεια, αφού οι υποδοχείς Notch-1 και Notch-4 δεν εκφραζόταν ούτε στα δείγματα προεκλαμψίας αλλά ούτε στα φυσιολογικά, προχωρήσαμε στην ανίχνευση της πρωτεΐνης με Western blotting του ενδοκυττάριου μέρους των υποδοχέων Notch-2 (NICD-2) και Notch-3 (NICD-3). Όπως ήταν αναμενόμενο, λόγω της έκφρασης τους σε mRNA επίπεδο, οι πρωτεΐνες NICD-2 και NICD-3 ήταν ελαττωμένες σε 14/20 (70%) και

σε 20/20 (100%) παθολογικούς πλακούντες, συγκριτικά με την έκφρασή τους στους πλακούντες που προέρχονται από φυσιολογικές κυήσεις, με μέσο όρο επιπέδων έκφρασης το 24% και 15% της έκφρασης των φυσιολογικών δειγμάτων (p=0.014 και p<0.001, αντίστοιχα). Αναλυτική απεικόνιση των αποτελεσμάτων ακολουθεί στους παρακάτω πίνακες και στο γράφημα.

Gene	Preeclampsia Placentas	Normal Placentas	P-value*	fold-change
Protein				
Notch-2	1.31 ± 0.44	2.96 ± 0.66	**0.014**	0.24
Notch-3	**0.70 ± 0.20**	**4.81 ± 0.71**	<0.001	0.15

Gene	Overexpression (%)	Normal expression (%)	Reduced expression (%)
Protein			
Notch-2	0/20 (0)	6/20 (30)	14/20 (70)
Notch-3	0/20 (0)	0/20 (0)	20/20 (100)

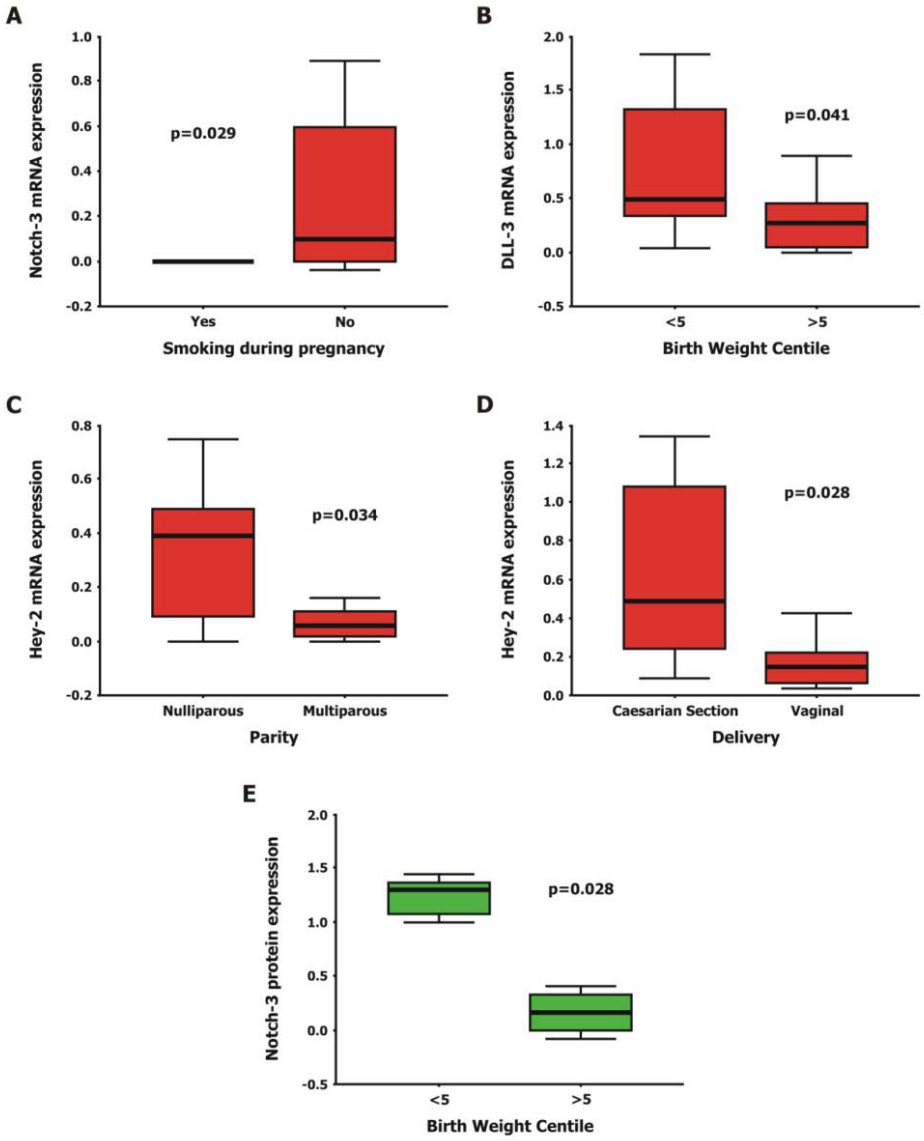


Στο γράφημα απεικονίζεται η σχετική έκφραση της πρωτεΐνης του ενδοκυττάριου μέρους των υποδοχέων Notch-2 και Notch-3 στα παθολογικά και στα φυσιολογικά δείγματα.

4.4. Συσχέτιση των αποτελεσμάτων έκφρασης των μελετώμενων γονιδίων και πρωτεϊνών με τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων προεκλαμψιας

Ωστόσο, περαιτέρω ανάλυση ανέδειξε σημαντικές στατιστικά συσχετίσεις μεταξύ των πλακουντιακών επιπέδων mRNA και πρωτεΐνης και συγκεκριμένων παθολογικών παραμέτρων στις περιπτώσεις προεκλαμψίας. Ιδιαίτερο εύρημα ήταν η μη έκφραση του υποδοχέα Notch-3 στις εγκύους εκείνες που κάπνιζαν και στη διάρκεια της εγκυμοσύνης σε σχέση με εκείνες που το έκοψαν (0.00±0.00 έναντι 0.29±0.09, p=0.029). Επιπρόσθετα, οι περιπτώσεις με προεκλαμψία και βάρος νεογνού μικρότερο από την 0,5η εκατοστιαία θέση είχαν υψηλότερα επίπεδα πρωτεΐνης του NICD-3 και υψηλότερα επίπεδα mRNA του Dll-3 συγκρινόμενα με εκείνες τις περιπτώσεις προεκλαμψίας με βάρος νεογνού μεγαλύτερο από την 0,5η

εκατοστιαία θέση (NICD-3:1.150.24 έναντι 0.16±0.07, p=0.28; DLL-3: 0.91±0.30 έναντι 0.42±0.19, p=0.041). Ένα άλλο εύρημα ήταν ότι η έκφραση του γονίδιο στόχος Hey-2 στους πλακούντες από τις εγκυμοσύνες με προεκλαμψία που ο τοκετός έγινε με καισαρική τομή ήταν αυξημένη συγκρινόμενη με τις περιπτώσεις του κολπικού τοκετού (0.63± 0.17 έναντι 0.15±0.05, p=0.028). Ένα άλλο στατιστικό στοιχείο που προέκυψε από τις αναλύσεις ήταν ότι το Hey-2 είχε αυξημένα επίπεδα έκφρασης στις γυναίκες με προεκλαμψία οι οποίες ήταν πρωτότοκες συγκρινόμενες με αυτές που γέννησαν το δεύτερο ή το τρίτο παιδί τους (0.44 ±0.13 έναντι 0.05± 0.02, p=0.034). Τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνονται συνοπτικά στα γραφήματα που ακολουθούν:



4.5. Μοτίβο συνέκφρασης των μελετώμενων γονιδίων

Στη συνέχεια, με τη χρήση του Spearman's rank test, ελέγξαμε το μοτίβο συνέκφρασης των ανωτέρω οκτώ γονιδίων (NOTCH-2, NOTCH-3, DLL-3, DLL-4, JAGGED-1, JAGGED-2, HEY-1 και HEY-2) σε συνδυασμό ζευγών (μετά από κανονικοποίηση). Με το συγκεκριμένο τεστ ελέγχουμε κατά πόσο δύο γονίδια υπερεκφράζονται ή υποεκφράζονται μαζί είτε με θετική είτε με αρνητική συσχέτιση. Στα φυσιολογικά δείγματα πλακούντα, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το

Notch-3 έχει θετική συσχέτιση με το Notch-2. Ο συνδέτης Dll-4 έχει θετική συσχέτιση με τους υποδοχείς Notch-2 και Notch-3 και με τους συνδέτες Jagged-1, Jagged-2 και Dll-3. Ο υποδοχέας Jagged-1 είχε θετική συσχέτιση με τον Notch-3 και με τον Jagged-1. Το γονίδιο στόχος Hey-1 συσχετιζόταν θετικά με τους συνδέτες Jagged-1, Jagged-2 και Dll-4. Τέλος, το Hey2 δεν συνεκφραζόταν με κανένα από τα άλλα μόρια όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης.

		NOTCH 2	**NOTCH3**	**JAGGED 1**	**JAGGED 2**	**DLL3**	**DLL4**	**HEY1**	**HEY2**
NOTCH2	CC	1.000							
	P-value	.							
NOTCH3	CC	**0.767**	1.000						
	P-value	**<0.001**	.						
JAGGED1	CC	0.136	**0.521**	1.000					
	P-value	0.569	**0.018**	.					
JAGGED2	CC	0.147	**0.468**	**0.767**	1.000				
	P-value	0.535	**0.038**	**<0.001**	.				
DLL3	CC	0.411	0.341	0.375	0.357	1.000			
	P-value	0.072	0.141	0.103	0.123	.			
DLL4	CC	**0.590**	**0.672**	**0.519**	**0.460**	**0473**	1.000		
	P-value	**0.006**	**0.001**	**0.019**	**0.041**	**0035**	.		
HEY1	CC	0.120	0.417	**0.819**	**0.672**	0253	**0.462**	1.000	
	P-value	0.613	0.068	**<0.001**	**0.001**	0282	**0.040**	.	
HEY2	CC	0.050	0.337	0.300	0.413	-0.060	0.364	0.289	1.000
	P-value	0.835	0.146	0.199	0.070	0.801	0.115	0.217	.

Στους πλακούντες των γυναικών με προεκλαμψία παρατηρήσαμε περισσότερες (19 έναντι 12) και διαφορετικές συνεκφράσεις ανάμεσα στα μελετώμενα γονίδια σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα. Συγκεκριμένα, οι θετικές συσχετίσεις του υποδοχέα Notch-3 με τον Notch-2 και του συνδέτη Dll-4 με τον Jagged-1 χάθηκαν στα δείγματα με προεκλαμψία. Επιπλέον, οι συνδέτες Jagged-1 και Jagged-2 δεν συνεκφράζονταν με τον υποδοχέα Notch-3 αλλά με τον Notch-2. Το Hey-1 σχετιζόταν επιπλέον με τα Notch-2 και Dll-3, και το Hey-2 είχε θετική συσχέτιση και με τα υπόλοιπα 7 γονίδια (NOTCH-2, NOTCH-3, DLL-3, DLL-4, JAGGED-1, JAGGED-2, HEY-1).

		NOTCH 2	**NOTCH 3**	**JAGGED 1**	**JAGGED 2**	**DLL3**	**DLL4**	**HEY1**	**HEY2**
NOTCH2	CC	1.000							
	P-value	.							
NOTCH3	CC	0.412	1.000						
	P-value	0.071	.						
JAGGED1	CC	**0.877**	0.364	1.000					
	P-value	**<0.001**	0.115	.					
JAGGED2	CC	**0.807**	0.269	**0.922**	1.000				
	P-value	**<0.000**	0.252	**<0.001**	.				
DLL3	CC	0.264	0.128	0.341	0.401	1.000			
	P-value	0.261	0.591	0.141	0.080	.			
DLL4	CC	**0.789**	**0.628**	**0.766**	**0.715**	0.215	1.000		
	P-value	**<0.001**	**0.003**	**<0.001**	**<0.001**	0.362	.		
HEY1	CC	**0.799**	0.400	**0.894**	**0.890**	**0.504**	**0.700**	1.000	
	P-value	**<0.001**	0.080	**<0.001**	**<0.001**	**0.024**	**0.001**	.	
HEY2	CC	**0.693**	**0.514**	**0.709**	**0.616**	**0.502**	**0.548**	**0.741**	1.000
	P-value	**0.001**	**0.020**	**<0.001**	**0.004**	**0.024**	**0.012**	**<0.001**	.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch εκφράζεται στον ανθρώπινο πλακούντα. Ωστόσο τα μέλη του έχουν μελετηθεί σε περιορισμένο επίπεδο όσον αφορά τη σχέση τους με παθολογίες της εγκυμοσύνης, όπως είναι η προεκλαμψία. Είναι καταγεγραμμένο ότι η έκφραση τους είναι μειωμένη σε πρωτεϊνικό επίπεδο σε δείγματα πλακούντα προερχόμενα από γυναίκες με προεκλαμψία, συγκρινόμενη με την έκφραση τους σε φυσιολογικά δείγματα πλακούντα και ότι μειωμένη έκφραση των Notch-1, Notch-2, Jagged-1 και Dll-4 οδηγεί σε αποτυχημένη ενσωμάτωση της πλακουντιακής κυκλοφορίας στη μητρική (53).

Στην παρούσα διατριβή η μείωση της έκφρασης των υποδοχέων Notch-2, Notch-3, των συνδετών Dll-3, Dll-4, Jagged-1, Jagged-2 και των γονιδίων στόχων Hey-1 και Hey-2 ήταν καθολική, όπως καταδείχτηκε από τη γονιδιακή έκφραση (μέσω qPCR) και την ποσότητα της πρωτεΐνης (μέσω Western blotting) στα δείγματα με προεκλαμψία σε σχέση με τα φυσιολογικά. Οι Cobellis και συν. παρατήρησαν ότι η έκφραση του υποδοχέα Jagged-1 και του αγγειακού ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) ήταν αρκετά μειωμένη σε πλακούντες με προεκλαμψία σε σχέση με τους φυσιολογικούς, το οποίο θα μπορούσε να παίζει ρόλο στο έναυσμα της προεκλαμψίας (54). Επιπλέον, ο υποδοχέας Jagged-1 δεν εκφράζεται σε πολλά αγγεία στις περιπτώσεις προεκλαμψίας (55).

Στην προσπάθεια μας να προσδιορίσουμε το επίπεδο έκφρασης των μελών του μονοπατιού Notch, παρατηρήσαμε ότι οι υποδοχείς Notch-1 και Notch-4 αλλά και ο συνδέτης Dll-1 δεν εκφράζονταν σε κανένα από τις δυο μελετώμενες ομάδες των δειγμάτων μας. Ωστόσο αυτό υποστηρίζεται και από προηγούμενες μελέτες οι οποίες έδειξαν ότι τελικά τα τροφοβλαστικά

κύτταρα μπορούν να αλλάξουν την έκφραση των υποδοχέων Notch και των συνδετών τους όσο αυτά διαφοροποιούνται, και αυτό εξαιτίας του ότι η έκφραση των μορίων του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch είναι τοπική και όχι καθολική σε όλο τον πλακούντα. Συγκεκριμένα ο Hunkapiller και συν. παρατήρησαν ότι ο υποδοχέας Notch-1 δεν εκφράζεται στα τροφοβλαστικά κύτταρα και ότι ο υποδοχέας Notch-4 έχει αισθητά μειωμένα επίπεδα έκφρασης στα εξωλαχνιακά τροφοβλαστικά κύτταρα (55).

Η έκφραση σε πρωτεϊνικό επίπεδο του ενδοκυττάριου μέρους των υποδοχέων Notch-2 (NICD-2) και Notch-3 (NICD-3), όπως ήταν αναμενόμενο, ήταν μειωμένη στα παθολογικά δείγματα πλακούντα συγκρινόμενη με τα φυσιολογικά. Προηγούμενη μελέτη έδειξε μειωμένη ανοσοδραστικότητα των πρωτεϊνών Notch-2 και Jagged-2 σε ανθρώπινους τελειόμηνους πλακούντες γυναικών με εμβρυική ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη (EYA) ή υπέρταση, σε σχέση με πλακούντες προερχόμενους από φυσιολογικές κυήσεις (56). Ωστόσο πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ο υποδοχέαςNotch-2 υποεκφράζεται σε πρωτεϊνικό επίπεδο στα δείγματα προεκλαμψιας συγκριτικά με τα φυσιολογικά ενώ ο υποδοχέας Notch-3 υπερεκφράζεται στην προεκλαμψία (57).

Είναι ήδη γνωστό ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch έχει την ικανότητα να επηρεάζει την τύχη των κυττάρων μέσω της ενεργοποίησης μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι αλλάζουν την έκφραση γονιδίων στόχων (58). Τα γονίδια Hey είναι οι κύριοι επαγωγείς των σημάτων του Notch κατά την ανάπτυξη. Τα Hey-1 και Hey-2 εκφράζονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του λαβυρίνθου, ενώ το Hey-1 εκφράζεται επίσης σε κάποια τροφοβλαστικά κύτταρα του εξωπλακουντιακού κώνου (50). Στη δική μας μελέτη ελέγξαμε τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων Hey-1 και Hey-2 τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε πλακούντες με προεκλαμψία. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι και τα δύο γονίδια στόχοι του Notch υποεκφράζονται στις παθολογικές περιπτώσεις σε σχέση με τους φυσιολογικούς πλακούντες. Προηγούμενη μελέτη

έδειξε ότι διπλή μετάλλαξη στα γονίδια Hey-1 και Hey-2 οδηγεί σε πρόωρο εμβρυικό θάνατο, εξαιτίας των μεγάλων αγγειακών και καρδιακών ελλατωμάτων (52). Αν και στη βιβλιογραφία δεν υπάρχουν προηγούμενα δεδομένα για την έκφραση των γονιδίων Hey σε δείγματα προεκλαμψίας, τα μειωμένα επίπεδα έκφρασης τους σε mRNA επίπεδο δείχνει την καθολική υποέκφραση του σηματοδοτικού μηχανισμού των γονιδίων Notch στην προεκλαμψία. Τα παραπάνω επαληθεύονται από την ανάλυση συν-έκφρασης των γονιδίων που πραγματοποιήσαμε, η οποία δείχνει ότι το γονίδιο Hey-2 υποεκφράζεται μαζί με τα γονίδια Notch-2, Notch-3, Jagged-1, Jagged-2, Dll-3, Dll-4 και Hey-1 στους πλακούντες με προεκλαμψία, ενώ στις γυναίκες με φυσιολογική εγκυμοσύνη το Hey-2 δεν συνεκφράζεται με κανένα από τα προαναφερθέντα γονίδια.

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι και άλλα ενδοκυτταρικά μονοπάτια ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων Hey, όπως το μονοπάτι BMP (59), το μονοπάτι ALK1 (60) και το μονοπάτι Smad-1/5 (19). Επιπρόσθετα, τα γονίδια Hey-1 και Dll-4 επάγονται από τον παράγοντα υποξίας (HIF-1a) στα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα ενώ και τα δυο γονίδια Hey μπορούν να καταστείλουν την περαιτέρω επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης του HIF-1a, ως μηχανισμό ανάδρασης για την προστασία του κυττάρου. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό βήμα στην αναπτυξιακή ρύθμιση του καθορισμού των ενδοθηλιακών κυττάρων (61).

Κάποια από τα μόρια που μελετήσαμε παρουσίασαν θετική συσχέτιση μεταξύ τους. Ωστόσο οι θετικές συσχετίσεις που υπήρχαν στα παθολογικά δείγματα ήταν διαφορετικές αλλά και περισσότερες (19 έναντι 12) σε σχέση με τα φυσιολογικά. Τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει διαφορετική αλληλεπίδραση ανάμεσα στα μελετηθέντα μόρια στα δείγματα προεκλαμψίας σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα.

Περαιτέρω ανάλυση των μελετώμενων μορίων στα δείγματα προεκλαμψίας έδειξε σημαντικές στατιστικές συσχετίσεις μεταξύ της έκφρασης τους, τόσο σε επίπεδο mRNA όσο και σε

πρωτεϊνικό επίπεδο, και συγκεκριμένων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών των γυναικών που συμμετείχαν στο ερευνητικό αυτό πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, στις γυναίκες με προεκλαμψία και βάρος νεογνού μικρότερο από την 5η εκατοστιαία θέση (BWC<5) τα επίπεδα mRNA του συνδέτη Dll-3 αλλά και πρωτεϊνικής έκφρασης του ενδοκυττάριου μέρους του υποδοχέα Notch-3 (NICD-3) ήταν αυξημένα σε σχέση με τις περιπτώσεις προεκλαμψίας με βάρος νεογνού μεγαλύτερο από την 5η εκατοστιαία θέση (BWC>5). Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με προηγούμενη μελέτη μας, στην οποία δείχθηκε ότι στις εγκυμοσύνες που επιπλέκονται με ενδομήτρια υπολειπομένη ανάπτυξη (EYA), ένα μέλος του μονοπατιού HIF, ο PHD-3, ήταν περισσότερο εκφρασμένος στα δείγματα με ενδομήτρια υπολειπόμενη ανάπτυξη στα μωρά που γεννηθήκαν με BWC<5 σε σχέση με τα μωρά που γεννήθηκαν με BWC>5 (62). Επιπρόσθετα, στις γυναίκες που γέννησαν το πρώτο τους παιδί τα επίπεδα του γονιδίου στόχου Hey-2 ήταν αυξημένα σε σχέση με αυτές που γέννησαν το 2ο ή το 3ο τους παιδί. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η γονιδιακή έκφραση αλλάζει στην 1η, 2η ή 3η γέννα, όπως στην περίπτωση του γονιδίου Sflt-1 (soluble fmslike tyrosine kinase-1), του οποίου τα επίπεδα είναι υψηλοτέρα στις πρωτότοκες γυναίκες με προεκλαμψία σε σχέση με τις μεταγενέστερες εγκυμοσύνες (63). Επίσης, ένα άλλο από τα ευρήματα μας ήταν ότι οι γυναίκες με προεκλαμψία που γέννησαν με καισαρική τομή είχαν μεγαλύτερη έκφραση mRNA του Hey-2 συγκριτικά με αυτές που είχαν φυσιολογικό τοκετό. Κάτι ανάλογο έχει παρατηρηθεί στον παράγοντα PHD-3 στην προαναφερθείσα μελέτη μας (62). Τέλος, στις γυναίκες με προεκλαμψία που κάπνιζαν κατά την εγκυμοσύνη τους παρατηρήσαμε ότι ο υποδοχέας Notch-3 δεν εκφραζόταν, ενώ εκφραζόταν στις μη-καπνίστριες. Μελέτες έχουν δείξει ότι το κάπνισμα μειώνει την έκφραση των μελών του μονοπατιού Notch στο επιθήλιο του πνεύμονα σε καπνιστές και σε ασθενείς με χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (64), και ότι προκαλεί

μητρική ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και ανώμαλη πλακουντοποίηση (65), ευρήματα τα οποία συμφωνούν με τα αποτελέσματα μας.

Τα ευρήματα της παρούσας διατριβής, ότι οι υποδοχείς Notch-2, Notch-3, οι συνδέτες Dll-3 Dll-4 και Jagged-1 Jagged-2 και τα γονίδια στόχοι Hey-1, Hey-2 υποεκφράζονται στους πλακούντες γυναικών με προεκλαμψία, αποδεικνύουν ότι το σηματοδοτικό μονοπάτι Notch αποτελεί σημαντικό μέρος της παθογένειας αυτής της επιπλοκής της εγκυμοσύνης. Παρ' όλα αυτά απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τους υποδοχείς Notch, τους συνδέτες τους και τα γονίδια στόχους τους, ώστε να προσδιοριστεί κατά πόσο ένα ή περισσότερα μέλη του σηματοδοτικού αυτού μηχανισμού θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση της προεκλαμψίας ή για νέες προληπτικές και θεραπευτικές στρατηγικές.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Crocker I. Gabor Than Award Lecture (2006) Pre-eclampsia and villous trophoblast turnover: perspectives and possibilities. Placenta 28, supplement A, trophoblast research 21:4-13.
2. Sibai BM (2003) Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol 102:181-192.
3. Davey DA, MacGillivray I (1988) The classification and definition of the hypertensive disorders of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 158:892-898.
4. Suzanne Baumwell, S. Ananth Karumanchi (2007) Pre-Eclampsia: Clinical Manifestations and Molecular Mechanisms. Nephron Clin Pract 106:c72–c81.
5. Μ Τζιβράς, Δ. Κουρτέσας (2007) Ηπατικά νοσήματα ειδικά της κύησης. Εκδόσεις ‘’Βαγιονάκη’.
6. Usher, R. and F. McLean (1969) Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. J Pediatr 74(6): 901-10.
7. Battaglia, F.C. and L.O. Lubchenco (1967) A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. J Pediatr 71(2): 159-63.
8. Breart, G., et al. (1982) Risk of fetal growth retardation as a result of maternal hypertension. Preparation to a trial on antihypertensive drugs. Dev Pharmacol Ther 4 Suppl: 116-23.

9. Benirschke, Gersell DJ, Kraus FT (2002) Diseases of the placenta. In: Blaustein' s pathology of the female genital tract 5th ed./ editor Kurman RJ: 1103-1193.
10. Stella CL, Sibai BM (2006) Preeclampsia: diagnosis and management of the atypical presentation. The Journal of Maternal- Fetal and Neonatal Medicine 19(7): 81-386.
11. Sibai BM, G Dekker, M Kupfermine (1997) Pre-eclampsia. Lancet 2005; 365: 785-99.
12. Taylor RN. Review: immunobiology of preeclampsia. Am J Reprod Immunol; 37(1):79-86.
13. Roberts JM, Hubel CA (2009) The Two Stage Model of Preeclampsia: Variations on the Theme. Placenta ; 30 (SupplA) :S32–S37. doi:10.1016/j.placenta.2008.11.00.
14. Sibai BM (2006) Preeclampsia as a cause of preterm and late preterm (near term) births. Semin Perinatol; 30: 16-19.
15. Roberts JM (2008) IFPA, Placenta Meeting, Graz.
16. Joshi VV (1994) Handbook of placental pathology. New York, Igaku– Shoin.
17. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R (2006) Macroscopic features of the delivered placenta. In: eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer–Verlag:13-16.
18. Langston C, Kaplan C, Macpherson T, Manci E, Peevy K, Clark B, et al. (1997) Practise Guideline for Examination of the Placenta. Arch Pathol Lab Med;121:449-476.
19. SE Mills, Lippincott Williams & Wilkins (2004) The placenta. In: Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology, 4th edition: 2301- 2333.
20. Α. Π. Σάββας (1985) Το Γεννητικό Σύστημα Θήλεος, Επίτομη ανατομική του Ανθρώπου και Άτλας, εκδ. οίκος Αφων Κυριακίδη, Θεσσαλονίκη, σελ. 413-439.
21. MBenirschke K, Kaufmann P, Baergen R (2006) eacroscopic features of the delivered placenta. In: ds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer–Verlag:13-16.

22. Benirschke K, Kaufmann P, Baergen R (2006) Anatomy and pathology of the umbilical cord. In: eds. Pathology of the Human Placenta. 5th ed. New York: Springer–Verlag:380-452.

23. Ronan O' Rahilly & Fabiola Müller (2000) Ο πλακούντας και τα αναπτυξιακά εξαρτήματα σελ. 69-87. Εμβρυολογία και τερατολογία του ανθρώπου, μεταφρ. Αζαρίας Καραμανλίδης – Γιάννης Σιατίστας, Ιατρ. Εκδ. Πασχαλίδης, Αθήνα

24. Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. Science;284(5415):770-6.

25. Kojika S1, Griffin (2001) Notch receptors and hematopoiesis. JD.Exp Hematol ;29(9):1041-52.

26. Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U (1994) The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium Mech Dev;46(2):123-36.

27. Lai EC (2004) Notch signaling:control of cell communication and cell fate. Dvelop 131:965-73.

28. Leong KG, Karsan A (2006) Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. Blood, 17.

29. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c gene&l=NOTCH1

30. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c gene&l=NOTCH2

31. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c gene&l=NOTCH3

32. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&c gene&l=NOTCH4

33. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=ACEView&db=36a&term=jag1

34. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=ACEView&db=36a&term=jag2

35. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=ACEView&db=36a&term=dll1

36. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=ACEView&db=36a&term=dll3

37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=ACEView&db=36a&term=dll4

38. Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S (1991) Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. Cell;67(4):687-99.

39. Lardelli M, Williams R, Mitsiadis T, Lendahl U (1996) Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. Mech Dev;59(2):177-90.

40. Le Borgne R, Bardin A, Schweisguth F (2005) The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. Development ;132(8):1751-62.

41. Andersson E, Sandberg R and Lendahl U (2011) Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. Development; 138(17): 3593-3612.

42. Henkel T, Ling PD, Hayward SD, Peterson MG (1994) Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. Science 1;265(5168):92-5.

43. Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS (1996) Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain.. Proc Natl Acad Sci U S A 20;93(4):1683-8.

44. B. Huppertz a, E. Abe, P. Murthi, T. Nagamatsu, D. Szukiewicz, C. Salafia (2007) Placental Angiogenesis, Maternal and Fetal Vessels. A Workshop Report. Placenta 28, Supplement A, Trophoblast Research 21: S94eS96.

45. M. Zygmunt et al. (2003) Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 110: S10–S18.

46. J.L.James, P.R.Stone and L.W.Chamley (2006) The regulation of trophoblast differentiation by oxygen in the first trimester of pregnancy. Human Reproduction Update 12:137–144.

47. Redman, C. W. &Sargent, I.L (2005) Science 308: 1592-1594.

48. Herr F, Schreiner I, Baal N, Pfarrer C, Zygmunt M (2011) Expression patterns of Notch receptors and their ligands Jagged and Delta in human placenta. Placenta ;32(8):554-63.

49. De Falco M, Cobellis L, Giraldi D, Mastrogiacomo A, Perna A, Colacurci N, et al. (2007) Expression and distribution of notch protein members in human placenta throughout pregnancy. Placenta;28(2-3):118-26.

50. Gasperowicz M, Otto F (2008) The notch signalling pathway in the development of the mouse placenta. Placenta;29(8):651-9.

51. High FA, Epstein JA (2008) The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. Nat Rev Genet;9(1):49-61.

52. Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M (2004) The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. Genes Dev ;18(8):901-11.

53. Ji L, Brkic J, Liu M, Fu G, Peng C, et al. (2013) Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. Mol Aspects Med 34: 981-1023.

54. Cobellis L, Mastrogiacomo A, Federico E, Schettino MT, De Falco M, Manente L, et al. (2007) Distribution of Notch protein members in normal and preeclampsia-complicated placentas. Cell Tissue Res;330(3):527-34.

55. Hunkapiller NM, Gasperowicz M, Kapidzic M, Plaks V, Maltepe E, et al. (2011) A role for Notch signaling in trophoblast endovascular invasion and in the pathogenesis of pre-eclampsia. Development 138: 2987-2998.

56. Sahin Z, Acar N, Ozbey O, Ustunel I, Demir R (2011) Distribution of Notch family proteins in intrauterine growth restriction and hypertension complicated human term placentas. Acta Histochem 113: 270-276.

57. Zhao WX, Huang TT, Jiang M, Feng R, Lin JH (2014) Expression of notch family proteins in placentas from patients with early-onset severe preeclampsia. Reprod Sci 21: 716-723.

58. Borggrefe T, Oswald F (2009) The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. Cell Mol Life Sci 66: 1631-1646.

59. Itoh F, Itoh S, Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Iso T, Dotto GP, et al. (2004) Synergy and antagonism between Notch and BMP receptor signaling pathways in endothelial cells. EMBO J;23(3):541-51.

60. Larrivee B, Prahst C, Gordon E, del Toro R, Mathivet T, Duarte A, et al. (2012) ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. Dev Cell;22(3):489-500.

61. Diez H, Fischer A, Winkler A, Hu CJ, Hatzopoulos AK, Breier G, Gessler M (2007) Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. Exp Cell Res ;313(1):1-9.

62. Gourvas V, Sifakis S, Dalpa E, Soulitzis N, Koukoura O, Spandidos DA (2010) Reduced placental prolyl hydroxylase 3 mRNA expression in pregnancies affected by fetal growth restriction. BJOG;117(13):1635-42.

63. Wolf M, Shah A, Lam C, Martinez A, Smirnakis KV, Epstein FH, et al. (2005) Circulating levels of the antiangiogenic marker sFLT-1 are increased in first versus second pregnancies. Am J Obstet Gynecol;193(1):16-22.

64. Tilley AE, Harvey BG, Heguy A, Hackett NR, Wang R, O'Connor TP, et al. (2009) Down-regulation of the notch pathway in human airway epithelium in association with smoking and chronic obstructive p ulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med;179(6):457-66.

65. Ness RB, Zhang J, Bass D, Klebanoff MA (2008) Interactions between smoking and weight in pregnancies complicated by preeclampsia and small-for-gestational-age birth. Am J Epidemiol 168: 427-433.

ΣΥΝΤΟΜΟ ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΕΡΣΕΦΟΝΗ ΦΡΑΓΚΙΑΔΑΚΗ

Υπηκοότητα: Ελληνική

Ημερομηνία γέννησης: 3 Δεκεμβρίου 1984

Διεύθυνση επικοινωνίας : Τρείς Βαγιές, Εζηκία 37, Ηράκλειο Κρήτης

Τηλέφωνα επικοινωνίας: 6980525424/ 2810 260545

E-mail: persefoni.f@gmail.com/pfragiadaki@med.uoc.gr

Σπουδές

2003– 2008 Φοίτηση στην σχολή Βιολογίας του Πανεπιστήμιου Κρήτης (Βαθμός πτυχίου 6.54)

Εκπόνηση Πτυχιακής Εργασίας

2006-2007 Εργαστήριο Αιματολογίας Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης (Υπεύθυνη καθ. Ε. Παπαδάκη)

Θέμα: «Μελέτη των ανοσοκατασταλτικών ιδιοτήτων των αρχέγονων μεσεγχυματικών κυττάρων σε ασθενείς χρόνιας ιδιοπαθούς ουδετεροπενίας και σε ασθενείς μυελοδυσπλαστικών συνδρόμων»

Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής

2009-2015 Εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας και Μοριακής Ογκολογίας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης (Διευθυντής καθ. Δ.Α. Σπαντίδος)

Θέμα : «Έκφρασης του σηματοδοτικού μονοπατιού NOTCH σε πλακούντες εγκύων με προεκλαμψία»

Εργασιακή/Ερευνητική Εμπειρία

2010 - σήμερα Ερευνήτρια στο εργαστήριο Τοξικολογίας και Εγκληματολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης (Διευθυντής καθ. Α. Τσατσάκης)

2013-σήμερα Ερευνήτρια στο κέντρο "DNAanalysis" (Κέντρο Αναλύσεων και Έρευνας Μοριακής Βιολογίας και Γενετικής, Διευθύντρια Λιναρδάκη Εμμανουέλα, PhD Μοριακός Βιολόγος)

Εμπειρία σε Μοριακές/ Διαγνωστικές Τεχνικές

Διατήρηση και ανάπτυξη κυτταρικών σειρών, παροδική διαμόλυνση κυτταρικών σειρών

Απομόνωση Τ λεμφοκυττάρων με την διαδικασία της τεχνικής του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού

Μέτρηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων με ενσωμάτωση [3H]-θυμιδίνης (Proliferationassay)

Western blotting
RNA/DNA/protein extraction
PCR, RT-PCR, Real-Time PCR
Elisa (enzyme-linked immunosorbent assay)
Κυτταρογενετική (Q-FISH)
Ανοσοφθορισμός
Γνώση στον χειρισμό οπτικού, συνεστιακού (confocal) και μικροσκοπίου φθορισμού
Υγρή (LC-MS) και Αέρια (GC-MS) Χρωματογραφία
Ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός αναβολικών σε σκευάσματα και σε ανθρώπινα ούρα
Γνώση χειρισμού αυτοματοποιημένων μηχανημάτων ανίχνευσης τοξικών ουσιών σε βιολογικά υγρά
Χειρισμός πειραματόζωων

Δημοσιεύσεις

1. Reserves, functional, immunoregulatory, and cytogenetic properties of bone marrow mesenchymal stem cells in patients with myelodysplastic syndromes.
   Klaus M, Stavroulaki E, Kastrinaki, MC, **Fragioudaki P**, Giannikou K, Psyllaki M, Pontikoglou C, Tsoukatou D, Mamalaki C, Papadaki HA. Stem Cells Dev. 2010 Jul;19(7):1043-54
2. Histopathological lesions, oxidative stress and genotoxic effects in liver and kidneys following long term exposure of rabbits to propoxur and diazinon.
   Christina Tsitsimpikou, Manolis Tzatzarakis, **Persefoni Fragkiadaki**, Leda Kovatsi, Polychronis Stivaktakis, Alexandra Kalogeraki, Demetrios Kouretas, Aristidis M. Tsatsakis. Toxicology. Nov 2012
3. Oxidative stress and myocardial dysfunction in young rabbits after short term anabolic steroids administration.
   Ioannis Germanakis; Konstantinos Tsarouhas; **Persefoni Fragkiadaki**; Christina Tsitsimpikou; Nikolaos Goutzourelas; Maria Christakis Champsas; Dimitrios Stagos; Elias Rentoukas; Aristides Michael Tsatsakis. Food Chemical Toxicology. March 2013
4. Cardiotoxicity in rabbits after a low-level exposure to diazinon, propoxur, and chlorpyrifos.
   A Zafiropoulos, K Tsarouhas, C Tsitsimpikou, **P Fragkiadaki**, I Germanakis, M Tsardi, G Maravgakis, N Goutzourelas, F Vasilaki, D Kouretas, AW Hayes and AM Tsatsakis. Human Experimental Toxicology. 2014
5. Dietary supplementation with tomato-juice in patients with metabolic syndrome: A suggestion to alleviate detrimental clinical factors.
   Tsitsimpikou C, Tsarouhas K, Kioukia-Fougia N, Skondra C, **Fragkiadaki P**, Papalexis P, Stamatopoulos P, Kaplanis I, Hayes AW, Tsatsakis A, Rentoukas E. Food Chemical Toxicology. 2014

6. Downregulation of Notch signaling pathway in late preterm and term placentas from pregnancies complicated by preeclampsia.
   Persefoni Fragkiadaki, Nikolaos Soulitzis, Stavros Sifakis, Demetrios Koutroulakis, Victor Gourvas, NikolaosVrachnis, Demetrios A. Spandidos. PlosOne, IN PRESS 2015

Abstracts

Histopathological findings, telomerase activity and ultrasound measurements in heart tissues after long-term rabbits exposure to diazinon and propoxur.
Persefoni Fragkiadaki, GiannisGermanakis, KonstantinosTsarouchas, Christina Tsitsimpikou, Maria Tsardi, Dolapsakis George, AristidisTsatsakis, FCVB-London, 2012- Poster
Histopathological findings, telomerase activity and ultrasound measurements in heart tissues after long-term rabbits exposure to turinabol and methanabol.
Tsitsimpikou Christina, Tsarouhas Konstantinos, Germanakis Ioannis, **Fragkiadaki Persefoni**, Tzardi Maria, Kouretas Demetrios, Kalogerakis Ioannis, Lasithiotakis Konstantinos, Tsatsakis Aristidis, Eurotox-2012
Histopathological findings, oxidative stress and ultrasound measurments in heart tissue after long term rabbits exposure to chlorpyrifos.
Fragkiadaki Persefoni, GermanakisIoannis, ZafeiropoulosAlexandros, KalogerakiAleka, TsarouchasKonstantinos, Tsitsimpikou Christina, Dolapsakis George, TsatsakisAristidis, Kouretas Demetrios, Eurotox-2012
Histopathological findings, telomerase activity and oxidative stress in kidney tissue after long-term rabbits exposure to turinabol and methanabol.
Fragkiadaki Persefoni, Tsitsimpikou Christina, Stivaktakis Polychronis, Segradakis John, Tsarouhas Konstantinos, Tzardi Maria, Kouretas Demetrios, Tsatsakis Aristidis, Eurotox-2013
Exposure to pesticides during pregnancy by the evaluation of their concentration in amniotic fluid and maternal urine.
Koutroulakis, D.; Tsatsakis, A.; Tzatzarakis, M.; Alegakis, A.; **Fragkiadaki, P**.; Sifakis, S.Toxicology Letters vol. 205 August 28, 2011. p. S61
Dietary exposure of Greek consumers to pesticides by a nutrition based on Mediterranean diet.Tsakiris, I.; Kokkinaki, A.; Tzatzarakis, M.; Alegakis, A.; Kokkinakis, M.; **Fragkiadaki, P**.; Vynias, D.;
Vasilaki Fotini, Tsitsimpikou Christina, TsarouhasKonstantinos, OzcagliEren, **Fragkiadaki Persefoni**, Heretisloannis, Kovatsi Leda, Kyriakakis Michael, Tsatsakis M. Aristidis,
Biochemical markers of long-term exposed rabbits to nandrolonedecanoate, Eurotox-2014

Alexander I. Vardavas, **Persefoni Fragkiadaki**, John Tsiaoussis, ErenOzcagli, DimitriosStagkos , Dimitrios Kouretas, Christina Tsitsimpikou, Félix Carvalho, Aristidis M. Tsatsakis, Oxidative Stress and telomerase activity in PBMCs after long term exposure of rabbits to Cypermethrin and PiperonylButoxide, Eurotox-2015

Polychronis D. Stivaktakis, Alexander I. Vardavas, Manolis N. Tzatzarakis, **Persefoni Fragkiadaki**, ErenOzcagli, FotiniVasilaki, Aristeidis K. Tsamoukas, StylianosPsycharakis, Aristidis M. Tsatsakis, Genotoxicity evaluation of long term rabbit exposure to Cypermethrin and PiperonylButoxide by Cytokinesis Block Micronucleus Assay (CBMN), Eurotox-2015

BuketAlpertunga, Mehtap Kara, ErenÖzçağlı, **Persa Fragkiadaki**, Aristides Tsatsakis, DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF STANOZOLOL IN RATS, Eurotox-2015

Vasilaki F., Tsitsimpikou C. , Tsarouhas K. , **Fragkiadaki P.** , Heretis I. , Tzardi M. , Kalogeraki A. , Germanakis I.,Tsatsakis A,

Histopathological findings and telomerase activity in kidney tissue in long-term exposed rabbits to nandrolonedecanoate, Eurotox-2015

Vasilaki F.1, Tsitsimpikou C. 2, Tsarouhas K. 3, **Fragkiadaki P**. 1, Kalogeraki A. 4, Stagkos D. 5, Kuretas D. 5, Ozcagli E. 6, Tsatsakis A.,

Oxidative stress and telomerase activity in blood and heart tissue in long-term exposed rabbits to nandrolonedecanoate, Eurotox-2015

P. Fragkiadaki1, E. Vakonaki1, E. Kouvidi2, D. Vynias1, D. Tsoukals1, A.M.Tsatsakis1,

Q-FISH analysis of metaphase spreads for clinical purpose, Bionanotox 2015

Ελεύθερες ανακοινώσεις

"Study of functional and molecular characteristics of three different bone marrow cell populations for expansion of mesechymal stem cells".

H. Papadaki, MC. Kastrinaki, A. Damianaki, **P. Fragiadaki** et al. Hematologica-The Hematology Journal JUN 2007, Vol 92 Pages: 118-118

ΣηφάκηςΣ, ΖαραβίνοςΑ, Ghatpande S, Seppo A, ΒακωνάκηΈ, ΜπίτζιουΓ, **ΦραγκιαδάκηΠ**, Tafas T, Kilpatrick MW, ΜαταλλιωτάκηςΙ, ΣπαντίδοςΔΑ, ΑντσακλήςΑ, Tsipouras P. «Ανίχνευσηεμβρυϊκώνκυττάρωνσεενδοτραχηλικόεπίχρισμαστηδιάρκειατουπρώτουτριμήνουτηςκύησης. Συμβολή στη δημιουργία μη επεμβατικής μεθόδου προγεννητικού ελέγχου».3ο Διαπανεπιστημιακό Διανοσοκομειακό Συνέδριο Μαιευτικής Γυναικολογίας, Ηράκλειο 18-20 Οκτωβρίου 2009. Βραβείο Καλύτερης Ελεύθερης Ανακοίνωσης

Γκούρβας Β, Δάλπα Ε, Σουλιτζής Ν, Κούκουρα Ο, **Φραγκιαδάκη Π**, Κωνσταντινίδου Α, Σηφάκης Σ, Σπαντίδος ΔΑ.

«Ελαττωμένη έκφραση της ANNEXINV σε πλακούντες κυήσεων με προεκλαμψία». 15ο Πανελλήνιο Συνέδριο Περιγεννητικής Ιατρικής, Θεσσαλονίκη, 18-20 Σεπτεμβρίου 2009. Δημοσίευση της περίληψης στην Περιγεννητική Ιατρική & Νεογνολογία, 2009; 4(3):25

Mantas N, SifakisS,Kappou D, Papadopoulou E, Koutroulakis D, **Fragkiadaki P**, Florentin L, Pangalos K, Velissariou V, Matalliotakis I.

Chromosomal rearrangements and minorstructural variations in prenatal diagnosis. 7th European Cytogenetics Conference, Stockholm Sweden, 4-7 July 2009. Publication of abstract in Chromosome Res 2009;17(suppl 1):229

Περσεφόνη Φραγκιαδάκη, Νίκος Σουλιτζής, Δημήτρης Κουτρουλάκης, Κώστας Ξανθάκης, Γιάννης Κοκολάκης, Βίκτωρ Γκούρβας, Νίκος Βραχνής, Δημήτριος Α. Σπαντίδος, Σταύρος Σηφάκης,

'Μειωμένη έκφραση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε κυήσεις που επιπλέκονται με προεκλαμψία', Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής και Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2015

Βραβεία

1. Procter&Gamble. Βραβείο καλύτερης ερευνητικής πρότασης, 2011: 'Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων του σηματοδοτικού μονοπατιού NOTCH σε πλακούντα κυήσεων που επιπλέκονται με προεκλαμψία και ενδομήτρια καθυστέρηση της εμβρυικής ανάπτυξης'
2. Πανελλήνιο Συνέδριο Μαιευτικής & Γυναικολογίας, 28-31 Μαΐου 2015. Βραβείο καλύτερης επιστημονικής εργασίας: 'Μειωμένη έκφραση του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch σε κυήσεις που επιπλέκονται με προεκλαμψία'

Συμμετοχή σε ερευνητικά προγράμματα

2010-σήμερα, τίτλος προγράμματος: 'Τοξικολογική διερεύνηση δειγμάτων Υπουργείου Δικαιοσύνης και μελέτη πολυμορφισμών και συσχετισμός με την απορρόφηση τοξικών ουσιών. (Κ.Α. 3464)

Παρουσία σε Συνέδρια/Σεμινάρια

Προγεννητικός Έλεγχος και Γενετική Προσέγγιση Σκελετικών Δυσπλασιών, Ηράκλειο, Οκτώβριος 2006

2ο Aegean Meeting on Neurologic Therapeutics, Ηράκλειο, Μάιος 2006

2ο Συνεδριο Παθολογίας- Σύγχρονες τάσεις στην Παθολογία, Ηράκλειο, Νοέμβρης 2005

1st Russian-Hellenic Symposium, Ηράκλειο, Μάιος 2010

XII International Congress of Toxicology, Βαρκελώνη, Ισπανία, Ιουλ 2010

Basic Toxicology Course, Ηράκλειο, Οκτώβριος 2010

Ενδομήτρια καθυστέρηση της αύξησης, Ημερίδα, Ηράκλειο, Δεκέμβρης 2010

Eurotox, Βαρκελώνη, Ιούλιος 2010

Bionanotox, Ηράκλειο, Μάιος 2011

Advanced Toxicology course, Τουρκία, Νοέμβριος 2011

Bionanotox, Ηράκλειο, Μάιος 2012

Eurotox, Στοκχόλμη, Ιούνιος 2012

Bionanotox, Ηράκλειο, Μάιος 2013

Bionanotox, Ηράκλειο, Μάιος 2014

Eurotox, Edinburgh, Σεπτέμβριος 2014

Bionanotox, Ηράκλειο, Μάιος 2015

Ξένες Γλώσσες

Πολύ καλά αγγλικά (γραπτά και προφορικά), επίπεδο: 'Lower'

Υπολογιστές

Κάτοχοςδιπλώματος ECDL (Windows, Word, Excel, Internet, Power Point, Access). Εκτεταμένες γνώσεις σεImageAnalysisProgram/ Image J.