



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑ ΜΗΤΕΡΑΣ-ΠΑΙΔΙΟΥ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ
ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΡΟΛΑΚΗ

**Επιβλέπων:
Επικ. Καθ. Μακρυγιαννάκης Α.**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗΣ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΗΤΕΡΑΣ ΠΑΙΔΙΟΥ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ, ΤΗΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΚΑΙ
ΤΟΥ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΜΟΡΙΩΝ ΣΥΝΑΦΕΙΑΣ
ΣΕ ΚΟΚΚΩΔΗ ΚΥΤΤΑΡΑ ΤΗΣ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΩΟΘΗΚΗΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ ΡΟΛΑΚΗ

**Επιβλέπων:
Επικ. Καθ. Μακρυγιαννάκης Α.**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007

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)

**Στους γονείς μου, τον αδερφό μου και
την Αντούλα, που είναι πάντα δίπλα
μου.**

Ευχαριστίες

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και την ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, Επίκουρο Καθηγητή Αντώνη Μακρυγιαννάκη, ο οποίος συνέβαλε καθοριστικά στην διεκπεραίωση της εργασίας και από την πρώτη στιγμή με στήριξε και με εμπιστεύθηκε.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά:

Τον Καθηγητή Αχιλλέα Γραβάνη, για τις συμβουλές του και την συνεχή στήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

Τον Επίκουρο καθηγητή Χρήστο Τσατσάνη, που ως μέλος της τριμελούς επιτροπής συνέβαλε στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Τα υπόλοιπα μέλη της 7μελούς επιτροπής μου: Καθηγητές Ανδρέα Μαργιωρή, Χρήστο Στουρνάρα, Επίκουρο Καθηγητή Γιώργο Λιαπάκη και την Λέκτορα Λίτσα Παπακωνσταντή.

Τους συνεργάτες μου, Γιώργο Πέτσα, Βασίλη Μηνά και Ειρήνη Ταλιούρη, για την συνεχή βοήθειά τους και τον γόνιμο διάλογο στην καθημερινή εργαστηριακή πράξη, καθώς και τους, Γιάννη Χαραλαμπίδου, Ιάκωβο Λαζαρίδη, Αριάδνη Ανδρουλιδάκη και Όλγα Ρασούλη, για τις συμβουλές και την βοήθειά που μου πρόσφεραν όταν χρειάστηκε.

Τους συνεργάτες από το τμήμα Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Πανεπιστημίου της Πενσυλβανίας, DeLisser HM., Κούκος Γ. και Κουτίφαρης Χ., για τις συμβουλές και την βοήθειά τους.

Τη γραμματέα του Τομέα Μητέρας-Παιδιού, Βαγγελιώ Ευδάκη και την γραμματεία Μεταπτυχιακών Σπουδών, Κατερίνα Τζωράκη, Δέσποινα Σπυριδάκη και Σοφία Φλουρή.

Ιδιαίτερα, ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Βάσω και Κώστα, τον αδερφό μου Γιάννη, την αδερφική μου φίλη και συγκάτοικο Άντα και τους φίλους μου, Μαρία, Μαρίνα, Αντώνη, Γιώργο, Γιάννη και τελευταίο αλλά σημαντικότερο τον Ανδρέα, που μου συμπαραστάθηκαν σε όλη την πορεία ολοκλήρωσης της διατριβής μου και έκαναν την διαμονή μου στην Κρήτη μία εμπειρία ζωής. Τους εύχομαι καλή επιτυχία στις σπουδές τους, κυρίως όμως στη ζωή τους.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα: Αλεξάνδρα
Επώνυμο: Ρολάκη
Πατρώνυμο: Κωνσταντίνος
Ημερομηνία γεννήσεως: 25 Μαρτίου 1980
Τόπος γεννήσεως: Αθήνα
Διεύθυνση κατοικίας: Ηράκλειο Κρήτης
Τηλέφωνο εργασίας: 281-0-394598
E-mail: rolakianda@yahoo.gr

Εκπαίδευση

2003 Πτυχίο Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών,
Τμήμα Βιολογίας
2004-2007 Εκπόνηση διδακτορικής διατριβής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή
Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά
Γερμανικά

Δημοσιεύσεις

Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D and Makrigiannakis A. (2005)
Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role
for apoptosis. *Reprod.Biomed. Online.* 11: 93-103

Rolaki A, Coukos G, Loutradis D, DeLisser M.H, Coutifaris C, and Makrigiannakis A.
(2007) Luteogenic Hormones Through a VEGF-dependent Mechanism Up-regulate
 $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ Integrins which Promote the Migration and Survival of Human Luteinized
Granulosa Cells. *Am J Pathol.* 107: 1561-1572

Minas V*, **Rolaki A***, Kalantaridou SN, Sidiropoulos J, Mitrou S, Petsas G, Jeschke U,
Paraskevaïdis EA,
Fountzilias G, Chrousos GP, Pavlidis N and Makrigiannakis A.(2007) Intratumoral
CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation.
British J Cancer.

*These two authors contributed equally

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1) **A. Rolaki**, A. Makrigiannakis.

Luteogenic hormones up-regulate $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ Integrins which Promote the Migration and Survival of Human Luteinized Granulosa Cells

2) A. Anifantaki, I. Magarakis, **A. Rolaki**, E. Koumantakis, M. Fraidakis, A. Makrigiannakis.

Study of the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ during embryo development.

3) **A. Rolaki**, A. Makrigiannakis.

Οι ωχρινικές ορμόνες (LH/hCG) επάγουν την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, μέσω ενός VEGF-εξαρτώμενου μηχανισμού, προάγοντας με αυτόν τον τρόπο την επιβίωση και την μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων αυτών.

4) Καραμούτη Μ, **Ρολάκη Α**, Βαρδάκη Ε, Πέτσας Γ, Μηνάς Β, Μακρυγιαννάκης Α.

Ο CRH παράγοντας, που παράγεται από τα κύτταρα του ωθητικού καρκίνου, διευκολύνει την ανοσο-διαφυγή των κυττάρων αυτών, μέσω ρύθμισης της έκφρασης του FasL.

Συντμήσεις

- AIF:** Apoptosis inducing factor (Παράγοντα Επαγωγής της Απόπτωσης)
ANOVA: Analysis of variance (Ανάλυση διασποράς)
Apaf1: Apoptosis-activating factor (Παράγοντας Επαγωγής της απόπτωσης)
BSA: Bovine serum albumin Fraction V (Αλβουμίνη ορού βοός)
bFGF: basic fibroblast growth factor (βασικός Αναπτυξιακός Παράγοντας Κυττάρων του Συνδετικού ιστού)
Cki: Cyclic-kinase inhibitor (Αναστολέας της κυκλικής κινάσης)
CL: Corpus Luteum (ωχρό σωματίο)
DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (τετραϋδροχλωρική 3,3'-διαμινοβενζιδίνη)
DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindole (Διχλωριούχο 4',6-Διαμιδινο-2-φαινιλινδόλη)
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Θρεπτικό Υλικό)
DMSO: Dimethyl sulfoxide (Διμεθυσουλφοξύδιο)
DNA: Desoribonucleic acid (Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ)
DNase I: Deoxyribonecluase I (Δεοξυριβονουκλεάση τύπου I)
dNTP: Deoxyribonucleoside triphosphate (Τριφωσφορικό δεοφυριβονουκλεοσίδιο)
DRs: Death receptors (Υποδοχείς θανάτου)
ECM: Extracellular matrix (Εξωκυττάριος χώρος)
EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ)
ELISA: Enzyme-linked immunoabsorbent assay (Ενζυμοσύνδετη ανοσοπροσοφορική μέτρηση)
EGF: Epidermal growth factor (Επιδερμικός αναπτυξιακός παράγοντας)
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
FACS: Fluorescence activated cell sorter (Κυτταρομετρητής ροής)
FADD: Fas-associated death domain (Σχετιζόμενη με το Fas αλληλουχία κυτταρικού θανάτου)
FasL: Fas Ligand (Προσδέτης του Fas υποδοχέα)
FBS: Fetal bovine serum (Ορός εμβρύου βοός)
FCS: Fetal Calf Serum (Ορός εμβρύου βοός)
FITC: Fluorescein isothiocyanate (Ισοθειοκυανιούχος φλουοροσκεΐνη)
FSH: Follicle stimulating hormone (Θυλακιοτρόπου ορμόνης)
FSH-RH: Follicle-stimulating hormone-Releasing hormone (Εκλυτική Ορμόνη της Θυλακιοτρόπου Ορμόνης)
Flk-1: Fetal liver kinase-1
Flt-1: fms-like tyrosine kinase 1
Flt-4: fms-like tyrosine kinase 4
FN: Fibronectin (Φιμπρονεκτίνη)
GC: Granulosa cells (κοκκώδη κύτταρα)
GnRH: Gonadotropin releasing hormone (Εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών)
GPI: Glycosyl-phosphatidyl-inositol
hCG: human chorionic gonadotropin (Ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη)
HBSS: Hanks Balanced Salt Solution (Διάλυμα αλάτων)
HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (N-2 υδροξεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ)
HLA-DR: Human leukocyte antigen-DR (Ανθρώπινο αντιγόνο λευκοκυττάρων-DR)
HRP: Horseradish Peroxidase (Υπεροξειδάση του ραπανιού)

IAP: Inhibitor of apoptosis protein (Παράγοντας Αναστολής της Απόπτωσης) **IgCAM:** Immunoglobulin cell adhesion molecule (Ανοσοσφαιρίνες, μόρια συνάφειας)

IGF: Insulin growth factor (Αναπτυξιακός Παράγοντας Ινσουλίνης)

IL-1: Interleukin-1 (Ιντερλευκίνη 1)

IRS: Immuno-reactive score (Ανοσοδραστική βαθμολογία)

IU: International Units

JNK: Jun N-terminal Kinase

kb: kilobases

kDa: Kilodalton

KDR: kinase domain region

LH: Luteinizing hormone (Ωχρινοποιητική Ορμόνη)

LH-RH: Luteinizing hormone- Releasing hormone (Εκλυτική Ορμόνη της Ωχρινοποιητικής Ορμόνης)

LL: Large luteal cells (Μεγάλα Ωχρινικά Κύτταρα)

LN: Laminin (Λαμινίνη)

MAPK: Mitogen-activated protein kinase (Πρωτεϊνική κινάση που ενεργοποιείται από μιτογόνα σήματα)

mAbs: Monoclonal antibodies (Μονοκλωνικά αντισώματα)

MFI: Mean fluorescent intensity (Μέση ένταση φθορισμού)

mRNA: messenger RNA (αγγελιαφόρο RNA)

NFkB: Nuclear Factor kB (Πυρηνικός παράγοντας kB)

PIGF: Placental growth factor (Πλακουντιακός Αναπτυξιακός Παράγοντας)

P13K: Phosphoinositide 3'-OH kinase

PBS: Phosphate Buffer Saline (Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών)

PECAM-1: Platelet endothelial growth factor (Αναπτυξιακός Παράγοντας των Αιμοπεταλίων)

PI: Propidium Iodide (Ιωδιούχο προπίδιο)

PLL: poly-L-lysine (πολύ-L-λυσίνη)

PGF_{2a}: prostaglandin F 2a (Προσταγλανδίνη F2a)

RNA: Ribonucleic Acid (Ριβονουκλεϊκό οξύ)

RPM: Rounds per min. (Στροφές ανά λεπτό)

RPMI: RPMI Medium 1640 (Θρεπτικό υλικό)

RTKs: Tyrosine-kinase receptor (Υποδοχέα κινάσης της τυροσίνης)

SDS: Sodium dodecyl sulfate (Μετά νατρίου άλας του θειικού δωδεκυλίου)

SE: Standard error of mean (Τυπικό σφάλμα μέσων όρων)

TdT: (Δεοξυνουκλεοτιδυλο-τρανσφεράση)

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylenediamine (N,N,N',N'-Τετρα-μεθυλενο αιθυλοδιαμίνη)

TNF: Tumor Necrosis Factor (Ογκονεκρωτικός παράγοντας)

TRIS: Tris (hydroxymethyl) aminomethan (Τρις-υδροξυ μεθυλ αμινομεθάνιο)

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (in situ χρώση του 3'-OH άκρου μονών αλυσίδων του γενετικού υλικού)

VEGF: Vascular endothelial growth factor (Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αναπτυξιακός παράγοντας)

VEGFR: Vascular endothelial growth factor-receptor (Υποδοχέας του Αγγειακού Ενδοθηλιακού Αναπτυξιακού παράγοντα)

VPF: Vascular permeability factor (Παράγοντας Αγγειακής Διαπερατότητας)

VN: Vitronectin (Βιτρονεκτίνη)

Περίληψη

Ο σχηματισμός του ωχρού σωματίου (CL) αποτελεί βασική λειτουργία για την επιτυχή έκβαση της εγκυμοσύνης. Την φάση της ωοθυλακιορρηξίας, ακολουθεί η ανάπτυξη του CL από τα υπολείμματα του ρηχθέντος θυλακίου, μία διαδικασία που ελέγχεται από τις ωχρινοποιητικές ορμόνες. Κατά την φάση αυτή, τα κύτταρα που συνιστούν το ωχρό σωματίο υφίστανται έντονες τροποποιήσεις, που απαιτούν πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του κυττάρου και του εξωκυττάρου χώρου, η πλειονότητα των οποίων παραμένει ασαφής.

Τα μόρια συνάφειας, και ιδιαίτερα οι ιντεγκρίνες, διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο σε φυσιολογικές λειτουργίες ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών συστημάτων. Η πρόσδεση των ιντεγκρινικών υποδοχέων στους αντίστοιχους εξωκυττάρους προσδέτες τους έχει ήδη αποδειχτεί ότι προάγει την κυτταρική κίνηση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση, σε πολλούς διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Επιπροσθέτως, οι ιντεγκρίνες συμμετέχουν σε αρκετές σημαντικές λειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης της γονιμοποίησης, της εμφύτευσης του εμβρύου και της αναδιάταξης του πλακούντα. Πιο πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι η ιντεγκρινική δραστηριότητα ελέγχεται, σε πολλές περιπτώσεις, από την ωχρινοποιητική ορμόνη, χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG), καθώς και από τον μιτογενετικό παράγοντα (VEGF).

Στα πλαίσια διερεύνησης του ρόλου των κυτταρικών αλληλεπιδράσεων με τα μόρια του εξωκυττάρου χώρου στην διαδικασία δημιουργίας του CL, μελετήσαμε την έκφραση μία εξωκυττάριας πρωτεΐνης, της φιμπρονεκτίνης (FN) και επιλεγμένων FN-προσδεδόμενων ιντεγκρινών σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα (GCs). Επιπλέον, ερευνήσαμε πιθανή ρύθμιση της έκφρασης αυτής από την hCG, καθώς και την ενδεχόμενη συμμετοχή του VEGF παράγοντα στην ίδια διαδικασία. Βασιζόμενοι στα προκύπτοντα αποτελέσματα, επεκτείναμε την έρευνά μας, μελετώντας τον ρόλο των προαναφερόμενων ιντεγκρινών στις διαδικασίες προσκόλλησης, μετανάστευσης και απόπτωσης των ωχρινοποιημένων GCs.

Στην παρούσα εργασία αποδείχτηκε ότι η FN ανιχνεύεται στον εξωκυττάρου χώρο των ωχρινοποιημένων GCs, ενώ ταυτόχρονα, οι FN-προσδεδόμενες ιντεγκρίνες και ο υποδοχέας του VEGF (Flt-1) εκφράζονται στην κυτταρική τους επιφάνεια, μόνο στα πρώτα στάδια της ωχρινικής φάσης. Η έκφραση αυτή μειώνεται σημαντικά στα τελευταία στάδια της ωχρινικής φάσης, ταυτόχρονα με την ωχρινολυτική διαδικασία.

Επιπλέον, βρέθηκε ότι τα GCs εκκρίνουν FN, μία λειτουργία που επηρεάζεται από την hCG. Η ορμόνη αυτή αυξάνει και την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης της FN, που δεσμεύεται στην κυτταρική επιφάνεια. Επανάληψη των αποτελεσμάτων παρατηρήθηκε και μετά από διέγερση των κυττάρων με VEGF, ενώ η προσθήκη αντι-VEGF αντισώματος οδηγούσε σε αναστολή της hCG-επαγόμενης αύξησης της έκφρασης. Εν συνεχεία, βρέθηκε ότι οι $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες ελέγχουν την κυτταρική σύνδεση με την FN του εξωκυττάριου χώρου, μία δυνατότητα που προωθεί την κυτταρική μετανάστευση και αναστέλλει την απόπτωση.

Συμπερασματικά, στην συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζονται νέα δεδομένα για την συμμετοχή των ιντεγκρινών στις διαδικασίες προσκόλλησης, μετανάστευσης και απόπτωσης των ωχρινοποιημένων GCs ανθρώπινης ωοθήκης, καθώς και για την ρύθμιση των επιδράσεων αυτών από την hCG και τον VEGF. Τα αποτελέσματά μας επομένως, υποδεικνύουν τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν τα προαναφερόμενα μόρια στην διαδικασία της δημιουργίας και διατήρησης του CL.

Summary

The formation of the corpus luteum (CL) is critical for the establishment of a successful pregnancy. Following ovulation, under the influence of luteogenic hormones, the CL develops from the remnants of the ovulated ovarian follicle. This process involves intense reorganization of constituent cells, phenomena that includes varying cell-matrix interactions. These events, however, are poorly characterized.

Adhesion molecules, especially integrins, have crucial role in the physiological functions of many different systems. Many studies, in the past, have established for several cell types that the binding of cell surface integrins to their ligands in the extracellular matrix facilitates cell proliferation, migration and survival. Integrins have also been found to participate in many important functions of the reproductive system, such as fertilization, interactions between the preimplantation embryo and endometrium as well as trophoblast outgrowth during implantation. Moreover, it has been demonstrated that activity of integrins was regulated by human chorionic gonadotropin (hCG) and vascular endothelial growth factor (VEGF).

In order to understand the role and potential regulation of cell-matrix interactions in the formation of the CL, we investigated the expression of the matrix protein fibronectin (FN) and selected FN-binding integrin receptors on luteinized granulosa cells (GCs). We further examined the possible regulation of that expression by the luteogenic hormone, hCG and the involvement of mitogenic VEGF. Lastly, we investigated the role of the aforementioned integrins in promoting the adhesion, migration and survival of GCs.

The present data reported that FN is detected around GCs with luteinization, while several FN-binding integrins, along with the VEGF receptor (Flt-1), appeared on the surface of these cells during the early luteal phase. Expression of these proteins declined in the late luteal phase with regression of the CL. In vitro, GCs released FN and stimulation of these cells with hCG, increased the surface expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins, as well as the amount of FN associated with the cell surface. These effects were reproduced by stimulation with VEGF and hCG-stimulated up-regulation of FN, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ on the surface of GCs was inhibited by anti-VEGF antibody. In addition, there has been shown that expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins mediates adhesion to FN, an ability that promotes cell movement and prevents apoptosis.

In conclusion, the present study reports new data on the role of integrins in migration, adhesion and apoptosis of human GCs, and the regulation of these processes

by the hCG and VEGF, and thus indicate the potential contribution of these molecules in formation and maintenance of the CL.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	1
1.1. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα	2
1.1.1. Η ωοθήκη	3
1.1.1.1. Η μορφολογία της ωοθήκης	3
1.1.1.2. Η φυσιολογία της ωοθήκης	4
1.1.1.3. Ανάπτυξη των ωοθυλακίων	6
1.2. Κυτταρικός θάνατος	11
1.2.1. Νέκρωση	11
1.2.2. Απόπτωση	12
1.2.2.1 Απόπτωση στην ωοθήκη	16
1.3. Κυτταρική συνάφεια	20
1.4. Ιντεγκρίνες	22
1.4.1. Ιντεγκρίνες και απόπτωση	24
1.4.2. Μηχανισμοί λειτουργίας των ιντεγκρινών	26
1.4.3. Ιντεγκρίνες και αναπαραγωγή	29
1.5. Βιολογικός ρόλος του VEGF	30
1.5.1. Η πρωτεΐνη	30
1.5.2. Οι υποδοχείς	31
1.5.3. Η λειτουργία	33
1.6. Ρόλος του VEGF στην φυσιολογία της ωοθήκης	34
1.6.1. Θυλακιακή φάση	34
1.6.2. Ωχρινική φάση	36
2. Ερευνητικό Ερώτημα	38
3. Υλικά και μέθοδοι	41

3.1. Πρωτογενής καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων ανθρώπινης ωοθήκης	42
3.1.1. Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων από θυλακιακό υγρό	42
3.2. Επίστρωση επιφανειών με μόρια του εξωκυττάρου χώρου	44
3.3. Ανοσοανίχνευση	45
3.3.1. Ανοσοϊστοχημεία	45
3.3.2. Ανοσοφθορισμός με μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy)	47
3.4. Κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης	49
3.5. Κυτταρική προσκόλληση	51
3.5.1. Κυτταρική προσκόλληση σε επιφάνειες επιστρωμένες με προσδέτες του εξωκυττάρου χώρου	51
3.5.2. Κυτταρική προσκόλληση σε επιφάνειες επιστρωμένες με ακινητοποιημένα αντισώματα κατά των ιντεγκρινών	53
3.6. Μέτρηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων	54
3.7. Μελέτη της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων	55
3.7.1. <i>in situ</i> χρώση του 3' - OH άκρου μονών αλυσίδων του γενετικού υλικού (TUNEL assay)	56
3.7.2. Ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης	57
3.7.2.1. Ηλεκτροφόρηση	58
3.7.3. Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό του DNA περιεχομένου	59
3.8. Ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης VEGF με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA	60
3.9. Στατιστική ανάλυση	61
4. Αποτελέσματα	63
4.1. Έκφραση της φιβρονεκτίνης και των υποδοχέων της (ιντεγκρινών) στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης.	64
4.1.1. Έκφραση σε τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης	64
4.1.2. Έκφραση της φιβρονεκτίνης και των υποδοχέων της $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$ σε κοκκώδη κύτταρα <i>in vitro</i>	66

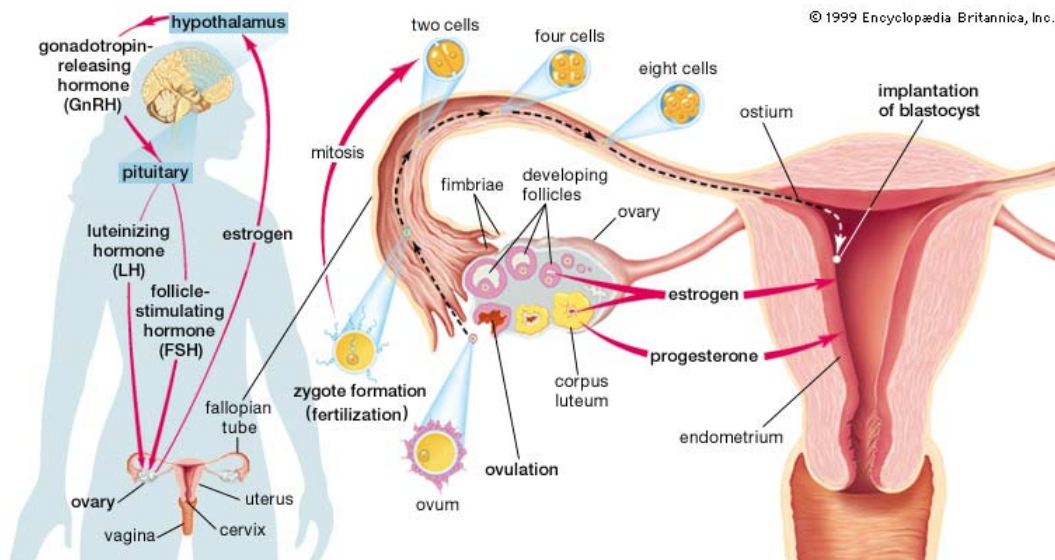
4.2. Η hCG αυξάνει την έκφραση της FN και των FN-συνδεόμενων ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων	70
4.3. Ρύθμιση της έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων από τον VEGF παράγοντα.	72
4.3.1. Η hCG αυξάνει την συγκέντρωση του VEGF σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων.	72
4.3.2. Ο VEGF προκαλεί αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της FN και των υποδοχέων της $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων.	73
4.3.3. Το anti-VEGF αντίσωμα αναστέλλει την αύξηση στην έκφραση της FN, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_5$, η οποία επάγεται από την hCG.	75
4.3.4. Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τον VEGF-R1 (Flt-1) υποδοχέα.	76
4.3.4.1. Έκφραση του Flt-1 υποδοχέα σε τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης	77
4.3.4.2. Ο υποδοχέας Flt-1 εκφράζεται σε κοκκώδη κύτταρα <i>in vitro</i>	79
4.3.5. Η χοριακή γοναδοτροπίνη hCG αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του Flt-1.	80
4.4. Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων στον εξωκυττάριο προσδέτη τους (FN).	81
4.4.1. Η hCG αυξάνει την ικανότητα προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων σε επιφάνειες επιστρωμένες με φιμπρονεκτίνη.	81
4.4.2. Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων στην φιμπρονεκτίνη αναστέλλεται από αντισώματα ειδικά για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες.	83
4.5. Η hCG διεγείρει την μετανάστευση των GCs πάνω σε φιμπρονεκτίνη, η οποία αναστέλλεται από αντισώματα ειδικά για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες.	85
4.6. Η αντι-αποπτωτική δράση της $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινο-εξαρτώμενης προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων στο υπόστρωμά τους.	86
4.6.1. Η $\alpha_5\beta_1$ - και $\alpha_v\beta_3$ -εξαρτώμενη προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε FN υπόστρωμα αναστέλλει την απόπτωσή τους.	87
4.6.2. Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε ενεργοποιημένα αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα έχει αντι-αποπτωτική δράση	90
5. Συζήτηση	92
5.1. Γενικά	93

5.2. Η έκφραση της FN και των ιντεγκρινικών της υποδοχέων σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα επάγεται από την hCG	95
5.3. Η δράση της hCG στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα μεσολαβείται από τον VEGF παράγοντα	98
5.4. Η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλληση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων στο υπόστρωμα σχετίζεται με την ωχρινοποίησή τους	101
5.5. Η αλληλεπίδραση μεταξύ της FN και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της επιφάνειας των κοκκωδών κυττάρων ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση	103
5.6. Η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλληση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης αναστέλλει την απόπτωσή τους	105
5.7. Προοπτικές	110
6. Βιβλιογραφία	112

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα

Το θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα του ανθρώπου αποτελείται από δύο σημαντικά μέρη (**Εικόνα 1**) : τον κόλπο και την μήτρα, που λειτουργούν ως χώρος αποθήκευσης του σπέρματος, και τις ωοθήκες, οι οποίες παράγουν το ωάριο. Ο κόλπος συνδέεται εξωτερικά με το αιδοίο, το οποίο αποτελείται ακολούθως από τα χείλη, την κλειτορίδα και την ουρήθρα. Εσωτερικά, η σύνδεση του κόλπου με την μήτρα γίνεται μέσω του τραχήλου, και αυτή με την σειρά της συνδέεται με τις ωοθήκες μέσω των σαλπίγγων. Σε καθορισμένες χρονικές περιόδους, οι ωοθήκες απελευθερώνουν ένα ωάριο, το οποίο καταλήγει στην μήτρα, διαπερνώντας τις σάλπιγγες. Στην περίπτωση που το ωάριο συναντήσει το σπέρμα κατά την διάρκεια αυτής της πορείας, τότε πραγματοποιείται η γονιμοποίηση. Η γονιμοποίηση συνήθως πραγματοποιείται στις σάλπιγγες, αλλά σπανιότερα συμβαίνει και στην μήτρα. Το ζυγωτό, το οποίο δημιουργείται από αυτήν την διαδικασία, εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας, όπου και ξεκινάει η εμβρυογένεση. Όταν η ανάπτυξη του εμβρύου εξελιχθεί αρκετά, ώστε αυτό να μπορεί να επιβιώσει έξω από την μήτρα, τότε πραγματοποιείται διεύρυνση του τραχήλου και οι ταυτόχρονες συσπάσεις της μήτρας προωθούν το έμβρυο προς τον κόλπο, από όπου και θα εξέλθει.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του θηλυκού ανθρώπινου αναπαραγωγικού συστήματος και της ρύθμισής του από την υπόφυση.

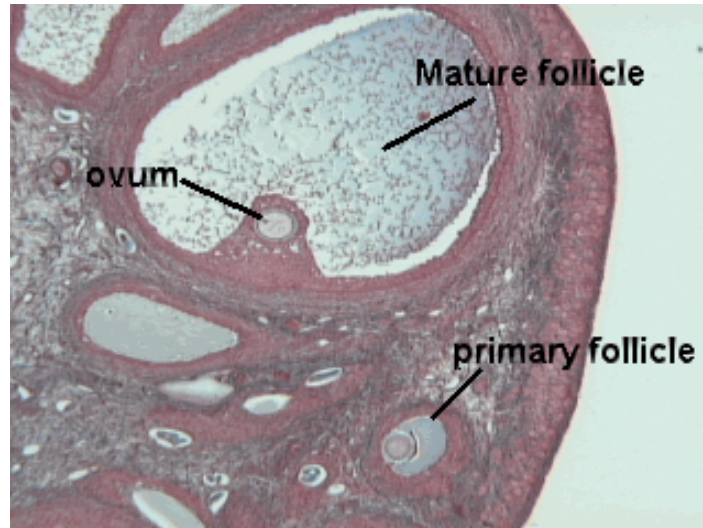
Η δραστηριότητα του γυναικείου γεννητικού συστήματος βρίσκεται υπό τον έλεγχο του υποθαλάμου και της υπόφυσης, δύο μικρών αδένων που ανήκουν στο ενδοκρινικό σύστημα. Από την εφηβεία και μετά ο υποθάλαμος παράγει με κυκλικό τρόπο δύο ορμόνες, την FSH-RH και την LH-RH, οι οποίες ενεργούν στην υπόφυση διεγείροντας την έκκριση των γοναδοτροπινών ορμονών FSH και LH. Βασικός ρόλος των γοναδοτροπινών είναι η ρύθμιση της λειτουργίας των θηλυκών γονάδων, ωοθηκών, διεγείροντας κυκλικά την ανάπτυξη ορισμένων ωοθυλακίων, και την ωοθυλακιόρρηξη. Η κατάσταση αυτή είναι γνωστή σαν “ωοθηκικός κύκλος”. Οι ανθρώπινες ωοθήκες είναι υπεύθυνες για την διαφοροποίηση και απελευθέρωση του ώριμου ωοκυττάρου στην είσοδο της σάλπιγγας και την παραγωγή των γυναικείων στεροειδών ορμονών (οιστρογόνα και προγεστερόνη). Με την σειρά τους οι στεροειδείς αυτές ορμόνες, μεταξύ άλλων, προετοιμάζουν την μήτρα για την εμφύτευση του εμβρύου σε περίπτωση ενδεχόμενης γονιμοποίησης, κατάσταση που είναι γνωστή σαν “καταμήνιος κύκλος”.

1.1.1. Η Ωοθήκη

1.1.1.1 Η μορφολογία της ωοθήκης

Οι ωοθήκες είναι δύο αδενικά όργανα σε σχήμα αμυγδάλου, μήκους 3-4 εκατοστών και πλάτους περίπου 2 εκατοστών, στην ενήλικη γυναίκα. Είναι τοποθετημένες συμμετρικά στο κάτω μέρος της πυελικής κοιλότητας και στις δύο πλευρές της μήτρας, καθεμία κάτω από την αντίστοιχη σάλπιγγα και στηρίζονται σε αυτήν την θέση με διάφορους συνδέσμους. Κάθε ωοθήκη αποτελείται από τρεις ζώνες: (α) την περιφερική (φλοιός), που περιέχει τα αναπαραγωγικά κύτταρα, καθένα από τα οποία εγκλείεται σε ένα ωοθυλάκιο, (β) τον μυελό και (γ) την πύλη. Ο μυελός και η πύλη σχηματίζονται κυρίως από συνδετικό ιστό και περιέχουν τα αιμοφόρα αγγεία που αιματώνουν το όργανο. Ο φλοιός επενδύεται από έναν κυτταρικό χιτώνα, το βλαστικό επιθήλιο, κάτω από το οποίο υπάρχει μία λεπτή ινώδης μεμβράνη, γνωστή ως ινώδης χιτώνας. Εσωτερικά του χιτώνα αυτού βρίσκεται η φλοιώδης ουσία, η οποία σχηματίζεται από πολυάριθμα κύτταρα και συνδετικές ίνες και περιέχει τις βασικές λειτουργικές δομές του οργάνου, τα ωοθυλάκια (**εικόνα 2**). Κάθε ωοθυλάκιο αποτελείται από το ωοκύτταρο, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης, που το περιβάλλουν. Τα κοκκώδη και τα κύτταρα θήκης παράγουν ορμόνες

και άλλες ουσίες, που πραγματοποιούν τοπική δράση και ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ωαρίου και την επακόλουθη έξοδό του από την ωοθήκη. Οι συγκεκριμένες ορμόνες εκκρίνονται επίσης στο αίμα και δρουν στους ωαγωγούς, στη μήτρα, στον κολεό, στους μαστούς, στον υποθάλαμο, στην υπόφυση, στον συνδετικό ιστό, στο ήπαρ, στους νεφρούς και στα οστά. Πολλές από αυτές τις ενδοκρινικές δράσεις, έχει διαπιστωθεί ότι προάγουν την διεργασία της αναπαραγωγής.



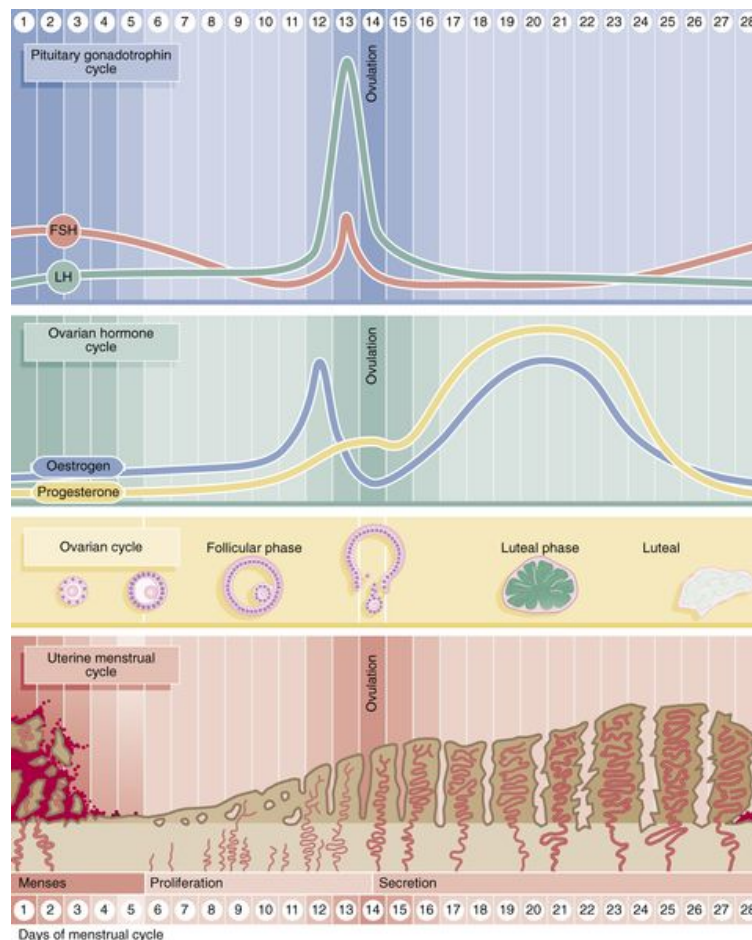
Εικόνα 2. Βιοψία της ανθρώπινης ωοθήκης στην οποία παρουσιάζονται το ωάριο και οι βασικές λειτουργικές δομές του οργάνου (πρωτογενές και ώριμο ωοθυλάκιο).

1.1.1.2. Η Φυσιολογία τη ωοθήκης

Κάθε ωοθηκικός κύκλος επιφέρει κάποιες χαρακτηριστικές διακυμάνσεις των επιπέδων των ωοθηκικών στεροειδών ορμονών, των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, οι επιδράσεις των οποίων γίνονται αισθητές σε όλο τον οργανισμό και ιδιαίτερος στην μήτρα (**εικόνα 3**). Εκ των πραγμάτων, η μήτρα είναι υπεύθυνη για την υποδοχή του προϊόντος της ενδεχόμενης γονιμοποίησης και σε αντιστοιχία με κάθε ωοθηκικό κύκλο, πρέπει να προετοιμαστεί για μια τέτοια πιθανότητα.

Κάθε καταμήνιος κύκλος υποδιαιρείται σε τρεις φάσεις: Η ωοθυλακική φάση ξεκινάει με την έναρξη της εμμηνορρυσίας και διαρκεί 15 περίπου ημέρες. Ακολουθεί η φάση της ωοθυλακιορρηξίας διάρκειας 1-3 ημερών και τελευταία είναι η ωχρινική φάση 13-14 ημερών, η οποία τελειώνει με την έναρξη της επόμενης

εμμηνορρυσίας. Οι βασικοί ρυθμιστές του κύκλου είναι οι γοναδοτροπίνες, FSH και LH, η παραγωγή των οποίων μεταβάλλεται ανάλογα με την φάση. Συγκεκριμένα, τα επίπεδα των FSH και LH στο πλάσμα είναι ιδιαίτερα χαμηλά λίγο πριν την έναρξη της ωοθυλακικής φάσης. Η συγκέντρωση της FSH στο πλάσμα αρχίζει να αυξάνει σταδιακά λίγο πριν την έναρξη της εμμηνορρυσίας, μία αύξηση που διατηρείται κατά το πρώτο μισό της ωοθυλακικής φάσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της LH ξεκινάει λίγο αργότερα αλλά συνεχίζει σε όλη την διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης, ενώ τα επίπεδα της FSH κατέρχονται στο δεύτερο μισό της φάσης αυτής. Ανάλογη αύξηση παρατηρείται και στα επίπεδα της οιστραδιόλης, η παραγωγή της οποίας κορυφώνεται λίγο πριν την φάση της ωοθυλακιορρηξίας. Η κορύφωση αυτή συνεπάγεται την μείωση των επιπέδων της FSH, ενώ η LH συνεχίζει να αυξάνεται. Την ίδια περίοδο παρατηρείται και αύξηση των επιπέδων της προγεστερόνης. Η φάση της ωοθυλακιορρηξίας που ακολουθεί χαρακτηρίζεται από μία μεγάλη παροδική κορύφωση των επιπέδων της LH (αιχμή της LH) του πλάσματος, που συνοδεύεται από μία μικρότερη κορύφωση της FSH. Σαφείς ενδείξεις οδηγούν στην υπόθεση ότι η απότομη αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροπινών ρυθμίζεται τόσο από τις ωοθήκες, όσο και από την λειτουργία της υπόφυσης. Κατά την ωχρινική φάση, η αρνητική ανάδραση από το ωχρό σωματίο προκαλεί πτώση των επιπέδων των FSH και LH, τα οποία φτάνουν στο κατώτατο σημείο τους κατά το τέλος της φάσης αυτής. Χαρακτηριστικό της ωχρινικής φάσης είναι η εξαιρετική αύξηση της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης, που προέρχονται από το ωχρό σωματίο. Εάν δεν πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση, το ωχρό σωματίο εκφυλίζεται, οι συγκεντρώσεις προγεστερόνης και οιστραδιόλης μειώνονται δραστικά, αυξάνεται η έκκριση της FSH και ξεκινάει η επόμενη εμμηνορρυσία.

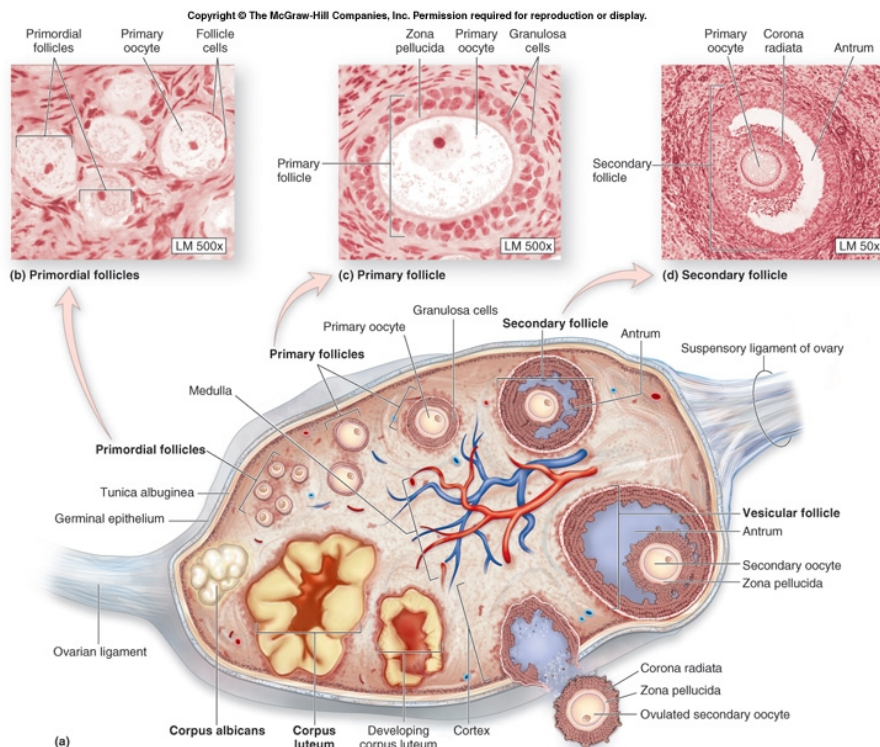


Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της φυσιολογίας ενός τυπικού καταμήνιου κύκλου διάρκειας 28 ημερών. Από πάνω προς τα κάτω απεικονίζονται οι διακυμάνσεις στα επίπεδα των γοναδοτροπινών στο πλάσμα, τα επίπεδα των στεροειδών ορμονών της ωοθήκης στο πλάσμα, οι διαδοχικές μεταβολές κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και οι μεταβολές του ενδομητρίου.

1.1.1.3. Ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Την στιγμή της γέννησης, οι φυσιολογικές ανθρώπινες ωοθήκες περιέχουν αρκετές χιλιάδες πρωτογενή ωοθυλάκια, καθένα από τα οποία φιλοξενεί ένα πρωτογενές ωοκύτταρο (Grazul-Bilska et al. 1997). Αυτά δημιουργούνται κατά την εμβρυϊκή ζωή και αμέσως μετά τον σχηματισμό τους η μειωτική διαίρεση διακόπτεται στο στάδιο της διπλοταινίας. Από την εφηβεία και μετά, υπό την επίδραση των γοναδοτροπινών, ξεκινάει η σταδιακή ωρίμανση των ωοθυλακίων μέσω αρχέγονων, πρωτογενών και δευτερογενών σταδίων. Συνήθως μόνο ένα

ωοθυλάκιο ολοκληρώνει την διαδικασία της ωρίμανσης, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Απλοποιημένη απεικόνιση της ωοθήκης. (α) Στο εσωτερικό του οργάνου παρουσιάζονται τα στάδια ωρίμανσης των ωοθυλακίων και του ωχρού σωματίου. (β) Αρχέγονο ωοθυλάκιο, το οποίο περιέχει το αρχέγονο γενετικό κύτταρο και περιβάλλεται από μία στοιβάδα κυττάρων. (γ) Πρωτογενές ωοθυλάκιο που περιβάλλεται από μία απλή στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων και περιέχει το πρωτογενές ωοκύτταρο. (δ) Δευτερογενές ωοθυλάκιο, στο οποίο έχει ήδη σχηματιστεί η κοιλότητα του άντρου και το οποίο περιβάλλεται από πολυάριθμες στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων.

Στον άνθρωπο, τα ωοθυλάκια διατηρούνται ανενεργά για αρκετά χρόνια στο στάδιο της διπλοταινίας, περιβαλλόμενα από μία μονή στοιβάδα κοκκωδών κυττάρων ατρακτοειδούς σχήματος. Καθώς τα κύτταρα αυτά διαιρούνται σχηματίζουν σταδιακά αρκετές στοιβάδες γύρω από το ωοκύτταρο και το σύμπλεγμα μετατρέπεται σε δευτερογενές ωοθυλάκιο, το οποίο έχει διάμετρο έως 150 μm. Το δεύτερο στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων ξεκινάει με την έναρξη του καταμήνιου κύκλου, κατά τον οποίο πραγματοποιείται σταδιακή ωρίμανση ενός μικρού αριθμού δευτερογενών ωοθυλακίων. Στα στάδιο αυτό δημιουργείται στο εσωτερικό των ωοθυλακίων μία

κοιλότητα, η οποία περιέχει θυλακιακό υγρό και ονομάζεται άντρο. Το υγρό του άντρου περιέχει ένα πολυσύνθετο σύμπλεγμα ουσιών, οι οποίες είτε εκκρίνονται από τα κοκκώδη και τα κύτταρα θήκης, είτε μεταφέρονται από το πλάσμα διαμέσου του κυτταροπλάσματος. Εντούτοις, μόνο μερικά από τα ωοθυλάκια αυτά θα αναπτυχθούν και θα ωριμάσουν, μέσω μιας διαδικασίας που ελέγχεται από αρκετούς ενδοκρινείς και παρακρινείς παράγοντες. Καθώς τα κοκκώδη κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, η διάμετρος του ωοθυλακίου αυξάνεται και φτάνει τα 2-5 mm και σχηματίζεται το προωοθυλακιόρρηκτικό ή γραφιανό ωοθυλάκιο. Το ωοκύτταρο μετατοπίζεται σε μία έκκεντρη θέση, ενώ τα κύτταρα θήκης σχηματίζουν δύο διακριτές στοιβάδες, την έσω και την έξω θήκη.

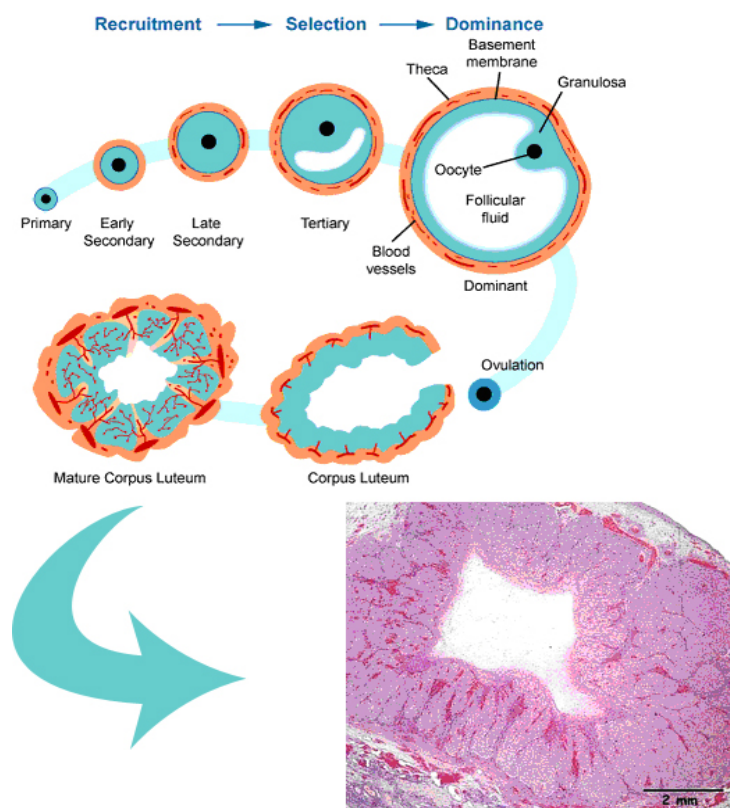
Στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων ένα από αυτά θα επιλεγεί για να ολοκληρώσει τελικά τον κύκλο ωρίμανσης και θα μετατραπεί σε κυρίαρχο ωοθυλάκιο. Αυτό υφίσταται ταχεία ανάπτυξη και φτάνει σε διάμετρο τα 10-20 mm, που οφείλεται στην μεγέθυνση των κοκκωδών κυττάρων και στην αυξημένη παραγωγή υγρού μέσα στο άντρο. Η κοιλότητα του άντρου στο στάδιο αυτό επικαλύπτεται από αρκετές στοιβάδες κοκκωδών κυττάρων, τα οποία συνηθίζονται να λέγονται κοκκώδης μεμβράνη (*membrana granulosa*) και περιβάλλονται από μία βασική μεμβράνη και εξωτερικές στοιβάδες κυττάρων θήκης, προερχόμενα από το στρώμα, τα οποία παράγουν τα στεροειδή (McGee & Hsueh, 2000). Η κοκκώδης μεμβράνη θεωρείται ένα ψευδο-επιθήλιο που η μία στοιβάδα του μόνο εφάπτεται στην βασική μεμβράνη, ενώ οι υπόλοιπες βρίσκονται σε συνεχή επαφή με το ωοκύτταρο. Σε μετέπειτα στάδια της ωρίμανσής του, το κυρίαρχο ωοθυλάκιο παράγει συνεχώς αυξανόμενες ποσότητες οιστραδιόλης. Η παραγόμενη ορμόνη επιδρά στο ενδομήτριο, ώστε να πραγματοποιηθεί αναγέννησή του και συμβάλλει στην μετατροπή της τραχηλικής βλέννας. Η ποσοτική αύξηση της οιστραδιόλης παρέχει επίσης το βασικό ερέθισμα για την πραγματοποίηση της αιχμής της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH), γεγονός που συντελεί στην ολοκλήρωση της ωρίμανσης του κυρίαρχου ωοθυλακίου, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί την ρήξη του και την απελευθέρωση του ωοκυττάρου (ωοθυλακιόρρηξία) στην περιτοναϊκή κοιλότητα. Στο σημείο αυτό ολοκληρώνεται η αρχική μειωτική διαίρεση του ωοκυττάρου. Το ένα από τα παραγόμενα ωοκύτταρα ελευθερώνεται μέσα στον ωαγωγό (σάλπιγγα), ενώ το άλλο καταστρέφεται. Η είσοδος του σπερματοζωαρίου στην σάλπιγγα ολοκληρώνει την δεύτερη μειωτική διαίρεση, με αποτέλεσμα την δημιουργία του απλοειδούς ωαρίου. Η ωοθυλακιόρρηξία πραγματοποιείται την 14^η ημέρα ενός καταμήνιου

κύκλου 28 ημερών. Τα υπόλοιπα ωοθυλάκια υφίστανται ατρησία μέσα στις ωοθήκες, η πραγματοποίηση της οποίας απαιτεί τον κυτταρικό θάνατο ή απόπτωση των κοκκωδών και των κυττάρων θήκης (Markstrom et al., 2002; Reynaud & Driancourt, 2000; Hsueh et al., 1994). Η τύχη κάθε ωοθυλακίου καθορίζεται από ένα πλήθος ενδοκρινικών και παρακρινικών παραγόντων (Gougeon, 1996).

Δομικές αλλαγές των κοκκωδών και των κυττάρων θήκης ακολουθούν την απελευθέρωση του ωαρίου, ενώ τα υπολείμματα του ρηχθέντος ωοθυλακίου, υπό την επίδραση της LH, σχηματίζουν μία άλλη ενδοκρινή μονάδα με αυξημένη αγγείωση, το ωχρό σωματίο, που τα κύρια συστατικά του είναι τα κοκκώδη κύτταρα (**Εικόνα 5**). Το υπόλοιπο ωχρό σωματίο αποτελείται από ωχρινοποιηθέντα κύτταρα θήκης, τα οποία διατάσσονται σε αναδιπλώσεις κατά μήκος της εξωτερικής επιφάνειας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή σαν ωχρινοποίηση, αρχίζει λίγο πριν από την ωοθυλακιορρηξία και επιταχύνεται αρκετά με την έξοδο του ωοκυττάρου από το ωοθυλάκιο. Κατά την διαδικασία αυτή η βασική μεμβράνη εξαφανίζεται, επιτρέποντας την είσοδο αγγείων για την άμεση αιμάτωση των κοκκωδών κυττάρων. Παράλληλα με τις δομικές τροποποιήσεις, τα κύτταρα του ωοθυλακίου υφίστανται και βιοχημικές αλλαγές. Υπό την συνεχή επίδραση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH) τα κύτταρα αυτά αυξάνουν σε μέγεθος και συσσωρεύουν λιπίδια και μία κίτρινη χρωστική, την ωχρίνη. Η βασική ορμόνη που παράγει το ωχρό σωματίο είναι η προγεστερόνη, η οποία επάγει την πραγματοποίηση των αναγκαίων τροποποιήσεων του ενδομητρίου που απαιτούνται για την δημιουργία του δεκτικού σταδίου, κατά το οποίο εμφυτεύεται το έμβρυο.

Η συνολική διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου είναι μικρή. Σε περίπτωση που δεν επέλθει σύλληψη υφίσταται υποπλασία σε χρονικό διάστημα δύο εβδομάδων και δημιουργεί ένα ινώδες, ορμονικά ανενεργό κατάλοιπο. Κατά την διάρκεια της παλινδρόμησης του ωχρού σωματίου, που είναι γνωστή σαν ωχρινόλυση, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης υφίστανται απόπτωση, μέσω ενός μηχανισμού που ελέγχεται από ποικίλους παράγοντες (Makrigiannakis et al., 2000a, Rolaki et al., 2005). Σε περίπτωση που πραγματοποιηθεί σύλληψη και επιτυχής εμφύτευση του εμβρύου, η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου επιμηκύνεται για 8-12 εβδομάδες. Η κατάσταση αυτή αποτελεί ένα πολύ κρίσιμο στάδιο για την διατήρηση της εγκυμοσύνης, εφόσον το ωχρό σωματίο είναι η βασική πηγή στεροειδών ορμονών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την υποστήριξη της κύησης. Η παρατεταμένη διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου επιτυγχάνεται με την παραγωγή, από την τροφοβλάστη,

της ανθρώπινης ορμόνης χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) (Neil et al., 1969), η οποία είναι μία γλυκοπρωτεΐνη ομόλογη της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH). Αρκετοί από τους βιοχημικούς και ενδοκρινικούς παράγοντες που χαρακτηρίζουν την δημιουργία και την παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου έχουν ήδη αποσαφηνιστεί (Makrigiannakis et al., 2000, Walz et al., 2005). Παρόλα αυτά οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην μετανάστευση και επιβίωση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (GCs) και οι ενδοκρινείς / παρακρινείς μηχανισμοί μέσω των οποίων η ωχρινοποιητική ορμόνη και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη δρουν στα κοκκώδη κύτταρα κατά την μετατροπή του ωοθυλακίου σε ωχρό σωματίο δεν έχουν απόλυτα διευκρινιστεί.



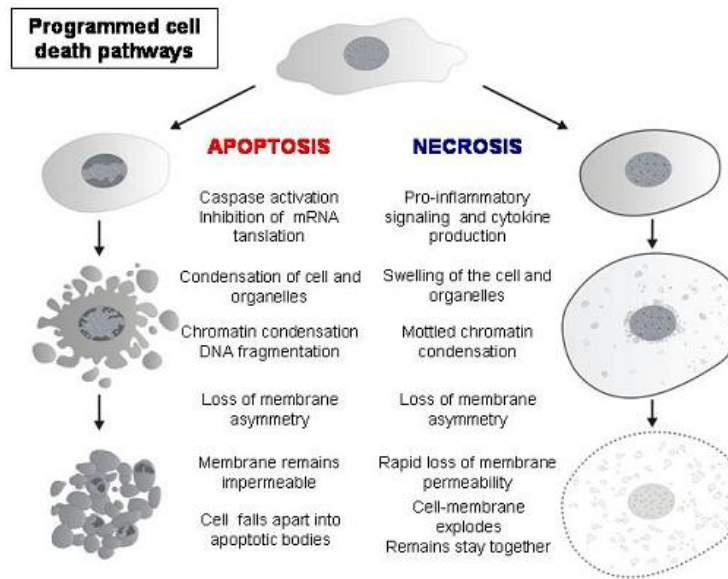
Εικόνα 5. Η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου και η ανάπτυξη του ωχρού σωματίου. (A) Σε κάθε ωοθηκικό κύκλο μόνο ένα ωοθυλάκιο ολοκληρώνει την διαδικασία ανάπτυξής του και επιλέγεται για την ωοθυλακιορρηξία. Από τα υπολείμματα του ρηχθέντος ωοθυλακίου σχηματίζεται το ωχρό σωματίο. (B) Απεικόνιση ενός ώριμου ωχρού σωματίου, όπου διακρίνονται το μέγεθος και η αυξημένη του αγγείωση.

1.2. Κυτταρικός θάνατος

Ο κυτταρικός θάνατος, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση αποτελούν κρίσιμες διεργασίες στον κύκλο ζωής των κυττάρων. Ο κυτταρικός πληθυσμός κάθε ζώντος οργανισμού βρίσκεται υπό συνεχή έλεγχο μέσω της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ πολλαπλασιασμού και κυτταρικού θανάτου. Πριν από μία δεκαετία περίπου διαπιστώθηκε η σημασία ενός νέου είδους κυτταρικού θανάτου, ο οποίος ελέγχεται από τα ίδια τα κύτταρα (Kerr et al., 1972) και στον οποίο δόθηκε το όνομα απόπτωση ή προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος.

1.2.1 Νέκρωση

Προτού δημιουργηθεί το αυξημένο αυτό ενδιαφέρον για τον κυτταρικό θάνατο, οι επιστήμονες όριζαν την διαδικασία αυτή σαν μία παθολογική διεργασία, η οποία συνέβαινε τυχαία στο κύτταρο, όταν αυτό δεχόταν βλαπτικές επιδράσεις από το περιβάλλον του (Wyllie et al., 1981). Η διαδικασία αυτή ήταν γνωστή σαν νέκρωση και αποτελούσε μη επιθυμητή κατάληξη για ένα κύτταρο. Ένα κύτταρο που υφίσταται νέκρωση παρουσιάζει διακριτά βιοχημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά (Festjens et al., 2006). Αρχικά, στο κύτταρο παρατηρείται διόγκωση του κυτταροπλάσματος και των μιτοχονδρίων, ενώ ο πυρήνας διατηρείται σχετικά ανέπαφος. Οι μορφολογικές αυτές αλλαγές οδηγούν στην αποδιάταξη των οργανιδίων του κυττάρου και στην διάρρηξη της πλασματικής μεμβράνης, επιτρέποντας την διάχυση του κυτταρικού περιεχομένου στον εξωκυττάριο χώρο (**Εικόνα 6**). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται λόγω απώλειας της εκλεκτικής διαπερατότητας της μεμβράνης, η οποία συνεπάγεται την είσοδο μεσοκυττάριου υγρού στο εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα αυτό να διογκώνεται και να λύεται. Τα διαχεόμενα κυτταρικά συστατικά ενεργοποιούν τοπικές φλεγμονικές αντιδράσεις και συνήθως ένα ποσοστό παρακείμενων κυττάρων βλάπτεται και νεκρώνεται.

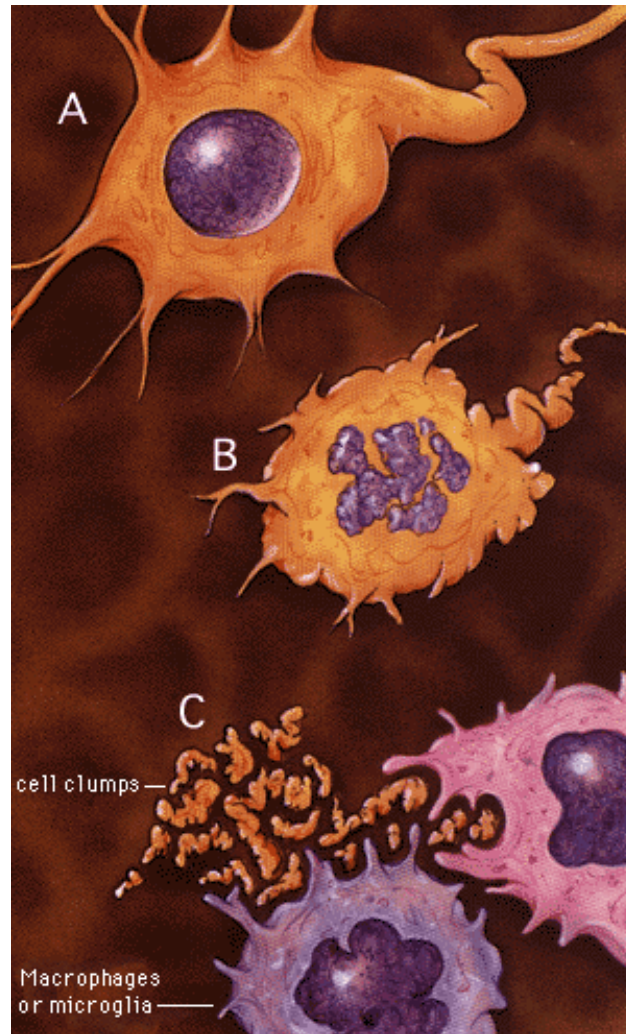


Εικόνα 6. Οι βασικές μορφολογικές διαφορές του κυττάρου κατά τις διαδικασίες του νεκρωτικού και του αποπτωτικού θανάτου. Κατά τη νέκρωση το κύτταρο αυξάνει σε όγκο, η κυτταρική μεμβράνη διαρρηγνύεται και το κυτταρικό περιεχόμενο, που διαχέεται στον μεσοκυττάριο χώρο, προκαλεί φλεγμονική αντίδραση. Αντίθετα, κατά την απόπτωση το κυτταρικό περιεχόμενο διατηρείται στα αποπτωτικά σωματίδια, χωρίς να βλάπτονται τα παρακείμενα κύτταρα.

1.2.2 Απόπτωση

Περαιτέρω μελέτες οδήγησαν στην αποδοχή της υπόθεσης ότι η απόπτωση αποτελεί μία φυσιολογική διαδικασία στην ζωή κάθε κυττάρου και πραγματοποιείται σε δύο διακριτά στάδια (**Εικόνα 7**). Αρχικά, παρατηρείται στο εσωτερικό του κυττάρου κυτταροπλασματική συμπύκνωση συνοδευόμενη και από μία πυρηνική, η οποία οφείλεται πιθανώς στην ανακατανομή της χρωματίνης. Παράλληλα, ενεργοποιούνται ενδογενείς ενδονουκλεάσες, οι οποίες φτάνουν μεταξύ των νουκλεοσωμάτων του DNA και καταφέρνουν να τεμαχίσουν το γονιδίωμα σε πολλαπλάσια των 180 kb. Η απώλεια αυτή της ακεραιότητας του DNA αποτελεί ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά των αποπτωτικών κυττάρων (Tilly, 1996). Το κύτταρο στην συνέχεια διαρρηγνύεται, σχηματίζοντας μερικά μεμβρανο-συνδεδεμένα τμήματα, κάθε ένα από αυτά περιέχει έναν αριθμό δομικά ανέπαφων οργανιδίων. Κατά το δεύτερο στάδιο, τα σχηματιζόμενα τμήματα, τα οποία είναι γνωστά ως αποπτωτικά κυστίδια, φαγοκυτταρώνονται από γειτονικά υγιή κύτταρα και τελικά αποδιατάσσονται ολοκληρωτικά. Η παραπάνω διαδικασία παρατηρείται σε έναν

μεγάλο αριθμό υγιών ή νεοπλασματικών ιστών, χωρίς η εμφάνισή του να εξαρτάται άμεσα από την ηλικία των κυττάρων.



Εικόνα 7. Οι μορφολογικές αλλαγές του κυττάρου κατά την αποπτωτική διαδικασία. Στον πυρήνα διακρίνεται η συμπύκνωση της χρωματίνης, που αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Μέχρι σήμερα, η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου θεωρείται ένας σημαντικός μηχανισμός άμυνας ενάντια σε κύτταρα ή τμήματα ιστών που δεν είναι απαραίτητα πλέον ή που θα μπορούσαν να προκαλέσουν βλάβες στον οργανισμό. Τέτοιου είδους κύτταρα θα μπορούσαν, για παράδειγμα να θεωρηθούν τα self-reactive λεμφοκύτταρα ή ακόμα και παθογόνα ή ογκογόνα κύτταρα (Wyllie,

1992). Επιτυγχάνεται με αυτόν τον τρόπο η διατήρηση σταθερού του αριθμού των κυττάρων ενός ιστού, όπως στην περίπτωση των κυττάρων του αίματος, τα οποία αντικαθίστανται ταχύτατα και ταυτόχρονα απομακρύνονται κύτταρα που έχουν επιτελέσει το ρόλο τους κατά την διαδικασία της ανάπτυξης, όπως οι μη σωστά προσδεδεμένοι νευρώνες κατά την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος. Παρά τις ευεργετικές δράσεις του μηχανισμού αυτού όμως, μία λανθασμένη ενεργοποίησή του θα μπορούσε να οδηγήσει στην παθογένεση του καρκίνου, αυτοάνοσων νοσημάτων (Ameisen et al., 2003), νευροεκφυλιστικών παθήσεων, όπως είναι η νόσος του Alzheimer ή του Parkinson (Jenner, 1989) ή ακόμα και ανθεκτικότητα σε χημειοθεραπείες (Barr and Tomei, 1994; Kerr and Winterford, 1994; Vinatier et al., 1996). Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό του αποπτωτικού μηχανισμού είναι η εξολόθρευση κυττάρων αποφεύγοντας την ενεργοποίηση τοπικών φλεγμονικών αντιδράσεων, οι οποίες ενδεχομένως θα προκαλούσαν την βλάβη παρακείμενων κυττάρων.

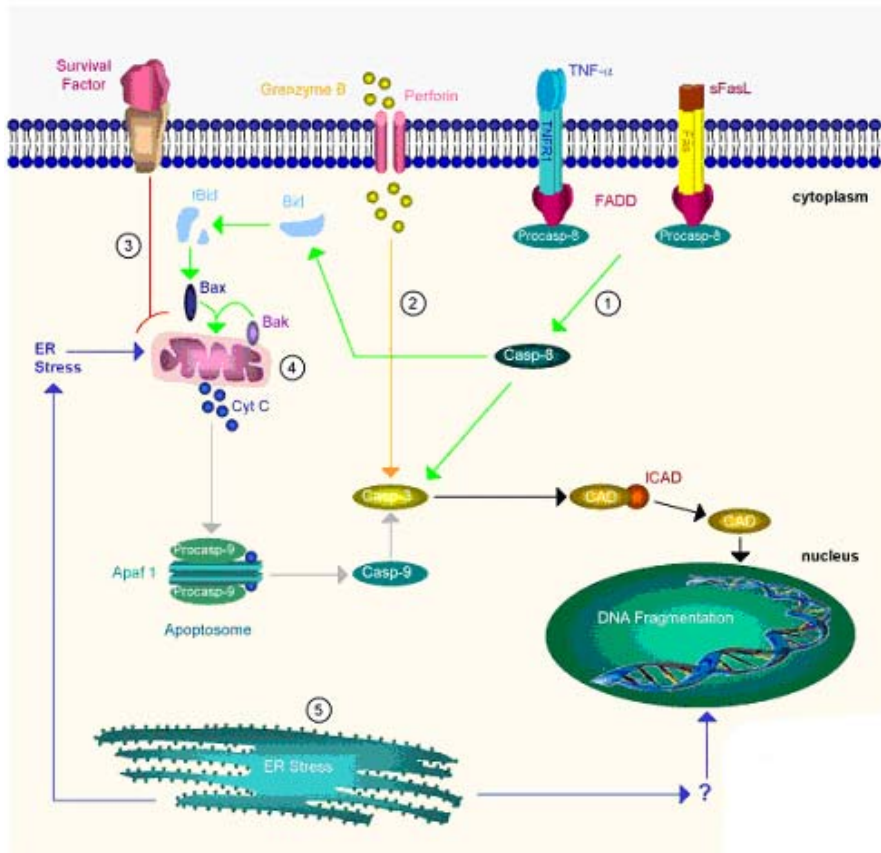
Η διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου αποτελεί επίσης απαραίτητη προϋπόθεση για την φυσιολογική ανάπτυξη του πολλυκύτταρου οργανισμού. Έχει παρατηρηθεί απόπτωση κατά την ανάπτυξη του γαστρεντερικού σωλήνα (Williams and Bell, 1991), ενώ μεγάλος αριθμός νευρώνων πεθαίνει σε περίπτωση που πραγματοποιήσουν λανθασμένες συνάψεις στο αναπτυσσόμενο νευρικό σύστημα (Kimura and Truman, 1990). Κυτταρικός θάνατος έχει επίσης παρατηρηθεί και κατά την ανάπτυξη των άκρων (Antalikova et al., 1989).

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι πιθανό να προκληθεί από μία ποικιλία ερεθισμάτων. Μερικά από αυτά είναι δυνατόν να προκαλέσουν την απόπτωση οποιουδήποτε κυττάρου, ενώ οι περισσότεροι αποπτωτικοί παράγοντες δρουν επιλεκτικά (Rich et al., 2000). Είναι εντυπωσιακό το γεγονός ότι οι ίδιοι αναστολείς πρωτεϊνικής σύνθεσης ή σύνθεσης mRNA είναι δυνατόν να μην επηρεάζουν κάποιους κυτταρικούς τύπους (Batisatou and Greene, 1993), ενώ προκαλούν απόπτωση κυττάρων διαφορετικού τύπου (Vaux and Weissman, 1993; Lewis et al., 1995). Πολλά παρακρινικά, ενδοκρινικά ή αυτοκρινή μόρια έχουν την δυνατότητα είτε να επάγουν την απόπτωση είτε να σώζουν τα κύτταρα με άμεσο τρόπο ή μέσω μεταγραφής νέων γονιδίων (Vaskivuo and Tapanainen, 2003). Η αποφυγή του θανάτου σε κάθε περίπτωση απαιτεί την παρουσία παραγόντων επιβίωσης. Η έλλειψη επαρκών συγκεντρώσεων αντι-αποπτωτικών μορίων οδηγεί

στην ενεργοποίηση των μηχανισμών απόπτωσης και τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Conlon and Raff, 1999).

Οι πολυάριθμες μελέτες που αφορούν αποπτωτικούς μηχανισμούς έχουν προωθήσει σε μεγάλο βαθμό τις γνώσεις μας στον τομέα αυτόν. Σήμερα, είναι γνωστό ότι η διαδικασία της απόπτωσης των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω δύο διακριτών μονοπατιών (**Εικόνα 8**): 1. Το ενδογενές (μιτοχονδριακό ή του στρες) μονοπάτι, το οποίο σχετίζεται με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια (Green and Reed, 1998), όταν δοθεί το κατάλληλο ερέθισμα (Ashe and Berry, 2003). Το κυτόχρωμα C προσδένεται στον παράγοντα επαγωγής της απόπτωσης (Apoptosis-activating factor, Apaf1) και στην προ-κασπάση 9, δημιουργώντας ένα πρωτεολυτικό σύμπλοκο (αποπτώσωμα). Το αποπτώσωμα αυτό ενεργοποιεί ακολούθως συγκεκριμένες κασπάσες (π.χ. τις κασπάσες 3, 6 και 7), οι οποίες ρυθμίζουν περαιτέρω κινάσες, πρωτεϊνικούς υποδοχείς και πυρηνικούς παράγοντες, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τον κυτταρικό θάνατο (Carragher et al., 2001; Wolf and Green, 1999). Η Smac-diablo και ο παράγοντας επαγωγής της απόπτωσης (apoptosis-inducing factor, AIF), απελευθερώνονται επίσης από τα μιτοχόνδρια και αναστέλλουν τον αναστολέα της απόπτωσης (inhibitor of apoptosis proteins, IAP) (Verhagen et al., 2000). Στο ενδογενές μονοπάτι, η αλληλεπίδραση μεταξύ προ- και αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας ρυθμίζει την έναρξη ή αναστολή της απόπτωσης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η Bcl-2, Bcl-x1 και η Bcl-w, οι οποίες δρουν ως αντι-αποπτωτικοί παράγοντες και η Bax, Bad, Bim, Bid και Bok, που επάγουν την απόπτωση. 2. Το εξωγενές μονοπάτι, που ενεργοποιείται με την διέγερση της κυτταρικής μεμβράνης από κατάλληλα ερεθίσματα. Η διέγερση δημιουργείται από την πρόσδεση ειδικών μορίων-προσδετών σε μεμβρανικούς υποδοχείς θανάτου (death receptors, DRs). Οι πιο γνωστοί από τους υποδοχείς αυτούς είναι ο Fas, ο TRAIL και ο TNF. Ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο, οι DR μπορούν να ενεργοποιήσουν το ERK, το JNK ή το NFκB σηματοδοτικό μονοπάτι (Strasser et al., 2000). Συνήθως, η πρόσδεση στους DR ενεργοποιεί την κασπάση 8, μέσω μίας άλλης πρωτεΐνης, της FADD (Fas associated death domain protein). Η ενεργοποιημένη κασπάση 8, με την σειρά της, ενεργοποιεί την κασπάση 3 ή τεμαχίζει την αποπτωτική Bid πρωτεΐνη, η οποία αλληλεπιδρά με τις Bax και Bak πρωτεΐνες, προκειμένου να δημιουργήσουν έναν πόρο στην εξωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, από όπου θα εξέλθει το κυτόχρωμα C. Η διαδικασία αυτή επάγει εν συνεχεία την

έναρξη διαδικασιών του ενδογενούς μονοπατιού (αναλύθηκε παραπάνω) (Muzio et al., 1998; Hengartner, 2000).



Εικόνα 8. Τα κύρια αποπτωτικά μονοπάτια. 1. Το εξωγενές μονοπάτι που ενεργοποιείται με την πρόσδεση ουσιών στους υποδοχείς θανάτου. 2. Το ενδογενές μονοπάτι, που σχετίζεται με την απελευθέρωση του κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Όπως φαίνεται, τα δύο μονοπάτια δεν είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους.

1.2.2.1 Απόπτωση στην ωοθήκη

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος είναι εξαιρετικής σημασίας σε τρεις βασικές λειτουργίες που πραγματοποιούνται στο εσωτερικό των ωοθηκών: (I) στην εμβρυϊκή μείωση των γαμετικών κυττάρων, (II) στην ατρησία των ωοθυλάκιων και (III) στην παλινδρόμηση του ωχρού σωματίου ή ωχρινόλυση.

I. Απόπτωση γαμετικών κυττάρων

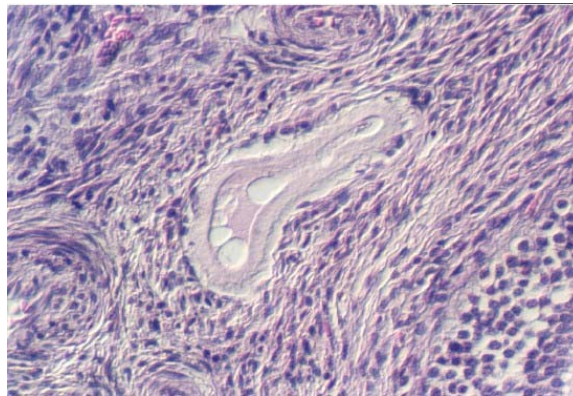
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο μέγιστος αριθμός γαμετικών κυττάρων υφίσταται στην ωοθήκη 4-5 εβδομάδες μετά την σύλληψη και στην συνέχεια μειώνεται μέχρι την γέννηση από 8.3×10^6 σε $1-2.3 \times 10^6$, μέσω μιας διαδικασίας που είναι γνωστή ως φθορά, "attrition", (Reynaud and Driancourt, 2000). Μελέτες σε εμβρυϊκές ωοθήκες ποντικών απέδειξαν ότι το φαινόμενο αυτό πραγματοποιείται *in vivo* μέσω απόπτωσης (Coucounanis et al. 1993). Στην ανθρώπινη ωοθήκη έχει βρεθεί ότι την 13^η εβδομάδα της κύησης 10% όλων των ωοκυττάρων είναι αποπτωτικά (Vaskivuo et al., 2001). Από την 14^η μέχρι την 20^η εβδομάδα ο ρυθμός απόπτωσης είναι εξαιρετικά υψηλός και κυμαίνεται από 11-17%. Στην συνέχεια, ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων μειώνεται σταδιακά, παρουσιάζοντας την μεγαλύτερη μείωση το τελευταίο τρίμηνο της κύησης. Πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι το ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων στις εβδομάδες 23 (2.8%), 27 (5.7%) και 31 (3.8%) είναι κατά πολύ μικρότερο από αυτό που παρατηρήθηκε σε έμβρυα λιγότερων εβδομάδων (Abir et al., 2002), ενώ δεν ανιχνεύονται αποπτωτικά κύτταρα κατά την στιγμή της γέννησης (Vaskivuo and Tapanainen, 2002). Ο αυξημένος ρυθμός απόπτωσης που παρατηρείται στις εμβρυϊκές ωοθήκες οδήγησε στην υπόθεση ότι τα ανθρώπινα ωοκύτταρα πεθαίνουν σύμφωνα με ένα προσχεδιασμένο γενετικό πρόγραμμα (Vaskivuo et al., 2001). Εξάλλου, ο εκφυλισμός των ωοκυττάρων και ο πολλαπλασιασμός των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων αποτελούν κρίσιμες διαδικασίες για τον καθορισμό του αριθμού των ωοκυττάρων την στιγμή της γέννησης. Για τον λόγο αυτό πολυάριθμες μελέτες έχουν ασχοληθεί με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στις συγκεκριμένες διαδικασίες (DeFelici et al., 2005).

II. Ατρησία ωοθυλακίων

Βασικό χαρακτηριστικό της έναρξης ανάπτυξης των ωοθυλακίων αποτελεί η μετάβαση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων από την ανενεργή στην ενεργητική (αναπτυξιακή) φάση. Πολλοί διαφορετικοί παράγοντες ελέγχουν την πολύπλοκη αυτή διαδικασία, συμπεριλαμβανομένου του ίδιου του ωοκυττάρου, των σωματικών κυττάρων που το περιβάλλουν και κάποιων τοπικών ορμονών. Επιπλέον, η επανεκκίνηση της μειωτικής διαίρεσης και η μετάβαση στην μετάφαση II (ωρίμανση του πυρήνα) αποτελούν εξαιρετικής σημαντικότητας διαδικασίες στον έλεγχο της ωοθυλακιακής ανάπτυξης. Τα κύτταρα του ωοθυλακίου, έχει αποδειχτεί ότι προάγουν την ικανότητα του ωοκυττάρου για γονιμοποίηση και κυτταροπλασματική ωρίμανση

(Erpzig, 2001). Τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν στην καταστολή της μεταγραφής, που συμβαίνει στο ωοκύτταρο λίγο πριν την πυρηνική ωρίμανση (De la Fuente and Erpzig, 2001).

Ένας μικρός μόνο αριθμός ωοθυλακίων θα φτάσει τελικά στο στάδιο της ωρίμανσης κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας. Η πλειοψηφία, όπως έχει ήδη αναφερθεί, αποδιατάσσεται μέσω μίας διαδικασίας, γνωστή σαν ατρησία (**Εικόνα 9**). Η απόπτωση των κυττάρων του ωοθυλακίου και ιδιαίτερα των κοκκωδών κυττάρων έχει αποδειχτεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην πραγματοποίηση της ατρησίας (Markstrom et al., 2002), και εξαρτάται από τις διαδικασίες μεταγραφής και πρωτεϊνικής σύνθεσης. Πολλαπλές μελέτες τα τελευταία χρόνια ασχολήθηκαν με την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων και την σημασία της στην διαδικασία της ατρησίας. Το αποπτωτικό μονοπάτι βρέθηκε ότι ελέγχεται από πολλούς διαφορετικούς αναπτυξιακούς παράγοντες, όπως ο EGF, ο IGF, ο bFGF και η ινσουλίνη (Tilly et al., 1992; Chun et al., 1994), όμως ο μηχανισμός ρύθμισης φαίνεται ιδιαίτερα περίπλοκος. Θεωρείται ότι η πρόσδεση των αναπτυξιακών μορίων στους υποδοχείς τους, ενεργοποιεί είτε το P13K (phosphoinositide 3'-OH kinase) είτε το MAPK (mitogen-activated protein kinase) μονοπάτι, τα οποία καταστέλλουν την απόπτωση (Quirk et al., 2003).



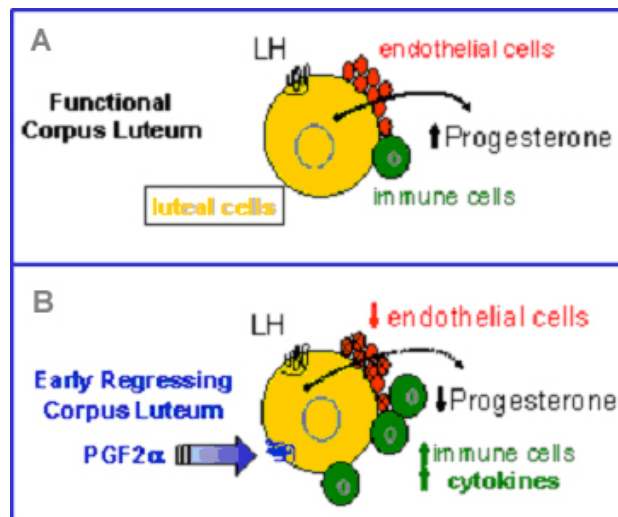
Εικόνα 9. Μικροφωτογραφία ενός άτρητου ωοθυλακίου.

III. Ωχρινόλυση

Αμέσως μετά την έξοδο του ωοκυττάρου (ωοθυλακιορρηξία), τα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία της θήκης εισβάλλουν στην κοκκώδη στοιβάδα διεγείροντας την ωχρινοποίηση των κοκκωδών κυττάρων και κατ' επέκταση την δημιουργία του ωχρού σωματίου. Τα κοκκώδη κύτταρα μετασχηματίζονται σε μεγάλα ωχρινικά

κύτταρα, με δομή όμοια με εκείνη των στεροειδογενών κυττάρων. Το ωχρό σωματίο, όπως προαναφέρθηκε, έχει περιορισμένη διάρκεια επιβίωσης και στην συνέχεια αποδιατάσσεται μέσω της διαδικασίας της ωχρινόλυσης σχηματίζοντας μία δομή που είναι γνωστή σαν λευκό σωματίο (corpus albicans).

Η πλειοψηφία των μελετών που αφορά την ωχρινόλυση υποστηρίζει την υπόθεση ότι η απόπτωση είναι ο βασικός μηχανισμός της δομικής αποδιάταξης του ωχρού σωματίου (Sugino et al., 2000; Vaskivuo et al., 2002). Συγκεκριμένα, έχουν ανιχνευθεί αποπτωτικά κύτταρα σε ωχρά σωματίια των πρώτων ημερών, των οποίων το ποσοστό αυξάνεται σημαντικά σε μετέπειτα στάδια και κορυφώνεται κατά την αποδιάταξη τους (Vaskivuo and Tapanainen, 2002). Περαιτέρω μελέτες, που ασχολήθηκαν με την ρύθμιση του μηχανισμού απόπτωσης κατά την ωχρινόλυση, απέδειξαν ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν κάποια μέλη της Bcl-2 οικογένειας πρωτεϊνών (Rodger et al., 1998; Sugino et al., 2000). Επιπλέον παράγοντες που εμπλέκονται στην απόπτωση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων θεωρούνται η προσταγλανδίνη F_{2a} (PGF_{2a}) (Orlicky et al., 1992), καθώς και η ωχρινική ορμόνη, χοριακή γοναδοτροπίνη (HCG) (Dharmarajan et al., 1994). Η λειτουργία των δύο αυτών παραγόντων φαίνεται ότι σχετίζεται με την συγκέντρωση της προγεστερόνης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. (A) Λειτουργικό ωχρό σωματίο. Παράγει αυξημένα ποσοστά προγεστερόνης. (B) Πρώτα στάδια ωχρινόλυσης. Το ωχρό σωματίο αποκτά υποδοχείς προσταγλανδίνης F_{2a} , μειώνονται σημαντικά τα παραγόμενα ποσοστά προγεστερόνης, ενώ ταυτόχρονα αυξάνονται τα επίπεδα κυτοκινών στο πλάσμα.

Άλλωστε, η σημασία της προγεστερόνης στην ρύθμιση της απόπτωσης αποδείχτηκε και από άλλες μελέτες, κατά τις οποίες φάνηκε ότι η ορμόνη αυτή δρα μέσω του υποδοχέα της, αναστέλλοντας τον αποπτωτικό μηχανισμό των ωχρινοποιημένων ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων (Makrigiannakis et al., 2000b). Παρόμοιες αντι-αποπτωτικές επιδράσεις της προγεστερόνης ανιχνεύθηκαν και σε διαφορετικών τύπων ανθρώπινα κύτταρα (Rotello et al., 1992) ή ακόμα και σε διαφορετικά είδη οργανισμών (Peluso and Pappalardo, 1994).

1.3. Κυτταρική συνάφεια

Σε κυτταρικό επίπεδο, οι αλληλεπιδράσεις μέσω επαφής συνιστούν έναν ιδιαίτερα σημαντικό τρόπο επικοινωνίας του κυττάρου, είτε με παρακείμενα κύτταρα, είτε με τον εξωκυττάριο χώρο. Στην δημιουργία του πολύπλοκου αυτού δικτύου επαφών συμμετέχουν πολλές χιλιάδες μοριακών αλληλεπιδράσεων. Μέχρι σήμερα, έχουν αναγνωρισθεί πολλά μόρια συνάφειας, τα οποία χωρίζονται σε 4 μεγάλες κατηγορίες-οικογένειες, κάθε μία από τις οποίες ευθύνεται για διαφορετικού τύπου λειτουργίες (Chothia and Jones, 1997; Humphries and Newman, 1998). Στην πραγματικότητα, η έκφραση των μορίων συνάφειας είναι συνήθως ζωτικής σημασίας για το κύτταρο, δεδομένου ότι εμπλέκονται στην δημιουργία, τόσο ακλόνητων διακυτταρικών συνδέσεων, όσο και συνδέσεων με μόρια του εξωκυττάρου χώρου, γεγονότα που έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητα για τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση την μετανάστευση και την επιβίωση του κυττάρου. Οι γνωστές, μέχρι σήμερα, οικογένειες μορίων συνάφειας διακρίνονται στις: (α) Οικογένεια των κατχερινών, (β) Οικογένεια των σελεκτινών, (γ) Υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών και (δ) Οικογένεια των ιντεγκρινών.

(α) Οικογένεια των κατχερινών

Οι κατχερίνες είναι μία οικογένεια Ca^{2+} - εξαρτώμενων γλυκοπρωτεϊνών τύπου I, οι οποίες δημιουργούν διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις, καθώς αναγνωρίζουν όμοια μόρια στην μεμβράνη παρακείμενων κυττάρων. Αποτελούνται από μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία μικρή κυτταροπλασματική περιοχή, η οποία συνδέεται με την ακτίνη του κυττροσκελετού μέσω ειδικών προσκολλητικών μορίων, τις κατενίνες. Το εξωκυττάριο τμήμα μιας τυπικής κατχερίνης περιέχει συνήθως 5 επαναλαμβανόμενα μοτίβα 100 αμινοξέων, ενώ το

αμινοτελικό άκρο θεωρείται υπεύθυνο για την προσκολλητική ικανότητα του μορίου. Στο άκρο αυτό, το οποίο περιέχει και περιοχές πρόσδεσης για ιόντα ασβεστίου, έχει αναγνωριστεί μία τριπεπτιδική αλληλουχία (His-Ala-Val, HAV), η οποία είναι απαραίτητη για την φυσιολογική λειτουργία των κατχερινών. In vivo, οι κατχερίνες είναι υπεύθυνες για την δημιουργία σταθερών ιστών, καθώς συντελούν σημαντικά στην μορφογένεση κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ παράλληλα διατηρούν την ακεραιότητα του διαφοροποιημένου ενδοθηλιακού και επιθηλιακού ιστού.

(β) Οικογένεια των σελεκτινών

Οι σελεκτίνες είναι εξειδικευμένα μόρια συνάφειας, τα οποία σχηματίζουν υδρογονανθρακο-εξαρτώμενες συνδέσεις των λευκοκυττάρων με ενδοθηλιακά κύτταρα και με αιμοπετάλια. Η οικογένεια αυτή αποτελείται από τρία μέλη: τις L- (Leukocyte), τις E- (Endothelial) και τις P- (Platelet) σελεκτίνες, τα οποία είναι όλα δομικά ομόλογα, τύπου I διαμεμβρανικά πρωτεϊνικά μόρια. Στο αμινοτελικό τους άκρο, οι σελεκτίνες περιέχουν μία λεκτινική υπομονάδα, η οποία είναι υπεύθυνη για τις κατιον-εξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις με τους υδρογονάνθρακες. Στην συνέχεια, εντοπίζεται μία υπομονάδα του επιδερμικού αναπτυξιακού παράγοντα (EGF), μερικές επαναλαμβανόμενες τριπεπτιδικές αλληλουχίες, μία διαμεμβρανική περιοχή και μία μικρή κυτταροπλασματική ουρά. Οι φυσικοί προσδέτες των σελεκτινών δεν έχουν πλήρως χαρακτηριστεί ακόμα. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια, η μελέτη της δομής και λειτουργίας των σελεκτινών φαίνεται να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, λόγω της σημασίας του ως θεραπευτικοί στόχοι για την ανάπτυξη αντιφλεγμονικών παραγόντων.

(γ) Υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών

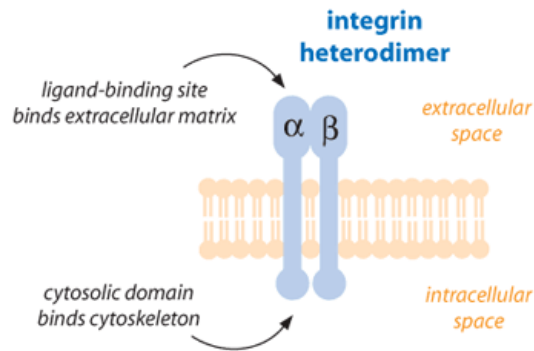
Τα μόρια της υπεροικογένειας των ανοσοσφαιρινών (IgCAMs) περιλαμβάνουν στο εξωκυτταρικό τους τμήμα μία ή περισσότερες ανοσοσφαιρινικές ομάδες τύπου C2 ενώ υπάρχουν και μέλη που διαθέτουν φμπρονεκτικές επαναλήψεις τύπου III (FNIII) στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Αυτές μπορεί να προσδένονται στην μεμβράνη με πρόσδεμα γλυκοσυλ-φωσφατιδυλ-ινοσιτόλης (GPI), γιατί στερούνται διαμεμβρανικής και κυτταροπλασματικής περιοχής. Υπάρχουν όμως και μόρια που διαθέτουν και IgC2 και FNIII. Η πολυπλοκότητα στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών αυτών καθιστά δυνατή την δημιουργία πλήθους αλληλεπιδράσεων. Έχει

βρεθεί ότι οι ανοσοσφαιρινικές αλληλεπιδράσεις συμμετέχουν κυρίως στη δημιουργία ετεροφιλικών αλληλεπιδράσεων, ενώ οι περιοχές FNIII, συμμετέχουν σε ομοφιλικές αλληλεπιδράσεις. Οι αλληλεπιδράσεις των μορίων αυτών εξασφαλίζουν την συνάφεια, ενώ παράλληλα εμπλέκονται στην μετάδοση του ενδοκυτταρικού σήματος για την προσαρμογή του κυτταροσκελετού κατά την διάρκεια της μετανάστευσης, της αξονικής αύξησης και της συναπτικής πλαστικότητας. Τα μόρια των IgCAMs υπόκεινται σε ένα πλήθος τροποποιήσεων με βάση το κυτταρικό σύστημα ή το στάδιο στο οποίο εκφράζονται, εξασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο το είδος της συνάφειας που απαιτείται σε κάθε περίπτωση. Οπότε μέσω μεταγραφικών ή μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων δημιουργούνται πολλές ισομορφές των πρωτεϊνών αυτών, οι οποίες μπορούν να αναγνωρίζουν και να αλληλεπιδρούν με διαφορετικά μόρια επιτυγχάνοντας εξειδικευμένη δράση.

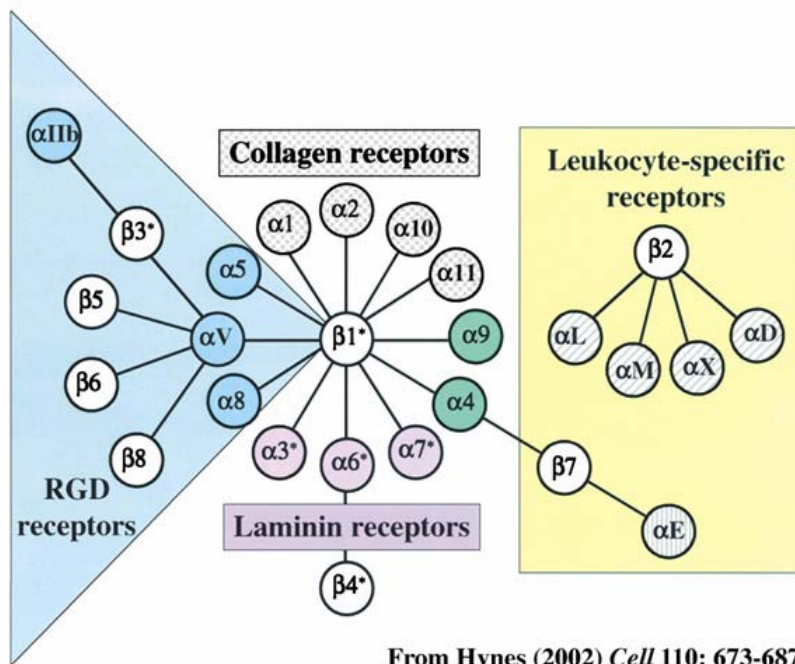
1.4. Ιντεγκρίνες

Οι ιντεγκρίνες είναι μία οικογένεια γλυκοπρωτεϊνικών υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η προσκόλληση των κυττάρων στις πρωτεΐνες της εξωκυττάριας ουσίας (ECM) ή οι διάφορες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις (**Εικόνα 11**). Ο όρος αυτός χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά πριν από μία δεκαετία περίπου (Tamkun et al., 1986) για να δηλώσει τον βασικό τους ρόλο στη διασύνδεση (integration) των κυττάρων με τις εξωκυττάρια πρωτεΐνες. Όλες οι γνωστές ιντεγκρίνες παρουσιάζονται ως ετεροδιμερή, αποτελούμενα από δύο υπομονάδες την α και την β. Κάθε υπομονάδα περιέχει μία μεγάλη εξωκυττάρια περιοχή, μία μικρή διαμεμβρανική και ένα κυτταροπλασματικό καρβοξυτελικό άκρο, το μέγεθος του οποίου ποικίλλει. Οι εξωκυττάρια περιοχές των δύο υπομονάδων συνδυάζονται, σχηματίζοντας την περιοχή υποδοχής του προσδέτη, ενώ το κυτταροπλασματικό άκρο προσδένεται συνήθως σε πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού (Hynes, 1992; Ruoslahti 1991). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί έως σήμερα 17 α και 8 β υπομονάδες, οι οποίες συνδέονται για να σχηματίσουν 22 διαφορετικούς υποδοχείς με διακριτούς βιολογικούς ρόλους ο καθένας (Kumar, 1998) (**Εικόνα 12**). Οι ιντεγκρίνες έχει βρεθεί ότι εκφράζονται σε όλους σχεδόν του κυτταρικούς τύπους των θηλαστικών, αλλά κανένας από αυτούς δεν εκφράζει ταυτόχρονα όλα τα ετεροδιμερή που υπάρχουν στην φύση. Η καθορισμένη ομάδα ιντεγκρινών που εκφράζει κάθε κύτταρο ρυθμίζει την δυνατότητα προσκόλλησης του

σε ουσίες του εξωκυττάριου χώρου ή διασύνδεσής του με άλλα κύτταρα, ενώ παράλληλα ελέγχει την ικανότητα ενδοκυττάριας μεταβίβασης των σημάτων. Σε πολλές περιπτώσεις όμως παρατηρείται μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης των ιντεγκρινών, η οποία ελέγχεται από τοπικά σήματα. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η απότομη αύξηση του $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινικού υποδοχέα στο αγγειογενετικό ενδοθήλιο (Brooks et al., 1994).



Εικόνα 11. Απλοποιημένη απεικόνιση των ιντεγκρινικών α και β αλυσίδων. Το ετεροδιμερές της ιντεγκρίνης διαθέτει εξωκυττάρια την θέση δέσμευσης των μορίων του ECM και ενδοκυττάρια τις περιοχές πρόσδεσης στον κυτταροσκελετό.



Εικόνα 12. Όλοι οι δυνατοί συνδυασμοί των α και β ιντεγκρινικών υπομονάδων.

Μελέτες πολλών κυτταρικών τύπων έχουν υποστηρίξει ότι η δέσμευση των ιντεγκρινών της κυτταρικής επιφάνειας με τους προσδέτες τους που βρίσκονται στο εξωκυττάριο περιβάλλον διευκολύνουν την κυτταρική μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την επιβίωσή τους (Ruoslahti et al., 1994; Huttenlocher et al., 1995; Clark et al., 1995; Frisch et al., 1997). Κάθε ένας από τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς μπορεί να προσδέεται σε περισσότερους από έναν προσδέτες. Το σημείο αναγνώρισης για τις ιντεγκρίνες που συνδέονται με τις πρωτεΐνες του εξωκυτταρίου χώρου είναι το τριπεπτίδιο RGD (Arg-Gly-Asp) (Ruoslanti and Peirschbacher, 1987), αλληλουχία που υπάρχει στην φιβρονεκτίνη, την βιτρονεκτίνη και την οστεοποντίνη. Η επιβίωση αρκετών κυττάρων θηλαστικών εξαρτάται από αυτού του είδους την πρόσδεση. Πρόσφατες μελέτες απέδειξαν ότι συγκεκριμένα είδη κυττάρων, όπως για παράδειγμα τα ενδοθηλιακά και τα επιθηλιακά, όταν αποσυνδεθούν από το υπόστρωμά τους υφίστανται απόπτωση (Frisch and Ruoslahti, 1997; Meredith and Schwartz, 1997). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται anoikis και αποτελεί έναν μηχανισμό αναστολής της φυσιολογικής ανάπτυξης των κυττάρων, όταν αυτά εγκαταλείπουν το φυσικό τους περιβάλλον.

1.4.1 Ιντεγκρίνες και απόπτωση

Οι ιντεγκρίνες έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια, όχι μόνο λόγω της εξαιρετικής τους σημασίας σε κρίσιμες βιολογικές διαδικασίες, αλλά και λόγω της σπουδαιότητάς τους σε τομείς της Ιατρικής επιστήμης. Τα μόρια αυτά έχει αποδειχτεί ότι διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην συνάθροιση των αιμοπεταλίων, σε ανοσολογικές λειτουργίες, στην ανάπτυξη κατεστραμμένων ιστών, καθώς και στην εξέλιξη του καρκίνου. Σήμερα, είναι επίσης γνωστό ότι αρκετές ασθένειες οφείλονται σε μεταλλαγές γονιδίων κάποιων ιντεγκρινών (Danen and Sonnenberg, 2003).

Οι ιντεγκρίνες αποτελούν επιπλέον βασικούς κυτταρικούς υποδοχείς μορίων του εξωκυτταρίου χώρου και συνεπώς διαδραματίζουν εξέχοντα ρόλο στην διαδικασία πρόσδεσης των κυττάρων στο υπόστρωμά τους, ενώ παράλληλα ρυθμίζουν την κυτταρική μορφολογία (Singhvi et al., 1994). Έχει βρεθεί περαιτέρω ότι η αλληλεπίδραση των ιντεγκρινών με εξωκυττάρια μόρια σχετίζεται με την κυτταρική επιβίωση, η οποία ρυθμίζεται μέσω άμεσης ή έμμεσης σύνδεσης των μορίων αυτών με παράγοντες του κυτταροσκελετού ή με υποδοχείς διαφόρων

αναπτυξιακών παραγόντων (Grossmann, 2002; Juliano, 2002; Redig and Juliano, 2005). Συγκεκριμένα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, μετά από πλήρη απώλεια της επαφής του κυττάρου με το υπόστρωμα επέρχεται ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, μία διαδικασία που είναι γνωστή σαν “anoikis” (Frisch and Francis, 1994; Frisch and Ruoslahti, 1997). Η επιβίωση ενός μεγάλου αριθμού διαφορετικών κυτταρικών τύπων εξαρτάται άμεσα από τις ιντεγκρινο-εξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις με μόρια του εξωκυττάρου χώρου. In vivo πειράματα έχουν αποδείξει ότι το φαινόμενο anoikis παρατηρείται σε κύτταρα του δέρματος (Polakowska et al., 1994), σε επιθηλιακό ιστό (Hall et al., 1994), στον μαστικό αδένα (Boudreau et al. 1995), ενώ πιο πρόσφατα αναφέρθηκε η εξαιρετική σημασία του φαινομένου στην διαδικασία της εμβρυογένεσης (Coucounanis and Martin, 1995). Εκτεταμένα πειράματα απέδειξαν ότι ορισμένοι μόνο ιντεγκρινικοί υποδοχείς έχουν την δυνατότητα αναστολής του φαινομένου anoikis, σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Η χρήση αντισωμάτων ειδικών για διαφορετικές ιντεγκρινικές α -υπομονάδες, απέδειξε ότι παρόλο που όλες σχεδόν οι ιντεγκρίνες σχετίζονται με την προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, ορισμένες μόνο α -υπομονάδες τα προστατεύουν από τον κυτταρικό θάνατο (Howlett et al., 1995). Η διαφορετική αυτή ικανότητα των ιντεγκρινών να προστατεύουν τα κύτταρα υποδηλώνει την χρήση διαφορετικών μονοπατιών μεταγωγής του σήματος επιβίωσης.

In vitro πειράματα έχουν αποδείξει ότι η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη όταν χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε κυτταρικές καλλιέργειες, ενισχύουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων, ενώ παράλληλα αναστέλλουν την απόπτωση κοκκωδών κυττάρων προερχόμενα από μικρά ωοθυλάκια του σταδίου του άντρου (Aharoni et al., 1997). Στην επιφάνεια κοκκωδών κυττάρων από πρόβατο έχουν ανιχνευθεί υποδοχείς φιμπρονεκτίνης ($\alpha_v\beta_3$) και λαμινίνης ($\alpha_6\beta_1$, $\alpha_3\beta_1$), γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι in vivo οι πρωτεΐνες αυτές διαδραματίζουν μεσολαβητικό ρόλο στην λειτουργία των ουσιών της εξωκυττάριας ουσίας. Παρόλα αυτά μόνο η $\alpha_6\beta_1$ αποδεικνύεται ότι εμπλέκεται στις διαδικασίες πολλαπλασιασμού και απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων (Le Bellego et al., 2002) και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων κατά την προ-ωορρηκτική φάση.

Η επαγωγή της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων κατά την ατρησία των ωοθυλακίων θεωρείται ότι ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ ιντεγκρινικών υποδοχέων και εξωκυτταρικών ουσιών. Στο συμπέρασμα αυτό οδήγησαν πρόσφατες μελέτες κατά τις οποίες παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης της $\alpha_6\beta_1$

ιντεγκρίνης γεγονός που πιθανώς να συνεπάγεται την διακοπή αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποδοχέα αυτού και του προσδέτη του (λαμινίνη) με συνεπακόλουθη απόπτωση των κυττάρων. Αντίθετα, η διαδικασία της ατρησίας έχει συνδεθεί σε πολλές περιπτώσεις με σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της $\alpha_3\beta_1$ ιντεγκρίνης αλλά και της α_3 υπομονάδας στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων (Giebel et al., 1996). Η σημασία της συγκεκριμένης αύξησης παραμένει αδιευκρίνιστη, παρόλο που η μελέτη της θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενδιαφέροντα συμπεράσματα δεδομένου ότι σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους έχει διαπιστωθεί ότι η ενεργοποίηση του $\alpha_3\beta_1$ υποδοχέα επάγει την απόπτωση (Sato et al., 1999; Seewaldt et al., 2001).

1.4.2 Μηχανισμοί λειτουργίας των ιντεγκρινών

Η λειτουργία των ιντεγκρινών θεωρείται ότι βασίζεται στην ικανότητά τους να προσκολλούνται και να ρυθμίζουν συγκεκριμένα μονοπάτια μετάδοσης του σήματος. Η πρόσδεση των ιντεγκρινών μόρια-προσδέτες συνεπάγεται την δημιουργία νέων δομών στην κυτταρική μεμβράνη, οι οποίες είναι γνωστές ως focal adhesions, μέσω των οποίων συνδέεται η εξωκυττάρια ουσία με συμπλέγματα του κυτταροσκελετού (Burrige et al., 1998). Οι πρωτεϊνικές αυτές συναθροίσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαμόρφωση της κυτταρικής συνάφειας, ενώ παράλληλα επάγουν την μετατροπή του κυτταρικού σχήματος, η οποία συνδέεται άμεσα με την κυτταρική κατανομή και κίνηση. Στα σημεία των focal adhesions, εκτός από ιντεγκρίνες, συγκεντρώνονται και άλλα πρωτεϊνικά μόρια διαφορετικής δομής και λειτουργίας, όπως ακτίνη, πρωτεϊνικές κινάσες και άλλα μόρια σηματοδότησης (Craig and Johnson, 1996). Οι πολυπρωτεϊνικές δομές που σχηματίζονται αποδείχτηκε ότι συμμετέχουν στην σηματοδότηση των ιντεγκρινών, όμως ο πλήρης μηχανισμός λειτουργίας των μορίων αυτών παρέμεινε για πολλά χρόνια αδιευκρίνιστος.

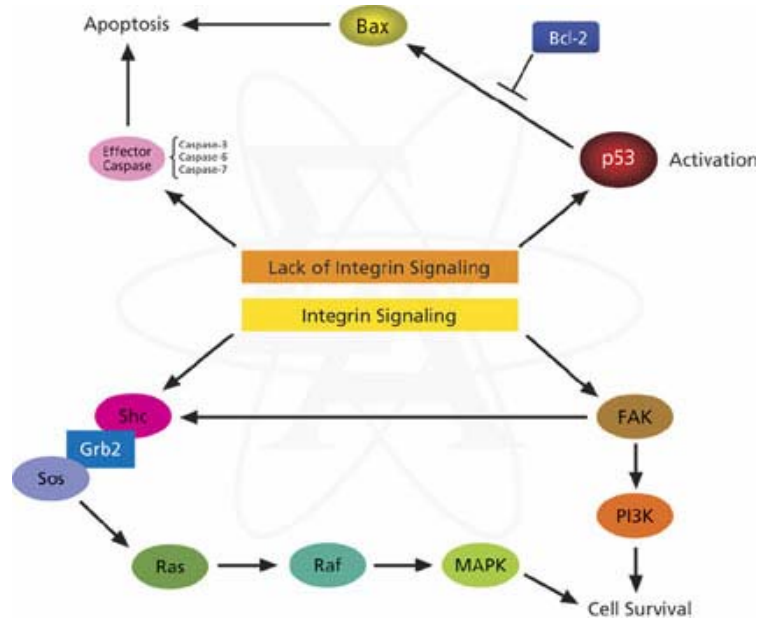
Σήμερα, είναι γνωστό ότι οι ιντεγκρινο-εξαρτώμενες συνδέσεις ρυθμίζουν την G1 φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι ιντεγκρινικοί υποδοχείς συνεργάζονται με τους υποδοχείς κινάσης της τυροσίνης (RTKs), προκαλώντας την έκφραση της D1 κυκλίνης και την μείωση των επιπέδων του κυκλινο-εξαρτώμενου αναστολέα κινάσης (cki). Με αυτόν τον τρόπο προκαλείται η είσοδος στην S φάση του κυτταρικού κύκλου (Zhu et al., 1996). Στο μονοπάτι αυτό, όπως και σε άλλα που αφορούν τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό, έχει βρεθεί ότι εμπλέκεται η MAP κινάση (Renshaw et al., 1997). Επιπλέον, τα επίπεδα της D1 κυκλίνης και του cki ρυθμίζονται και από την Rho οικογένεια GTPασών, η οποία επηρεάζεται άμεσα από τον συνδυασμό των ιντεγκρινών που εκφράζονται σε ένα κύτταρο (Danen et al., 2002; Danen et al., 2000).

Η έκφραση των ιντεγκρινών σχετίζεται άμεσα, όπως έχει αναλυθεί παραπάνω, και με την απόπτωση των κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό είναι περισσότερο συνηθισμένο σε επιθηλιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα, αλλά έχει επίσης αναφερθεί και σε κύτταρα του συνδετικού ιστού (Frisch and Ruoslahti, 1997). Σήμερα, υπάρχουν αποδείξεις ότι οι ιντεγκρινικοί υποδοχείς εμπλέκονται τόσο στο εξωγενές, όσο και στο ενδογενές αποπτωτικό μονοπάτι μέσω των παρακάτω μηχανισμών:

1. Η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη σύνδεση ρυθμίζει την έκφραση και την ενεργότητα διαφόρων πρωτεϊνών της Bcl-2 οικογένειας, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο το ενδογενές μονοπάτι της απόπτωσης. Συγκεκριμένα, ενεργοποιείται η κινάση P13, η οποία μέσω της πρωτεϊνικής κινάσης B/AKT (King et al., 1997) αυξάνει την έκφραση του Bcl-2 αντι-αποπτωτικού παράγοντα (Mater and Ruoslahti, 2001). Επιπλέον, η ενεργοποίηση της Akt πρωτεΐνης επάγει την έκφραση του Bcl_{xl} παράγοντα, πιθανώς μέσω του NFκB μονοπατιού, το οποίο σχετίζεται με την ρύθμιση πολλών αντι-αποπτωτικών Bcl-2 πρωτεϊνών (Duriez et al., 2000). Παράλληλα με την επαγωγή της έκφρασης αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών, οι ιντεγκρινο-εξαρτώμενες συνδέσεις αναστέλλουν και την μεταγραφή αποπτωτικών παραγόντων της Bcl-2 οικογένειας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με την ενεργοποίηση του Raf/Mek/ERK μονοπατιού (Schlaepfer et al., 1999; Wary et al., 1996), μέσω του οποίου φωσφορυλιώνονται και απενεργοποιούνται προ-αποπτωτικές πρωτεΐνες, π.χ. η Bax, πιθανότατα μέσω αρνητικής ρύθμισης της μεταγραφικής δραστηριότητας του p53 (Stromblad et al., 1996). Παράλληλα, η φωσφορυλίωση της Bcl-2 πρωτεΐνης από MAP κινάσες την προστατεύει από πρωτεολυτικούς παράγοντες, προάγοντας την κυτταρική επιβίωση (Breitschopf et al., 2000). Επιπλέον, οι ιντεγκρίνες αυξάνουν την έκφραση των αναστολέων απόπτωσης (IAPs, inhibitors of apoptosis proteins), οι οποίες απενεργοποιούν συγκεκριμένες κασπάσες (Salvesen and Duckett, 2002).
2. Η προσκόλληση των ιντεγκρινών στα μόρια του εξωκυττάριου χώρου ενισχύει επίσης την διατήρηση της ακεραιότητας του κυτταροσκελετού, αναστέλλοντας με αυτόν τον τρόπο και το εξωγενές αποπτωτικό μονοπάτι. Έχει βρεθεί ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα, η πρόσδεση ρυθμίζει θετικά την έκφραση του c-FLIP

παράγοντα, ο οποίος είναι αναστολέας της κασπάσης 8, ενώ παράλληλα μειώνει την έκφραση του υποδοχέα θανάτου Fas και του προσδέτη του (FasL) (Aoudjit and Vuoti, 2000), με αποτέλεσμα την άμεση αναστολή του αποπτωτικού μηχανισμού. Στην εικόνα 13 που ακολουθεί φαίνονται σχηματικά οι μηχανισμοί ρύθμιση των δύο αποπτωτικών μονοπατιών.



Εικόνα 13. Ιντεγκρινο-εξαρτώμενα μονοπάτια μεταγωγής σήματος, τα οποία οδηγούν στην κυτταρική επιβίωση. Η σύνδεση των ιντεγκρινών με μόρια του ECM οδηγεί είτε στην ενεργοποίηση συγκεκριμένων κινασών, που επάγουν περαιτέρω την έκφραση του Bcl-2 αντι-αποπτωτικού παράγοντα, είτε στην απενεργοποίηση διαφόρων κασπασών με ταυτόχρονη αναστολή της λειτουργίας του Fas υποδοχέα θανάτου.

Η πρόσδεση των ιντεγκρινών στον εξωκυττάριο χώρο σχετίζεται επίσης και με την έκφραση γονιδίων που ρυθμίζουν την κυτταρική διαφοροποίηση. Για παράδειγμα, σε καλλιέργειες μαστικών επιθηλιακών κυττάρων έχει παρατηρηθεί ότι η προσκόλληση σε μόρια της βασικής μεμβράνης ενεργοποιούν την σύνθεση πρωτεϊνών του γάλακτος, μέσω αύξησης της φωσφορυλίωσης των υποδοχέων της προλακτίνης (Edwards et al., 1998). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι οι ιντεγκρινικοί υποδοχείς σχετίζονται άμεσα με την διαφοροποίηση κυττάρων του μυϊκού συστήματος (Menko et al., 1987), και με την δημιουργία φλεγμονικών αντιδράσεων από μονοκύτταρα (Haskill et al., 1988).

1.4.3 Ιντεγκρίνες και αναπαραγωγή

Εξειδικευμένες μελέτες απέδειξαν ότι ένας αριθμός ιντεγκρινών παίζει σημαντικό ρόλο σε φυσιολογικές και παθολογικές λειτουργίες της ανθρώπινης αναπαραγωγής, σε επίπεδο γονιμοποίησης, εμφύτευσης του εμβρύου και διάταξης του πλακούντα. Συγκεκριμένα, στην διαφανή ζώνη του ανθρώπινου ωαρίου έχουν ανιχνευθεί οι α_2 , α_5 , α_6 , α_v , β_1 και β_3 ιντεγκρινικές αλυσίδες (Fusi et al., 1993), και συνεπώς έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη των υποδοχέων φμπρονεκτίνης ($\alpha_5\beta_1$) και βιτρονεκτίνης ($\alpha_v\beta_3$) στα κύτταρα αυτά. Παράλληλα στην επιφάνεια των ανθρώπινων σπερματοζωαρίων ανιχνεύθηκε φμπρονεκτίνη και βιτρονεκτίνη (Fusi et al., 1994), γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση ότι οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων αυτών με τους αντίστοιχους ιντεγκρινικούς υποδοχείς σχετίζονται με την ικανότητα γονιμοποίησης. Επιπλέον, ανίχνευση ιντεγκρινών πραγματοποιήθηκε και στην μεμβράνη των σπερματοζωαρίων, τα επίπεδα έκφρασης των οποίων μεταβάλλονται ανάλογα με το λειτουργικό στάδιο των κυττάρων αυτών (Fusi et al., 1995). Έκφραση ιντεγκρινικών υποδοχέων παρατηρήθηκε και στο επιθήλιο του ανθρώπινου ενδομητρίου, η οποία διαφέρει μεταξύ των σταδίων του καταμήνιου κύκλου (Lessey et al., 1992) και η οποία θεωρείται ότι εμπλέκεται στον καθορισμό του “παραθύρου εμφύτευσης”. Περαιτέρω μελέτες έδειξαν ότι μεταβολή του προτύπου έκφρασης των ιντεγκρινών ή των προσδετών τους σχετίζεται με αδυναμία του σπερματοζωαρίου να γονιμοποιήσει το ωάριο, με δυσλειτουργίες του ενδομητρίου της ωχρινικής φάσης ή ακόμα και με την εμφάνιση ενδομητρίωσης (Bronson and Fusi, 1996).

Έκφραση ιντεγκρινικών υποδοχέων καθώς και των προσδετών τους έχει αναφερθεί και σε κοκκώδη κύτταρα ωοθήκης διαφορετικών ειδών (Monniaux et al., 2006). Η α_6 υπομονάδα παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων όλων των φυσιολογικών αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων μέχρι το στάδιο της ωοθυλακιορρηξίας (Clavero et al., 2004; Le Bellego et al., 2002; Honda et al. 1995; Fujiwara et al., 1995). Η α_6 υπομονάδα συνδυάζεται με την β_1 σχηματίζοντας τον $\alpha_6\beta_1$ υποδοχέα της λαμινίνης, του οποίου η έκφραση μειώνεται στα ατρητικά ωοθυλάκια (Le Bellego et al., 2002; Giebel et al., 1997). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου εκφράζουν στην επιφάνειά τους την ιντεγκρίνη $\alpha_5\beta_1$ και τον προσδέτη της, την φμπρονεκτίνη (FN) (Honda et al., 1997), αλλά παραμένει αδιευκρίνιστο αν η συγκεκριμένη ή άλλες

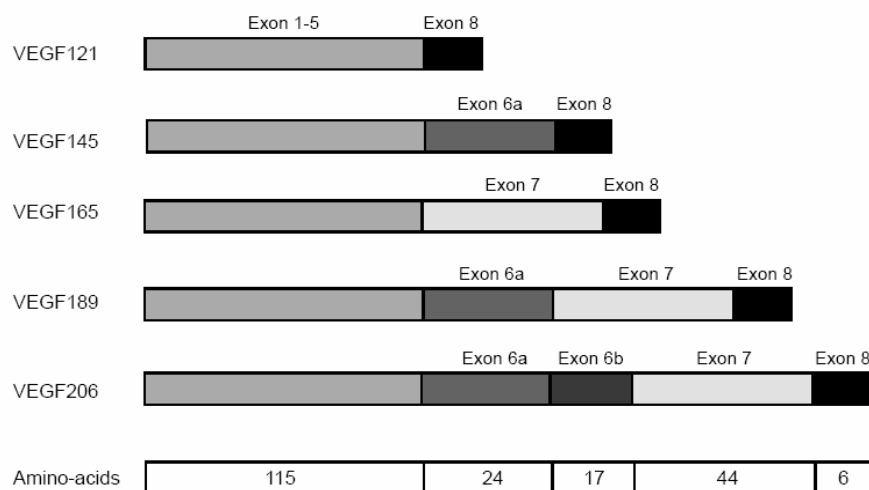
αλληλεπιδράσεις μεταξύ ιντεγκρινών και παραγόντων της εξωκυττάριας ουσίας έχουν σημαντικές λειτουργικές συνέπειες για τα κοκκώδη κύτταρα.

1.5. Βιολογικός ρόλος του VEGF

1.5.1 Η Πρωτεΐνη

Ο VEGF (Vascular endothelial growth factor), γνωστός και σαν VPF (Vascular permeability factor), είναι ένας αγγειογενετικός παράγοντας, ο οποίος επάγει την μίτωση του αγγειώδους ενδοθηλίου. Είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 45 kd, η οποία αποτελείται από δύο όμοια τμήματα και προσδένεται με μεγάλη συνάφεια σε ειδικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων. Το ανθρώπινο γονίδιο έχει εντοπιστεί στο χρωμόσωμα 6p21.3 και αποτελείται από οκτώ εξόνια, στα οποία παρεμβάλλονται 7 ιντρόνια.

Η οικογένεια των VEGF πρωτεϊνών αποτελείται από αρκετά μέλη, συμπεριλαμβανομένου του VEGF-A, το πρώτο μόριο που αναγνωρίστηκε, του PlGF (placental growth factor), των VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, καθώς και δύο VEGF-like πρωτεϊνών (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Επιπλέον, σήμερα έχουν αναγνωριστεί τουλάχιστον πέντε μοριακές ισομορφές του VEGF-A (αναφέρεται και ως VEGF), οι οποίες δημιουργούνται από εναλλακτικό μάτισμα του γονιδίου και διαφέρουν μεταξύ τους στον αριθμό των αμινοξέων (**Εικόνα 14**). Στον άνθρωπο, οι ισομορφές αυτές είναι οι: VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ και VEGF₂₀₆ (Houck et al., 1992).



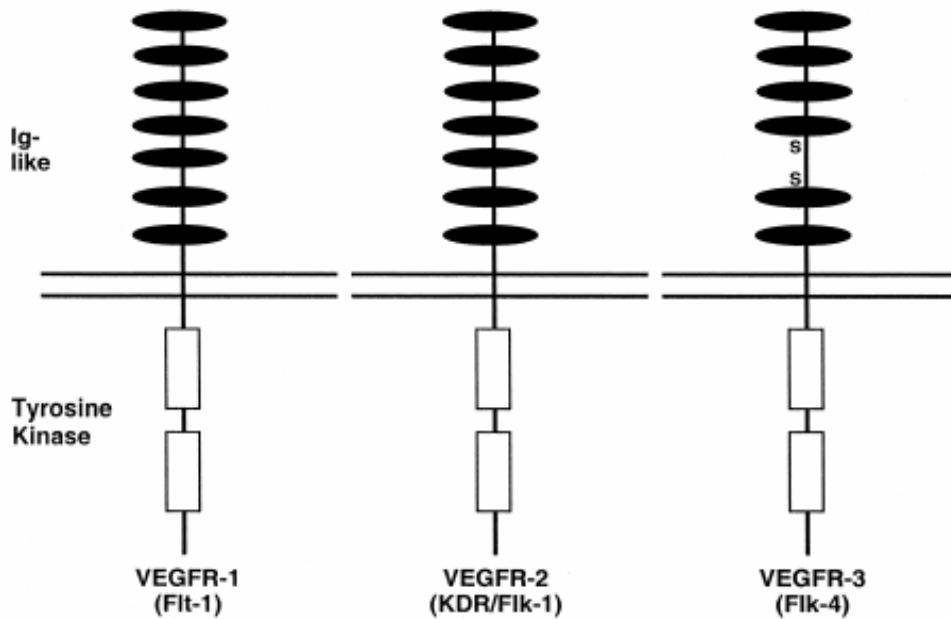
Εικόνα 14. Η δομή των διαφορετικών VEGF πρωτεϊνών, προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος. Με διαφορετικό χρώμα φαίνονται τα εξόνια που κωδικοποιούνται από το ανθρώπινο VEGF γονίδιο. Στην βάση της εικόνας φαίνεται ο αριθμός των αμινοξέων που περιέχονται σε καθένα από τα εξόνια.

Οι VEGF₁₂₁ και VEGF₁₆₅ είναι τα επικρατέστερα μοριακά είδη, τα οποία παράγονται από μία μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών κυττάρων. Η εκκρινόμενη VEGF₁₆₅ πρωτεΐνη έχει την ικανότητα να προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια, καθώς και σε μόρια του εξωκυττάρου χώρου. Η μορφή VEGF₁₈₉ ανιχνεύεται στην πλειονότητα των ιστών και κυττάρων, που εκφράζουν το γονίδιο του VEGF, ενώ η VEGF₂₀₆ είναι η πιο σπάνια από όλες τις ισομορφές, και η οποία ανιχνεύεται αποκλειστικά στον εξωκυττάρου χώρο (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Εκκρινόμενη είναι επίσης και η VEGF₁₄₅ ισομορφή, η οποία προσδένεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα και θεωρείται ότι παρουσιάζει την περισσότερο περιορισμένη έκφραση (Poltorak et al., 1997). Ο VEGF₁₄₅ εμφάνιζε χαμηλά ποσοστά έκφρασης στους αναπαραγωγικούς ιστούς, σε σχέση με τους VEGF₁₂₁ και VEGF₁₆₅ (Charnock-Jones et al., 1993; Cheung et al., 1995; Krussel et al., 2001), όμως περαιτέρω μελέτες απέδειξαν την έκφρασή του σε αρκετά δείγματα καρκίνων του μαστού (Stimpfl et al., 2002).

1.5.2 Οι υποδοχείς

Οι βιολογικές επιδράσεις των VEGF πρωτεϊνών πραγματοποιούνται μέσω τριών βασικών υποδοχέων που ανήκουν στην οικογένεια των υποδοχέων κινάσης της τυροσίνης: VEGFR1/Flt-1 (fms-like-tyrosine kinase), VEGFR2 ή KDR/Flk-1 (kinase domain region/fetal liver kinase-1), και VEGFR3/Flt-4 (Nicosia, 1998; Stouffer et al., 2001). Οι υποδοχείς Flt-1 και KDR αποτελούν τους βασικότερους επαγωγείς των σημάτων του VEGF, τα οποία ρυθμίζουν τις διαδικασίες της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Waltenberger et al., 1994). Ο KDR θεωρείται ότι παρουσιάζει μικρότερη συγγένεια για τον VEGF σε σχέση με τον Flt-1 (de Vries et al., 1992). Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς έχουν ανιχνευθεί, εκτός από τα κύτταρα του ενδοθηλίου, σε μακροφάγα, τροφοβλάστες και σε χοριοκαρκίνωμα (Charnock-Jones et al., 1994; Cheung, 1997; Shore et al., 1997) και ο καθένας περιέχει μία εξωκυττάρια περιοχή με επτά επαναλαμβανόμενα μοτίβα, ένα διαμεμβρανικό τμήμα και μία κυτταροπλασματική περιοχή κινάσης της τυροσίνης (**εικόνα 15**). Ο Flt-4

αποτελείται από τέσσερα επαναλαμβανόμενα μοτίβα στην εξωκυττάρια περιοχή του, τα οποία συνδέονται με δύο ακόμα μοτίβα μέσω δισουλφιδικών δεσμών (Ferrara & Davis-Smyth, 1997). Οι VEGF υποδοχείς υφίστανται VEGF-επαγόμενο διμερισμό, μέσω του οποίου ενεργοποιείται η μεταγωγή του σήματος, ενώ παράλληλα πραγματοποιείται αυτοφωσφορυλίωση της κυτταροπλασματικής περιοχής (Ullrich and Schlessinger, 1990).



Εικόνα 15. Η δομή των γνωστών υποδοχέων του VEGF. Ο Flt-1 και ο Flk-1 υποδοχέας περιέχουν 7 εξωκυττάρια επαναλήψεις, ενώ ο Flt-4 περιέχει 4 επαναλαμβανόμενα μοτίβα, τα οποία συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς με δύο επιπλέον. Το κυτταροπλασματικό τμήμα είναι κοινό για όλους τους υποδοχείς και περιλαμβάνει μία περιοχή κνάσης της τυροσίνης.

Τα μονοπάτια μεταγωγής του σήματος που μεσολαβούνται από τους VEGF υποδοχείς δεν έχουν διευκρινιστεί πλήρως. Ένας μεγάλος αριθμός ερευνών υποστηρίζει ότι οι Flt-1 και KDR ενεργοποιούν διαφορετικά μονοπάτια (Waltenberger et al., 1994), και πιθανώς ευθύνονται για διαφορετικές βιολογικές λειτουργίες (Cross et al., 2003). Η ενεργοποίηση του KDR έχει συσχετιστεί με τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση και την αγγειακή διαπερατότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων, ενώ ο Flt-1 θεωρείται ότι διαδραματίζει ρόλο αναστολέα του VEGF, εμποδίζοντας την αλληλεπίδρασή του με τον KDR (Ferrara, 2004). Μέχρι σήμερα,

έχουν αναγνωριστεί αρκετές θέσεις φωσφορυλίωσης και πιθανά μόρια πρόσδεσης (Shibuya et al., 1999), όμως η σχέση τους με την VEGF-επαγόμενη κυτταρική απόκριση παραμένει υπό διερεύνηση.

1.5.3 Η Λειτουργία

Στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα, όπως συμβαίνει και σε μερικούς άλλους ενήλικους ιστούς, η αγγειογένεση αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για την φυσιολογική του ανάπτυξη. Ο όρος αγγειογένεση αναφέρεται στην διαδικασία δημιουργίας νέων αιμοφόρων αγγείων από προϋπάρχοντα αγγεία (Folkman & Klagsbrun, 1987), η οποία αποτελείται από τρεις διακριτές λειτουργίες: (1) Την ρήξη της βασικής μεμβράνης των ήδη υπάρχοντων αγγείων, (2) την μετανάστευση ενδοθηλιακών κυττάρων από τα αγγεία αυτά προς το αγγειογενετικό ερέθισμα, και (3) τον πολλαπλασιασμό των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τελικά, η δημιουργία των νέων αιμοφόρων αγγείων ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό της βασικής κοιλότητας του τριχοειδούς σωλήνα και την διαφοροποίηση των νέων αγγείων σε μικρές αρτηρίες και φλέβες (Folkman & Klagsbrun, 1987; Risau, 1997). Ο σημαντικότερος αγγειογενετικός παράγοντας θεωρείται σήμερα ο VEGF (Robinson and Stringer, 2001). Στην ωοθήκη, η διαδικασία της αγγειογένεσης σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και του σχηματισμού και της αποδιάταξης του ωχρού σωματίου.

Ο VEGF είναι γνωστός και σαν παράγοντας αγγειακής διαπερατότητας (VPF, vascular permeability factor), ονομασία προερχόμενη από την ικανότητά του να αυξάνει την δυνατότητα διαρροής ουσιών από τα αγγεία (Senger et al., 1983). Η αύξηση της διαπερατότητας βασίζεται πιθανώς σε ένα μηχανισμό δημιουργίας θυρίδων σε ενδοθηλιακά κύτταρα μικρών αρτηριών και αγγείων (Roberts et al., 1995).

Πιο πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τον VEGF σε μηχανισμούς επιβίωσης ενδοθηλιακών κυττάρων, μέσω επαγωγής της έκφρασης των αντι-αποπτωτικών πρωτεϊνών Bcl-2 και A1 (Gerber et al., 1998). Η αντι-αποπτωτική δράση του VEGF μεσολαβείται από τον υποδοχέα του KDR και το P13/Akt μονοπάτι (Gerber et al., 1998b). Ο συσχετισμός του VEGF με την απόπτωση διαπιστώθηκε και σε κοκκώδη κύτταρα βοός, όπου η έκφραση της πρωτεΐνης αυτής και του KDR υποδοχέα του

κυμαινόταν σε υψηλά επίπεδα σε δείγματα υγιών ωοθυλακίων, ενώ εξασθενούσε σε ατρητικά ωοθυλάκια (Greenaway et al., 2004).

1.6. Ρόλος του VEGF στην φυσιολογία της ωοθήκης

1.6.1 Ωοθυλακική φάση

Ο βασικός ρόλος του VEGF στην ωοθήκη είναι η ρύθμιση της αγγειογένεσης, η οποία πραγματοποιείται σε κυκλική βάση (Geva and Jaffe, 2000; Kaczmarek et al., 2005). Η αγγειογενετική διαδικασία ξεκινάει από τα πρώτα στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης, με την έναρξη πολλαπλασιασμού των κοκκωδών και των κυττάρων θήκης, και εξακολουθεί μέχρι την στιγμή της ωοθυλακιορρηξίας (Suzuki et al., 1998). Συγκεκριμένα, παράλληλα με την δημιουργία του άντρου, ξεκινάει και ο σχηματισμός ενός αγγειώδους περιβλήματος, το οποίο αποτελείται από δύο αγγειακά δίκτυα τοποθετημένα εκατέρωθεν της θήκης. Τα αιμοφόρα αγγεία διευκολύνουν την προμήθεια του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου με θρεπτικές ουσίες, γοναδοτροπίνες, οξυγόνο και άλλα συστατικά, απαραίτητα για την ομαλή του λειτουργία. Η πολυπλοκότητα και το μέγεθος του αγγειακού δικτύου αυξάνεται σταδιακά και πιθανώς επιλεκτικά σε κάποια από τα ωοθυλάκια, συμμετέχοντας στην προνομιακή ωρίμανση των κυρίαρχων ωοθυλακίων (Zeleznik et al., 1981). Η άποψη ότι ο VEGF σχετίζεται με την διαδικασία επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου ενισχύεται από μελέτες που αποδεικνύουν ότι η πρωτεΐνη αυτή εκφράζεται μόνο σε κύτταρα των ωοθυλακίων που βρίσκονται στην φάση του άντρου και όχι σε νωρίτερα στάδια (Greenaway et al., 2005; Barboni et al., 2000; Stouffer et al., 2001). Επιπλέον, η ενίσχυση της έκφρασης του VEGF κατά την ωοθυλακική φάση βρέθηκε ότι αυξάνει τον αριθμό των ωοθυλακίων που φτάνουν στην ωοθυλακιορρηξία (Shimizu et al., 2003; Danforth et al., 2003).

Ο ρόλος του VEGF παρόλα αυτά δεν περιορίζεται στην αγγειογένεση, αλλά σχετίζεται και με την αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Levin et al., 1998), διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την είσοδο και συσσώρευση του πλάσματος στο άντρο (Kamat et al., 1995). Άλλωστε έχει αποδειχτεί ότι η δημιουργία του άντρου αναστέλλεται σε ωοθυλάκια μυών, μετά από επεξεργασία με αντι-KDR αντισώματα (Zimmermann et al., 2003). Επιπροσθέτως, ευνοείται η πρόσβαση των λιπιδίων στα κύτταρα θήκης, τα οποία χρησιμοποιούνται

ως υπόστρωμα για την σύνθεση των ανδρογόνων. Αυτά μεταφέρονται ακολούθως στο κοκκώδες στρώμα, όπου σχηματίζονται τα οιστρογόνα. Η συγκεκριμένη άποψη ενισχύεται από αποτελέσματα ερευνών που αποδεικνύουν ότι υψηλότερα επίπεδα VEGF σχετίζονται με αυξημένη παραγωγή οιστρογόνων σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (Mattioli et al., 2001). Περαιτέρω έρευνες για την σχέση του VEGF με την ωοθυλακική ανάπτυξη και την στεροειδογένεση έδειξαν ότι οι διαδικασίες αυτές αναστέλλονται σε προχωρημένα στάδια της ωοθυλακικής φάσης, με την χρήση αντι-VEGF αντισώματος (Zimmermann et al., 2001).

Έχει επίσης παρατηρηθεί ότι η αύξηση της έκφρασης του VEGF σχετίζεται με την μεταβολή των επιπέδων των προσταγλανδινών, γεγονός που εμπλέκεται στην διαδικασία της ωοθυλακιορρηξίας (Espey and Lipner, 1994). Η αλληλεπίδραση του VEGF με τις προσταγλανδίνες, που αποδίδεται στην αύξηση της διαπερατότητας, πιθανώς μεσολαβεί την δημιουργία του θυλακιακού υγρού και την απότομη μεγέθυνση των κυρίαρχων ωοθυλακίων στην φάση της ωοθυλακιορρηξίας (Koos, 1995). Εξαιρετικά σημαντική θεωρείται και η ικανότητα του VEGF να επάγει την ενεργοποίηση ορισμένων πρωτεολυτικών ενζύμων και ενεργοποιητών πλασμινογόνου σε ενδοθηλιακά κύτταρα (Pepper et al., 1991; Olofsson et al., 1998). Στα ένζυμα αυτά, που εκφράζονται από κοκκώδη κύτταρα (Reinthalier et al., 1990), αποδίδεται η αποδιάταξη του θυλακιακού περιβλήματος πριν την ρήξη των ωοθυλακίων (Tsafiriri et al., 1993). Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο VEGF και ο υποδοχέας του Flt-1 έχουν ήδη ανιχνευθεί σε κοκκώδη κύτταρα της προ-ωορρηκτικής φάσης (Otani et al., 1999), υποστηρίζεται η άποψη ότι ο VEGF εμπλέκεται και στην διαδικασία της ωοθυλακιορρηξίας.

Πολλαπλές μελέτες έχουν αποδείξει ότι η έκφραση του VEGF διεγείρεται από τις ωχρινοποιητικές ορμόνες LH (σε φυσικούς κύκλους) και hCG (σε τεχνητούς κύκλους) (Christenson and Stouffer, 1997; Barboni et al., 2000; Koos, 1995). Άλλωστε η έκθεση των ωοθυλακίων, προερχόμενα από διάφορα είδη, σε αυξημένες συγκεντρώσεις hCG συνεπάγεται την ταυτόχρονη αύξηση όχι μόνο των επιπέδων του VEGF, αλλά και των υποδοχέων του Flt-1 και KDR (Hazzard et al., 1999; Gomez et al., 2003; Shimizu et al., 2002). Βέβαια, τα συγκεκριμένα ευρήματα δεν αποκλείουν το ενδεχόμενο και άλλοι παρακρινικοί παράγοντες να εμπλέκονται στην ρύθμιση του VEGF κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Taylor et al., 2004).

1.6.2 Ωχρινική φάση

Μετά την ωοθυλακιορρηξία, αποδιατάσσεται η βασική μεμβράνη και τα αγγεία της θήκης εισέρχονται στο μη αγγειωμένο κοκκώδες στρώμα δημιουργώντας ένα εκτεταμένο αγγειακό δίκτυο, μέσω του οποίου προμηθεύεται το αναπτυσσόμενο ωχρο σωματίο τα θρεπτικά συστατικά (Koos, 1993). Η έντονη αγγειογενετική διαδικασία του νεοσχηματισμένου ωχρού σωματίου, η οποία συγκρίνεται με την δημιουργία αιμοφόρων αγγείων σε ταχέως αναπτυσσόμενους και επιθετικούς όγκους, το καθιστά σαν τον ιστό με τον μεγαλύτερο ρυθμό ροής αίματος στο ανθρώπινο σώμα (Niswender and Nett, 1988). Εν συνεχεία, η αγγείωση διατηρείται σε περίπτωση εγκυμοσύνης (Tamura et al., 1987), ή αποδιοργανώνεται στο τέλος του εμμηνορροϊκού κύκλου ταυτόχρονα με την ωχρινόλυση (Gaytan et al., 1999). Η έκφραση του VEGF στον άνθρωπο, ενισχύεται στα πρώτα στάδια της ωχρινικής φάσης και της εγκυμοσύνης, αλλά εξασθενεί πριν την ωχρινόλυση και κατά την εμμηνόρροια (Sugino et al., 2000b; Endo et al., 2001). Υψηλότερα επίπεδα VEGF ανιχνεύονται σε κοκκώδη ωχρινικά κύτταρα σε σχέση με τα κύτταρα θήκης (Kamat et al., 1995; Endo et al., 2001), γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι δρα σαν χημειοελκτικό μόριο για τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ώστε αυτά να εισέλθουν στο κοκκώδες στρώμα και να το αγγειώσουν.

Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι τα επίπεδα του VEGF διατηρούνται υψηλά και στο μέσο της ωχρινικής φάσης (Otani et al., 1999; Endo et al., 2001), όπου η αγγειογενετική διαδικασία έχει ολοκληρωθεί. Αποδεικνύεται συνεπώς ότι εκτός από τον αγγειογενετικό του ρόλο, ο VEGF πιθανώς σχετίζεται και με την διαδικασία διατήρησης των νεοσχηματιζόμενων αγγείων (Alon et al., 1995). Επιπλέον, η αύξηση της αγγειακής διαπερατότητας, που μεσολαβείται από τον VEGF, διευκολύνει την μεταφορά λιπιδίων στα ωχρινικά κύτταρα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την σύνθεση της προγεστερόνης. Οι πιθανοί συσχετισμοί του VEGF με την δημιουργία και την λειτουργία του ωχρού σωματίου επιβεβαιώθηκαν με μελέτες αναστολής του παράγοντα αυτού, κατά τις οποίες παρατηρήθηκε ταυτόχρονη απενεργοποίηση της αγγειογενετικής διαδικασίας, αλλά και μείωση των επιπέδων της παραγόμενης προγεστερόνης (Ferrara et al., 1998; Dickson and Fraser, 2000). Οι επιδράσεις του VEGF κατά την διάρκεια της ωχρινικής φάσης έχει βρεθεί ότι ελέγχονται από γοναδοτροπίνες (Yan et al., 1998; Neulen et al., 1998). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι η χρήση του GnRH ανταγωνιστή κατά την ωχρινική φάση μειώνει τα επίπεδα του

VEGF mRNA στο ωχρό σωματίο, υποδειλώνοντας ότι η LH επιδρά άμεσα ή έμμεσα στην έκφραση της VEGF πρωτεΐνης (Ravindranath et al., 1992). Τα αποτελέσματα αυτά, σε συνδυασμό με την παρατηρούμενη μείωση της έκφρασης του VEGF κατά την διάρκεια της ωχρινόλυσης, οδήγησαν στην διατύπωση και τον έλεγχο της υπόθεσης ότι η σταδιακή αυτή μείωση οφείλεται στα μειωμένα επίπεδα της LH στο τέλος κάθε μη γόνιμου κύκλου (Stouffer et al., 2001). Εντούτοις, οι μηχανισμοί ρύθμισης της έκφρασης του VEGF παράγοντα και των υποδοχέων του κατά την ωχρινική φάση απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση προκειμένου να διευκρινιστούν πλήρως.

2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΕΡΩΤΗΜΑ

Οι ιντεγκρίνες θεωρούνται οι βασικότεροι κυτταρικοί υποδοχείς των μορίων του εξωκυττάρου χώρου. Η σύνδεση των ιντεγκρινικών υποδοχέων με τον προσδέτη τους ρυθμίζει σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την διαφοροποίηση, την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των κυττάρων. Στην ωοθήκη, έχουν ανιχνευθεί μόρια του εξωκυττάρου χώρου, καθώς και ιντεγκρινικοί υποδοχείς, οι οποίοι έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των κοκκωδών κυττάρων, και ενδεχομένως σχετίζονται με τις διαδικασίες θυλακιακής ανάπτυξης, ωχρινογένεσης και ωχρινόλυσης.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εστίασε στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του ωχρού σωματίου, χρησιμοποιώντας δείγματα ωοθηκικού ιστού αλλά και κοκκώδη κύτταρα προερχόμενα από την ωχρινική φάση. Έχει βρεθεί ότι η α_5 ιντεγκρινική υπομονάδα, καθώς και ο εξωκυττάριος προσδέτης της, η FN, αρχίζουν να εκφράζονται στα κοκκώδη κύτταρα λίγο πριν από την έναρξη της ωοθυλακιορρηξίας, μία έκφραση που διατηρείται και στα πρώτα στάδια της ωχρινικής φάσης (Honda et al., 1995), γεγονός που υποδηλώνει την πιθανή συμμετοχή της ωχρινοτρόπου ορμόνης (LH) στην ρύθμιση της έκφρασης αυτής. Παράλληλα, αποδείχτηκε ότι η hCG ρυθμίζει κατά τον εμμηνορροϊκό κύκλο τη γυναίκα την έκφραση του VEGF μιτογενετικού παράγοντα (Sugino et al., 2000b). Επιπροσθέτως, οι ιντεγκρίνες έχουν άμεσα συσχετιστεί με την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι όταν διαταράσσεται η σύνδεση μεταξύ του κυττάρου και του υποστρώματός του επέρχεται κυτταρικός, αποπτωτικός θάνατος (anoikis) (Reddig and Juliano, 2005).

Στόχος της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε: (α) Η μελέτη της έκφρασης της FN και ορισμένων FN-συνδεδεμένων ιντεγκρινών ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης και σε διαφορετικά στάδια του εμμηνορροϊκού κύκλου. (β) Η μελέτη της ρύθμισης της FN και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. (γ) Η διερεύνηση του βιολογικού ρόλου των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ καθώς και της FN σε βασικές λειτουργίες (διαφοροποίηση, μετανάστευση, απόπτωση) των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (δ) Η μελέτη της πιθανής συμμετοχής του VEGF παράγοντα στις παραπάνω λειτουργίες, ως μέρος του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης της έκφρασης και της λειτουργίας των προαναφερόμενων ιντεγκρινών.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν:

- Η έκφραση των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρινικών υποδοχέων και του εξωκυττάρου προσδέτη τους (FN) σε κοκκώδη κύτταρα της ωοθυλακικής φάσης, καθώς και σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα.
- Η ρύθμιση της έκφρασης της FN και των FN-συνδεόμενων ιντεγκρινών ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), κατά την διάρκεια ανάπτυξης του ωχρού σωματίου.
- Η συμμετοχή του VEGF στον μηχανισμό ρύθμισης της FN και των FN-συνδεόμενων ιντεγκρινών.
- Η έκφραση του VEGFR1 υποδοχέα (Flt-1) σε κοκκώδη κύτταρα της ωοθυλακικής φάσης αλλά και σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα της ανθρώπινης ωοθήκης.
- Η ρύθμιση της έκφρασης του Flt-1 υποδοχέα, κατά την ανάπτυξη του ωχρού σωματίου.
- Η μεταναστευτική ικανότητα των κοκκωδών κυττάρων σε συγκεκριμένα υποστρώματα και η επίδραση της hCG στην λειτουργία αυτή.
- Η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της FN και των υποδοχέων της ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) για την δυνατότητα μετανάστευσης των κοκκωδών κυττάρων.
- Η δυνατότητα προσκόλλησης των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων σε διαφορετικά υποστρώματα και η επίδραση της hCG στην λειτουργία αυτή.
- Η σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ της FN και των υποδοχέων της ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) για την προσκολλητική ικανότητα των εξεταζόμενων κυττάρων.
- Η απόπτωση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων μετά από έλλειψη θρεπτικών και αναπτυξιακών παραγόντων στο μέσο καλλιέργειας, καθώς και ο προστατευτικός ρόλος της αλληλεπίδρασης μεταξύ της FN και των εξεταζόμενων ιντεγκρινικών υποδοχέων της.

Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν με την χρήση μονιμοποιημένου ιστού ανθρώπινης ωοθήκης, καθώς και πρωτογενείς καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων, προερχόμενα από γυναίκες που υποβάλλονται σε in vitro γονιμοποίηση.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πρωτογενής καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων ανθρώπινης ωοθήκης

Τα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα απομονώθηκαν από ασθενείς που υποβάλλονται σε *in vitro* γονιμοποίηση.

3.1.1 Απομόνωση κοκκωδών κυττάρων από θυλακιακό υγρό

Υλικά

Θρεπτικό υλικό Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM/F12) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Ορός Εμβρύου Βοός, Fetal Bovine Serum (FBS) (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Πενικιλίνη-Στρεπτομυκίνη, Penicillin-Streptomycin (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

L-γλουταμίνη, L-Glutamine (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Hepes, N-2-υδροξυεθυλπιπεραζίνη N-2 αιθανοσουλφονικό οξύ (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

HBSS: Hanks Balanced Salt Solution (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

Φικόλη (Histopaque-1077, Sigma-Aldrich, USA)

Fungizone (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

Τρυψίνη, Trypsin (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

VEGF πρωτεΐνη (R&D Systems Inc., USA)

Αντι-VEGF αντίσωμα εξουδετέρωσης (R&D Systems Inc., USA)

hCG

Επωαστικός κλίβανος Forma (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

Φυγόκεντρος (Hettich Zentrifugen, Germany)

Φλάσκες καλλιέργειών (BD Biosciences, USA)

Πλάκες αιματοκυτταρομετρητή Neubauer

Χρωστική Trypan Blue (Seromed Biochrom, Germany).

Μέθοδος

Το θυλακιακό υγρό συλλέγεται μέσα σε στείρο σωλήνα Corning των 50 ml και φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 400 x g για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης αφαιρείται το υπερκείμενο υγρό ενώ το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλυματοποιείται σε HBSS απουσία Ca^{2+} και Mg^{2+} . Μέσα σε στείρο σωλήνα Corning των 25 ml έχει προηγουμένως τοποθετηθεί διάλυμα φικόλης, πάνω στο οποία αποτίθεται το κυτταρικό διάλυμα σε αναλογία 1:1, πολύ προσεκτικά ώστε να μην αναμειχθούν τα δύο διαλύματα. Στην συνέχεια, το μείγμα φυγοκεντρείται σε ταχύτητα 400 x g για 30 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης, στον σωλήνα παρατηρούνται τρεις φάσεις. Τα κύτταρα περιέχονται στην μεσόφαση από όπου και συλλέγονται ώστε να επαναδιαλυματοποιηθούν σε θρεπτικό υλικό που περιέχει DMEM/F-12, 10 mM L-γλουταμίνη και 15mM HEPES και συμπληρώνεται με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS), 50 IU/ml πενικιλίνη, 50μg/ml στρεπτομυκίνη και 50 IU/ml Fungizone, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Makrigianakis et al., 1999). Προκειμένου να αποφευχθεί η ανάπτυξη μακροφάγων στην καλλιέργεια, 30 λεπτά αφού μείνουν τα κύτταρα στο θρεπτικό τους, συλλέγουμε το υπερκείμενο διάλυμα που περιέχει τα κύτταρα και τα μεταφέρουμε σε νέες φλάσκες, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τα πειράματα. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουμε την απομάκρυνση των μακροφάγων, εφόσον τα κύτταρα αυτά προσκολλούνται αμέσως στον πυθμένα της φλάσκας και δεν μεταφέρονται στην νέα καλλιέργεια. Οι κυτταρικές καλλιέργειες διατηρούνται και πολλαπλασιάζονται σε ατμόσφαιρα 5% CO_2 / 95% αέρα και σε θερμοκρασία 37° C. Το θρεπτικό υλικό ανανεώνεται κάθε 48 ώρες.

Μετά από επώαση με το κατάλληλο αντιδραστήριο για κάθε περίπτωση, τα κύτταρα ανασηκώνονται ενζυμικά με την χρήση 5% τρυψίνης και συλλέγονται. Ακολουθεί φυγοκέντρωση του κυτταρικού διαλύματος για 10 λεπτά με ταχύτητα 1000-2000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιάλυση σε 10 ml από το θρεπτικό τους υλικό. Ακολουθεί προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων με λήψη 10μl από το κυτταρικό διάλυμα σε 90μl Trypan Blue. Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων για επίστρωση σε κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε με αρίθμηση τους (σε πλάκα Neubauer) και την βοήθεια μικροσκοπίου ορατού φωτός, σε μεγέθυνση 40x. Συγκεκριμένος αριθμός κυττάρων κάθε φορά τοποθετείται σε φλάσκες ή ειδικές

επιφάνειες, που έχουν επιστρωθεί με κατάλληλα υποστρώματα για την εκτέλεση συγκεκριμένων πειραμάτων.

Τα κύτταρα που μελετάμε καλλιεργούνται παρουσία ή απουσία αντισώματος για τον VEGF παράγοντα, σε αραιώση 100 ng/ml σε PBS. Επιπλέον, πραγματοποιείται και επώαση με ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG, 1 IU/ml), παρουσία ή απουσία αντι-VEGF αντισώματος, το οποίο καταστέλλει την δράση της VEGF πρωτεΐνης. Το αντι- VEGF χρησιμοποιείται σε αραιώση 6 µg/ml σε PBS.

3.2 Επίστρωση επιφανειών με μόρια του εξωκυττάριου χώρου

Υλικά

Φιμπρονεκτίνη (Fibronectin fragment, Sigma-Aldrich, USA).

Βιτρονεκτίνη

Λαμινίνη

Πολυ-L - λυσίνη (Poly-L-lysine) (Sigma-Aldrich, USA)

Φυσιολογικός ορός (Water For Injection): NaCl 0.9%

PBS

Διαλύματα

Διάλυμα φιμπρονεκτίνης σε WFI 50 µg/ml

Διάλυμα βιτρονεκτίνης σε WFI 20 µg/ml

Διάλυμα λαμινίνης σε WFI 20 µg/ml

Διάλυμα Πολυ-L - λυσίνης σε WFI 100 µg/ml

Μέθοδος

Η διαδικασία επίστρωσης γίνεται όπως έχει ήδη περιγραφεί (Noyes et al., 1975) με μικρές τροποποιήσεις. Συγκεκριμένα, τα μόρια του εξωκυττάριου χώρου αραιώνονται σε WFI στις εξής συγκεντρώσεις: Φιμπρονεκτίνη (50 µg/ml), βιτρονεκτίνη (20 µg/ml), πολυ-L-λυσίνη (100 µg/ml) και λαμινίνη (20 µg/ml). Η αντίστοιχη επιφάνεια που θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε πείραμα επωάζεται όλη νύχτα με τα διαλύματα αυτά στους 4°C. Ακολουθεί έκπλυση των επιφανειών με PBS και τοποθέτηση των κυττάρων ή των πρωτεϊνών που μελετάμε κάθε φορά.

3.3 Ανοσοανίχνευση

Η ανοσοανίχνευση είναι μία διαδικασία εντοπισμού των αντιγόνων στην επιφάνεια ή στο εσωτερικό των κυττάρων και περιλαμβάνει δύο στάδια: Στο πρώτο στάδιο, χρησιμοποιείται ένα πρωτοταγές αντίσωμα, που δεσμεύεται στο υπό μελέτη αντιγόνο. Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ανίχνευση του πρώτου αντισώματος με έναν δεύτερο παράγοντα, πάνω στον οποίο είναι προσδεδεμένο ένα ενζυμικό σύστημα χρώσης ή μία φθορίζουσα ουσία. Η διαδικασία αυτή είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί τόσο σε τομές όσο και σε κύτταρα.

3.3.1. Ανοσοϊστοχημεία

Οι τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης στα διαφορετικά στάδια του ωοθηκικού κύκλου, παραχωρήθηκαν από ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε ωοθηκεκτομή για καλοήθεις γυναικολογικές παθήσεις. Η ανίχνευση του σταδίου της ωοθυλακιακής ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται το κάθε δείγμα βασίστηκε σε δείγματα από ιστό ενδομητρίου, από τους ίδιους ασθενείς, και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα κριτήρια του Noyes (Noyes et al., 1975).

Υλικά και συσκευές

Super sensitive Multilink Detection kit, HRP/DAB (BioGenex, San Ramon, USA) που περιέχει:

Πολυκλωνικό αντίσωμα συνδεδεμένο με βιοτίνη (Multilink biotinylated anti-immunoglobulins)

Horseradish Peroxidase Label, το ένζυμο είναι συνδεδεμένο με στρεπταβιδίνη

Power Block reagent, διάλυμα καζεΐνης.

Peroxide Block, 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό.

Hematoxylin Mayer's, αιμοτοξυλίνη χρωστική

DAB, 3,3'-diaminobenzidine

Υπόστρωμα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂ substrate).

Substrate Buffer

Tris/HCl (Bio-Rad Labs, USA)

NaCl (Merk Germany)

Κιτρικό οξύ (Merk, Germany)

Πρώτα αντισώματα:

- $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc., USA)
- $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon International Inc., USA)
- $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon International Inc., USA)
- Flt-1 (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Glycergel Mounting Medium (DakoCytomation)

Μικροσκόπιο ορατού φωτός Olympus, Japan με ψηφιακή κάμερα φωτογράφισης Nikon.

Διαλύματα

TBS (ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl) που περιέχει:

Tris/HCl 50 mM

NaCl 150 mM

Το PH ρυθμίζεται στους 7.6 και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα κιτρικού οξέος, που περιέχει:

2 gr κιτρικού οξέος σε 1 λίτρο H₂O

Μέθοδος

Οι τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης παραμένουν στους 56° C για 1 ώρα και στην συνέχεια εμβαπτίζονται σε 100% ξυλόλη, ώστε να πραγματοποιηθεί αποπαραφίνωσή τους. Ακολουθεί ενυδάτωση των τομών σε διαβαθμιζόμενη συγκέντρωση αιθανόλης με την ακόλουθη σειρά:

3.4 100% αιθανόλη, 3 εμβαπτίσεις διάρκειας 5 λεπτών η καθεμία

3.5 96% αιθανόλη, 3 εμβαπτίσεις από 5 λεπτά η καθεμία

3.6 80% αιθανόλη, 1 εμβάπτιση των 5 λεπτών

3.7 70% αιθανόλη, 1 εμβάπτιση των 5 λεπτών.

Τελικά πραγματοποιείται έκπλυση με διάλυμα TBS, το οποίο περιέχει 50 mmol/l Tris και 150 mmol/l NaCl. Μετά το τέλος της ενυδάτωσης, ακολουθεί επεξεργασία των δειγμάτων με μικροκύματα, ώστε να ελευθερωθούν κάποιοι από τους δεσμούς που δημιουργήθηκαν από την μονιμοποίηση των ιστών, με αποτέλεσμα να αυξάνει η ένταση της χρώσης των θετικών κυττάρων. Η διαδικασία περιλαμβάνει εμβάπτιση των τομών σε κιτρικό διάλυμα και ταυτόχρονη θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων, με ισχύ 450 W, για 5 λεπτά. Ανανεώνουμε το κιτρικό διάλυμα και επαναλαμβάνουμε συνολικά 3 φορές. Αφού κρυώσει το διάλυμα, πραγματοποιούμε έκπλυση των τομών με TBS και επεξεργασία τους με 3% υπεροξειδίου του υδρογόνου για 10 λεπτά σε

θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η δράση της ενδογενούς υπεροξειδάσης. Μετά από έκπλυση με TBS, ακολουθεί επεξεργασία με αντιδραστήριο (Power Block) ειδικό για το μπλοκάρισμα των μη-ειδικών θέσεων δέσμευσης, μειώνοντας την μη-ειδική χρώση. Στην συνέχεια οι τομές επωάζονται με τα κατάλληλα πρωτοταγή αντισώματα ($\alpha_{\nu\beta_3}$, $\alpha_{\nu\beta_5}$, $\alpha_5\beta_1$ και Flt-1), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραιώση 1:100 σε TBS με 1% διάλυμα καζεΐνης (Power Block). Παράλληλα, χρησιμοποιούνται τομές αναφοράς, στις οποίες έχει παραλειφθεί το πρώτο αντίσωμα. Τα αντισώματα αυτά θα εντοπιστούν επωάζοντας για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με δεύτερο αντίσωμα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με βιοτίνη. Η ανίχνευση της βιοτίνης πραγματοποιείται με την επεξεργασία του ιστού με στεπταβιδίνη και HRP για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί επώαση με το χρωμογόνο διάλυμα DAB, η χρήση του οποίου θα χρώσει τις περιοχές εντόπισης του ενζύμου. Μετά την έκπλυση με άφθονο νερό χρησιμοποιείται η αιματοξυλίνη για χρώση των μη δεσμευμένων περιοχών και τοποθέτηση καλυπτρίδων με την χρήση ειδικής κόλλας με γλυκερόλη, Glycergel.

Τα δείγματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο ορατού φωτός.

Η ποσοτική εκτίμηση της έκφρασης των υπό εξέταση πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση μιας ημι-ποσοτικής μεθόδου. Ο δείκτης IRS (immuno-reactive score) με εύρος από 0 έως 12 υπολογίζεται από το γινόμενο της έντασης της χρώσης (βαθμονομημένη ως 0 = καθόλου χρώση, 1 = αδύναμη χρώση, 2 = χρώση μέτριας έντασης, 3 = χρώση ισχυρής έντασης) και του ποσοστού των κυττάρων θετικών για τη χρώση (0 = κανένα χρωσμένο κύτταρο, 1 = χρωσμένα κύτταρα <10% επί του συνόλου των εξεταζομένων κυττάρων, 2 = 11-50% των κυττάρων, 3 = 51-80% των κυττάρων και 4 = >81% των κυττάρων) (Remmele et al, 1986).

3.3.2. Ανοσοφθορισμός με μικροσκοπία συνεστίασης (Confocal Laser Scanning Microscopy)

Υλικά και συσκευές

Καλυπτρίδες 22 x 22 mm (SUPERIOR, Germany)

Αντικειμενοφόρες πλάκες 76 x 26mm (GLASSEX, Germany)

Μεθανόλη

FBS (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, Phosphate Buffer Saline, PBS (Sigma-Aldrich, USA).

Μονοκλωνικά πρωτοταγή αντισώματα ενάντια στις εξής πρωτεΐνες ποντικίου:

- $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc., USA)
- $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon International Inc., USA)
- $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon International Inc., USA)
- FN (Chemicon International Inc., USA)

Δευτεροταγές αντίσωμα: Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG ανοσοσφαιρινών ποντικίου συνδεδεμένο με φθορίζουσα ουσία (fluorescein isothiocyanate, FITC) (Chemicon International Inc., USA)

Μέσο προστασίας φθορισμού: ProLong Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen,)

Μικροσκόπιο συνεστίασης Confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)

Μέθοδος

Αποστειρωμένες καλυπτρίδες επικαλύπτονται με μόρια πρόσδεσης του εξοκυτταρικού περιβάλλοντος με την διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω. Κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης αναπτύσσονται πάνω στις επικαλυμμένες καλυπτρίδες μέσα στο θρεπτικό τους υλικό. Μετά από 24 ώρες, γίνεται έκπλυση των κυττάρων με PBS και μονιμοποίησή τους με 100% μεθανόλη για 5 λεπτά στους -20°C . Ακολουθεί επώαση με 10% ορό εμβρύου βοός (FBS) για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων δέσμευσης. Τα κύτταρα επωάζονται όλη νύχτα στους 4°C με τα κατάλληλα πρωτοταγή αντισώματα ($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_5\beta_1$, FN), τα οποία είναι αραιωμένα 10 $\mu\text{g/ml}$ σε PBS με 1% FCS. Παράλληλα, χρησιμοποιούνται κύτταρα αναφοράς που επωάζονται με ορό (1% FCS σε PBS) αντί αντισώματος. Την επόμενη μέρα, τα κύτταρα επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα, για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, σε υγρό και σκοτεινό περιβάλλον. Τα δεύτερα αντισώματα περιέχουν προσδεδεμένη φθορίζουσα ουσία (fluorescein isothiocyanate, FITC) και χρησιμοποιούνται σε αραιώση 1:200 σε 1% FBS και PBS. Τα κύτταρα που χρησιμοποιούνται ως κύτταρα αναφοράς επωάζονται επίσης με το δεύτερο αντίσωμα. Ακολουθεί έκπλυση με PBS και τοποθέτηση των καλυπτρίδων πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες χρησιμοποιώντας ένα μέσο διατήρησης του φθορισμού. Η παρατήρηση των κυττάρων

γίνεται σε μικροσκόπιο φθορισμού, το οποίο χρησιμοποιεί ακτίνες laser για την εστίαση σε ένα σημείο του κυττάρου.

Βελτιστοποίηση της φωτεινότητας και της αντίθεσης των εικόνων γίνεται με τη χρήση του προγράμματος software (Adobe Photoshop 7.0).

3.4 Κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της έκφρασης πρωτεϊνών στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης

Υλικά και συσκευές

Στείρες πλάκες των 6 οπών

Μονοκλωνικά πρωτοταγή αντισώματα ενάντια στις εξής πρωτεΐνες ποντικού:

- anti-FN (Chemicon International Inc., USA)
- anti- $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc., USA)
- anti- $\alpha_5\beta_1$ (Chemicon International Inc., USA)
- anti- $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon International Inc., USA)
- IgG3 (Chemicon International Inc., USA)
- anti-Flt-1 (Chemicon International Inc., USA)
- anti-PECAM-1 (Chemicon International Inc., USA)
- Δευτεροταγές αντίσωμα: Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας κατά των IgG ανοσοσφαιρινών ποντικού συζευγμένο με ισοθειοκυανιούχο φλουοροσκεΐνη (fluorescence isothiocyanate, FITC) (Chemicon International Inc., USA)

hCG / VEGF

PBS (Sigma-Aldrich, USA)

BSA (Sigma-Aldrich, USA)

Κυτταρομετρητής ροής (Coulter Epics XL-MCL Beckman-Coulter, USA)

Διαλύματα

Διάλυμα PBS-BSA 0.1%

Μέθοδος

Η κυτταρομετρία ροής είναι μία δυναμική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση και τον διαχωρισμό των κυττάρων ενός πληθυσμού, ανάλογα με τα φυσικά χαρακτηριστικά τους. Συγκεκριμένα, προσφέρει έναν τρόπο για την συγκέντρωση στατιστικών δεδομένων από έναν μεγάλο αριθμό κυττάρων, συσχετίζοντας αυτές τις πληροφορίες με πολλαπλές παραμέτρους ενός κυτταρικού

πληθυσμού. Παράλληλα, χρησιμοποιώντας φθορίζοντα μόρια, είναι δυνατή η ανίχνευση πρωτεϊνών ή ενζύμων που εκφράζουν διάφορα κύτταρα στο εσωτερικό τους ή στην μεμβρανική τους επιφάνεια. Ο κυτταρομετρητής ροής πραγματοποιεί την ανάλυση των κυττάρων με τον εξής τρόπο: Τα κύτταρα περνάνε μέσα από μία δέσμη laser, ένα-ένα, σκεδάζοντας το φως προς διαφορετικές γωνίες, ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του κάθε κυττάρου (μέγεθος, όγκος, pH κλπ). Στην περίπτωση χρήσης αντισωμάτων συνδεδεμένων με φθορίζουσες ουσίες, το φως προσκρούει στις ουσίες αυτές, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται ένα φθορίζον σήμα, το οποίο ανιχνεύεται από τον κυτταρομετρητή ροής.

Η ανίχνευση των ιντεκρινικών υποδοχέων και της φμπρονεκτίνης πραγματοποιήθηκε με την χρήση αντισωμάτων, που προσδέονται στις πρωτεΐνες αυτές. Ένα δεύτερο αντίσωμα συνδεδεμένο με ισοθειοκυανιούχο φλουοροσκεΐνη (fluorescence isothiocyanate, FITC), ανιχνεύει τα πρώτα αντισώματα και συνδέεται με αυτά. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός και η μέτρηση εκείνων των κυττάρων που φθορίζουν δηλαδή εκείνων στα οποία έχουν δεσμευθεί τα πρώτα αντισώματα.

Κοκκώδη κύτταρα από ανθρώπινη ωοθήκη, που έχουν απομονωθεί, καλλιεργούνται για 48-72 ώρες, σε στείρες πλάκες των 6 οπών (10^6 κύτταρα ανά οπή), παρουσία ή απουσία της VEGF πρωτεΐνης ή της ωχρινοποιητικής ορμόνης hCG. Τα κύτταρα συλλέγονται με ανακίνηση και σε σύντομο χρονικό διάστημα γίνεται έκπλυση μία φορά με PBS, το οποίο περιέχει 1% αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA), ενώ διατηρούνται συνεχώς στους 4°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση με ταχύτητα 2000 rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τα κύτταρα που έχουν κατακρημνιστεί επωάζονται για 1 ώρα στους 4°C με τα κατάλληλα πρωτοταγή αντισώματα:

⇒ anti-FN, anti- $\alpha\beta_3$, anti- $\alpha\beta_5$, και anti- $\alpha\beta_5$, όλα αραιωμένα 1:100 σε PBS

⇒ mouse IgG3, που χρησιμοποιείται σαν αρνητικός μάρτυρας, σε αραιώση 100 $\mu\text{g/ml}$ σε PBS

Μετά από έκπλυση με PBS, το κυτταρικό διάλυμα φυγοκεντρείται και επωάζεται με το δεύτερο anti-mouse IgG αντίσωμα, το οποίο είναι συζευγμένο με φλουοροσκεΐνη (fluorescein isothiocyanate, FITC), στους 4°C για 30 min. Μετά από έκπλυση με PBS ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων εντός 20 λεπτών με κυτταρομετρία ροής, με τη χρήση κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSAarray και αναλύονται με το

πρόγραμμα CELLQuest και ModFit LT. Τα αποτελέσματα προκύπτουν με τη μορφή ιστογραμμάτων, στα οποία ο άξονας των y αντιστοιχεί στον αριθμό των εξεταζόμενων κυττάρων και ο άξονας των x εκφράζει την ένταση του φθορισμού σε λογαριθμική κλίμακα.

3.5 Κυτταρική προσκόλληση

Υλικά

Πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 οπών (Corning & Costar, USA)

hCG

Anti- $\alpha_5\beta_1$, anti- $\alpha_v\beta_3$, anti- $\alpha_v\beta_5$ (Chemicon International Inc., USA)

Goat anti-mouse IgG αντίσωμα (Cappel Research, USA)

anti-HLA-DR (Santa Cruz Biotechnology, USA)

Tris/HCl (Bio-Rad Laboratories, USA)

Μετα-νατρίου άλας του θεϊκού δωδεκυλίου, SDS (Bio-Rad Laboratories, USA)

PBS

FBS (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

Αλβουμίνη ορού βοός, Bovine Serum Albumin, BSA (Sigma-Aldrich, USA)

HEPES (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK).

NaCl, KCl, CaCl₂, (Sigma-Aldrich, USA)

MgCl₂ (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

MEM sodium pyruvate (GIBCO-BRL, Life Technologies, UK)

Διαλύματα

Διάλυμα PBS/BSA 1%

Ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει: 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM sodium pyruvate.

Το pH ρυθμίζεται στα 7,4.

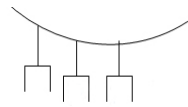
Μέθοδοι

3.5.1. Κυτταρική προσκόλληση σε επιφάνειες επιστρωμένες με προσδέτες του εξωκυττάριου χώρου

Η πρόσδεση των ιντεγκρινικών υποδοχέων στα μόρια του εξωκυττάριου χώρου ανιχνεύθηκε με ειδικές μελέτες συνάφειας, κατά τις οποίες επιτεύχθηκε

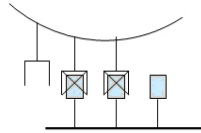
ποσοτικός προσδιορισμός των συμπλόκων και κατά προσέγγιση υπολογισμός των προσκολλημένων κυττάρων. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης περιλαμβάνει σήμανση των ιντεγκρινών με ραδιενέργεια, πρόσδεση των ιντεγκρινικών υποδοχέων στους προσδέτες του εξωκυττάρου χώρου, απόσπαση των κυτταρικών συστατικών από τα συνδεδεμένα σύμπλοκα και ανίχνευση των προσδεδεμένων ιντεγκρινών με μέτρηση της ραδιενέργειας.

Συγκεκριμένα, την πρώτη μέρα του πειράματος ειδικές πλάκες κυτταροκαλλιέργειας 96 οπών επικαλύπτονται με ουσίες του εξωκυττάρου χώρου (50 $\mu\text{g/ml}$ FN, ή 100 $\mu\text{g/ml}$ PLL). Στις επικαλυμμένες επιφάνειες, όπως και σε μερικές που δεν έχουν επικαλυφθεί με κάποια ουσία, πραγματοποιείται έκπλυση με PBS και επώαση με 1 % BSA/PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να περιοριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης. Κοκκώδη κύτταρα έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί σε θρεπτικό μέσο χωρίς μεθειονίνη για 2 ώρες, ενώ στην συνέχεια έχουν επωαστεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει ^{35}S -μεθειονίνη και hCG όλη νύχτα στους 37 °C. Τα κύτταρα αυτά συλλέγονται και μετρώνται με την χρήση του αιματοκυτταρομέτρου. 5×10^3 κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο με 1% FBS, τοποθετούνται στις διαφορετικά επικαλυμμένες επιφάνειες και αφήνονται να επιδράσουν με τις ουσίες αυτές για 30 λεπτά στους 37°C, ώστε να πραγματοποιηθεί σύνδεση των ιντεγκρινικών υποδοχέων με τους αντίστοιχους προσδέτες. Ακολουθεί έκπλυση με PBS, για την απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων και επεξεργασία με Tris HCl που περιέχει 1% SDS, προκειμένου να κατασταλούν οι μη δεσμευμένες ιντεγκρίνες και να αποσπαστούν τα κυτταρικά συστατικά των προσκολλημένων κυττάρων. Τα μόρια του εξωκυττάρου χώρου δεν επηρεάζονται από την ήπια δράση του SDS, με αποτέλεσμα να παραμένουν στο διάλυμα μαζί με τους προσδεδεμένους ιντεγκρινικούς υποδοχείς. Οι ιντεγκρίνες που μετέχουν στα σύμπλοκα αυτά είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθούν με μέτρηση της ραδιενέργειας (counts per minute, cpm). Στην εικόνα 1 που ακολουθεί περιγράφεται σχηματικά η ποσοτικοποίηση της προσκόλλησης των κυττάρων στον εξωκυττάριο χώρο.

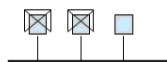


1. Σήμανση των ιντεγκρινών με 35S-methionine.

2. Επώαση 30 min στους 37°C, ώστε να προσκολληθούν τα κύτταρα στο υπόστρωμα



3. Απομάκρυνση των μη προσκολλημένων κυττάρων και των κυτταρικών συστατικών



4. Επαναδιάλυση σε 1% SDS

5. Μέτρηση της ραδιενέργειας και ποσοτικοποίηση των προσκολλημένων κυττάρων

Εικόνα 1. Απλοποιημένη σχηματική απεικόνιση του υπολογισμού των κυττάρων που προσκολλούνται στο υπόστρωμα.

3.5.2. Κυτταρική προσκόλληση σε επιφάνειες επιστρωμένες με ακινητοποιημένα αντισώματα κατά των ιντεγκρινών

Με την παραπάνω μέθοδο διαπιστώθηκε η προσκόλληση των κυττάρων στις επικαλυμμένες με μόρια του εξωκυττάριου χώρου επιφάνειες. Περαιτέρω μελέτες όμως πραγματοποιήθηκαν, προκειμένου να διαπιστωθεί η συμμετοχή των ιντεγκρινικών υποδοχέων στην προσκόλληση αυτή, καθώς και η επίδραση της κάθε ιντεγκρίνης χωριστά. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα ειδικά για τις συγκεκριμένες ιντεγκρίνες, τα οποία αναγνωρίζουν τις ειδικές θέσεις δέσμησης πάνω στα μόρια της φμπρονεκτίνης και προσδένονται σε αυτές, δρώντας ανταγωνιστικά ως προς τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς των κυττάρων.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επικάλυψη ειδικών πιάτων με φμπρονεκτίνη, όπως έχει περιγραφεί, και επώασή τους για 2 ώρες στους 37 °C με anti-mouse IgG αντίσωμα, με συγκέντρωση 50 µg/ml σε PBS. Ακολουθεί έκπλυση με PBS και επεξεργασία με 1 % BSA/PBS για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να περιοριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμησης. Οι επικαλυμμένες επιφάνειες επωάζονται όλη νύχτα στους 4°C με αντισώματα κατά των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ και $\alpha_v\beta_3$

ιντεγκρινών, ή με HLA-DR σε συγκέντρωση 40 µg/ml σε PBS, το οποίο χρησιμοποιείται σαν αρνητικός μάρτυρας. Κοκκώδη κύτταρα που έχουν καλλιεργηθεί παρουσία ^{35}S -μεθειονίνης, και είναι διεγερμένα ή μη με hCG (με την διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω) συλλέγονται με τρυψίνη και μετρώνται. 5×10^3 κύτταρα επαναδιαλύονται σε ρυθμιστικό διάλυμα με σύσταση 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2,5 mM CaCl₂, 5 mM sodium pyruvate, pH 7,4 και επωάζονται στις επικαλυμμένες επιφάνειες για 30 λεπτά στους 37 °C. Ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω και τελικά πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των δεσμευμένων ιντεγκρινών με μέτρηση της ραδιενέργειας.

3.6 Μέτρηση της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων

Υλικά

Αντικειμενοφόρες πλάκες (Lab-Tek, Micro Video Instruments, Arrow, Massachusetts, USA)

Βαζελίνη/Παραφίνη

Φιμπρονεκτίνη (Sigma-Aldrich, USA)

BSA/PBS

Time Lapse Video Microscopy (Nikon Corp. Japan)

anti- $\alpha 5\beta 1$ (Chemicon International Inc., USA)

anti- $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc., USA)

anti-mouse IgG (Cappel Research, USA)

hCG

Μέθοδος

Με ειδικό μικροσκόπιο παρατηρήθηκε η κινητικότητα των κυττάρων, όπως έχει ήδη περιγραφεί (Makrigiannakis et al., 1999). Ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες επικαλύπτονται με μίγμα βαζελίνης και παραφίνης (20:1), προκειμένου να διατηρηθεί σταθερό το pH του διαλύματος. Εν συνεχεία, οι πλάκες επιστρώνονται με FN (10 µg/ml), με τον τρόπο που έχει αναλυθεί παραπάνω. Ακολουθεί επώαση των επιφανειών με 2% BSA για 1 ώρα στους 37 °C, ώστε να μπλοκαριστούν οι μη ειδικές θέσεις δέσμευσης και έκπλυση με 1% PBS. Στην συνέχεια, οι επιφάνειες επωάζονται όλη νύχτα στους 4°C με μονοκλωνικά αντισώματα κατά των $\alpha 5\beta 1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, καθώς και με mouse IgG αντίσωμα. Απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα

ανθρώπινης ωοθήκης, τα οποία έχουν προηγουμένως καλλιεργηθεί για 48 ώρες απουσία ορού και αναπτυξιακών παραγόντων τοποθετούνται στις επικαλυμμένες επιφάνειες, σε συγκέντρωση $0,5 \times 10^5$ κύτταρα / επιφάνεια και παρατηρούνται σε ειδικό μικροσκόπιο (Time Lapse Video Microscopy). Ένα πεδίο που περιέχει αρκετά μεγάλο αριθμό κυττάρων επιλέγεται κάθε φορά και παρατηρείται στο μικροσκόπιο για τουλάχιστον 7 συνεχείς ώρες. Στο προαναφερόμενο χρονικό διάστημα συλλέγονται σειριακές εικόνες των κυττάρων ανά μία ώρα, ο συνδυασμός των οποίων επιτρέπει τον υπολογισμό της συνολικής απόστασης που καλύφθηκε από τα εξεταζόμενα κύτταρα. Για κάθε διαφορετική συνθήκη μελετήθηκε η κινητική δραστηριότητα 70 τουλάχιστον κυττάρων σε τρία, ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα.

3.7 Μελέτη της απόπτωσης των κοκκωδών κυττάρων.

Κατά την αποπτωτική διαδικασία, όπως έχει ήδη ειπωθεί ενεργοποιούνται συγκεκριμένες κασπάσες, οι οποίες είναι δυνατόν να ενεργοποιήσουν περαιτέρω ένζυμα (DNάσες) που καταλύουν τον τεμαχισμό του DNA στις περιοχές μεταξύ των νουκλεοσωμάτων. Το αποτέλεσμα κατακερματισμού του DNA είναι η παρουσία ολιγονουκλεοτιδικών τεμαχίων, τα οποία έχουν μοριακό βάρος 180 kd ή πολλαπλάσιά του. Η περιοδική κατανομή του DNA σε πολλαπλάσια των 180 kb είναι ορατή κατά την ηλεκτροφόρηση του γενωμικού DNA σε πηκτή αγαρόζης. Το DNA των αποπτωτικών κυττάρων όμως υφίσταται μερικό τεμαχισμό, και μόνο τα μικρού μοριακού βάρους τμήματα εξέρχονται του πυρήνα, ενώ τα μεγάλα τμήματα παραμένουν στο εσωτερικό του. Η ποσοτική εκτίμηση του περιεχομένου του DNA ενός αποπτωτικού πυρήνα επιτυγχάνεται με χρώση των νουκλεϊκών οξέων με συγκεκριμένες φθορίζουσες χρωστικές, όπως για παράδειγμα το ιωδιούχο προπίδιο.

Το ιωδιούχο προπίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική, η οποία προσδένεται με στοιχειομετρικό τρόπο μεταξύ των βάσεων του DNA ενός κυττάρου, ώστε η εκπομπή του φθορισμού να είναι ανάλογη με την ποσότητά του στο εσωτερικό του πυρήνα. Τα κύτταρα που βρίσκονται στα τελικά στάδια της απόπτωσης ή τα οποία είναι ήδη νεκρά, είναι θετικά σε ιωδιούχο προπίδιο, επειδή, όντας διαπερατή η μεμβράνη τους, επιτρέπει στο ιωδιούχο προπίδιο να εισέρχεται στον πυρήνα, όπου προσδένεται και βάφει το γενετικό υλικό. Η διαδικασία αυτή όμως είναι δυνατόν να οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις, εφόσον έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη

κατακερματισμένου DNA και σε νεκρωτικά κύτταρα. Επιπλέον, το ιωδιούχο προπίδιο μπορεί να ανιχνεύσει πυρηνικό DNA, το οποίο δεν είναι τεμαχισμένο αλλά έχει διαφορετική δομή χρωματίνης, που ενδεχομένως επιτρέπει την πρόσβαση της φθορίζουσας χρωστικής (π.χ κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε διαδικασία διαφοροποίησης) (Darzynkiewicz et al., 2001). Για τον λόγο αυτό πριν πραγματοποιηθεί η ποσοτική ανάλυση του πυρηνικού περιεχομένου με κυτταρομετρία ροής, η κυτταρική απόπτωση ανιχνεύθηκε με ηλεκτροφόρηση γενομικού DNA σε πηκτή αγαρόζης, καθώς και με *in situ* σήμανση του 3'-OH άκρου μονών αλυσίδων του γενετικού υλικού (TUNEL assay). Σε κάθε μία από τις παραπάνω διαδικασίες, τα κύτταρα είχαν προηγουμένως καλλιεργηθεί απουσία ορού, συνθήκες που έχει αποδειχτεί ότι επάγουν την κυτταρική απόπτωση (Makrigiannakis et al., 1999; Breckwoldt et al., 1996). Επιπλέον, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση, 24 ώρες μετά την έκθεση των κυττάρων στις συνθήκες αυτές, ώστε να βρίσκονται στην ίδια φάση της αποπτωτικής διαδικασίας.

3.7.1 *In situ* χρώση του 3'-OH άκρου μονών αλυσίδων του γενετικού υλικού (TUNEL assay).

Υλικά

In situ cell death detection kit, Fluorescein, που περιέχει:

- Ενζυμικό διάλυμα (Terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT).
- Νουκλεοτιδικό διάλυμα (dUTP συνδεδεμένα με φθορίζουσα χρωστική).

Chamber slides

Φιμπρονεκτίνη (Fibronectin fragment, Sigma-Aldrich, USA).

Πολυ-L - λυσίνη (Poly-L-lysine) (Sigma-Aldrich, USA)

PBS

Αντισώματα για να μπλοκάρουμε τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς:

$\alpha_5\beta_1$ (Chemicon International Inc. California, USA)

$\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc. California, USA)

Ενεργοποιημένα αντισώματα κατά των:

$\alpha_5\beta_1$ (Chemicon International Inc. California, USA)

$\alpha_v\beta_3$ (Chemicon International Inc. California, USA)

HLA-DR (Chemicon International Inc. California, USA)

Φορμαλίνη

Ανάστροφο μικροσκόπιο εξοπλισμένο με laser ιόντων αργού-κρυπτού (Zeiss IM35)
Διαλύματα

10% φορμαλίνη σε PBS

πολυ-L-λυσίνη σε PBS 100 µg/ml

Διάλυμα αντίδρασης TUNEL: 450 µl νουκλεοτιδικό και 50 µl ενζυμικό διάλυμα

Μέθοδος

Με την διαδικασία αυτή ανιχνεύονται οι μονές αλυσίδες με *in situ* σήμανση του 3'-OH άκρου των κομματιών DNA *in vitro*, με την χρήση νουκλεοτιδίων (dUTP) συνδεδεμένων με φθορίζουσες χρωστικές. Συγκεκριμένα, ειδικές αντικειμενοφόρες πλάκες (chamber slides) επικαλύπτονται με ενεργοποιημένα αντισώματα κατά των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, ή με μόρια πρόσδεσης του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος, με την διαδικασία που έχει ήδη περιγραφεί. Η επίστρωση με ενεργοποιημένα αντισώματα πραγματοποιείται με την εξής διαδικασία: οι πλαστικές επιφάνειες επωάζονται με τα αντίστοιχα αντισώματα σε τελική συγκέντρωση 40 µg/ml σε PBS, όλη νύχτα στους 4°C. Κοκκώδη κύτταρα από ανθρώπινη ωοθήκη αναπτύσσονται στην συνέχεια στις πλάκες αυτές και μέσα σε θρεπτικό υλικό που δεν περιέχει ορό. Μετά από χρονικό διάστημα 24 ωρών, τα κύτταρα μονιμοποιούνται με 10% διάλυμα φορμαλίνης και γίνεται έκπλυση δύο φορές με PBS. Ακολουθεί επώαση των κυττάρων με το διάλυμα αντίδρασης TUNEL στους 37°C για 1 ώρα στο σκοτάδι. Κατά την χρονική αυτή περίοδο, το ένζυμο TdT επάγει τον πολυμερισμό των φθορίζουσων νουκλεοτιδίων (dUTP) στο 3' άκρο των κομματιών του DNA. Στο τέλος πραγματοποιείται έκπλυση των κυττάρων με PBS και παρατήρηση των σημασμένων κομματιών DNA σε μικροσκόπιο φθορισμού. Ο αριθμός των TUNEL-θετικών πυρήνων μετράται σε 12 τυχαία επιλεγμένα πεδία (40X) και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως επί τοις εκατό θετικά κύτταρα. Κατά μέσο όρο μετρώνται 250 κύτταρα για κάθε περιοχή επικαλυμμένη με διαφορετικό μόριο του εξωκυττάρου χώρου.

3.7.2 Ανίχνευση του κατακερματισμένου DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης

Υλικά και συσκευές

Tris/HCl (Bio-Rad Labs, USA)

EDTA

Triton X-100 (SIGMA-Aldrich, USA)

Πρωτεΐνάση K

RNase

Μέθοδος

Τα κοκκώδη κύτταρα, αφού καλλιεργηθούν, πλένονται με PBS και συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 1000 x g για 10 λεπτά. Στην συνέχεια, προκαλείται λύση των κυττάρων σε lysis buffer, το οποίο περιέχει 10 mmol/l TrisHCL, 10 mmol/L EDTA και 0,5% Triton X-100 για 20 λεπτά σε πάγο και κατεργασία με πρωτεΐνάση K (20 mg/ml) και RNAση (20 mg/ml) 1 µl, για 1 ώρα στους 37°C. Το δείγμα ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα 2% αγαρόζης και το DNA, γίνεται ορατό με υπεριώδη ακτινοβολία.

3.7.2.1 Ηλεκτροφόρηση

Υλικά και συσκευές

Αγαρόζη

Tris (Bio-Rad Laboratories, USA)

Οξικό νάτριο (sodium acetate)

EDTA

Βρωμιούχο αιθίδιο

Δείκτες γνωστού μοριακού βάρους (Life Technologies, ΗΠΑ)

Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης

Μέθοδος

Για την ανίχνευση του DNA, τα δείγματα τοποθετούνται σε συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης που περιέχει βρωμιούχο αιθίδιο. Η συσκευή συνδέεται με τροφοδοτικό, εφαρμόζεται σταθερή τάση και αφήνεται να διαχωριστεί το DNA. Πραγματοποιείται ο διαχωρισμός ανάλογα με το μοριακό βάρος. Ο υπολογισμός του μοριακού βάρους των γονιδίων είναι εφικτός με τη χρήση των δεικτών γνωστού μοριακού βάρους που τρέχουν παράλληλα με τα άγνωστα δείγματα.

Το βρωμιούχο αιθίδιο δεσμεύεται και χρώνει το DNA, το οποίο ανιχνεύεται σε συσκευή υπεριώδους φωτός.

3.7.3 Κυτταρομετρία ροής για προσδιορισμό του DNA περιεχομένου

Υλικά και συσκευές

Ιωδιούχο προπίδιο

Αιθανόλη/PBS (Merk, Germany)

RNAse A

Φυγόκεντρος

Κυτταρομετρητής Beckton-Dickinson FACSAarray (Beckton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ)

Software προγράμματα CELLQuest (Beckton-Dickinson) και ModFit LT (Verify Software, Topsham, MN)

Μέθοδος

Η μέθοδος στηρίζεται στην ειδική χρώση των αποπτωτικών κυττάρων με Ιωδιούχο Προπίδιο (Propidium iodide). Έτσι εκτιμάται το ποσοστό αποπτωτικών κυττάρων ως προς τα ζώντα φυσιολογικά κύτταρα. Κατά την εκτέλεση του πειράματος, μετά από 24 ώρες επώασης με τις υπό μελέτη πρωτεΐνες (σε θεραπευτικό υλικό απουσία ορού), τα κύτταρα συλλέγονται, μονιμοποιούνται, φυγοκεντρούνται και βάφονται με Ιωδιούχο Προπίδιο.

Συγκεκριμένα, για την εκτέλεση της μεθόδου τα κύτταρα συλλέγονται από τα δοχεία καλλιέργειας με χρήση τρυψίνης και μετρώνται με το αιματοκυτταρόμετρο. $1-2 \times 10^6$ κύτταρα τοποθετούνται σε σωλήνα και φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με ταχύτητα 1600 rpm. Ακολουθεί επαναδιάλυση του κυτταρικού περιεχομένου με 70% αιθανόλη για 16 ώρες μέσα στον πάγο, ώστε να πραγματοποιηθεί μονιμοποίησή τους. Στο διάλυμα αιθανόλης μπορούν να διατηρηθούν για μερικές εβδομάδες, στους -20°C . Το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 1600 rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και απομακρύνεται το υπερκείμενο αιθυλικό διάλυμα. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε διάλυμα PBS, που περιέχει 500 $\mu\text{g/ml}$ RNάση A για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Το βήμα αυτό πραγματοποιείται, προκειμένου να αποφευχθεί ενδεχόμενη πρόσδεση του ιωδιούχου προπιδίου στο RNA, που θα οδηγήσει σε λανθασμένες εκτιμήσεις. Αφού

φυγοκεντρηθεί το διάλυμα και απομακρυνθεί το υπερκείμενο, επωάζεται με διάλυμα PBS, που περιέχει ιωδιούχο προπίδιο σε συγκέντρωση 20 $\mu\text{g/ml}$, για 30 λεπτά στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα δείγματα εξετάζονται με τη χρήση κυτταρομετρητή τύπου Beckton-Dickinson FACSAarray και αναλύονται με το πρόγραμμα CELLQuest και ModFit LT.

3.8 Ποσοτική μέτρηση της συγκέντρωσης VEGF με ανοσοενζυμική μέθοδο ELISA

Υλικά

Kit για την μέτρηση του VEGF (R&D Systems, Minneapolis), που περιέχει:

Πλάκες 96-οπών επιστρωμένες με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της VEGF₁₆₅ πρωτεΐνης

Πολυκλωνικό αντίσωμα κατά του VEGF με προσδεδεμένη υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP)

Ανασυνδυασμένη VEGF₁₆₅ ανθρώπινη πρωτεΐνη

Ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης της Υπεροξειδάσης

Ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης της VEGF πρωτεΐνης

Ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης

Αντιδραστήριο A, με υπεροξείδιο του υδρογόνου

Αντιδραστήριο B, με χρωμογόνο

Διάλυμα λήξης της αντίδρασης

Ειδικές αυτοκόλλητες ταινίες για κάλυψη των πλακών

Σωλήνες πολυστυρενίου (15 mm)

Φωτόμετρο πλακών ELISA (Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA)

Διαλύματα

Substrate solution: Ανάμειξη ίσων ποσοτήτων από τα αντιδραστήρια A και B, 15 λεπτά πριν από την χρήση

Πρωτεϊνικό διάλυμα: Ανάμειξη της VEGF πρωτεΐνης με το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα

Μέθοδος

Το συγκεκριμένο kit αποτελεί ανοσοενζυμικό σύστημα ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay). Ένα ενεργοποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα, ειδικό

για την ανθρώπινη VEGF₁₆₅ πρωτεΐνη, έχει επιστρωθεί σε φρεάτια 96 οπών. Τα άγνωστα δείγματα, μαζί με τα αντιπροσωπευτικά δείγματα (controls) γνωστών συγκεντρώσεων του VEGF, και με τα οποία κατασκευάζεται η πρότυπος καμπύλη, τοποθετούνται μέσα στα φρεάτια και επωάζονται για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την διάρκεια της επώασης, οι πλάκες είναι καλυμμένες με τις ειδικές αυτοκόλλητες ταινίες. Κατά την πρώτη επώαση, τα μόρια της VEGF πρωτεΐνης που περιέχονται στα δείγματα προσδένονται στο ακινητοποιημένο-επιστρωμένο αντίσωμα. Ακολουθεί έκπλυση 3 φορές, για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ουσιών, και προστίθεται ένα πολυκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τον VEGF, το οποίο έχει προσδεδεμένη την υπεροξειδάση. Κατά τη δεύτερη επώαση, η οποία διαρκεί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, το τελευταίο αντίσωμα χρησιμεύει ως ανιχνευτής, μέσω της πρόσδεσής του στα ακινητοποιημένα μόρια του VEGF που έχουν ήδη δεσμευτεί κατά την πρώτη επώαση και με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται τελικά το τετραμερές sandwich. Μετά την αφαίρεση του πλεονάζοντος αντισώματος "ανιχνευτή", προστίθεται ένα διάλυμα χρωμογόνου (substrate buffer) που παράγει χρώμα σε εκείνα τα πηγαδάκια που περιέχουν προσδεδεμένη VEGF πρωτεΐνη, και το οποίο αφήνεται να δράσει για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προστατευμένο από το φως. Η αντίδραση παραγωγής χρώματος διακόπτεται με την επίδραση του διαλύματος λήξης της αντίδρασης. Η ένταση του χρώματος σε κάθε φρεάτιο είναι ευθέως ανάλογη με την συγκέντρωση του VEGF. Μετά από 30 λεπτά ανάδευσης το κάθε φρεάτιο μετράται σε Elisa Reader, σε μήκος κύματος 450 nm και η τιμή αυτή αποτελεί μέτρο της εκάστοτε συγκέντρωσης..

Οι γνωστές συγκεντρώσεις του VEGF που χρησιμοποιήθηκαν ήταν: 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62.5 pg/ml, 31.2 pg/ml, 15.6 pg/ml, 0 pg/ml.

3.9 Στατιστική ανάλυση

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της απόπτωσης με TUNEL, για τον καθορισμό της σημαντικότητας των διαφορών που παρατηρείται στο μέσο ποσοστό των αποπτωτικών κυττάρων σε κάθε πείραμα, χρησιμοποιείται η στατιστική μέθοδος one-sided Student's t test. Στα πειράματα συνάφειας και κινητικότητας των κοκκωδών κυττάρων, οι διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών, που παρατηρήθηκαν σε κάθε πείραμα, εκτιμήθηκαν με την χρήση της μεθόδου ANOVA (one-way analysis of variance) ακολουθούμενη από Student's t-test. Στις αναλύσεις

της κυτταρομετρίας ροής οι παρατηρούμενες διαφορές του ρυθμού θετικότητας (positivity rate) και της μέσης έντασης φθορισμού (MFI) στην έκφραση των ιντεγκρινών και της φμπρονεκτίνης στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων αναλύθηκαν με την χρήση της στατιστικής μεθόδου Mann-Whitney test. Στατιστικώς σημαντικά θεωρούνται τα p values < 0.05 , και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως μέσες τιμές \pm SE. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τα προγράμματα SPSS και Statistica.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Έκφραση της FN και των υποδοχέων της (ιντεγκρινών) στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης.

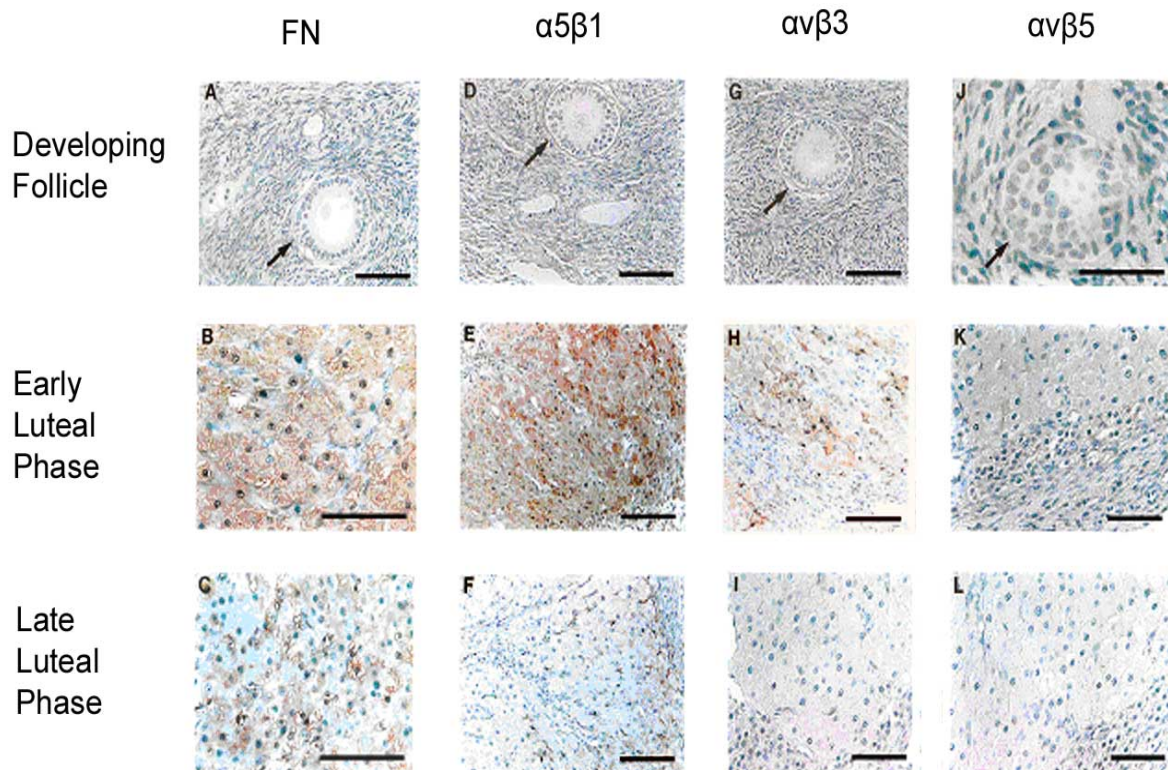
Ποικίλες μελέτες στο παρελθόν έχουν αποδείξει ότι η έκφραση των ιντεγκρινών στην μεμβρανική επιφάνεια των κυττάρων διαφορετικών τύπων και η επακόλουθη αλληλεπίδρασή τους με μόρια του εξωκυττάρου χώρου σχετίζεται άμεσα με την φυσιολογική τους λειτουργία (Gospodarwicz et al., 1978; Ingber, 1990). Ειδικά στα κοκκώδη κύτταρα, η παρουσία διαφόρων ιντεγκρινικών υποδοχέων θεωρείται κρίσιμη στην ρύθμιση πολλαπλών λειτουργιών τους, τόσο κατά την διάρκεια ανάπτυξης των ωοθυλακίων, όσο και κατά την δημιουργία και τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου (Honda et al., 1997; Giancotti and Ruoslahti, 1999).

4. 1. 1 Έκφραση σε τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης

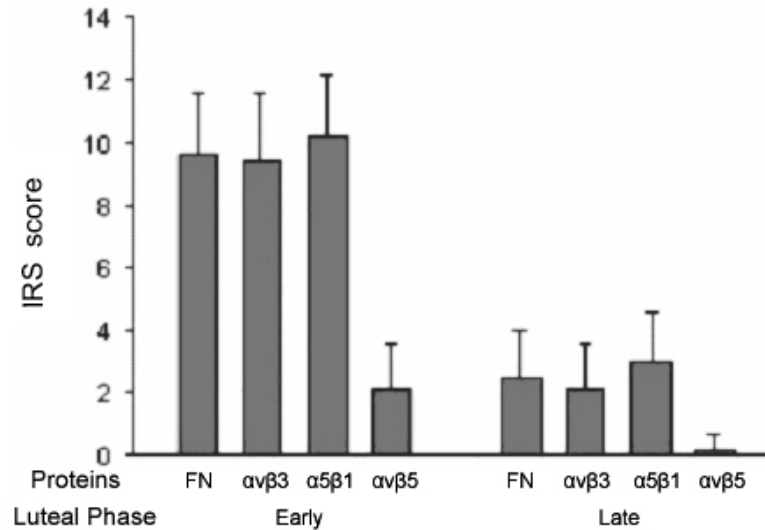
Αρχικά ανιχνεύθηκε η έκφραση ενός από τα μόρια του εξωκυττάρου χώρου (FN) και τριών από τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς του μορίου αυτού ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$) σε κοκκώδη κύτταρα αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, καθώς και στο ωχρο σωματίο κατά την διαδικασία σχηματισμού και αποδιάταξης του. Για τον σκοπό αυτόν πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε τομές που προέρχονται από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης και από διαφορετικές χρονικές στιγμές του εμμηνορροϊκού κύκλου. Συγκεκριμένα, οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από ιστό ωοθηκης της ωοθυλακικής φάσης, των πρώτων σταδίων της ωχρινικής φάσης (ημέρα του κύκλου 15-18) και των τελευταίων σταδίων της ωχρινικής φάσης (ημέρα του κύκλου 24-28). Όπως φαίνεται στην εικόνα 1, τα παραπάνω μόρια δεν εκφράζονται στην επιφάνεια κοκκωδών κυττάρων, ούτε στην περιοχή που τα περιβάλλει, σε τομές που προέρχονται από ωοθήκη που βρίσκεται στην ωοθυλακική φάση. Αντιθέτως, η έκφραση της φμπρονεκτίνης και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$) φάνηκε να σχετίζεται άμεσα με την δημιουργία του ωχρού σωματίου, δεδομένης της έντονης χρώσης που παρατηρήθηκε στα δείγματα των πρώτων σταδίων της ωχρινικής φάσης. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα από κάθε χρονική περίοδο του κύκλου και κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

Συγκεκριμένα, σε τομές προερχόμενες από τα πρώτα στάδια της ωχρινικής φάσης, ανιχνεύθηκε έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών και σε μικρότερο βαθμό

της $\alpha\beta_5$, στην επιφάνεια των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (εικόνα 1 E, H, K). Παράλληλα, σε τομές της ίδιας φάσης του εμμηνορροϊκού κύκλου παρατηρήθηκε έκφραση φιβρονεκτίνης στην ουσία που περιβάλλει τα κύτταρα αυτά (εικόνα 1 B). Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης, φάνηκε να μειώνεται σημαντικά, ή και να εξαφανίζεται σε μερικές περιπτώσεις, στις τομές των τελευταίων σταδίων της ωχρινικής φάσης, δηλαδή μετά την μείωση των επιπέδων της LH. Τα ευρήματα αυτών των πειραμάτων υποδηλώνουν ότι η δημιουργία του ωχρού σωματίου, η οποία βρίσκεται υπό τον συνεχή έλεγχο της ωχρινικής ορμόνης LH, σχετίζεται με την εναπόθεση φιβρονεκτίνης στην περιοχή που περιβάλλει τα κοκκώδη κύτταρα. Το γεγονός αυτό αποκτά ιδιαίτερη σημασία σε συνδυασμό με την αυξημένη έκφραση των FN-συνδεόμενων ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων την ίδια χρονική περίοδο.



Εικόνα 1. In situ χρώση ιστού ωθήκης για την έκφραση της φιβρονεκτίνης και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της σε κοκκώδη κύτταρα. Ο ιστός χρώστηκε με αντισώματα για (FN) (A-C), $\alpha_5\beta_1$ (D-F), $\alpha_5\beta_3$ (G-I) και $\alpha_5\beta_5$ (J-L) προκειμένου να διευκρινιστεί η έκφραση των μορίων αυτών σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και κατά την δημιουργία και αποδιάταξη του ωχρού σωματίου. Στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (A, D, G, J) τα βέλη υποδεικνύουν τα κοκκώδη κύτταρα. (Μεγεθύνσεις: A, D-I, K,L x 200; B,C,J x 400) (Space bars: 50 μm).



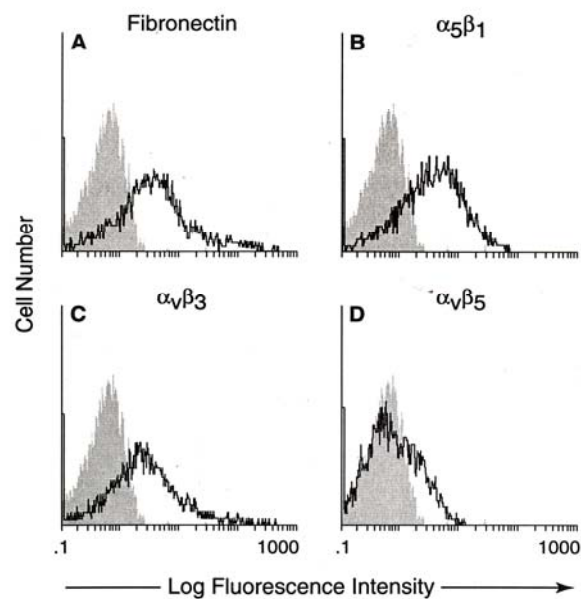
Εικόνα 2. Σύγκριση των επιπέδων έκφρασης όπως αυτά εκτιμήθηκαν με τη μέθοδο IRS. Οι τιμές αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους \pm SE (*, $p < 0.05$).

4.1.2 Έκφραση της FN και των υποδοχέων της $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$ σε κοκκώδη κύτταρα *in vitro*

Για την επιβεβαίωση των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν *in vitro* πειράματα, τα οποία αφορούσαν την έκφραση της φιμπρονεκτίνης και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$) σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης. Όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι" τα κύτταρα αυτά προέρχονται από γυναίκες που υποβάλλονται σε *in vitro* γονιμοποίηση. Στις γυναίκες αυτές έχει προηγουμένως χορηγηθεί μία υψηλή δόση (10000 IU) χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) *in vivo*, γεγονός που τους δίνει την δυνατότητα απόκτησης χαρακτηριστικών ωχρινικών κοκκωδών κυττάρων του αρχικού σταδίου της ωχρινικής φάσης (Grazul-Bilska et al., 1997).

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής χρησιμοποιώντας αντισώματα ειδικά για τα μόρια που μελετάμε. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε καθαρό IgG3 αντίσωμα, ώστε παρατηρώντας τις μεταβολές στις τιμές από τα δείγματα αυτά διαπιστώθηκε η έκφραση ή μη της κάθε πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα προέρχονται από τις τιμές που συλλέχθηκαν από 10 τουλάχιστον ανεξάρτητα μεταξύ τους πειράματα. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων απέδειξε ότι οι $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες εκφράζονται στην επιφάνεια σημαντικού αριθμού

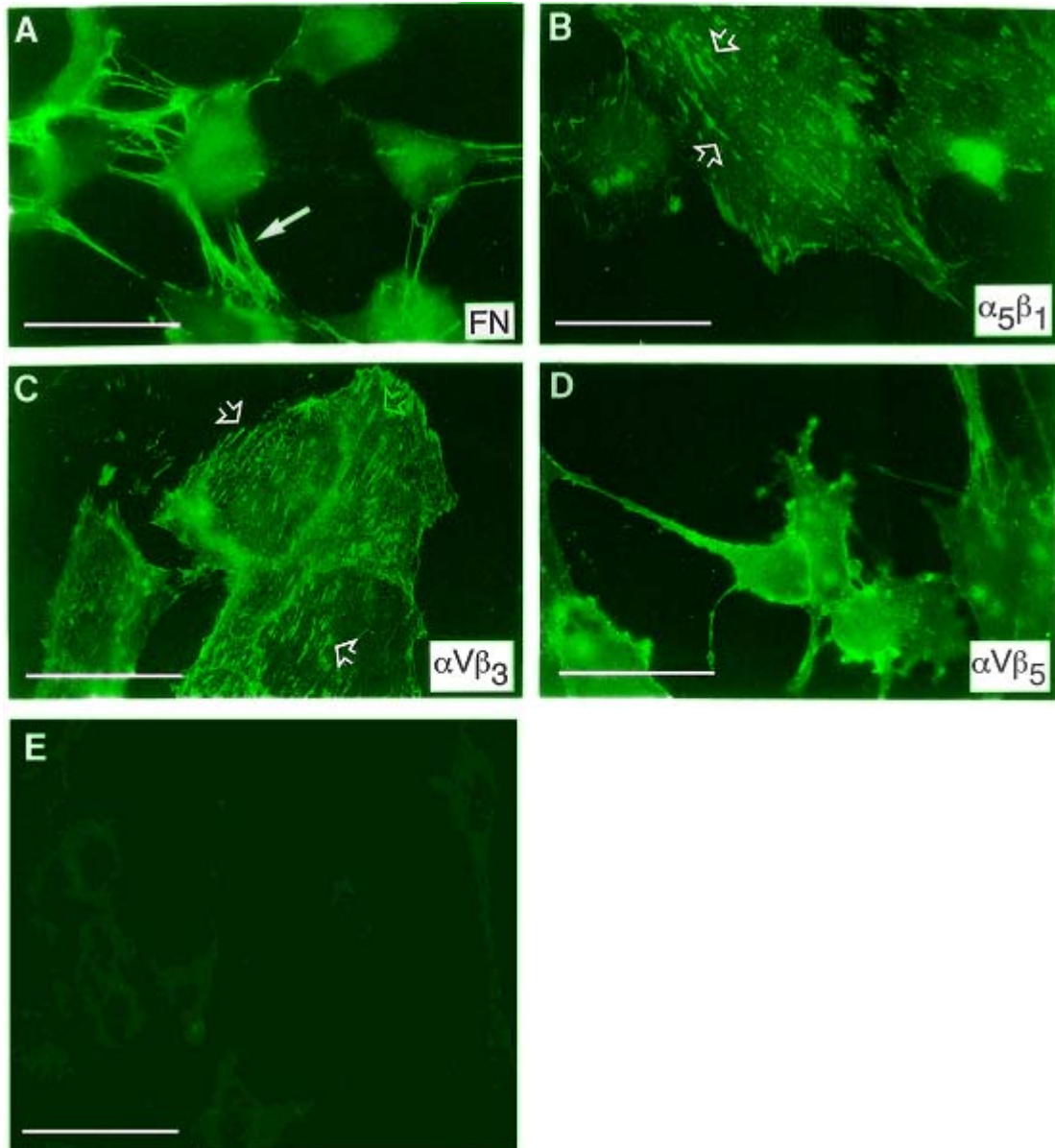
κοκκωδών κυττάρων (ανιχνεύθηκαν στο $61\pm 10\%$ και στο $38\pm 5\%$ των κυττάρων αντίστοιχα) (εικόνες 3B-C), στο σύνολο 16 εξεταζόμενων δειγμάτων. Στο ίδιο δειγματικό σύνολο, εξίσου σημαντική ήταν και η έκφραση της φιβρονεκτίνης (ανιχνεύθηκε στο $52\pm 10\%$ των κυττάρων) (εικόνα 3A), ενώ ένα πολύ μικρότερο ποσοστό κυττάρων εμφάνισε έκφραση της $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνης (ανιχνεύθηκε στο $8,8\pm 1\%$ του κυτταρικού πληθυσμού) (εικόνα 3D). Η έκφραση της φιβρονεκτίνης στην κυτταρική επιφάνεια, οδήγησε στην υπόθεση ότι τα κοκκώδη κύτταρα εκκρίνουν το μόριο αυτό, το οποίο στην συνέχεια, προσδένεται στους ιντεγκρινικούς υποδοχείς.



Εικόνα 3. Η έκφραση της FN (A) $\alpha_5\beta_1$ (B), $\alpha_v\beta_3$ (C) and $\alpha_v\beta_5$ (D), σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα γεμάτα και άδεια γραφήματα αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα την χρώση για το IgG3 αντίσωμα και την χρώση για την κάθε πρωτεΐνη. Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από 10 ανεξάρτητα πειράματα.

Η προαναφερθείσα έκφραση της FN και των υποδοχέων της $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, και $\alpha_v\beta_5$, σε τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης, επιβεβαιώθηκε με μία ακόμη μέθοδο που βασίστηκε στην φθορίζουσα σήμανση των μορίων αυτών. Το πλεονέκτημα της μεθόδου αυτής έναντι της κυτταρομετρίας ροής είναι η δυνατότητα παρατήρησης του κυττάρου, γεγονός που παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον ακριβή εντοπισμό των μελετούμενων μορίων πάνω σε αυτό. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, κοκκώδη

κύτταρα ανθρώπινης ωθήκης καλλιεργήθηκαν σε επιφάνειες επιστρωμένες με βιτρονεκτίνη (VN) ή λαμινίνη (LN) για 48-72 ώρες κάτω από συνθήκες έλλειψης ορού. Σε αυτήν την περίπτωση, παρατηρήθηκε και πάλι έκφραση της φμπρονεκτίνης στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων (εικόνα 4), ενώ στην αρχική καλλιέργεια υπήρχε μόνο LN ή VN. Όπως φαίνεται στην εικόνα 4A, το μόριο αυτό εντοπίστηκε κυρίως στις προεκβολές των κυττάρων. Δεδομένου ότι τα συγκεκριμένα κύτταρα αναπτύσσονται απουσία ορού, θεωρήθηκε ότι η FN εκκρίνεται από αυτά, και στην συνέχεια κάποια από τα μόρια της συνδέονται με την κυτταρική επιφάνεια. Επιπλέον, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη έκφραση των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, ιντεγκρινών, η οποία εντοπίζεται στην κυτταρική επιφάνεια. Σημαντική παρατήρηση της έκφρασης των ιντεγκρινών αυτών είναι ότι φαίνεται να σχηματίζουν focal adhesions. Η $\alpha_v\beta_5$ ανιχνεύθηκε σε πολύ μικρότερο ποσοστό κυττάρων σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό, ενώ δεν φάνηκε να σχηματίζει focal adhesions (εικόνα 4D). Τα αποτελέσματα των παρατηρήσεων αυτών επιβεβαιώνονται και από μελέτες σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Wayner et al., 1991), οι οποίες συσχετίζουν τον σχηματισμό των focal adhesions με την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, όχι όμως και της $\alpha_v\beta_5$.



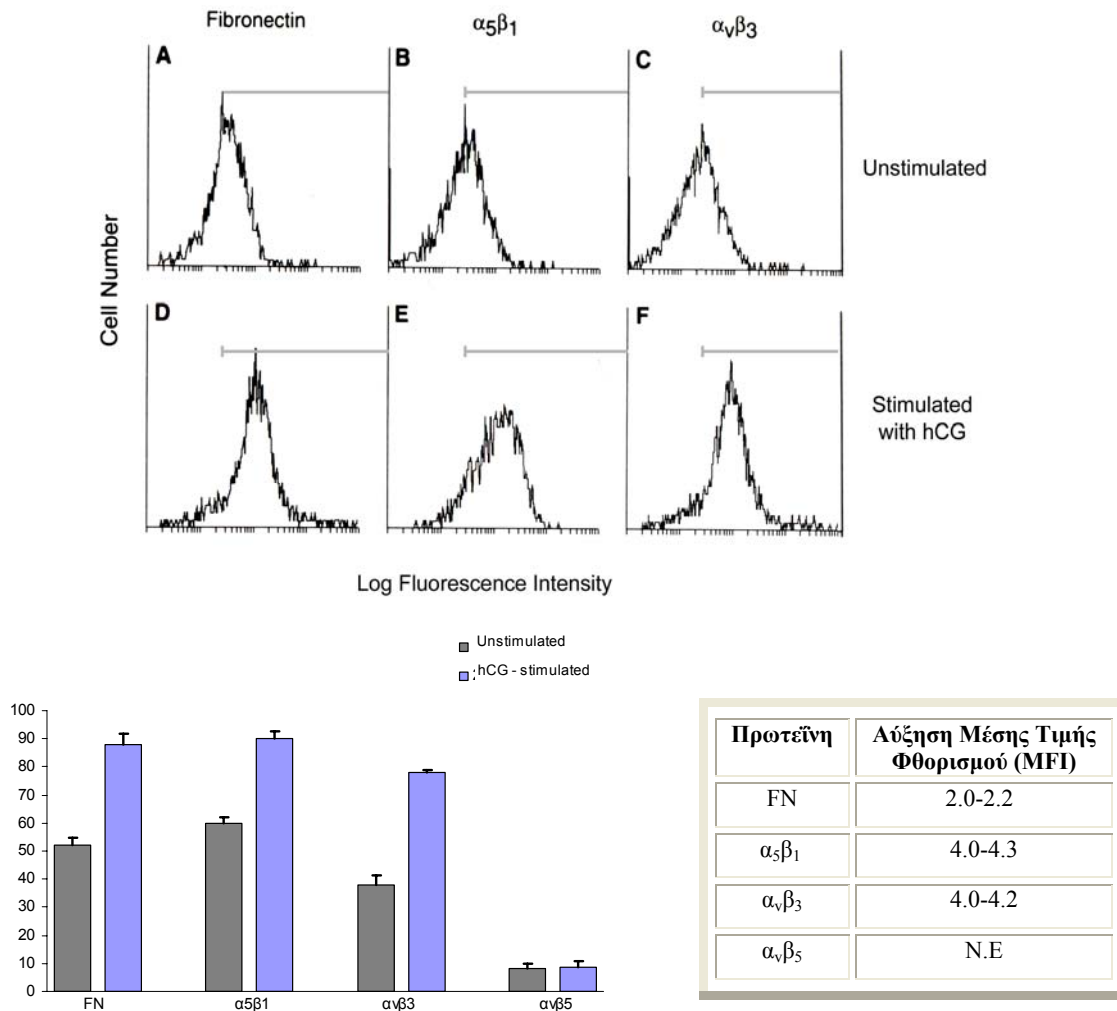
Εικόνα 4. Φαίνεται ο ανοσοφθορισμός για κοκκώδη κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε βιτρονεκτίνη (A) ή φιμπρονεκτίνη (B-D) χωρίς ορό και στην συνέχεια ανιχνεύθηκε η FN (A), $\alpha_5\beta_1$ (B), $\alpha_V\beta_3$ (C) and $\alpha_V\beta_5$ (D). Στην επιφάνεια των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε βιτρονεκτίνη ανιχνεύθηκε FN, αλλά μόνο στα φιλοπόδια (βέλη). Στην επιφάνεια των κυττάρων που καλλιεργήθηκαν σε φιμπρονεκτίνη εκφράζονται οι ιντεγκρίνες $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$ και σε μικρότερο ποσοστό η $\alpha_V\beta_5$. Επιπλέον, στην B και C είναι φανερός ο σχηματισμός των focal adhesions (βέλη).

4. 2. Η hCG αυξάνει την έκφραση της FN και των FN-συνδεδεμένων ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων

Η ωχρινοποιητική ορμόνη, χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) έχει συσχετιστεί, μεταξύ άλλων, και με την επαγωγή της έκφρασης διαφόρων ιντεγκρινών σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης (Honda et al., 1997). Βασιζόμενοι στα δεδομένα αυτά ελέγξαμε την υπόθεση ότι η hCG επηρεάζει την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων. Επιπλέον, δεδομένης της ταυτόχρονης αύξησης που παρατηρήθηκε στην έκφραση του εξωκυττάρου προσδέτη (FN) των ιντεγκρινικών αυτών υποδοχέων, μελετήσαμε και την ενδεχόμενη επίδραση της hCG στην έκφραση του μορίου αυτού στα ίδια κύτταρα.

Τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε στείρες πλάκες καλλιέργειών των 6 οπών (10^6 κύτταρα ανά οπή) για χρονικά διαστήματα από 48 έως και 72 ώρες, είτε σε θρεπτικό υλικό που περιέχει hCG, είτε απουσία της συγκεκριμένης ορμόνης. Μετά το τέλος της επίδρασης ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης των μελετούμενων μορίων με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και ταυτόχρονη σύγκριση των τιμών από κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί παρουσία και απουσία της ορμόνης. Όπως φαίνεται από γράφημα 1, τα επίπεδα έκφρασης της FN και των ιντεγκρινικών της υποδοχέων σε κοκκώδη κύτταρα που δεν είχαν διεγερθεί δεν παρουσίαζαν σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τα προσφάτως απομονωμένα κύτταρα. Αντιθέτως, διέγερση με hCG οδήγούσε σε αξιοσημείωτη αύξηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν την $\alpha_5\beta_1$ ιντεγκρίνη, σε σχέση με τα φυσιολογικά ($p < 0,05$), και των κυττάρων που εκφράζουν την $\alpha_v\beta_3$ σε σχέση με τα φυσιολογικά ($p < 0,05$). Η ορμονική διέγερση όμως, δεν φάνηκε να έχει ανάλογη επίδραση στην έκφραση της $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνης ($8.8 \pm 1.8\%$ έναντι $8.0 \pm 1.7\%$). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα προέρχονται από στατιστική ανάλυση των τιμών 3 τουλάχιστον διαφορετικών πειραμάτων. Επιπλέον, γίνεται φανερό ότι η έκθεση των κυττάρων στην hCG οδήγησε μέχρι και σε τετραπλασιασμό της μέσης τιμής φθορισμού. Οι αναφερόμενες μεταβολές της έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων συνοδεύτηκαν από ανάλογες μεταβολές στα επίπεδα έκφρασης της FN που συνδέεται στην κυτταρική επιφάνεια. Συγκεκριμένα, διαπιστώθηκε αξιοσημείωτη αύξηση του αριθμού των κυττάρων που

εκφράζουν FN μετά από διέγερση των κοκκωδών κυττάρων με hCG, σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα ($p < 0.05$).



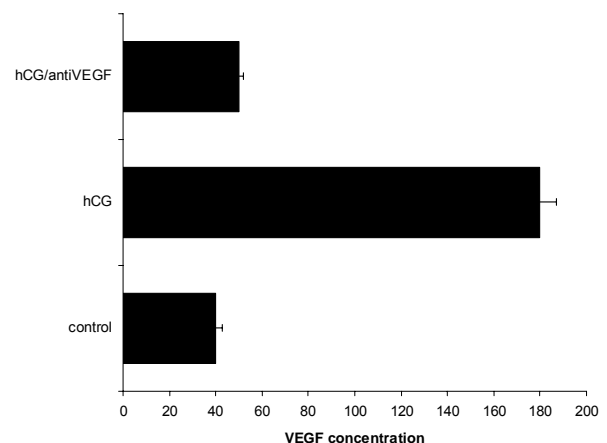
Εικόνα 5. Κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης FN (A, D, G), $\alpha_5\beta_1$ (B, E, H) και $\alpha_v\beta_3$ (C, F, I) σε μη διεγερμένα κύτταρα (A-C) και κύτταρα διεγερμένα με hCG (D-F). Η κάθετη γραμμή δείχνει την ανώτατη ένταση φθορισμού για τα μη διεγερμένα κύτταρα. Χρησιμοποιώντας αυτό σαν σημείο αναφοράς, βρέθηκε ότι η hCG αυξάνει την έκφραση και των τριών πρωτεϊνών. Από τον πίνακα φαίνεται επίσης ότι η μέση ένταση φθορισμού αυξάνεται μέχρι και 4 φορές, μετά από διέγερση με hCG (N.E: No Effect). Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα.

4.3. Ρύθμιση της έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων από τον VEGF παράγοντα.

4.3.1 Η hCG αυξάνει την συγκέντρωση του VEGF σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων.

Η hCG έχει ήδη αναφερθεί ότι επάγει την έκκριση του VEGF από τα κοκκώδη κύτταρα της ωοθήκης (Neulen et al., 1995; Lee et al., 1997; Artini et al. 1998; Ferrara et al., 1998). Προς επιβεβαίωση των αναφορών αυτών πραγματοποιήθηκε μέτρηση της συγκέντρωσης του VEGF παράγοντα στο θρεπτικό μέσο καλλιεργειών, παρουσία ή απουσία της hCG. Συγκεκριμένα, απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργούνται για χρονικό διάστημα 48 ωρών είτε σε θρεπτικό υλικό που περιέχει hCG σε τελική συγκέντρωση 1 IU/ml, είτε απουσία της συγκεκριμένης ορμόνης. Μετά το τέλος των επώασεων συλλέγεται το υγρό μέσο καλλιέργειας, στο οποίο υπολογίζεται η συγκέντρωση του VEGF περιεχομένου με την μέθοδο της ενζυμοσύνδετης ανοσοπροσροφητικής μέτρησης (ELISA) χρησιμοποιώντας kit με δεσμευμένο αντίσωμα ειδικό για την πρωτεΐνη VEGF₁₆₅. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 1, ο οποίος αναφέρεται σε στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από 4 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα, η διέγερση με hCG αυξάνει την συγκέντρωση του VEGF στο μέσο καλλιέργειας, σε σχέση με τα αποτελέσματα από καλλιέργειες που δεν είχαν διεγερθεί με την ορμόνη αυτή. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε αντι-VEGF ουδετεροποιητικό αντίσωμα σε καλλιέργειες, οι οποίες περιείχαν και χοριακή γοναδοτροπίνη. Σε αυτή την περίπτωση, οι μετρήσεις ELISA φανέρωσαν ότι εξουδετερώνεται περίπου το 90% του εκκρινόμενου από τα κύτταρα VEGF.

<u>Condition</u>	<u>VEGF Concentration</u>
Control	40 ± 3 pg/ml
(+) hCG	180 ± 7pg/ml
(+) hCG / (+) anti-VEGF	50 ± 2 pg/ml



Πίνακας 1. Η απελευθέρωση του VEGF από κοκκώδη κύτταρα. Η συγκέντρωση του VEGF σε καλλιέργειες μη διεγερμένων και διεγερμένων με hCG κοκκωδών κυττάρων, παρουσία ή απουσία αντι-VEGF αντισώματος υπολογίστηκε με ELISA. Η προσθήκη του αντι-VEGF αντισώματος εξουδετερώνει περισσότερο από το 90% του VEGF που απελευθερώνεται. Τα δεδομένα προέρχονται από τον μέσο όρο 4 διπλών δειγμάτων.

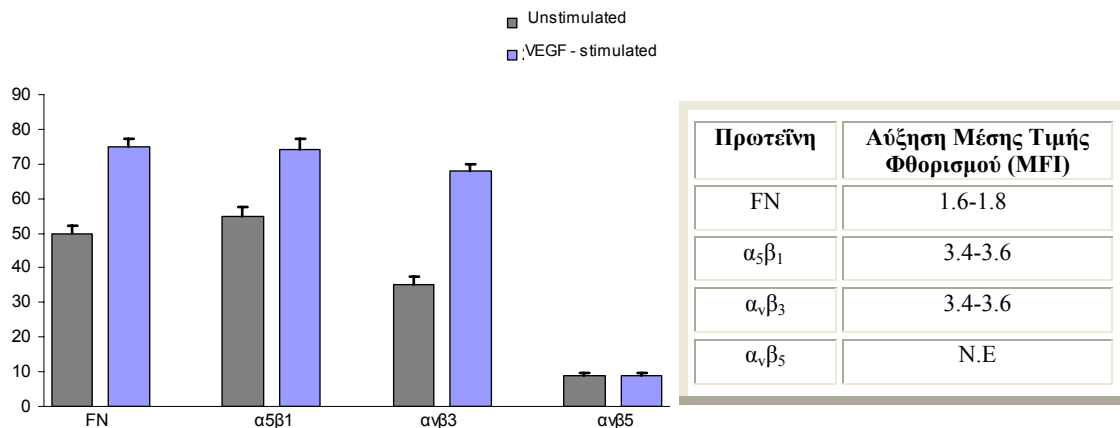
4.3.2 Ο VEGF προκαλεί αύξηση στα επίπεδα έκφρασης της FN και των υποδοχέων της $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων.

Όπως έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια, ο VEGF προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης ορισμένων ιντεγκρινών στην επιφάνεια κυττάρων διαφορετικού τύπου (Senger et al., 1997; Suzuma et al., 1998). Παράλληλα, η μελέτη της σημασίας του συγκεκριμένου παράγοντα στην φυσιολογική ή μη λειτουργία των ωοθηκικών δομών έχει προσφέρει αρκετά στοιχεία, ώστε να καθίσταται δυνατή η αναφορά του σαν βασικό μόριο της ανθρώπινης αναπαραγωγής (Geva and Jaffe, 2000; Wulff et al., 2002). Στηριζόμενοι στις παραπάνω αναφορές, μελετήσαμε την υπόθεση ότι ο VEGF επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης της FN και των ιντεγκρινικών της υποδοχέων στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης.

Η υπόθεσή μας εξετάστηκε με την πραγματοποίηση πειραμάτων, κατά τα οποία κυτταρικοί πληθυσμοί αναπτύχθηκαν παρουσία ή απουσία του VEGF. Με τον τρόπο αυτό ελέγχθηκε η ικανότητα του μορίου αυτού να επάγει μεταβολές στην έκφραση των προαναφερόμενων πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε στείρες πλάκες καλλιέργειών των 6 οπών (10^6 κύτταρα ανά οπή) για χρονικά διαστήματα από 48 έως και 72 ώρες, σε θρεπτικό υλικό που περιείχε VEGF₁₆₅ σε τελική συγκέντρωση 100 ng/ml. Παράλληλα, και για το ίδιο χρονικό διάστημα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία του αναφερόμενου μορίου. Η έκφραση της κάθε πρωτεΐνης ανιχνεύθηκε με φθορίζον αντίσωμα και ακόλουθη ανάλυση κυτταρομετρίας ροής. Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι ανιχνεύει την χρώση όλων των κυττάρων μιας καλλιέργειας, και συνεπώς τα αποτελέσματα είναι περισσότερο αξιόπιστα σε σχέση με την οπτικά παρατηρούμενη χρώση.

Όπως γίνεται φανερό από την εικόνα 6, η παρουσία του VEGF₁₆₅ προκάλεσε σημαντική αύξηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν FN στην επιφάνειά τους ($75 \pm 2,2\%$), σε σχέση με τα κύτταρα που μετρήθηκαν σε καλλιέργειες που δεν

περιείχαν τον παράγοντα ($50 \pm 2\%$ με $p < 0.05$). Επιπλέον, παρατηρήθηκαν εξίσου σημαντικές μεταβολές στον αριθμό των κυττάρων που παρουσίασαν θετική χρώση για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες. Αναλυτικότερα, εντοπίστηκε έκφραση του $\alpha_5\beta_1$ υποδοχέα στο $74 \pm 3,2\%$ του συνολικού πληθυσμού των καλλιέργειών που είχαν διεγερθεί με τον VEGF₁₆₅, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε μη διεγερμένες καλλιέργειες ήταν $55 \pm 2,4\%$ (με $p < 0,05$). Ανάλογες μετρήσεις για τον $\alpha_v\beta_3$ παρουσία ή απουσία του VEGF παράγοντα έδειξαν ότι τα ποσοστά των κυττάρων που εκφράζουν το μόριο αυξήθηκαν επίσης, σε σχέση με τα μη διεγερμένα κύτταρα ($p < 0,05$). Στις καλλιέργειες, όπου χρησιμοποιήθηκε αντίσωμα ειδικό για την $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνη ο αριθμός των κυττάρων που εμφάνισε φθορίζουσα χρώση δεν μεταβαλλόταν με την προσθήκη του VEGF. Τα αποτελέσματα που φαίνονται στον πίνακα προέρχονται από στατιστική ανάλυση των μετρήσεων από 7 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.



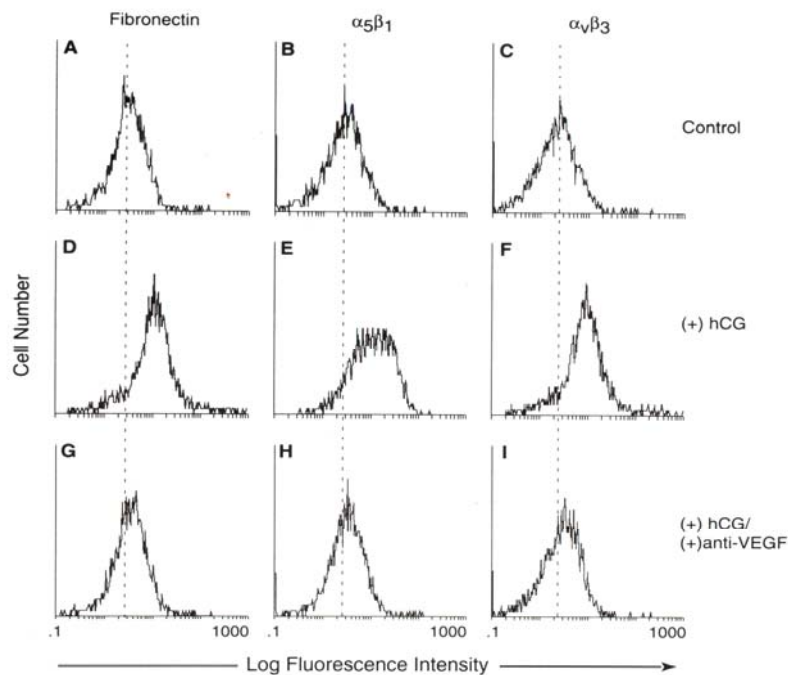
Εικόνα 6. Έκφραση της FN και των υποδοχέων της στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, μετά από διέγερση με VEGF. Με κυτταρομετρία ροής πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των μορίων αυτών σε διεγερμένα με VEGF ή μη διεγερμένα κοκκώδη κύτταρα. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η έκφραση αυξάνεται μετά από διέγερση με VEGF (σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα). Επιπλέον, παρατηρείται αύξηση και στην μέση ένταση φθορισμού (Πίνακας). Στην έκφραση της $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνης δεν παρουσιάστηκε καμία μεταβολή (N.E: No Effect).

4.3.3 Το anti-VEGF αντίσωμα αναστέλλει την αύξηση στην έκφραση της FN, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_5$, η οποία επάγεται από την hCG.

Βασιζόμενοι στο γεγονός ότι η hCG και ο VEGF προκαλούν αύξηση στην έκφραση της FN και των FN-προσδεδεμένων ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, και δεδομένης της αύξησης στην συγκέντρωση του VEGF που προκαλείται στο μέσο καλλιέργειας υπό την επίδραση της hCG, ελέγξαμε την υπόθεση ότι οι επιδράσεις της hCG διαμεσολαβούνται από τον VEGF. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των επιπέδων έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων και της FN σε κοκκώδη κύτταρα, τα οποία αναπτύσσονταν απουσία ή παρουσία του VEGF, υπό την επίδραση όμως της hCG.

Απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε στείρες πλάκες καλλιέργειας των 6 οπών (10^6 κύτταρα ανά οπή) για χρονικό διάστημα 48 ωρών απουσία ορού. Στο θρεπτικό μέσο προστέθηκε επιπλέον hCG σε τελική συγκέντρωση 1 IU/ml, η παρουσία της οποίας έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει την συγκέντρωση του VEGF στο διάλυμα. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν επώσεις κοκκωδών κυττάρων υπό τις ίδιες συνθήκες με προσθήκη αντι-VEGF ουδετεροποιητικού αντισώματος, με σκοπό την μείωση των επιπέδων του εκκρινόμενου VEGF στις συγκεκριμένες καλλιέργειες. Η ακόλουθη επώαση των κυττάρων με αντισώματα ειδικά για κάθε μία από τις μελετούμενες πρωτεΐνες και με συζευγμένη φθορίζουσα ουσία είχε σαν αποτέλεσμα την σήμανση των κυττάρων που εκφράζουν τις πρωτεΐνες αυτές στην μεμβρανική τους επιφάνεια. Τα σημασμένα κύτταρα ανιχνεύθηκαν και μετρήθηκαν με την μέθοδο ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής. Όπως φαίνεται στην εικόνα 7, η επώαση με το αντι-VEGF αντίσωμα, το οποίο εξουδετερώνει το 90% του VEGF που απελευθερώνεται μετά από διέγερση με hCG (πίνακας 1), αναστέλλει σχεδόν πλήρως την hCG-επαγόμενη αύξηση της έκφρασης των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στα κοκκώδη κύτταρα. Ανάλογη μείωση του αριθμού των σημασμένων κυττάρων παρατηρήθηκε και σε καλλιέργειες μετά από χρήση αντισώματος ανίχνευσης της FN, παρουσία του αντι-VEGF μορίου. Μετά από επώαση των κυττάρων στις παραπάνω συνθήκες με VEGF πρωτεΐνη, η επίδραση του anti-VEGF αναστρέφεται και τα επίπεδα έκφραση επανέρχονται στα επίπεδα που παρατηρούμε απουσία του αντισώματος αυτού. Τα παραπάνω αποτελέσματα, υποδηλώνουν ότι η hCG αυξάνει την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινικών υποδοχέων και του εξωκυττάρου

προσδέτη τους (FN), τουλάχιστον εν μέρει, με αυτοκρινή / παρακρινή τρόπο μέσω της έκκρισης του VEGF παράγοντα από τα κοκκώδη κύτταρα.



Εικόνα 7. Κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης FN (A, D, G), $\alpha_5\beta_1$ (B, E, H) και $\alpha_v\beta_3$ (C, F, I) σε μη διεγερμένα κύτταρα (A-C) και κύτταρα διεγερμένα με hCG απουσία (D-F) ή παρουσία αντισώματος για τον VEGF (G-I). Η διακεκομμένη γραμμή δείχνει την ανώτατη ένταση φθορισμού για τα μη διεγερμένα κύτταρα. Χρησιμοποιώντας αυτό σαν σημείο αναφοράς, βρέθηκε ότι η hCG αυξάνει την έκφραση και των τριών πρωτεϊνών, επίδραση που αναστέλλεται με την προσθήκη αντι-VEGF αντισώματος. Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από 3 ανεξάρτητα πειράματα

4.3.4 Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν τον VEGF-R1 (Flt-1) υποδοχέα.

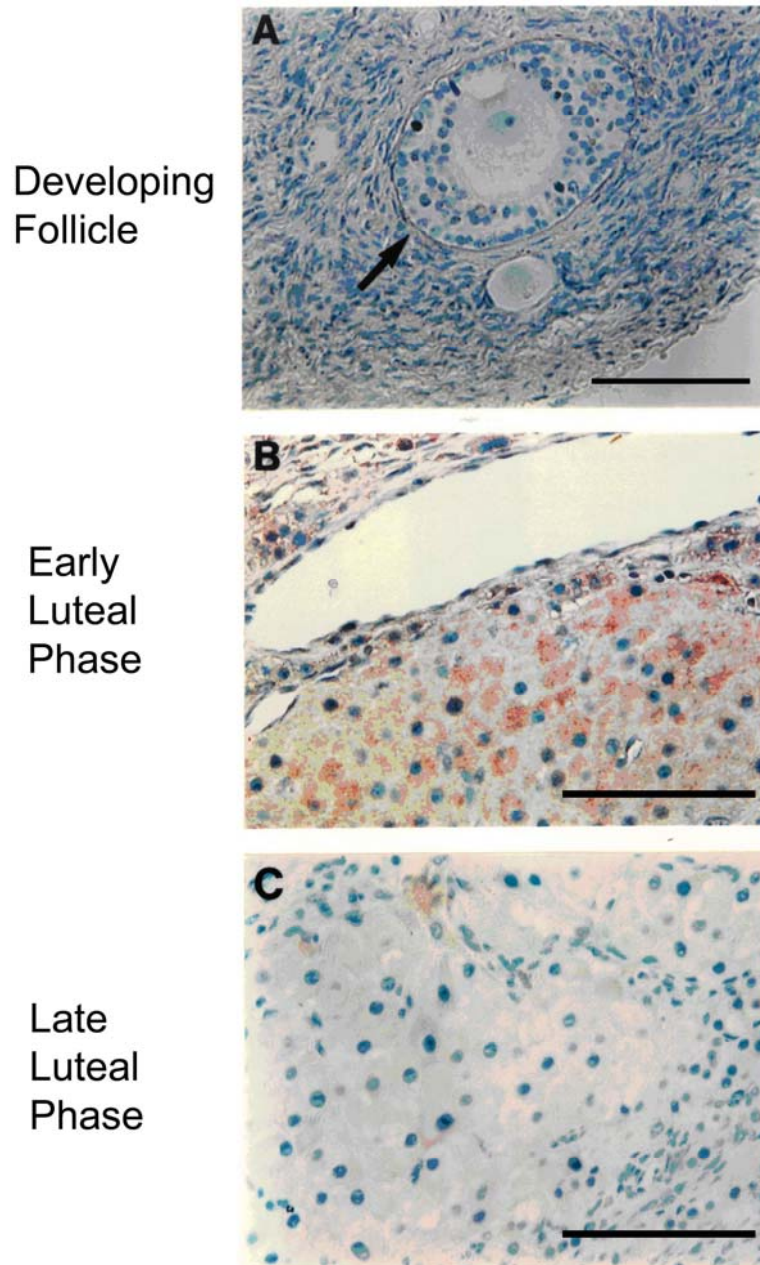
Πολλαπλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι δράσεις του VEGF μεσολαβούνται από τους υποδοχείς του (VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, VEGFR3/Flt-4), μέσω των οποίων προσδένεται στην κυτταρική επιφάνεια (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Stouffer et al., 2001). Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες ασχολήθηκαν με την λειτουργική σημασία των υποδοχέων αυτών σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα αποδεικνύουν την ύπαρξη του Flt-1 και του

KDR στην επιφάνεια των συγκεκριμένων κυττάρων (Otani et al., 1999; Sugino et al., 2000b) όμως ο ακριβής μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν τα μόρια αυτά δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

4.3.4.1 Έκφραση του Flt-1 υποδοχέα σε τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης

Προς επιβεβαίωση των παραπάνω αναφορών και προκειμένου να ανιχνευθεί η έκφραση του Flt-1 υποδοχέα σε όλα τα στάδια του εμμηνορροϊκού κύκλου, εξετάστηκε η έκφραση του VEGFR-1 υποδοχέα (Flt-1), κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου και την δημιουργία του ωχρού σωματίου. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τομές από ιστό ανθρώπινης ωοθήκης, που προέρχονταν από διαφορετικές χρονικές στιγμές της θυλακιακής ανάπτυξης. Στα δείγματα πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική χρώση σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια (ωοθυλακική φάση), καθώς και σε ωχρό σωματίο (ωχρινική φάση) κατά τα στάδια σχηματισμού και αποδιάταξής του. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν 12 δείγματα από κάθε χρονική περίοδο του κύκλου και κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

Η εικόνα 8 φανερώνει ότι ο Flt-1 δεν εκφράζεται σε κοκκώδη κύτταρα αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων (εικόνα 8A). Αντίθετα, ανιχνεύθηκε σημαντική χρώση σε τομές ωχρών σωματίων, που προέρχονταν από τα αρχικά στάδια της ωχρινικής φάσης (ημέρα του κύκλου 15-18) (εικόνα 8B). Η παρατηρούμενη έκφραση μειώθηκε, ή και εξαφανίστηκε σε μερικές περιπτώσεις, σε ωχρά σωματίδια των τελευταίων σταδίων (ημέρα του κύκλου 24-28), δηλαδή λίγο πριν από την φάση της ωχρινόλυσης.

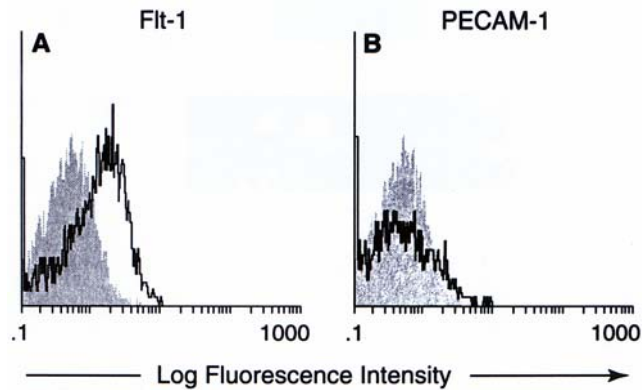


Εικόνα 8. Χρώση ωοθηκικού ιστού με αντισώματα για Flt-1, προκειμένου να ανιχνευθεί η έκφραση του σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και κατά την δημιουργία και αποδιάταξη του ωχρού σωματίου. Ο Flt-1 δεν ανιχνεύθηκε στα ωοθυλάκια (A, βέλη), αλλά ανιχνεύθηκε έκφραση του στα κοκκώδη κύτταρα της αρχικής ωχρινικής φάσης (B), μία έκφραση που μειώνεται σε μετέπειτα στάδια (C). (Μεγεθύνσεις: x 400) (Space bars: 50 μm).

4.3.4.2 Ο υποδοχέας Flt-1 εκφράζεται σε κοκκώδη κύτταρα *in vitro*

Η έκφραση του Flt-1 σε κύτταρα του ωχρού σωματίου στα αρχικά στάδια της ωχρινικής φάσης, υποστηρίχτηκε επιπρόσθετα με ανίχνευση του υποδοχέα σε απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία όπως έχει αναφερθεί φέρουν χαρακτηριστικά ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων. Η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε στην πρόσδεση φθορίζουσας χρωστικής σε κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα. Με τον ίδιο τρόπο και στις ίδιες συνθήκες ανιχνεύθηκε η έκφραση του PECAM-1 παράγοντα, ώστε να αποκλείσουμε την πιθανότητα ότι η ανοσοϊστοχημική χρώση που παρατηρήθηκε στα προηγούμενα πειράματα προέρχεται από ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα αποτελέσματα προέρχονται από την πραγματοποίηση 5 τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων.

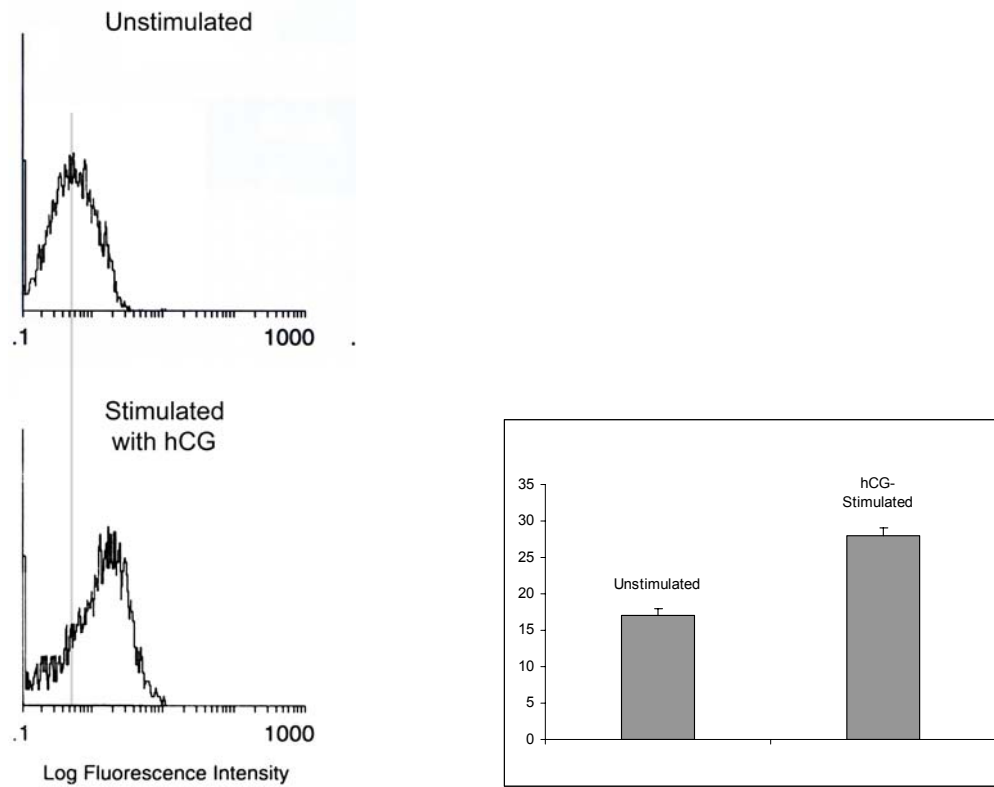
Σε κάθε περίπτωση, απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα τα οποία είχαν προηγουμένως καλλιεργηθεί για χρονικό διάστημα 48 ωρών, σε πλήρες θρεπτικό υλικό σημάθηκαν με ειδικά αντισώματα, για τον Flt-1 και τον PECAM-1, τα οποία ήταν επιπλέον συζευγμένα με φθορίζουσα χρωστική. Η θετική χρώση ανιχνεύθηκε, στην συνέχεια, με την μέθοδο ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής. Όπως γίνεται φανερό από την εικόνα 9, τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν σε μεγάλο ποσοστό τον Flt-1 υποδοχέα στην επιφάνειά τους, ενώ η έκφραση του PECAM-1 κυμαίνεται σε αρκετά μικρότερα επίπεδα. Σε παράλληλο έλεγχο του VEGFR-2 (KDR) υποδοχέα στα ίδια κύτταρα και στις ίδιες συνθήκες, δεν παρατηρήθηκε θετική χρώση των κοκκωδών κυττάρων. Βασιζόμενοι στα παραπάνω δεδομένα, καθώς και στις ήδη υπάρχουσες βιβλιογραφικές αναφορές, καταλήξαμε στην υπόθεση ότι οι δράσεις του VEGF στα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης μεσολαβούνται από την πρόσδεση του παράγοντα αυτού στον Flt-1 υποδοχέα του.



Εικόνα 9. Η έκφραση του Flt-1 (A) και PECAM-1 (B) στην επιφάνεια των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Τα γεμάτα και άδεια γραφήματα αντιπροσωπεύουν αντίστοιχα την χρώση του υπόβαθρου και την χρώση για την κάθε πρωτεΐνη. Τα κοκκώδη κύτταρα εκφράζουν Flt-1 αλλά όχι PECAM-1. Τα δεδομένα αυτά προήλθαν από 5 ανεξάρτητα πειράματα.

4.3.5 Η hCG αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του Flt-1.

Δεδομένης της έκφρασης του Flt-1 υποδοχέα σε κοκκώδη κύτταρα προερχόμενα από τα αρχικά στάδια της ωχρινικής φάσης, σε συνδυασμό με την διαπίστωση ότι η hCG αυξάνει την παραγωγή του VEGF από τα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, μελετήθηκε πιθανή επίδραση της ορμόνης αυτής στην έκφραση του Flt-1 υποδοχέα στα ίδια κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε στείρες πλάκες καλλιέργειών των 6 οπών (10^6 κύτταρα ανά οπή) για χρονικά διαστήματα από 48 έως και 72 ώρες, είτε σε θρεπτικό υλικό που περιέχει hCG, είτε απουσία της συγκεκριμένης ορμόνης. Ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης του Flt-1 υποδοχέα με την μέθοδο της κυτταρομετρίας ροής και ταυτόχρονη σύγκριση των τιμών από κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί παρουσία και απουσία της ορμόνης. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, διέγερση των κυττάρων με hCG οδήγησε σε μία μετρίου μεγέθους αύξηση του αριθμού των κυττάρων που εκφράζουν Flt-1 (από $17 \pm 1\%$ σε $28 \pm 1\%$, $p < 0.05$). Η ταυτόχρονη επίδραση της χοριακής γοναδοτροπίνης στην παραγωγή του VEGF από τα εξεταζόμενα κύτταρα, καθώς και στην έκφραση του υποδοχέα του στα ίδια κύτταρα, ενισχύει την υπόθεση ότι η hCG δρα μέσω ενός VEGF-εξαρτώμενου μηχανισμού.



Εικόνα 10. Η έκφραση του FIt-1 στην επιφάνεια κοκκωδών κυττάρων, διεγερμένα και μη διεγερμένα με hCG, ανιχνεύθηκε με κυτταρομετρία ροής.

4.4. Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων στον εξωκυττάριο προσδέτη τους (FN).

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αποδεικνύουν την έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, όπως επίσης και της φιμπρονεκτίνης στα ίδια κύτταρα, χωρίς όμως να διαπιστώνεται η ακριβής λειτουργική σημασία της έκφρασης αυτής.

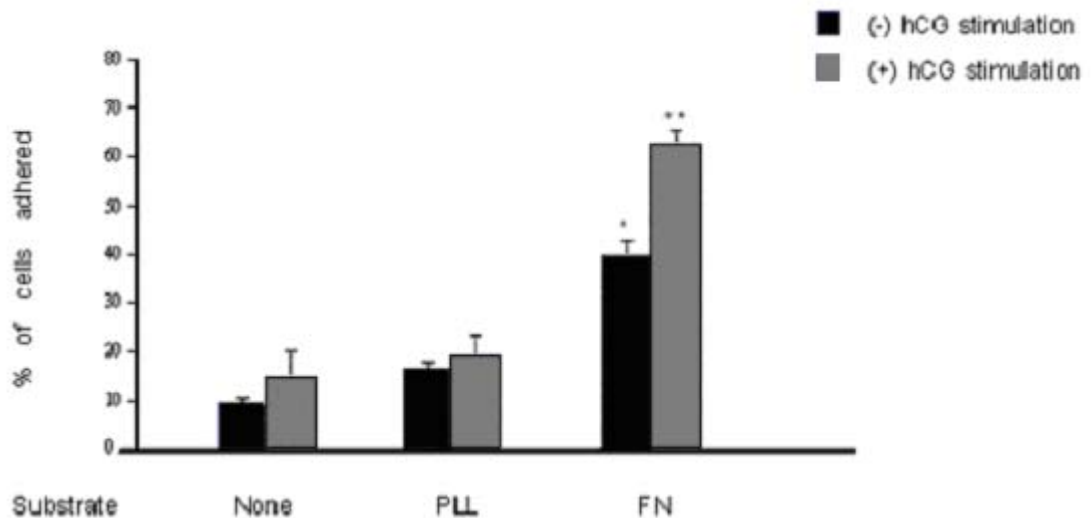
4.4.1 Η hCG αυξάνει την ικανότητα προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων σε επιφάνειες επιστρωμένες με FN.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η λειτουργική σημασία της έκφρασης των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, πραγματοποιήθηκαν ειδικά πειράματα συνάφειας με την χρήση δύο διαφορετικών μορίων του

εξωκυττάριου χώρου, με την βοήθεια των οποίων υπολογίστηκε ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων σε κάθε περίπτωση. Επιπροσθέτως, βασιζόμενοι στα ευρήματά μας, τα οποία ανίχνευαν αύξηση της έκφρασης των παραπάνω ιντεγκρινών μετά από διέγερση με την hCG, μελετήθηκε η επίδραση της ορμόνης αυτής στην ικανότητα προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων σε διάφορα υποστρώματα. Τα αποτελέσματα προέρχονται από στατιστική ανάλυση των μετρήσεων από τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.

Συγκεκριμένα, απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργούνται σε στείρες πλάκες καλλιέργειών των 96 οπών (5×10^3 κύτταρα ανά οπή) και σε θρεπτικό μέσο πλήρες ορού για χρονικό διάστημα 30 λεπτών στους 37°C . Οι στείρες πλάκες είχαν προηγουμένως επιστρωθεί με δύο διαφορετικά μόρια του εξωκυττάριου χώρου (FN, πολύ-L-λυσίνη), με μία διαδικασία που περιγράφεται λεπτομερώς στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι". Η πολύ-L-λυσίνη (PLL) χρησιμοποιήθηκε γιατί αποτελεί ένα μη-ειδικό υπόστρωμα, το οποίο επάγει την κυτταρική προσκόλληση ανεξάρτητα από την ύπαρξη των υπό μελέτη ιντεγκρινών. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες, οι οποίες δεν είχαν επιστρωθεί με καμία ουσία. Επιπλέον, τα κύτταρα είχαν επωαστεί όλη νύχτα σε θρεπτικό μέσο, απουσία ή παρουσία της hCG, στα πλαίσια μελέτης της επίδρασης της συγκεκριμένης ορμόνης. Η εικόνα 11 παρουσιάζει τα αποτελέσματα των μετρήσεων, από τα οποία διαφαίνεται ότι ο αριθμός των κυττάρων, που προσκολλήθηκε σε υπόστρωμα PLL, παρουσίαζε μικρή αύξηση σε σχέση με τον αριθμό που παρατηρήθηκε στις μη επιστρωμένες επιφάνειες. Το ποσοστό όμως των προσκολλημένων κυττάρων αυξανόταν σημαντικά στις FN-επιστρωμένες επιφάνειες. Επιπροσθέτως, η διέγερση των κυττάρων με hCG προκάλεσε περαιτέρω αύξηση του αριθμού των προσδεδεμένων κυττάρων και στις τρεις διαφορετικές περιπτώσεις, ιδιαίτερα όμως στην περίπτωση της FN, όπου η αύξηση έφτανε σχεδόν στον διπλασιασμό του αρχικού ποσοστού.

Τα παραπάνω δεδομένα, ενισχύουν την άποψη ότι οι $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες της επιφάνειας των κοκκωδών κυττάρων επάγουν την προσκόλλησή τους σε υπόστρωμα πλούσιο σε FN, ενώ παράλληλα αποδεικνύουν ότι η διασύνδεση αυτή επηρεάζεται θετικά από ωχρινοποιητικές ορμόνες, όπως η hCG. Τα πειράματα αυτά, βέβαια, δεν αποκλείουν την πιθανότητα και άλλοι παράγοντες, της επιφάνειας των κοκκωδών κυττάρων, να εμπλέκονται στην διαδικασία της προσκόλλησης μέσω διασύνδεσης με το μόριο της PLL ή ακόμη και άλλων μορίων του εξωκυττάριου χώρου που δεν έχουν εξεταστεί.



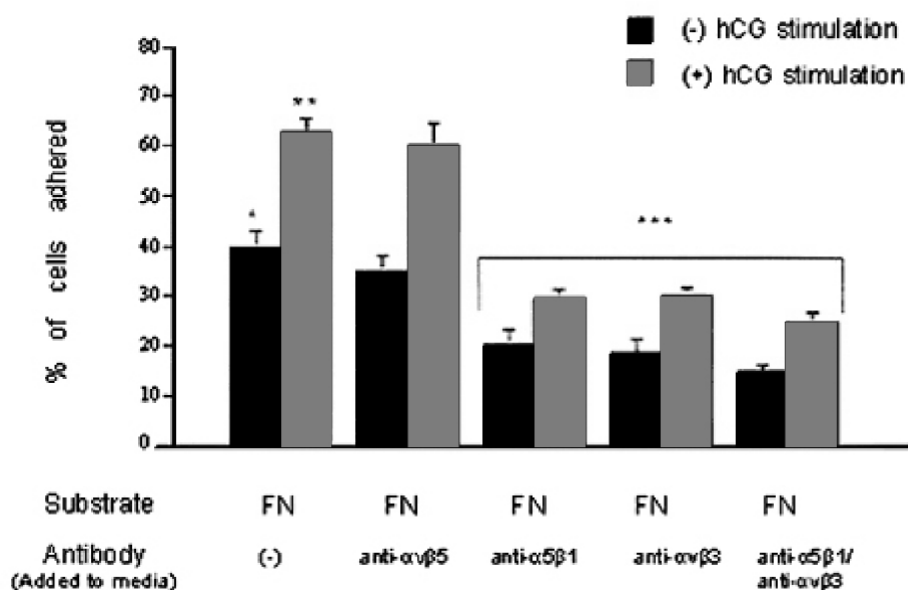
Εικόνα 11. Μελετήθηκε η προσκόλληση διεγερμένων με hCG και μη διεγερμένων κυττάρων σε πλαστικές επιφάνειες καλυμμένες με PLL ή FN. Για τα μη διεγερμένα κύτταρα η προσκόλληση ήταν μεγαλύτερη στις επιφάνειες με FN σε σχέση με αυτές της PLL (* $p < 0.05$). Η προσκόλληση αυξανόταν μετά από διέγερση με hCG (** $p < 0.05$).

4.4.2 Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων FN αναστέλλεται από αντισώματα ειδικά για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες.

Προς επιβεβαίωση της παραπάνω υπόθεσης και προκειμένου να πραγματοποιηθεί ποσοτική εκτίμηση της προσκόλλησης, που οφείλεται στις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες, εκτελέστηκαν περαιτέρω πειράματα συνάφειας με την χρήση ενεργοποιημένων αντισωμάτων κατά των μορίων αυτών, αλλά και της $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνης. Η συγκεκριμένη διαδικασία περιλαμβάνει επίστρωση επιφανειών με φιμπρονεκτίνη και καλλιέργεια των απομονωμένων κοκκωδών κυττάρων πάνω σε αυτές, όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα κύτταρα διεγείρονταν και πάλι με hCG, ενώ σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί ελλείψει της ορμόνης. Η διαφορά, σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα είναι ότι οι επιστρωμένες επιφάνειες έχουν προηγουμένως επωαστεί με αντισώματα που αναγνωρίζουν τις ειδικές θέσεις δέσμευσης των ιντεγκρινών πάνω στο μόριο της FN και συνδέονται με αυτές, με αποτέλεσμα να αναστέλλουν την προσκόλληση των κυττάρων πάνω στο υπόστρωμα. Η εικόνα 12 δείχνει τα αποτελέσματα των μετρήσεων σε κάθε μία από τις προαναφερόμενες περιπτώσεις, τα οποία προέρχονται

από στατιστική ανάλυση των τιμών που παρατηρήθηκαν σε τρία τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα.

Ο αριθμός των κυττάρων που συνδέονται με την FN-επιστρωμένη επιφάνεια παρουσιάζει σημαντική μείωση σε σχέση με τα ποσοστά που παρατηρήθηκαν στα πειράματα που δεν υπήρχαν τα ανταγωνιστικά αντισώματα. Συγκεκριμένα, το ποσοστό των προσκολλημένων κυττάρων είναι σχεδόν ίδιο με αυτό που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των PLL επιφανειών. Η μείωση αυτή όμως παρατηρείται μόνο για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες, ενώ η αναστολή της $\alpha_v\beta_5$ δεν φαίνεται να επηρεάζει την προσκόλληση στο υπόστρωμα. Σε περιπτώσεις, όπου η επώαση του υποστρώματος είχε πραγματοποιηθεί με ανταγωνιστές και των δύο ($\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$) ιντεγκρινών, η μείωση ήταν εξαιρετική και ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων φάνηκε να είναι μικρότερος ακόμη και σε σχέση με εκείνον που είχε παρατηρηθεί στο PLL υπόστρωμα. Τα ανωτέρω δεδομένα επομένως, συνηγορούν με την άποψη ότι η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε FN υπόστρωμα διαμεσολαβείται από τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες, αποδεικνύοντας όμως ταυτόχρονα ότι και άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας εμπλέκονται στην διασύνδεση αυτή, τα οποία δρουν ανεξάρτητα από τους υπό μελέτη υποδοχείς. Επιπλέον, και σε αυτήν την περίπτωση, η hCG φαίνεται να αυξάνει σε μικρό βαθμό την προσκόλληση, γεγονός που υποδηλώνει ότι πιθανώς η ορμόνη αυτή επηρεάζει θετικά την προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων στην FN, εν μέρει, μέσω ενός μηχανισμού ανεξάρτητου των ιντεγκρινικών υποδοχέων.

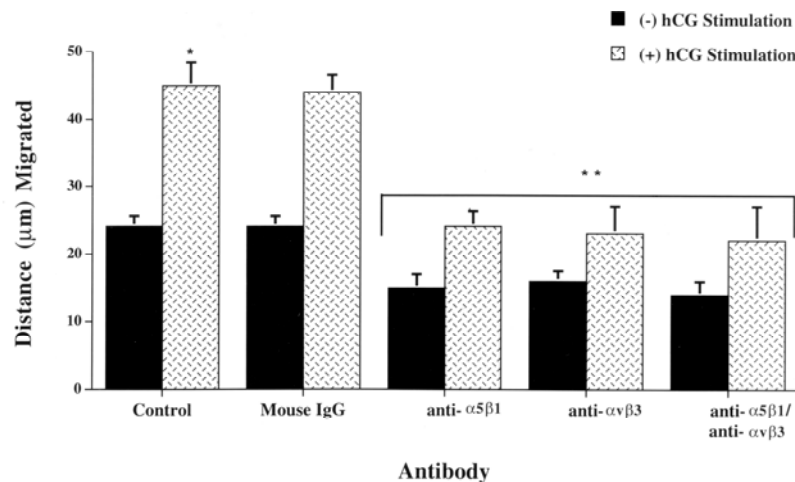


Εικόνα 12. Η προσκόλληση διεγερμένων με hCG και μη διεγερμένων κυττάρων σε πλαστικές επιφάνειες καλυμμένες με FN, αναστέλλεται με την προσθήκη αντισωμάτων κατά των $\alpha_5\beta_1$ και/ή $\alpha_v\beta_3$ (***) $p < 0.05$) αλλά όχι από αντισώματα κατά της $\alpha_v\beta_5$.

4.5. Η hCG διεγείρει την μετανάστευση των GCs πάνω σε FN, η οποία αναστέλλεται από αντισώματα ειδικά για τις $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες.

Τα αποτελέσματά μας, περί συμμετοχής των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στην διαδικασία προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα FN, οδήγησαν στην μελέτη της επίδρασης των ίδιων μορίων στην κινητική δραστηριότητα των κυττάρων αυτών, φαινόμενο που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και υποστρώματος. Χρησιμοποιώντας time-lapse video microscopy παρατηρήθηκε η μεταναστευτική δραστηριότητα των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων επάνω σε FN. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε η επίδραση της hCG στην λειτουργία αυτή.

Συγκεκριμένα, ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, που είχαν προηγουμένως διεγερθεί με hCG και άλλα, που είχαν καλλιεργηθεί απουσία της ορμόνης, τοποθετήθηκαν σε επιφάνειες επιστρωμένες με FN και παρατηρήθηκαν, με την βοήθεια του ειδικού μικροσκοπίου, για 7 τουλάχιστον ώρες σε κάθε περίπτωση. Επιπλέον, ορισμένες από τις FN-καλυμμένες επιφάνειες είχαν επωαστεί και με αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα, τα οποία μπλοκάρουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των επιφανειακών ιντεγκρινικών υποδοχέων και του υποστρώματος. Ο συνδυασμός των εικόνων, οι οποίες συλλέγονται κάθε μία ώρα, παρείχε την δυνατότητα για υπολογισμό της συνολικής απόστασης που καλύπτουν τα κύτταρα σε κάθε συνθήκη. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων φαίνεται στην εικόνα 13, από την οποία γίνεται φανερό ότι η κινητική δραστηριότητα των κυττάρων παρουσιάζει σημαντική μείωση στις επιφάνειες που υπάρχουν τα αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα, σε σχέση με τα control, ένα φαινόμενο που δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση χρήσης του mouse IgG. Εξίσου σημαντική είναι η διαπίστωση ότι σε όλες τις συνθήκες η συνολική απόσταση που διανύουν τα κύτταρα αυξάνεται, όταν αυτά είναι διεγερμένα με hCG.



Εικόνα 13. Μελετήθηκε η μετανάστευση διεγερμένων με hCG και μη διεγερμένων κυττάρων σε πλαστικές επιφάνειες καλυμμένες με FN. Η διέγερση των κυττάρων με hCG, απουσία αντισώματος, αύξησε σημαντικά την κινητική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων, σε σύγκριση με τα μη διεγερμένα κύτταρα (* $p < 0.05$). Η κινητική δραστηριότητα των διεγερμένων και μη κυττάρων, μειώθηκε σημαντικά με προσθήκη αντισωμάτων κατά των $\alpha_5\beta_1$ και/ή $\alpha_v\beta_3$ (** $p < 0.05$) αλλά όχι από τα mouse IgG.

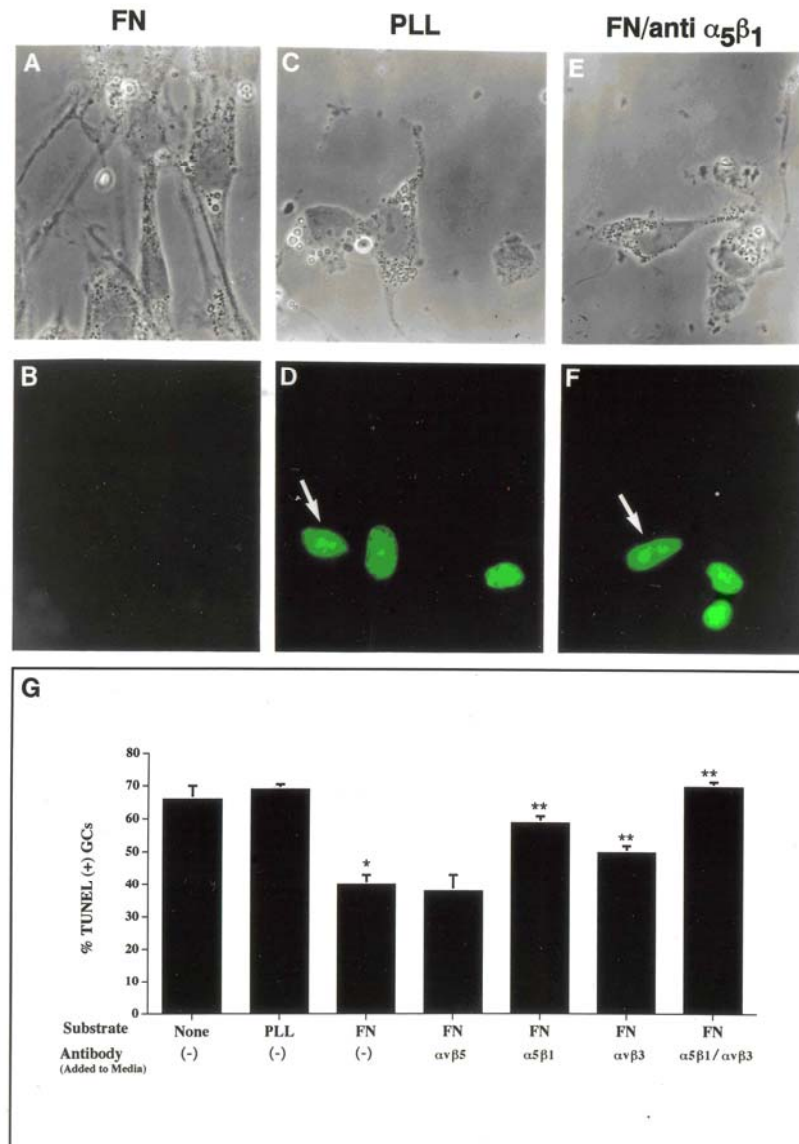
4.6. Η αντι-αποπτωτική δράση της $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινο-εξαρτώμενης προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων στο υπόστρωμά τους.

Η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη σύνδεση των κοκκωδών κυττάρων με μόρια του εξωκυττάρου χώρου έχει αποδειχτεί ότι προστατεύει τα κύτταρα από την διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ή απόπτωσης (Meredith et al., 1993; Frisch and Francis, 1994). Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι η αποδέσμευση των κοκκωδών κυττάρων από τα μόρια του εξωκυττάρου περιβάλλοντος προκαλεί άμεσα την έναρξη των μηχανισμών του αποπτωτικού θανάτου, μία διαδικασία που είναι γνωστή σήμερα σαν “anoikis” (Ruoslahti and Reed, 1994; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Οι ιντεγκρίνες κατά συνέπεια, εμπλέκονται στην αναστολή του φαινομένου, δεδομένου ότι αποτελούν τους βασικούς υποδοχείς των κοκκωδών κυττάρων για τα περισσότερα εξωκυτταρικά μόρια (Stupack and Chersesh, 2002; Zhau et al., 2004).

4.6.1 Η $\alpha_5\beta_1$ - και $\alpha_v\beta_3$ -εξαρτώμενη προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε FN υπόστρωμα αναστέλλει την απόπτωσή τους.

Βασιζόμενοι στις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές μελετήσαμε την πιθανότητα αντι-αποπτωτικής δράσης των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in situ* σήμανσης του 3'-OH άκρου μονών αλυσίδων τεμαχισμένου DNA, με την χρήση νουκλεοτιδίων (dUTP) συζευγμένων με φθορίζουσες χρωστικές (TUNEL assay). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μονές αλυσίδες πυρηνικού DNA είναι ένα από τα βασικά χαρακτηριστικά της απόπτωσης των κυττάρων και για τον λόγο αυτό η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί μία από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες για ανίχνευση του κυτταρικού θανάτου.

Απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργούνται σε ειδικές αποστειρωμένες πλάκες των 8 οπών (chamber slides) για χρονικό διάστημα 24 ωρών, σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ορό. Από βιβλιογραφικές αναφορές είναι γνωστό ότι σε συνθήκες έλλειψης ορού επάγεται η κυτταρική απόπτωση (Breckwoltd et al., 1996; Makrigianakis et al., 1999). Οι πλάκες των καλλιεργειών έχουν προηγουμένως επιστρωθεί με FN, PLL, ενώ χρησιμοποιούνται και μη επιστρωμένες πλάκες σαν αρνητικοί μάρτυρες. Στο τέλος κάθε καθορισμένης χρονικής στιγμής τα κύτταρα επωάζονται με ειδικό φθορίζον αντίσωμα, το οποίο προσδένεται στο ελεύθερο 3-OH άκρο του αποδιαταγμένου γενετικού υλικού. Οι σημασμένοι πυρήνες ανιχνεύονται με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού και μετρώνται σε 12 τυχαία επιλεγμένα πεδία. Από την εικόνα 14 γίνεται φανερό ότι ένα σημαντικό ποσοστό κυττάρων υφίστανται απόπτωση στις μη επιστρωμένες επιφάνειες ($66 \pm 4\%$), καθώς και στις επιφάνειες που είχαν επιστρωθεί με PLL ($70 \pm 2\%$). Αντίθετα, τα κύτταρα που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα FN εμφάνισαν σημαντική μείωση του αριθμού των αποπτωτικών κυττάρων ($38 \pm 6\%$, $p < 0.05$). Σε περιπτώσεις που στο θρεπτικό υλικό προστέθηκαν αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα, τα οποία ανταγωνιζόντουσαν την προσκόλληση των κυττάρων στην FN, παρατηρήθηκε και πάλι αύξηση του ρυθμού απόπτωσης. Η προσθήκη αντι- $\alpha_v\beta_5$ αντισώματος δεν προκάλεσε καμία μεταβολή στα παρατηρούμενα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων.



Εικόνα 14. Τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε FN απουσία ορού και τα επίπεδα απόπτωσης υπολογίστηκαν με TUNEL assay. Στις εικόνες φαίνονται φωτογραφίες από τα καλλιεργούμενα κύτταρα (A, C, E) και η TUNEL χρώση σε κάθε περίπτωση (B, D, F), καθώς επίσης και η ποσοτικοποίηση των επιπέδων απόπτωσης (G), που εκφράζονται σαν ποσοστό των TUNEL θετικών πυρήνων (% TUNEL (+) GCs). Τα κύτταρα υπέστησαν σημαντική απόπτωση μετά από 24 ώρες καλλιέργειας απουσία ορού σε PLL (C, D, G). Τα επίπεδα απόπτωσης μειώθηκαν δραστικά στα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε FN (A, B, G) (* $p < 0.05$ σε σύγκριση με PLL). Οι επιδράσεις αυτές της FN χάθηκαν με την προσθήκη αντισώματος κατά $\alpha_5\beta_1$ (E, F, G) και/ή $\alpha_5\beta_3$ (G) (** $p < 0.05$ σε σύγκριση με FN).

Προς επιβεβαίωση των ανωτέρω παρατηρήσεων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του DNA περιεχομένου με την μέθοδο της ανάλυσης της κυτταρομετρίας ροής. Τα κοκκώδη κύτταρα προετοιμάστηκαν και καλλιεργήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφεται παραπάνω. Μετά το τέλος του καθορισμένου χρονικού διαστήματος το DNA των αποπτωτικών κυττάρων σημαίνεται με ιωδιούχο προπίδιο και τα κύτταρα αναλύονται με ειδικό κυτταρόμετρο ροής. Τα αποτελέσματα, τα οποία προέρχονται από στατιστική ανάλυση των τιμών που παρατηρήθηκαν σε 4 τουλάχιστον ανεξάρτητα πειράματα, φαίνονται στον πίνακα 2. Όπως ήταν αναμενόμενο, τα ποσοστά των αποπτωτικών κυττάρων μειώνονταν σημαντικά σε καλλιέργειες που είχαν πραγματοποιηθεί σε υπόστρωμα FN, ενώ η προσθήκη ανταγωνιστών των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στο θρεπτικό μέσο ανέστειλε την αντι-αποπτωτική επίδραση της FN. Βασιζόμενοι στα παρατηρούμενα αποτελέσματα, καταλήξαμε στην διαπίστωση ότι η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα πλούσιο σε FN, η οποία μεσολαβείται κυρίως από τους $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινικούς υποδοχείς, έχει την ικανότητα να αναστέλλει την απόπτωσή τους.

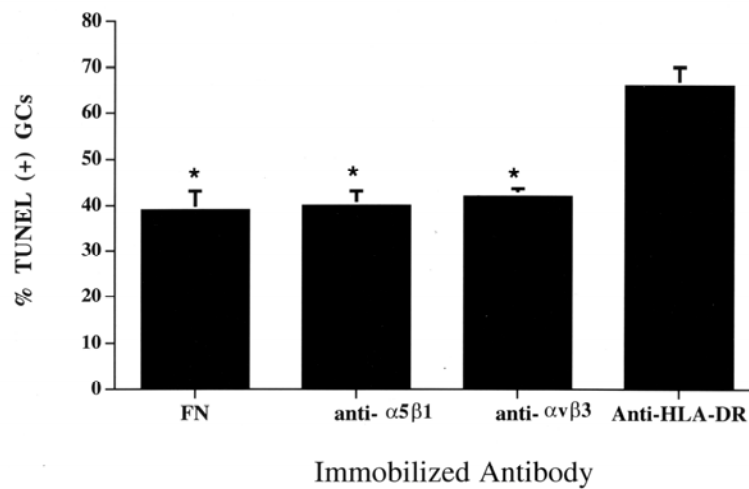
<u>Substrate</u>	<u>Antibody</u> (added to media)	<u>% Cells in Sub G₀</u>
(-)	(-)	70 ± 1
PLL	(-)	74 ± 5
FN	(-)	40 ± 3*
FN	$\alpha_v\beta_3$	41 ± 2
FN	$\alpha_5\beta_1$	60 ± 1**
FN	$\alpha_v\beta_3$	51 ± 1**
FN	$\alpha_5\beta_1 / \alpha_v\beta_3$	68 ± 2**

Πίνακας 2. Τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε FN, απουσία ορού και τα επίπεδα απόπτωσης υπολογίστηκαν με ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής του DNA περιεχομένου. Τα επίπεδα απόπτωσης ήταν σημαντικά μικρότερα για τα κύτταρα που μεγάλωναν σε FN (*p < 0.05 σε σύγκριση με την PLL). Οι επιδράσεις της FN χάνονταν με προσθήκη στην καλλιέργεια αντισωμάτων κατά των $\alpha_5\beta_1$ και/ή $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών (**p < 0.05 σε σύγκριση με την FN).

4.6.2 Η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων σε ενεργοποιημένα αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα έχει αντι-αποπτωτική δράση

Τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραμάτων αποδεικνύουν την αντι-αποπτωτική δράση της ιντεγκρινο-εξαρτώμενης προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η ειδική δράση των υπό μελέτη ιντεγκρινών καθώς και η λειτουργική τους σημασία για τα κοκκώδη κύτταρα, εκτελέστηκαν συμπληρωματικά πειράματα, στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ενεργοποιημένα αντι- $\alpha_5\beta_1$ και αντι- $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα. Τα συγκεκριμένα αντισώματα διαθέτουν την ικανότητα να μιμούνται την δράση του εξωκυττάρου προσδέτη των ιντεγκρινικών υποδοχέων. Στην συγκεκριμένη περίπτωση, επομένως, λειτουργούν ως υπόστρωμα φιβρονεκτίνης.

Στα συγκεκριμένα πειράματα, ειδικές αποστειρωμένες πλάκες των 8 οπών (chamber slides) επωάζονται με τα ενεργοποιημένα αντισώματα όλη νύχτα στους 4°C. Απομονωμένα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργούνται στις επιστρωμένες πλάκες για 24 ώρες, σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει ορό. Σαν αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιούνται επιφάνειες που έχουν επωαστεί με ενεργοποιημένο HLA-DR αντίσωμα. Τα επίπεδα απόπτωσης ανιχνεύονται με την μέθοδο της *in situ* σήμανσης του 3'-OH άκρου μονών αλυσίδων τεμαχισμένου DNA (TUNEL assay). Η εικόνα 15, η οποία παρουσιάζει τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης τριών τουλάχιστον ανεξάρτητων πειραμάτων, αποδεικνύει ότι τα επίπεδα απόπτωσης διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των κυττάρων που αναπτύχθηκαν παρουσία των ενεργοποιημένων ιντεγκρινικών αντισωμάτων και του HLA-DR αντισώματος. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στην πρώτη περίπτωση, ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων ήταν σχεδόν ίδιος με τον αριθμό που υπολογίστηκε στην περίπτωση καλλιέργειας των κυττάρων σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης. Αντίθετα, στην δεύτερη περίπτωση, τα επίπεδα απόπτωσης παρουσίασαν σημαντική αύξηση, γεγονός που ενισχύει την αρχική μας υπόθεση.



Εικόνα 15. Τα κοκκώδη κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλαστικές επιφάνειες, επικαλυμμένες με αντι- $\alpha_5\beta_1$ ή $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα, απουσία ορού και τα επίπεδα απόπτωσης υπολογίστηκαν σαν ποσοστό TUNEL θετικών πυρήνων (% TUNEL (+) GCs). Υπό αυτές τις συνθήκες τα επίπεδα απόπτωσης μετά από σύνδεση με τα $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ αντισώματα ήταν παρόμοια με αυτά που παρατηρήθηκαν μετά από σύνδεση με την FN και παρουσίαζαν μεγάλες διαφορές με αυτά που παρατηρήθηκαν με το control αντίσωμα HLA-DR (* $p < 0.05$ σε σύγκριση με το αντι-HLA-DR).

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1 Γενικά

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ωοθήκη της ενήλικης γυναίκας περιέχει κάποιες ενδοκρινείς δομές, τα ωοθυλάκια και το ωχρο σωματίο, τα οποία αναπτύσσονται, ωριμάζουν και εκφυλίζονται με κυκλικό τρόπο. Η εναλλαγή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την ταυτόχρονη εναλλαγή των ορμονών που εκκρίνονται από την ωοθήκη, ενώ απαιτεί την συνεχή ανακατασκευή των ιστών, την διαφοροποίηση και τον θάνατο των κυττάρων που δομούν τα παραπάνω όργανα. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και την δημιουργία και αποδιάταξη του ωχρού σωματίου έχουν αποτελέσει τα τελευταία χρόνια πεδίο ιδιαίτερου ενδιαφέροντος τόσο της βασικής όσο και της κλινικής έρευνας. Το γεγονός αυτό δικαιολογείται εύκολα, δεδομένης της εξαιρετικής σημασίας των μηχανισμών αυτών στην ανθρώπινη αναπαραγωγή.

Τα ωοθυλάκια αποτελούν την βασικότερη λειτουργική μονάδα της ωοθήκης των θηλαστικών. Στο εσωτερικό των δομών αυτών υπάρχει το θηλυκό γαμετικό κύτταρο ή ωοκύτταρο, το οποίο περιβάλλεται από έναν ή περισσότερους διαφορετικούς πληθυσμούς σωματικών κυττάρων, η συντονισμένη λειτουργία των οποίων ρυθμίζει την ωρίμανση και απελευθέρωσή του προκειμένου να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση (Gougeon, 1996). Σε αντίθεση με τα αρσενικά γαμετικά κύτταρα, τα οποία έχουν δυνατότητα ανανέωσης, τα ωοκύτταρα δεν ανανεώνουν τον πληθυσμό τους κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας. Κατά την γέννηση, κάθε θηλυκό άτομο διαθέτει ένα καθορισμένο και μη ανανεώσιμο απόθεμα γαμετικών κυττάρων, το οποίο μειώνεται σταδιακά κατά την διάρκεια ζωής του ατόμου έως ότου εξαιρεθεί πλήρως, οπότε η γυναίκα διανύει την περίοδο της εμμηνόπαυσης. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 85-90% των ωοκυττάρων που δημιουργούνται κατά την γαμετογένεση υποκύπτουν σε αποπτωτικούς μηχανισμούς κατά την εμβρυϊκή ή μετεμβρυϊκή ζωή του θηλυκού, δηλαδή πριν ακόμα ξεκινήσει η αναπαραγωγική περίοδος (Rolaki et al., 2005). Θεωρητικά, η συγκεκριμένη διαδικασία εξυπηρετεί τον ποιοτικό έλεγχο των γαμετικών κυττάρων, ώστε να επιβιώσουν τα ισχυρότερα, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό την πιθανότητα γονιμοποίησης και ανάπτυξης ενός υγιούς εμβρύου (Tilly, 2001). Για παράδειγμα, έχει υπολογιστεί ότι στον άνθρωπο μόνο 300-400 ωοκύτταρα έχουν την δυνατότητα να γονιμοποιηθούν σε όλη την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής της γυναίκας, ενώ ο αρχικός αριθμός των γαμετικών κυττάρων στην εμβρυϊκή

ωοθήκη ξεπερνάει τα 7×10^6 . Έχει διαπιστωθεί περαιτέρω ότι κατά την έναρξη της εμμηνόπαυσης υπάρχουν περίπου 100-1000 ωοκύτταρα στην ωοθήκη, τα περισσότερα από τα οποία είναι ήδη εκφυλισμένα (Baker, 1963; Faddy et al., 1992). Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα δεδομένα, γίνεται φανερό ότι η πιο συνηθισμένη μοίρα των ωοθυλακίων είναι η απόπτωση, και η διασαφήνιση των μηχανισμών που ελέγχουν την διαδικασία αυτή θα μπορούσε ενδεχομένως να ενισχύσει τις έρευνες για την αντιμετώπιση φαινομένων υπογονιμότητας ή ακόμα και να οδηγήσει σε δυναμικές λύσεις του προβλήματος.

Ανάλογης σημασίας για την ανθρώπινη αναπαραγωγή θεωρείται και το ωχρό σωματίο, μία ενδοκρινής δομή που συντίθεται από τα κατάλοιπα των ωοθυλακίων μετά την φάση της ωοθυλακιορρηξίας, μέσω μίας δυναμικής διαδικασίας που καλείται ωχρινοποίηση (Murphy, 2000). Το ερέθισμα για την έναρξη της ωχρινοποιητικής διαδικασίας παρέχεται από την αιχμή της LH, η οποία πραγματοποιείται λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία (Filicori, 1999). Η δημιουργία και ωρίμανση του ωχρού σωματίου αποτελεί μία από τις βασικότερες προϋποθέσεις για την πραγματοποίηση και διατήρηση της εγκυμοσύνης, στα πρώτα τουλάχιστον στάδια. Το ωχρό σωματίο αποτελεί την βασική πηγή προγεστερόνης για τον οργανισμό της ενήλικης γυναίκας (Lipsett, 1978), μία ορμόνη που επάγει τις απαραίτητες τροποποιήσεις του ενδομητρίου για την δεκτική φάση, δηλαδή την κατάσταση κατά την οποία πραγματοποιείται η εμφύτευση του εμβρύου. Εν συνεχεία, και εφόσον πραγματοποιηθεί γονιμοποίηση, η ενδοκρινής αυτή δομή αποτελεί τον μοναδικό τρόπο διατροφικής ενίσχυσης του εμβρύου, μέχρι την δημιουργία του πλακούντα. Σε περίπτωση που δεν υπάρχει εγκυμοσύνη, η διάρκεια ζωής του ωχρού σωματίου περιορίζεται σημαντικά: στο τέλος του εμμηνορροϊκού κύκλου τα κύτταρα που το δομούν υφίστανται απόπτωση και το ωχρό σωματίο αποδιατάσσεται μέσω της ωχρινολυτικής διαδικασίας (Shikone et al., 1996; Vaskivuo et al., 2002). Παρόλο που οι περισσότερες βιοχημικές και ενδοκρινείς διεργασίες που χαρακτηρίζουν την δημιουργία και τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου έχουν διευκρινιστεί, οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την μετανάστευση και την απόπτωση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (GCs), καθώς και η διαδικασία μέσω της οποίας η ωχρινοποιητική ορμόνη LH επιδρά στην μετατροπή του αποδιαταγμένου ωοθυλακίου σε ωχρό σωματίο δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί. Η σαφής και ολοκληρωμένη γνώση των παραγόντων καθώς και των κυτταρικών και μοριακών μηχανισμών ανάπτυξης, διαφοροποίησης και θανάτου των ωοθηκικών δομών, θα

οδηγήσει ενδεχομένως στην πλήρη κατανόηση της φυσιολογικής λειτουργίας της ωοθήκης. Παράλληλα, θα παράσχει το απαραίτητο θεωρητικό υπόστρωμα για την θεραπευτική αντιμετώπιση της υπογονιμότητας ή ακόμα και άλλων γυναικολογικών διαταραχών, όπως δυσπλασίες ή το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών.

Οι διαδικασίες δημιουργίας και εκφυλισμού του ωχρού σωματίου συνεπάγονται εντατική αναδιοργάνωση του κυττάρου και ανακατασκευή των ιστών, φαινόμενα που απαιτούν δυναμικές αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου και εξωκυττάριας ύλης (Grazul-Bilska et al., 1997). Εξάλλου, η σημασία του εξωκυττάριας περιβάλλοντος στην ανακατασκευή ιστών διαφορετικών οργάνων έχει ήδη αποδειχτεί με εκτεταμένες μελέτες (Rodgers et al., 2000; Rodgers et al., 2003). Επιπλέον, τα μόρια της εξωκυττάριας ύλης θεωρείται ότι σχετίζονται άμεσα με την προσκόλληση των κυττάρων στον εξωκυττάρια χώρο, την αλλαγή και διαμόρφωση του κυτταρικού σχήματος, την μετανάστευση και διαφοροποίηση των κυττάρων, καθώς και με τον κυτταρικό θάνατο (Hay, 1991), διαδικασίες που παρατηρούνται σε μεγάλο βαθμό και στις προαναφερόμενες ωοθηκικές δομές. Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθεί τα τελευταία χρόνια υποδεικνύοντας την συμμετοχή της διακυτταρικής συνάφειας στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων, καθώς και στην ωρίμανση και διατήρηση του ωχρού σωματίου (Makrigiannakis et al., 1999; Makrigiannakis et al. 2000a; Groten et al., 2006). Εντούτοις, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων και των μορίων της εξωκυττάριας ουσίας κατά τις παραπάνω διαδικασίες δεν είναι πλήρως κατανοητές.

5.2 Η έκφραση της FN και των ιντεγκρινικών της υποδοχέων σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα επάγεται από την hCG

Σήμερα, γνωρίζουμε ότι η ικανότητα των κυττάρων να ανταποκρίνονται σε διάφορους αναπτυξιακούς παράγοντες, όπως επίσης και σε ερεθίσματα διαφοροποίησης, καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το σχήμα και τον προσανατολισμό τους επάνω στο υπόστρωμα, τα οποία με την σειρά τους ρυθμίζονται από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του εξωκυττάριας περιβάλλοντος και συγκεκριμένων διαμεμβρανικών υποδοχέων του κυττάρου, τις ιντεγκρίνες (Gospodarwicz et al., 1978; Ingber, 1990). Επιπλέον, έχει αποδειχτεί *in vitro* ότι η λαμινίνη και η φιμπρονεκτίνη όταν χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα σε κυτταρικές καλλιέργειες προάγουν την διαδικασία του πολλαπλασιασμού και της

μετανάστευσης των κοκκωδών κυττάρων, προερχόμενα από μικρά ωοθυλάκια της φάσης του άντρου (Aharoni et al., 1997; Huet et al., 2001), ενώ πολλά προσκολλημένα κύτταρα υφίστανται απόπτωση μόλις χάσουν την επαφή τους με το υπόστρωμα (Ruoslahti and Reed, 1994; Giancotti and Ruoslahti, 1999). Τα προαναφερόμενα δεδομένα επιβεβαιώνουν την υπόθεση περί συμμετοχής των μορίων του εξωκυττάριου περιβάλλοντος σε πολυάριθμες λειτουργίες των κοκκωδών κυττάρων τόσο κατά την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, όσο και κατά την δημιουργία και τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε αρχικά το πρότυπο έκφρασης και η λειτουργική σημασία της φιμπρονεκτίνης σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, ενώ παράλληλα ανιχνεύθηκε η παρουσία ορισμένων ιντεγκρινικών υποδοχέων της φιμπρονεκτίνης ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) στην επιφάνεια των ίδιων κυττάρων. Η σημασία της φιμπρονεκτίνης σαν μόριο της εξωκυττάριας ουσίας έχει ήδη μελετηθεί σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Carsons, 1989; Hynes, 1990; Yamada and Clark, 1996), όπου αποδείχτηκε ο καίριος ρόλος του στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα, αλλά και στην μεταναστευτική τους διαδικασία, την διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Το συγκεκριμένο μόριο μελετάται για περισσότερο από δύο δεκαετίες, εντούτοις αποτελεί ακόμα πεδίο ενδιαφέροντων ανακαλύψεων (Pankov and Yamada, 2002), ενώ μόλις πριν από μερικά χρόνια διαπιστώθηκε η εξαιρετική του σημασία για την ανάπτυξη των σπονδυλωτών, όταν παρατηρήθηκε ότι η στοχευμένη απενεργοποίηση του γονιδίου της φιμπρονεκτίνης προκαλούσε θνησιμότητα σε αρχικά εμβρυϊκά στάδια σε επίμυες (George et al., 1993). Το μόριο της φιμπρονεκτίνης αποτελεί προσδέτη αρκετών μελών της οικογένειας των ιντεγκρινών (Plow et al., 2000), συμπεριλαμβανομένων των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ (Mohri, 1996; Aota and Yamada, 1995), που επελέγησαν και στην συγκεκριμένη εργασία.

Η οικογένεια των ιντεγκρινών αποτελείται από τους καλύτερα μελετημένους μεμβρανικούς υποδοχείς που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις με το εξωκυττάριο περιβάλλον (Clark and Brugge, 1995). Στην παρούσα μελέτη ελέγχθηκαν τα αποτελέσματα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρινών και του εξωκυττάριου προσδέτη τους, την FN σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα. Για τον σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκαν ανοσοϊστοχημικές μελέτες, κατά τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν τομές από ιστό ανθρώπινη ωοθήκης προερχόμενες από διαφορετικές χρονικές στιγμές του

εμμηνορροϊκού κύκλου. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων απέδειξαν ότι η έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_5\beta_3$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων συμπίπτει χρονικά με την συσσώρευση της φιμπρονεκτίνης στον εξωκυττάριο χώρο. Συγκεκριμένα, τα παραπάνω μόρια ανιχνεύονται σε τομές των αρχικών σταδίων του ωχρού σωματίου (ημέρα του κύκλου 15-18), ενώ δεν εντοπίζονται σε κοκκώδη κύτταρα των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων, αλλά ούτε και σε μετέπειτα στάδια της ωχρινικής φάσης (ημέρα του κύκλου 24-28) (εικόνα 1 και 2). Η ιντεγκρίνη $\alpha_5\beta_3$ παρουσίασε το ίδιο πρότυπο έκφρασης με τους δύο άλλους υποδοχείς, εντούτοις η ένταση της χρώσης εμφανιζόταν σημαντικά μειωμένη. Οι παρατηρήσεις αυτές επιβεβαιώθηκαν με περαιτέρω πειράματα ανοσοφθορισμού και κυτταρομετρίας ροής (εικόνες 3 και 4), κατά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης προερχόμενα από γυναίκες που υποβάλλονται σε *in vitro* γονιμοποίηση. Το πλεονέκτημα χρήσης των συγκεκριμένων κυττάρων σαν πειραματικά μοντέλα έγκειται στο γεγονός ότι διαθέτουν χαρακτηριστικά ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, δεδομένης της προηγούμενης, *in vivo*, χορήγησης υψηλών δόσεων χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG) στις ασθενείς. Από τα πειράματα ανοσοφθορισμού αποδείχτηκε επιπλέον ότι η FN, η οποία συσσωρεύεται στον μεσοκυττάριο χώρο, εκκρίνεται από τα ίδια τα κοκκώδη κύτταρα δεδομένου ότι παρατηρήθηκε έκφραση του μορίου ακόμη και στην περίπτωση που το υπόστρωμα της καλλιέργειας ήταν LN. Η έκφραση αυτή περιορίζεται στις προεκβολές των κυττάρων, γεγονός που υποδεικνύει πιθανή μετέπειτα πρόσδεση της εκκρινόμενης FN στους ιντεγκρινικούς υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης των κοκκωδών κυττάρων.

Τα ανωτέρω αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενες παρατηρήσεις ερευνητών (Honda et al., 1997), οι οποίοι διαπίστωσαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης της α_5 ιντεγκρινικής υπομονάδας και της φιμπρονεκτίνης κατά τον εμμηνορροϊκό κύκλο. Τα αποτελέσματά μας, σε συνδυασμό με τα ήδη υπάρχοντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η έκφραση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_5\beta_3$ ιντεγκρινών, καθώς και η συσσώρευση της φιμπρονεκτίνης στον εξωκυττάριο χώρο, ενισχύονται σημαντικά λίγο πριν την πραγματοποίηση της ωοθυλακιορρηξίας, γεγονότα που πιθανώς σχετίζονται με την απότομη προ-ωοθυλακιορρηκτική αύξηση των επιπέδων της LH στο πλάσμα. Με σκοπό να ελέγξουμε το ενδεχόμενο επαγωγής της έκφρασης των ιντεγκρινικών υποδοχέων και της φιμπρονεκτίνης από την LH, πραγματοποιήσαμε πειράματα κυτταρομετρίας ροής σε κοκκώδη κύτταρα που καλλιεργήθηκαν παρουσία ή απουσία της χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), μία ωχρινοποιητική ορμόνη που δρα

μέσω των ίδιων υποδοχέων με την LH (Funaro et al., 2003). Τα *in vitro* αποτελέσματα ενισχύουν την παραπάνω υπόθεση, δεδομένου ότι η διέγερση των εξεταζόμενων κυττάρων με hCG αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_5\beta_3$ ιντεγκρινών, όπως επίσης και του εξοκυττάριου προσδέτη τους (FN) (εικόνα 5). Παράλληλα, υποδηλώνουν ότι *in vivo* η LH πιθανώς προάγει την έκφραση των εξεταζόμενων ιντεγκρινών στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα του ωχρού σωματίου κατά την δημιουργία του, ενώ ταυτόχρονα σχετίζεται με την παραγωγή και συσσώρευση της FN γύρω από αυτά.

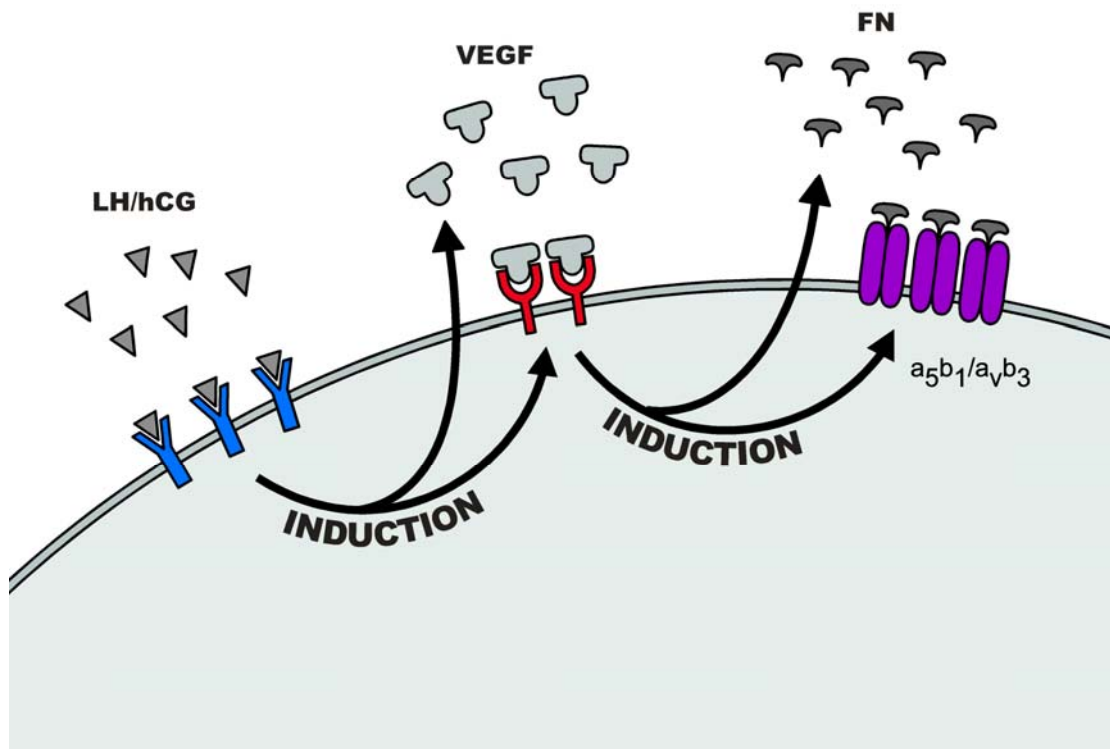
5.3 Η δράση της hCG στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα μεσολαβείται από τον VEGF παράγοντα

Περαιτέρω μελέτες πραγματοποιήθηκαν, με βασικό στόχο την διερεύνηση των μηχανισμών και των παραγόντων που σχετίζονται με την επαγωγή της έκφρασης των ιντεγκρινών από την hCG. Στον άνθρωπο, το θυλακιακό υγρό περιέχει έναν μεγάλο αριθμό ουσιών, όπως είναι οι κυτοκίνες και οι αναπτυξιακοί παράγοντες, οι οποίες έχει βρεθεί ότι επιδρούν στην φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκικών δομών (Brannstrom and Norman, 1993). Ο VEGF είναι ένας μιτογενετικός παράγοντας, ο οποίος έχει συσχετιστεί με την ρύθμιση της αγγειογένεσης σε πολυάριθμες φυσιολογικές και παθολογικές συνθήκες (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Lebovic et al., 1999; Nicosia, 1998; Tamanini and De Ambrogio, 2004). Εκφράζεται και εκκρίνεται στην φυσιολογική προ-εμμηνοπαυσιακή ωοθήκη και η ρύθμιση της λειτουργίας του κατά τον εμμηνορροϊκό κύκλο πραγματοποιείται μέσω της hCG (Neulen et al., 1995; Sugino et al., 2000b). Ο συγκεκριμένος παράγοντας έχει στο παρελθόν συσχετιστεί με την ρύθμιση της αγγειογενετικής διαδικασίας στο ενδομήτριο (Smith, 2001) και στον πλακούντα (Ong et al., 2000), καθώς και με την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Breier, 2000). Οι ανωτέρω παρατηρήσεις καθιστούν τον VEGF βασικό παράγοντα για την φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία (Geva and Jaffe, 2000). Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι το θυλακιακό υγρό, που προέρχεται από γυναίκες που πρόκειται να υποβληθούν σε τεχνητή γονιμοποίηση, περιέχει σημαντικές ποσότητες VEGF (Friedman et al., 1998; Manau et al., 2000; Balasch et al., 2004), ενώ μελέτες σε θηλαστικά (όχι ανθρώπινης προέλευσης) έχουν διαπιστώσει έκφραση του παράγοντα αυτού σε κυρίαρχα ωοθυλάκια και στο ωχρό σωματίο (Christenson and Stouffer, 1997; Lebovic et al., 1999). Ο καίριος ρόλος του VEGF όμως στην

αναπαραγωγή αποδείχτηκε με πειράματα αναστολής της λειτουργίας του σε αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια, κατά τα οποία παρατηρήθηκε παρεμπόδιση της αγγειογενετικής λειτουργίας, γεγονός που οδήγησε σε μη φυσιολογική ανάπτυξη της κοιλότητας του άντρου και περαιτέρω σε καταστολή της ωοθυλακιορρηξίας (Wulff et al., 2002). Επιπροσθέτως, πρόσφατες έρευνες απέδειξαν ότι αναστολή της λειτουργίας του VEGF κατά την ωχρινική φάση, σε πρώιστα είδη, προκαλεί σημαντική μείωση της παραγωγής ορμονών από τα στεροειδογενετικά κύτταρα, χωρίς όμως να επηρεάζεται η μορφολογία τους, ενώ ταυτόχρονα, προκαλείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων των γοναδοτροπινών (FSH και LH) στο πλάσμα (Fraser et al., 2000; Fraser et al., 2005).

Τα ανωτέρω δεδομένα, σε συνδυασμό με την διαπίστωσή μας ότι η παραγωγή του VEGF παράγοντα από ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα αυξάνεται με την επίδραση της χοριακής γοναδοτροπίνης (πίνακας 1), οδήγησαν στην διατύπωση της υπόθεσης ότι ορισμένες από τις δράσεις της ορμόνης αυτής στα εξεταζόμενα κύτταρα πραγματοποιούνται με αυτοκρινή ή παρακρινή τρόπο, μέσω hCG-επαγόμενης απελευθέρωσης του VEGF. Στα πλαίσια διερεύνησης της υπόθεσής μας πραγματοποιήθηκαν αρχικά πειράματα, κατά τα οποία πληθυσμοί κοκκωδών κυττάρων καλλιεργήθηκαν παρουσία και απουσία του VEGF. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι η διέγερση των κοκκωδών κυττάρων με VEGF προκαλεί σημαντική αύξηση των επιπέδων έκφρασης της φιμπρονεκτίνης και των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινικών υποδοχέων στην επιφάνειά τους (εικόνα 6), γεγονός που έχει ήδη διαπιστωθεί για διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (Senger et al., 1997; Suzuma et al., 1998). Εν συνεχεία, παρατηρήθηκε ότι η προσθήκη αντι-VEGF αντισώματος, και συνεπώς η εξουδετέρωση του εκκρινόμενου VEGF, σε κύτταρα διεγερμένα με hCG προκαλεί σχεδόν ολοκληρωτική αναστολή της hCG-επαγόμενης αύξησης των επιπέδων έκφρασης της φιμπρονεκτίνης και των υποδοχέων της στην επιφάνειά των κυττάρων αυτών (εικόνα 7). Τα αποτελέσματά μας ενισχύουν την αρχική υπόθεση και υποδηλώνουν ότι, *in vivo*, ο VEGF σχετίζεται όχι μόνο με την αγγειογενετική διαδικασία στο ωχρό σωματίο, αλλά και με άλλες φυσιολογικές λειτουργίες του, οι οποίες μεσολαβούνται από την χοριακή γοναδοτροπίνη. Εξάλλου, έχει ήδη αποδειχτεί ότι ο VEGF παράγεται από ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, μία λειτουργία που ρυθμίζεται από την ωχρινοποιητική ορμόνη, hCG (Lee et al., 1997; Neulen et al., 1998; Artini et al., 1998; Ferrara et al., 1998; Pietrowski et al., 2004).

Οι βιολογικές λειτουργίες του VEGF παράγοντα έχει ήδη αποδειχτεί ότι πραγματοποιούνται μέσω μίας οικογένειας υποδοχέων που είναι γνωστοί σαν VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/KDR, και VEGFR3/Flt-4 (Ferrara and Davis-Smyth, 1997; Stouffer et al., 2001). Οι υποδοχείς Flt-1 και KDR αποτελούν τους βασικότερους επαγωγείς των σημάτων του VEGF, τα οποία ρυθμίζουν τις διαδικασίες της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων (Waltenberger et al., 1994), ενώ παρόλο που θεωρούνται βασικοί υποδοχείς του ενδοθηλίου (Clauss et al., 1996), έχουν ανιχνευθεί ακόμα σε μακροφάγα, τροφοβλάστες και σε χοριοκαρκίνωμα (Charnick-Jones et al., 1994; Cheung, 1997; Shore et al., 1997). Πρόσφατες αναφορές, επιπλέον, αναφέρουν ανίχνευση του Flt-1 υποδοχέα, τόσο σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης (Otani et al., 1999; Sugino et al., 2000b; Endo et al., 2001), όσο και σε κοκκώδη κύτταρα άλλων οργανισμών (Berisha et al., 2000). Προς επιβεβαίωση των ανωτέρω παρατηρήσεων, αλλά και για την μελέτη του προτύπου έκφρασης του Flt-1, πραγματοποιήθηκαν μελέτες ανίχνευσης του συγκεκριμένου υποδοχέα σε κοκκώδη κύτταρα προερχόμενα από διαφορετικά στάδια του ωοθηκικού κύκλου. Τα αποτελέσματα οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι το πρότυπο έκφρασης του Flt-1 ακολουθεί εκείνο της φιμπρονεκτίνης και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της, με την Flt-1 πρωτεΐνη να ανιχνεύεται έντονα στα αρχικά στάδια της ωχρινικής φάσης και να μειώνεται σταδιακά στα μετέπειτα στάδια (εικόνα 8 και 9). Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε μία μετρίου μεγέθους αύξηση των επιπέδων έκφρασης του Flt-1 υποδοχέα στην επιφάνεια των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, μετά από διέγερσή τους με hCG (εικόνα 10). Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν ενισχύουν την υπόθεση ότι οι παρατηρούμενες επιδράσεις της hCG πραγματοποιούνται μέσω ενός VEGF-εξαρτώμενου μηχανισμού. Συγκεκριμένα, προτείνεται ότι, *in vivo*, οι ωχρινοποιητικές ορμόνες (LH/hCG) επάγουν την παραγωγή VEGF από τα κοκκώδη κύτταρα, ενώ ταυτόχρονα διεγείρουν την έκφραση του Flt-1 υποδοχέα του στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η ακόλουθη αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο αυτών μορίων προκαλεί αύξηση των επιπέδων έκφρασης των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, καθώς και έκκριση FN από τα ίδια κύτταρα (Εικόνα I).



Εικόνα I: Απλοποιημένη απεικόνιση του μηχανισμού δράσης των ωχρινοποιητικών ορμονών LH/hCG, μέσω του VEGF παράγοντα.

5.4 Η εντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλληση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων στο υπόστρωμα σχετίζεται με την ωχρινοποίησή τους

Το ερώτημα που δημιουργήθηκε στο σημείο αυτό είναι αν πραγματικά οι εντεγκρινικοί υποδοχείς που μελετάμε συνδέονται με το εξωκυττάριο μόριο της φιβρονεκτίνης και κατά πόσο η διέγερση με hCG (ή LH) επηρεάζει την αλληλεπίδραση αυτή. Προς απάντηση του συγκεκριμένου ερωτήματος πραγματοποιήθηκαν πειράματα συνάφειας των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων σε διαφορετικά επικαλυμμένες επιφάνειες, κατά τα οποία υπολογίστηκε το ποσοστό των κυττάρων που προσκολλάται σε κάθε περίπτωση. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών αποδεικνύουν ότι η προσκόλληση των κοκκωδών κυττάρων ενισχύεται σημαντικά σε υπόστρωμα φιβρονεκτίνης, σε αντίθεση με τις μη επικαλυμμένες ή PLL-επικαλυμμένες επιφάνειες (εικόνα 11). Μετά από διέγερση με

hCG παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων σε FN-υπόστρωμα αυξάνεται περίπου στο διπλάσιο του αρχικού ποσοστού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η hCG (και η LH, in vivo) προάγει την αλληλεπίδραση μεταξύ της φимπρονεκτίνης και των υποδοχέων της, που βρίσκονται στην μεμβράνη των κοκκωδών κυττάρων. Εντούτοις δεν αποκλείεται το ενδεχόμενο μεσολάβησης και άλλων επιφανειακών μορίων των ίδιων κυττάρων, στις διαδικασίες προσκόλλησής τους στον εξωκυττάριο χώρο, δεδομένου ότι ένας μη αμελητέος αριθμός κυττάρων φάνηκε να συνδέεται με μόρια πολύ-λυσίνης (PLL), που δεν αποτελεί προσδέτη των εξεταζόμενων ιντεγκρινικών υποδοχέων. Προς επιβεβαίωση των ανωτέρω παρατηρήσεων, επαναλάβαμε την διαδικασία χρησιμοποιώντας ενεργοποιημένα αντισώματα κατά των $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρινών, τα οποία αναστέλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων αυτών και της εξωκυττάριας φимпρονεκτίνης (αναφορά στο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι"). Όπως αναμενόταν, η διαδικασία αυτή προκάλεσε μείωση του ποσοστού προσκόλλησης των κυττάρων (εικόνα 12), μία μείωση που δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση χρήσης του $\alpha_v\beta_5$ αντισώματος. Επιπλέον, το γεγονός ότι μετά από ταυτόχρονη χρήση των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ανταγωνιστικών αντισωμάτων η αναστολή της προσκόλλησης των κοκκωδών κυττάρων στο FN-υπόστρωμα δεν ήταν πλήρης, επιβεβαιώνει και την πιθανή συμμετοχή περισσότερων παραγόντων στην διαδικασία αυτή, μία υπόθεση που απαιτεί περαιτέρω μελέτη. Οι παρατηρήσεις μας συμφωνούν με προηγούμενες αναφορές, οι οποίες επισημαίνουν τον καίριο ρόλο των ιντεγκρινών στην σύνδεση μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάρια περιβάλλοντος (Hynes, 1992; Wehrle-Haller and Imhof, 2003). Για αρκετούς κυτταρικούς τύπους, η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλληση και η επακόλουθη ενδοκυττάρια μεταβίβαση του σήματος σχετίζεται άμεσα με λειτουργίες ζωτικής σημασίας, όπως η κίνηση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση και ο θάνατος (Assoian, 1997; Schwartz, 1997; Huet et al., 2001).

Η δημιουργία του ωχρού σωματίου, όπως έχει ήδη συζητηθεί, έπεται της αιχμής της LH και απαιτεί την ταχεία διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα (LL, large luteal cells). Κατά την διαδικασία αυτή, τα κοκκώδη κύτταρα υφίστανται δυναμικές μορφολογικές και λειτουργικές μεταβολές, ενώ αποκτούν την ικανότητα παραγωγής σημαντικών ποσοτήτων προγεστερόνης. Ένας μεγάλος αριθμός μορίων, που σχετίζεται με την διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, έχει εντοπιστεί στην επιφάνειά τους και έχει διαπιστωθεί αύξηση της έκφρασής τους κατά την διαδικασία της ωχρινογένεσης (Fujiwara et al., 1992;

Fujiwara et al., 1993; Fujiwara et al., 1996). Ακολουθώντας το παραπάνω πρότυπο έκφρασης, οι ιντεγκρίνες $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$, σε συνδυασμό με την εξασθενημένη έκφρασή τους στα τελευταία στάδια της ωχρινικής φάσης, όπου τα κύτταρα είναι πλήρως διαφοροποιημένα, οι συγκεκριμένοι υποδοχείς θα μπορούσαν να θεωρηθούν δείκτες διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων στα αρχικά στάδια δημιουργίας του ωχρού σωματίου, όπως συμβαίνει με την ιντεγκρίνη $\alpha_6\beta_1$ (Honda et al., 1995). Επιπλέον, αναλογιζόμενοι το γεγονός του χρονικού συνεντοπισμού με την φιμπροεκτίνη μπορούμε να υποθέσουμε ότι η αλληλεπίδραση του μορίου αυτού με τους ιντεγκρινικούς υποδοχείς του στα κοκκώδη κύτταρα σχετίζεται άμεσα με την διαφοροποίησή τους σε ωχρινικά κύτταρα. Εξάλλου, εκτεταμένες μελέτες των μορίων του εξωκυττάρου χώρου υποδεικνύουν την συμμετοχή τους σε διαδικασίες διαφοροποίησης και στεροειδογένεσης των κοκκωδών κυττάρων διάφορων οργανισμών (Amsterdam et al., 1986; Schipper et al., 1993) ενώ παράλληλα, έχει αποδειχτεί και η σημασία των αλληλεπιδράσεών τους με ιντεγκρινικά μόρια στις παραπάνω διαδικασίες (Sammande et al., 1991; Marley et al., 1996; Clavero et al., 2004).

5.5 Η αλληλεπίδραση μεταξύ της FN και των ιντεγκρινικών υποδοχέων της επιφάνειας των κοκκωδών κυττάρων ρυθμίζει την κυτταρική μετανάστευση

Επιπροσθέτως, αρκετές αναφορές υποδεικνύουν τον κεντρικό ρόλο της ιντεγκρινο-εξαρτώμενης προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμα σε διαδικασίες κυτταρικής μετανάστευσης (Sheetz et al., 1998; Wehrle-Haller and Imhof, 2003). Η απενεργοποίηση της ιντεγκρινικής υπομονάδας α_5 έχει βρεθεί ότι σχετίζεται με σοβαρές βλάβες κατά την εμβρυογένεση, υποδεικνύοντας τον ενδεχόμενο ρόλο του $\alpha_5\beta_1$ υποδοχέα στην ρύθμιση της μετανάστευσης κυτταρικών πληθυσμών κατά την διάρκεια της οργανογένεσης (Goh et al., 1997). Η κυτταρική κίνηση αποτελεί μία συνεχή, κυκλικού τύπου, διαδικασία (Huttenlocher et al., 1995; Lauffenburger and Horwitz, 1996), κατά την οποία το κύτταρο εκτείνει λεπτές μεμβρανικές προεκβολές, τα λαμελιπόδια, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλλησή τους στο υπόστρωμα. Η αποδιάταξη των συνδέσεων αυτών, καθώς το κύτταρο αποκολλάται, και η επακόλουθη αποδέσμευσή του από το υπόστρωμα, ολοκληρώνουν την διαδικασία της μετακίνησης, η οποία επαναλαμβάνεται αρκετές φορές έως ότου το κύτταρο φτάσει στον προορισμό του. Η

κυτταρική αυτή κίνηση είναι υψίστης σημασίας για την διαδικασία της ωχρινογένεσης, η οποία χαρακτηρίζεται από έντονο μεταναστευτικό ρυθμό ενδοθηλιακών κυττάρων, από τις στοιβάδες των κυττάρων θήκης προς την εσωτερική κοιλότητα του ωοθυλακίου.

Βασιζόμενοι στις ανωτέρω παρατηρήσεις, επιχειρήθηκε ο έλεγχος της πιθανής μεσολάβησης των εξεταζόμενων ιντεγκρινικών υποδοχέων στην κινητική διαδικασία των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων. Για τον σκοπό αυτό τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε FN-επιστρωμένες επιφάνειες και με την βοήθεια ειδικού μικροσκοπίου καταγράφηκε η απόσταση που διένυσαν τα κύτταρα σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα. Παράλληλα, μελετήθηκε η κινητική δραστηριότητα των κυττάρων σε καλλιέργειες, μετά την χρήση ακινητοποιημένων αντισωμάτων κατά των $\alpha_5\beta_1$ και/ ή $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρινών, με σκοπό την αναστολή της δράσης των συγκεκριμένων υποδοχέων της επιφάνειας των κοκκωδών κυττάρων. Το σύνολο των αποτελεσμάτων απέδειξε σημαντική μείωση της τυχαίας κινητικής δραστηριότητας των εξεταζόμενων κυττάρων, με την χρήση των ανταγωνιστικών αντισωμάτων (εικόνα 13). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι *in vivo*, σε ένα υπόστρωμα πλούσιο σε φιμπρονεκτίνη, οι $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνες δημιουργούν συνδέσεις με τα μόρια του εξωκυττάρου χώρου, μέσω των οποίων προωθείται η μεταναστευτική τους ικανότητα. Ανάλογη δράση έχει παρατηρηθεί και σε διαφορετικούς ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος, όπως για παράδειγμα στην ανθρώπινη τροφοβλάστη, όπου έχει αποδειχτεί ότι η μεταναστευτική της ικανότητα ρυθμίζεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της α_5 ιντεγκρινικής υπομονάδας και της φιμπρονεκτίνης του εξωκυττάρου χώρου (Coutifaris et al., 2005). Παρόλα αυτά, η συνδυασμένη χρήση των ανταγωνιστικών αντισωμάτων δεν προκάλεσε ολοκληρωτική αναστολή της κινητικής ικανότητας των κοκκωδών κυττάρων (εικόνα 13), παρέχοντας σαφείς ενδείξεις για την συμμετοχή και άλλων μεμβρανικών μορίων στην παραπάνω διαδικασία.

Η ωχρινοποιητική ορμόνη (hCG), όπως έχει ήδη συζητηθεί, εμπλέκεται στην διαδικασία προσκόλλησης των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων στο υπόστρωμα, γεγονός που οδήγησε στην υπόθεση πιθανής ρύθμισης της ικανότητας μετανάστευσης των ίδιων κυττάρων, δεδομένου ότι η κινητική δραστηριότητα των κυττάρων προϋποθέτει αλληλεπιδράσεις με τα μόρια του εξωκυττάρου χώρου. Για τον έλεγχο της υπόθεσης αυτής επαναλάβαμε τις ανωτέρω πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιώντας κύτταρα, τα οποία είχαν προηγουμένως διεγερθεί με την ορμόνη

hCG. Διαπιστώθηκε ότι η ωχρινοποιητική αυτή ορμόνη προωθεί την ικανότητα μετανάστευσης των κυττάρων, εφόσον η συνολική απόσταση μετακίνησής τους παρουσίαζε σημαντική αύξηση (εικόνα 13). Ανάλογες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί και σε κύτταρα ανθρώπινης τροφοβλάστης, όπου έχει αποδειχτεί ότι η hCG προωθεί την μεταναστευτική τους δραστηριότητα μέσω ενός υποδοχέα του IGF-II αναπτυξιακού παράγοντα (Zygmunt et al., 1998; Zygmunt et al., 2005), γεγονός που συνδέει την ωχρινοποιητική αυτή ορμόνη και με την παρακρινική ρύθμιση της τροφοβλαστικής εισβολής (Tao et al., 1995). Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την άποψη περί συμμετοχής της χοριακής γοναδοτροπίνης σε διαδικασίες κυτταρική μετακίνησης και υποδηλώνουν ότι η προοθυλακιορρηκτική αιχμή της LH συντελεί όχι μόνο στην διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα, αλλά και σε άλλες λειτουργίες, απαραίτητες για την δημιουργία και ενδεχομένως την διατήρηση του ωχρού σωματίου.

5.6 Η ιντεγκρινο-εξαρτώμενη προσκόλληση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα FN αναστέλλει την απόπτωσή τους

Ο εκφυλισμός ή η επιμήκυνση της ζωής του ωχρού σωματίου συνδέονται άμεσα με την απόπτωση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (Makrigiannakis et al., 1999; Sugino et al., 2000; Vaskivuo et al., 2002). Σε περίπτωση επιτυχούς γονιμοποίησης, η διατήρηση ακέραίου του ωχρού σωματίου, και κατ' επέκταση η αναστολή της απόπτωσης των διαφοροποιημένων κοκκωδών κυττάρων, αποτελεί λειτουργία ζωτικής σημασίας για το έμβρυο και απαραίτητη προϋπόθεση για την φυσιολογική εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Η διάσωση των κυττάρων του ωχρού σωματίου πραγματοποιείται κατά βάση μέσω της ορμόνης, hCG, η οποία είναι τροφοβλαστικής προέλευσης (Neil et al., 1969; Dharmarajan et al., 1994; Walz et al., 2005). Οι μοριακοί μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντι-αποπτωτική λειτουργία της hCG δεν έχουν πλήρως διευκρινιστεί. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η hCG δρα σαν αγγειογενετικός αυξητικός παράγοντας και η προστατευτική του δράση συνοδεύεται από ένα δεύτερο κύμα αγγειογένεσης και σταθεροποίησης των αγγείων (Wulff et al., 2001; Zygmunt et al., 2002). Επιπροσθέτως, μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί και μελετηθεί αρκετοί διαφορετικοί παράγοντες με αντι-αποπτωτική δράση για τα κοκκώδη κύτταρα. Τα περισσότερα

μελετημένα μόρια είναι τα μέλη της Bcl-2 οικογένειας, τα οποία θεωρούνται υψίστης σημασίας στην ρύθμιση του αποπτωτικού μηχανισμού των κοκκωδών κυττάρων, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης και παλινδρόμησης των ωθητικών δομών (Rodger et al., 1998; Choi et al., 2004; Vaskivuo et al., 2002).

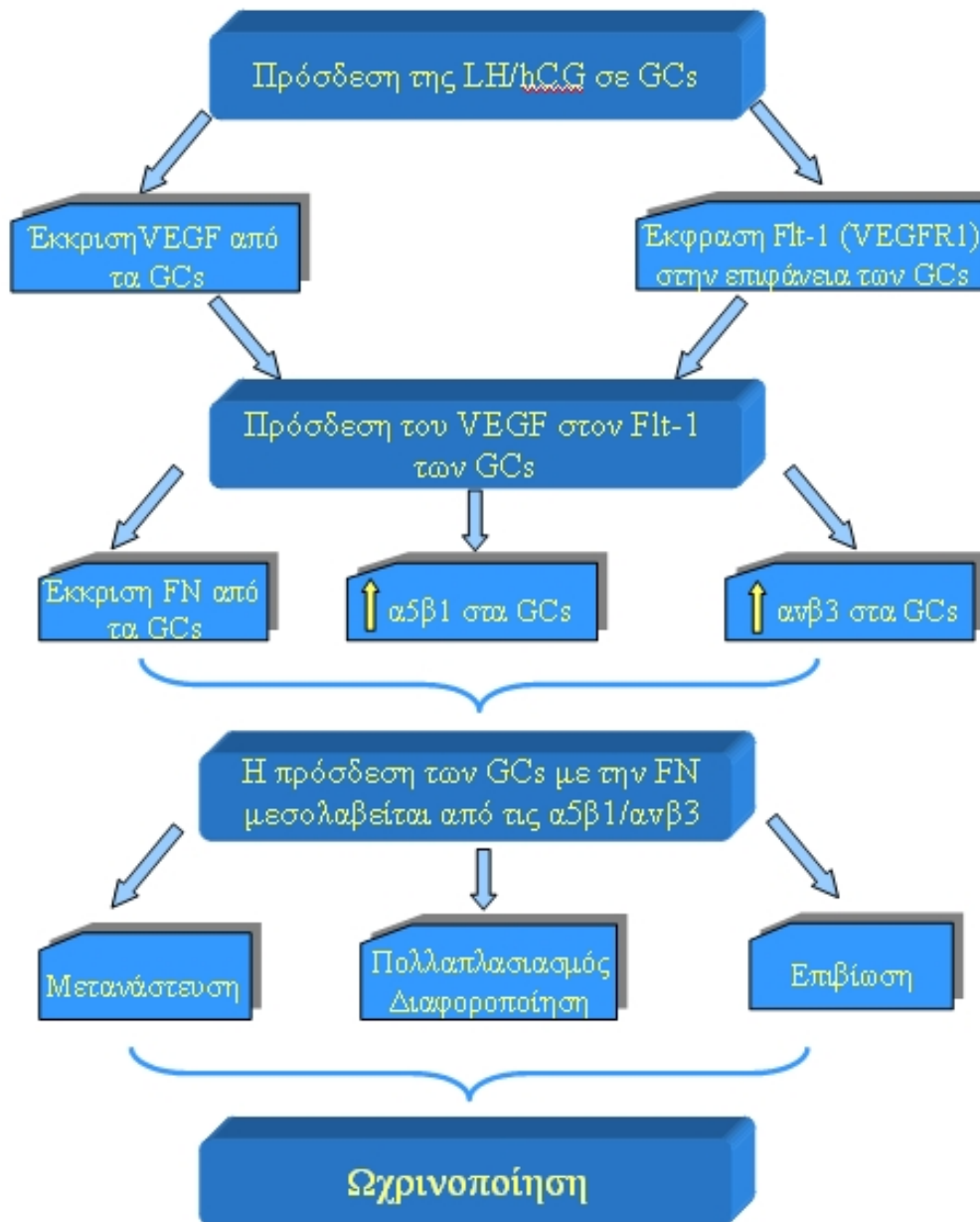
Ο εκφυλισμός του ωχρού σωματίου έχει βρεθεί ότι σχετίζεται επίσης με την απώλεια των διασυνδέσεων μεταξύ των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων (Yuan and Judice, 1997), οδηγώντας στην υπόθεση ότι τα μόρια συνάφειας (CAMs) συμμετέχουν σε μηχανισμούς ρύθμισης της αποπτωτικής διαδικασίας. Πράγματι, η N-cadherin, ένα μόριο που ανήκει στην οικογένεια των κατχερινών, ανιχνεύεται στα κοκκώδη κύτταρα των πρώτων σταδίων του ωχρού σωματίου, ενώ η έκφρασή του φθίνει σε μετέπειτα στάδια της ωχρινικής φάσης, όπου ο ρυθμός απόπτωσης αυξάνεται (Makrigiannakis et al., 1999; Peluso et al., 1996). Επιπλέον, αποδείχτηκε ότι η δημιουργία διασυνδέσεων προωθεί την επιβίωση των κοκκωδών κυττάρων, ενώ η αποκοπή του εξωκυττάρου τμήματος της N-cadherin από την κυτταρική επιφάνεια, με την δράση των μεταλλοπρωτεϊνών, επάγει την έναρξη της αποπτωτικής διαδικασίας (Makrigiannakis et al., 2000a). Η N-cadherin, όμως, δεν είναι το μοναδικό μόριο συνάφειας που έχει συσχετιστεί με τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. Η πρόσδεση των κυττάρων στο εξωκυττάριο στρώμα αποτελεί εξίσου σημαντική προϋπόθεση για την επιβίωσή τους, εφόσον η αποδέσμευσή τους από αυτό προκαλεί τον θάνατο, μία διαδικασία που είναι γνωστή σαν “anoikis” (Giancotti and Ruoslahti, 1999; Ruoslahti and Reed, 1994). Η ύπαρξη της συγκεκριμένης διαδικασίας υποδηλώνει την επίδραση των ιντεγκρινών στον μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου, δεδομένου ότι τα μόρια αυτά αποτελούν, *in vivo*, τους βασικούς υποδοχείς για τα περισσότερα μόρια του εξωκυττάρου περιβάλλοντος (Frisch and Ruoslahti, 1997; Stupack and Cheresch, 2002; Zhau et al., 2004). Ο ακριβής μηχανισμός της αντι-αποπτωτικής δράσης των ιντεγκρινών παραμένει αδιευκρίνιστος, ενώ αποτελεί πεδίο έρευνας μεγάλου ενδιαφέροντος. Μέχρι σήμερα, υπάρχουν μόνο ενδείξεις για την ύπαρξη μονοπατιών που ενεργοποιούνται αμέσως μετά την πρόσδεση των ιντεγκρινών, κατά τα οποία είτε επάγονται αντι-αποπτωτικά μόρια (Zhang et al., 1995), είτε αναστέλλονται προ-αποπτωτικοί παράγοντες (π.χ Bax) (Kugu et al., 1998).

Το γεγονός ότι η διακυτταρική αλληλεπίδραση αναστέλλει την κυτταρική απόπτωση υποδεικνύει ότι η μετακίνηση των κοκκωδών κυττάρων κατά την δημιουργία του ωχρού σωματίου θα έπρεπε να προκαλεί τον θάνατό τους, εφόσον η

διαδικασία αυτή απαιτεί την καταστροφή των κυτταρικών συμπλόκων. In vivo όμως δεν παρατηρείται κυτταρικός θάνατος κατά την ωχρινοποιητική διαδικασία, γεγονός που ενισχύει την άποψη περί συμμετοχής και άλλων παραγόντων στους μηχανισμούς αναστολής της απόπτωσης. Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η συμμετοχή τριών FN-συνδεδεμένων ιντεγκρινικών υποδοχέων ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$) στο φαινόμενο του αποπτωτικού κυτταρικού θανάτου σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης και ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της αλληλεπίδρασης των μορίων αυτών με τον εξωκυττάριο προσδέτη τους, την FN. Για την μελέτη των επιδράσεων αυτών επιλέχθηκε ένα καλά τεκμηριωμένο και ευρέως χρησιμοποιούμενο μοντέλο επαγωγής της κυτταρικής απόπτωσης, η στέρηση ορού και αυξητικών παραγόντων. Ειδικά για τα κοκκώδη κύτταρα, έχει αποδειχτεί ότι η στέρηση ορού επάγει την έναρξη των αποπτωτικών διαδικασιών μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Makrigiannakis et al., 1999; Breckwoldt et al., 1996), μία ιδιότητα που αποδείχθηκε και στο εργαστήριό μας με χρήση της τεχνικής ανίχνευσης του κατακερματισμένου DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Ο συγκεκριμένος έλεγχος απέδειξε ότι η $\alpha_5\beta_1$ - και η $\alpha_v\beta_3$ – εξαρτώμενη πρόσδεση των κοκκωδών κυττάρων, σε υπόστρωμα πλούσιο σε φιμπρονεκτίνη, αναστέλλει σημαντικά το φαινόμενο της απόπτωσης (εικόνα 14 και πίνακας 2). Όμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με την πρόσδεση των κοκκωδών κυττάρων σε υπόστρωμα που περιείχε ενεργοποιημένα αντισώματα, ειδικά για τις $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ και $\alpha_v\beta_5$ ιντεγκρίνες, τα οποία δρουν σαν εξωκυττάριος προσδέτης των μορίων αυτών (εικόνα 15). Ανάλογες μελέτες στο παρελθόν έχουν αποδείξει την ύπαρξη και άλλων ιντεγκρινικών υποδοχέων στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων (Monniaux et al., 2006), ενώ η αλληλεπίδραση της $\alpha_6\beta_1$ ιντεγκρίνης με τον εξωκυττάριο προσδέτη της, την λαμινίνη, φαίνεται να δρα προστατευτικά για τα κύτταρα αυτά (Le Bellego et al., 2002). Αντι-αποπτωτική δράση έχει αναφερθεί επίσης και για την $\alpha_v\beta_3$ ιντεγκρίνη σε άλλους κυτταρικούς τύπους (Montgomery et al., 1994), χωρίς όμως να αποσαφηνίζεται ο μηχανισμός μέσω του οποίου πραγματοποιείται η λειτουργία αυτή. In vitro πειράματα, έχουν αποδείξει επιπλέον ότι η hCG αναστέλλει την απόπτωση ωοθυλακίων της προ-ωοθυλακιόρρηκτης φάσης (Chun et al., 1994) και κυττάρων του ωχρού σωματίου (Dharmarajan et al., 1999). Συνδυασμένα τα ανωτέρω δεδομένα υποδεικνύουν ότι, in vivo, μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης, η hCG που προέρχεται από την τροφοβλάστη, επάγει της ιντεγκρινο-εξαρτώμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των

κοκκωδών κυττάρων και της εξωκυττάριας FN, οι οποίες δρουν προστατευτικά για το ωχρού σωματίο των πρώτων τουλάχιστον σταδίων της εγκυμοσύνης.

Συμπερασματικά, προτείνεται το ακόλουθο μοντέλο (Εικόνα II). Η πρόσδεση της ωχρινοποιητικής ορμόνης (LH ή hCG) στα κοκκώδη κύτταρα επάγει την απελευθέρωση του VEGF παράγοντα από αυτά και την έκφραση του υποδοχέα VEGFR1/Flt-1 στην επιφάνειά τους. Ο εκκρινόμενος παράγοντας VEGF (και ίσως και VEGF από άλλες πηγές) αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του, επάγοντας ακολούθως την έκκριση φμπρονεκτίνης στο εξωκυττάριο περιβάλλον και προκαλώντας ταυτόχρονα αύξηση στα επίπεδα έκφρασης δύο τουλάχιστον FN-προσδεδόμενων ιντεγκρινών, των $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_v\beta_3$. Ακόλουθες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιντεγκρινών αυτών και της φμπρονεκτίνης ενεργοποιούν ενδοκυττάριας διαδικασίες μετάδοσης του σήματος, οι οποίες σχετίζονται με την μετανάστευση, την επιβίωση και την διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων, διαδικασίες που συντελούν στην δημιουργία και διατήρηση του ωχρού σωματίου.



Εικόνα II. Προτεινόμενος μηχανισμός: Οι ωχρινικές ορμόνες, μέσω ενός VEGF-εξαρτώμενου μηχανισμού, αυξάνουν την έκφραση των ιντεγκρινών $\alpha_5\beta_1$ και $\alpha_V\beta_3$, οι οποίες προάγουν την επιβίωση και την μετανάστευση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων

5.7 Προοπτικές

Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων καθώς και οι διαδικασίες ωχρινογένεσης και ωχρινόλυσης στην ανθρώπινη ωοθήκη έχουν συσχετιστεί άμεσα με την ικανότητα αναπαραγωγής της γυναίκας και αποτελούν ένα πεδίο με συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για την Ιατρική Επιστήμη. Η διερεύνηση και αποσαφήνιση των μηχανισμών και των παραγόντων που εμπλέκονται στις ανωτέρω διαδικασίες θα αποτελέσει ενδεχομένως σημαντικό βήμα για την ανάπτυξη θεραπευτικών μεθόδων για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας ή και δυσλειτουργιών της ωοθήκης, με βασικότερο το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών ή ακόμα και του καρκίνου.

Η συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή περιγράφει τον βιολογικό ρόλο των ιντεγκρινο-εξαρτώμενων αλληλεπιδράσεων στην ανάπτυξη του ωχρού σωματίου. Το προτεινόμενο μοντέλο αναφέρεται σε έναν μηχανισμό κατά τον οποίο η χοριακή γοναδοτροπίνη ρυθμίζει την έκφραση και λειτουργία των ιντεγκρινικών υποδοχέων, μέσω του VEGF παράγοντα. Τα αποτελέσματά μας εντούτοις παρέχουν σαφείς ενδείξεις για την συμμετοχή και άλλων μορίων στις λειτουργίες διαφοροποίησης, μετανάστευσης και απόπτωσης των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, ένα ενδεχόμενο που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν την έκφραση και άλλων μορίων συνάφειας στην επιφάνεια των κοκκωδών κυττάρων, όπως είναι η N-Cadherin και η E-Cadherin, τα οποία έχουν συσχετιστεί με την αποπτωτική του διαδικασία. Ειδικά η N-Cadherin έχει ανιχνευθεί σε κύτταρα του ωχρού σωματίου και έχει προταθεί ότι ρυθμίζει την διαδικασία ωχρινόλυσης (Makrigiannakis et al., 1999). Τα μόρια αυτά, συνεπώς, θα μπορούσαν να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και κατά την ωχρινογένεση και να λειτουργούν παράλληλα με τις ιντεγκρίνες στις διαδικασίες που έχουν ήδη περιγραφεί.

Επιπλέον, η $\alpha_6\beta_1$ ιντεγκρίνη έχει ανιχνευθεί σε κοκκώδη κύτταρα, παρουσιάζοντας παρόμοιο πρότυπο έκφρασης με την λαμινίνη (LN), το οποίο αποτελεί τον προσδέτη της στον εξωκυττάριο χώρο. Η ιντεγκρίνη αυτή θεωρείται ότι ρυθμίζει την ωχρινοποιητική διαδικασία των κοκκωδών κυττάρων, όμως παραμένει αδιευκρίνιστο αν συμμετέχει και σε διαδικασίες απόπτωσης και μετανάστευσής τους. Το ενδεχόμενο αυτό έχει μελετηθεί μόνο σε άλλα είδη, και όχι στον άνθρωπο, με αποτελέσματα που ενισχύουν την υπόθεση περί συμμετοχής του μορίου αυτού σε βασικές λειτουργίες των κοκκωδών κυττάρων, αλληλεπιδρώντας εξωκυττάρια με την LN. Πρώιμες μελέτες στο εργαστήριό μας επιβεβαιώνουν την έκφραση της $\alpha_6\beta_1$ σε

ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα και παρέχουν ενδείξεις για την ρύθμιση της απόπτωσής τους από το συγκεκριμένο μόριο.

Ένας επιπλέον τομέας που απαιτεί την διενέργεια περαιτέρω μελετών είναι η πλήρης αποσαφήνιση του μοριακού μηχανισμού, μέσω του οποίου η hCG ρυθμίζει την έκφραση της FN και των υποδοχέων της, αλλά και του μονοπατιού που ενεργοποιείται από τα ιντεγκρινικά μόρια και το οποίο οδηγεί στην προστασία των κοκκωδών κυττάρων από την αποπτωτική διαδικασία. Πολυάριθμα μόρια, τα οποία σχετίζονται με την αναστολή ή την επαγωγή του κυτταρικού θανάτου θα μπορούσαν να θεωρηθούν ενδιάμεσοι ενδοκυττάριοι παράγοντες μεταγωγής του σήματος στο "μονοπάτι επιβίωσης". Πιθανότεροι υποψήφιοι είναι οι πρωτεΐνες της Bcl-2 οικογένειας, οι οποίες έχουν ήδη περιγραφεί σαν σημαντικοί ρυθμιστές σε πολλαπλά διαφορετικά αποπτωτικά μονοπάτια, και των οποίων η λειτουργία έχει αποδειχτεί ότι ρυθμίζεται από την πρόσδεση των ιντεγκρινών σε εξωκυττάριους προσδέτες. Εξίσου σημαντική βέβαια είναι και η μελέτη πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού, δεδομένου ότι οι ποικίλες δράσεις των ιντεγκρινών πραγματοποιούνται μέσω πρόσδεσης του κυτταροπλασματικού τους άκρου με κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες, μία αλληλεπίδραση που δεν έχει μελετηθεί αρκετά σε κύτταρα ωοθήκης.

Τέλος, εκτός από την επίδραση των ωχρινοτρόπων ορμονών (LH/hCG) στους μηχανισμούς ρύθμισης της λειτουργίας του ωχρού σωματίου, απαιτείται και η μελέτη περισσότερων μορίων στην ίδια διαδικασία, όπως για παράδειγμα των κυτοκινών. Είναι ήδη γνωστό ότι οι παράγοντες TGF- β 1 και M-CSF ρυθμίζουν την διαδικασία της ωχρινοποίησης των κοκκωδών κυττάρων, μέσω αναστολής της απόπτωσής τους, ενώ ο TNF α επάγει την απόπτωση των ίδιων κυττάρων κατά την ωχρινική φάση (Matsubara et al., 2000). Επιπροσθέτως, η ιντερλευκίνη-1 β (IL-1 β) έχει ωχρινολυτική δράση σε κοκκώδη κύτταρα ανθρώπινης ωοθήκης in vitro (Best and Hill, 1995). Εντούτοις, ο μοριακός μηχανισμός, μέσω των οποίων πραγματοποιείται η προαναφερθείσα δράση των κυτοκινών καθώς και το αν οι ιντεγκρινικοί υποδοχείς διαδραματίζουν κάποιον ρόλο στον μηχανισμό αυτό, αποτελούν ερωτήματα που παραμένουν αδιευκρίνιστα. .

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abir R, Orvieto R, Dicker D, Zukerman Z, Barnett M, Fisch B: Preliminary studies on apoptosis in human fetal ovaries. *Fertility and Sterility* **2002, 78: 259-264**
2. Aharoni D, Meiri I, Atzmon R, Vlodavsky I, Amsterdam A: Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Curr Biol.* **1997, 7: 43-51**
3. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E: Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* **1995, 1: 1024-1028**
4. Ameisen JC, Pleskoff O, Lelievre D, De Bels F. Subversion of cell survival and cell death: viruses as enemies, tools, teachers and allies. *Cell Death and Differentiation.* **2003, 10: 53 -56**
5. Amsterdam A, Rotmenach S, Kohney F, Mashiach S, Amsterdam A: Regulation of rat granulosa cell differentiation by extracellular matrix produced by bovine corneal endothelial cells. *Endocrinology.* **1986, 83:309-337**
6. Antalikova L, Kren V, Kasperek R, Bila V: Patterns of physiological cell death and mitoses in the apical ectodermal ridge in normodactylous and polydactylous rat limb buds. A quantitative evaluation. *Folia Biol.* **1989, 35: 339-346**
7. Aota S, Yamada KM: Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* **1995, 70:1-21**
8. Aoudjit E, Vuori K: Matrix attachment regulates Fs-induced apoptosis in endothelial cells: a role for c-Flip and implications for anoikis. *J Cell Biol.* **2001, 152: 633-643**
9. Artini RG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D'Ambrogio G, Genazzani AR: Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* **1998, 70:560-564**
10. Ashe PC, Berry MD: Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **2003, 27:199-214**
11. Assoian RK: Anchorage-dependent cell-cycle progression. *J Cell Biol.* **1997, 136:1-4**

12. Baker TG: A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc. R Soc. London B.* **1963, 158: 417-433**
13. Balasch J, Guimera M, Martinez-Pasarell O, Ros J, Vanrell JA, Jimenez W: Adrenomedullin and vascular endothelial growth factor production by follicular fluid macrophages and granulosa cells. *Hum Reprod.* **2004, 19: 808-814**
14. Barboni B, Turriani M, Galeati G, Spinaci M, Bacci ML, Forni M, Mattioli M: Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles. *Biology of Reproduction* **2000, 63: 858-864.**
15. Barr PJ, Tomei LD: Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology.* **1994, 12: 487-493**
16. Batisatou A, Greene LA: Internucleosomal DNA cleavage and neuronal cell survival/death. *Journal of Cellular Biology.* **1993, 122: 523-532**
17. Berisha B, Schams D, Kosmann M, Amselgruber W, Einspanier R: Expression and tissue concentration of vascular endothelial growth factor, its receptors and localization in the bovine corpus luteum during estrous cycle and pregnancy. *Biol Reprod.* **2000, 63: 1106-1114**
18. Best CL, Hill JA: Interleukin-1a and b modulation of luteinized human granulosa cell oestrogen and progesterone biosynthesis. *Hum Reprod.* **1995, 10:3206 –3210.**
19. Boudreau N, Sympton C J, Werb Z, Bissell M J: Suppression of ICE end apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* **1995, 267:891-893.**
20. Brannstrom M, Norman RJ: Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod.* **1993, 8: 1762-1775**
21. Breckwoldt M, Selaraj N, Aharoni D, Barash A, Segal I, Insler V, Amsterdam A: Expression of Ad4-BP/cytochrome 450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long term cultures of human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* **1996, 6:391-400**
22. Breier G: Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta.* **2000, 21: 11-15**
23. Breitschopf K, Haendeler J, Malchow P, Zeiher AM, Dimmeler S: Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent

- degradation: molecular characterization of the involved signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* **2000**, **20**: 1886-1896
24. Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA: Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* **1994**, **264**: 569-571
 25. Brooks P, Montgomery A, Rosenfeld M, Reisfeld R, Hu T, Klier G, Cheresh D: Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **1994**, **79**:1157-1164.
 26. Bronson AR and Fusi MF: Integrins and human reproduction. *Mol Hum Reprod.* **1996**, **2**: 153-168
 27. Carragher NO, Fincham VJ, Riley D, Frame MC: Cleavage of focal adhesion kinase by different proteases during SRC-regulated transformation and apoptosis. Distinct roles for calpain and caspases. *J Biol Chem.* **2001**, **276**: 4270-4275
 28. Carsons, SE: Fibronectin in Health and Disease. **1989**, Florida: CRC Press, Inc.
 29. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA, Smith SK: Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* **1993**, **48**: 1120-1128
 30. Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Boocock CA, Ahmed A, Plevin R, Ferrara N, Smith SK: Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod.* **1994**, **5**:524-530
 31. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA: Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obst Gynecol.* **1995**, **173**: 753-759
 32. Cheung CY: Vascular endothelial growth factor: possible role in fetal development and placental function. *J Soc Gynecol Invest.* **1997**, **4**:169-177
 33. Choi D, Hwang S, Lee E, Yoon S, Yoon B, Bae D: Expression of mitochondria-dependent apoptosis genes (p53, Bax, Bcl-2) in rat granulosa cells during follicular development. *J Soc Gynecol Investig.* **2004**, **11**: 311-317

34. Chothiac. Jones EY: The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem.* **1997, 66:823-62**
35. Christenson LK, Stouffer RL: Follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone/chorionic gonadotropin stimulation of vascular endothelial growth factor production by macaque granulosa cells from pre- and periovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metabol.* **1997, 82: 2135-2142**
36. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafiriri A, Hsueh AJ: Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor-I. *Endocrinology.* **1994, 135: 1845-1853**
37. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science.* **1995, 268:233-239**
38. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W: The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. *J Biol Chem.* **1996, 271: 17629-17634**
39. Clavero A, Castilla JA, Martinez L, Mendoza N, Fontes J, Maldonado V: Expression of integrin fraction and adhesion molecules on human granulosa cells and its relation with oocyte maturity and follicular steroidogenesis. *J Assist Reprod Genet.* **2004, 21: 187-195**
40. Conlon I, Raff M: Size control in animal development. *Cell.* **1999, 96: 235-244**
41. Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP: Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Experiments in Cellular Research.* **1993, 209: 238-247**
42. Coucouvanis E, Martin G: Signals for death and survival: a twostep mechanism for cavitation in the vertebrate embryo. *Cell* 1995, 83:279-287.
43. Coutifaris C, Omigbodun A, Coukos G: The fibronectin receptor α_5 integrin subunit is upregulated by cell-cell adhesion via a cyclic AMP-dependent mechanism: implications for human trophoblast migration. *Am J Obst Gynecol.* **2005, 192:1240-1255**
44. Craig SW, Johnson RP: Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr Opin Cell Biol.* **1996, 8:74-85**
45. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L: VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sc.* **2003, 28: 488-494**

46. Danen EH, Sonneveld P, Sonnenberg A, Yamada KM: Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol.* **2000, 151:1413-22**
47. Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R, Sonnenberg A: The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol.* **2002, 159:1071-86**
48. Danen EH, Sonnenberg A: Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol.* **2003, 201:632-41**
49. Danforth DR, Arbogast LK, Ghosh S, Dickerman A, Rofagha R, Friedman CI: Vascular endothelial growth factor stimulates preantral follicle growth in the rat ovary. *Biol Reprod.* **2003, 68: 1736-1741**
50. De Felici M, Klinger FG, Farini D, Scaldafferi ML, Iona S, Lobascio M: Establishment of oocyte population in the fetal ovary: primordial germ cell proliferation and oocyte programmed cell death. *Reproductive Biomedicine Online.* **2005, 10: 182-19**
51. De la Fuente R, Eppig JJ: Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. *Developmental Biology.* **2001, 229: 224-236**
52. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science.* **1992, 255: 989-991**
53. Dharmarajan AM, Zanagnolo VL, Dasko LM, Zirkin BR, Ewing LL, Walasch EE: Estradiol regulation of the rabbit corpus luteum: in vivo and in vitro studies. *Endocrinology* **1994, 128: 2678-2684**
54. Dharmarajan AM, Hisheh S, Singh B, Parkinson S, Tilly KI, Tilly JL: Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum *in vitro*: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology.* **1999, 140:2555-2561**
55. Dickson SE, Fraser HM: Inhibition of early luteal angiogenesis by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment in the primate. *J Clin Endocr. Metabol.* **2000, 85: 2339-2344**

56. Duriez PJ, Wong F, Dorovini-Zis K, Shahidi R, Karsan A: A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J Biol Chem.* **2000, 275: 18099-18107**
57. Edwards GM, Wilford FH, Liu X, Hennighausen L, Djiane J, Streuli CH: Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves proteityrosine phosphatases. *J Biol Chem.* **1998, 273: 9495-9500**
58. Endo T, Kitajima Y, Nishikawa A, Manase K, Shibuya M, Kudo R: Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptor flt-1 and KDR/flk-1 and Ets-1 in human corpora lutea. *Fertil. Steril.* **2001, 76:762-768**
59. Eppig JJ: Oocyte control of ovarian follicular development and function in Mammals. *Reproduction.* **2001, 122: 829-838**
60. Espey LL, Lipner H: Ovulation. In: Knobil E, Neil JD eds. The physiology of reproduction. *Raven Press, New York.* **1994, pp 725-780.**
61. Faddy MJ, Godsden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF: Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum. Reprod.* **1992, 7: 1342-1346**
62. Ferrara N, Davis-Smyth T: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* **1997, 18: 4-25**
63. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nature Med.* **1998, 4: 336-340**
64. Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* **2004, 25: 581-611**
65. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P: Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* **2006, 1757: 1371-87**
66. Filicori M: The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertil Steril.* **1999, 71: 405-414**
67. Folkman J, Klagsburn M: Angiogenic factors. *Science.* **1987, 235: 442-447**
68. Fraser HM, Wilson H, Morris KD, Swanston I, Wiegand SJ: Vascular Endothelial Growth Factor Trap Suppresses Ovarian Function at All Stages

- of the Luteal Phase in the Macaque. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90: 5811-5818
69. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll V, Bicknell R: Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology.* 2000, 141:995–1000
70. Friedman CI, Seifer DB, Kennard EA, Arbogast L, Alak B, Danforth DR: Elevated level of follicular fluid vascular endothelial growth factor is a marker of diminished pregnancy potential. *Fertil Steril.* 1998, 70: 836-839
71. Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol.* 1994, 124:619-626
72. Frisch SM, Ruoslahti E: Integrins and anoikis. *Cur Opin Cell Biol.* 1997, 9:701-706
73. Fujiwara H, Maeda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K, Mori T: Human luteal cells express dipeptidyl peptidase IV on the cell surface. *J Clin Endocrinol Metabol.* 1992, 75: 1352-1357
74. Fujiwara H, Ueda M, Imai K, Fukuoka M, Yasuda K, Takakura K, Suginami H, Kanzaki H, Inoko H, Mori T: Human leukocyte antigen-DR is a differentiation antigen for human granulosa cells. *Biol Reprod.* 1993, 49: 705-715
75. Fujiwara H, Ueda M, Takakura K, Mori T, Maeda M: A porcine homolog of human integrin alpha 6 is a differentiation antigen of granulosa cells. *Biol Reprod.* 1995, 53: 407-417
76. Fujiwara H, Ueda M, Hattori N, Mori T, Maeda M: A differentiation antigen of human large luteal cells in corpora lutea of the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 1996, 54: 1173-1183
77. Funaro A, Sapino A, Ferranti B, Horenstein AL, Castellano I, Bagni B, Garotta G, Malavasi F: Functional, structural and distribution analysis of the chorionic gonadotropin receptor using murine monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2003, 88:5537-46
78. Fusi FM, Vignali M, Gailit J, Bronson RA: Mammalian oocytes exhibit specific recognition of the RGD (Asp-Gly-Arg) tripeptide and express oolemmal integrins. *Mol Reprod Develop.* 1993, 36: 212-219
79. Fusi FM, Lorenzetti I, Mangili F, Herr JC, Freemerman AJ, Gailit J, Bronson RA: Vitronectin is an intrinsic protein of human spermatozoa

- released during the acrosome reaction. *Mol Reprod Develop.* **1994, 39: 337-343**
80. Fusi FM, Tamburini C, Mangili F, et al.,: The expression of α_v , α_5 , β_1 and β_3 integrin chains on ejaculated human spermatozoa varies with their functional state. *Hum Reprod.* **1995, 11, in press**
81. Gaytan F, Morales C, Garcia-Pardo L, Reymundo C, Bellido C, Sanchez-Criado JE: A quantitative study of changes in the human corpus luteum microvasculature during the menstrual cycle. *Biol Reprod.* **1999, 60: 914-919**
82. George, EL, Georges-Labouesse EN, Patel-King RS, Rayburn H, Hynes RO: Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development.* **1993, 119:1079-1091.**
83. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* **1998, 273: 13313-3316**
84. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem.* **1998, 273: 30336-30343**
85. Geva E, Jaffe RB: Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril.* **2000, 74: 429-438**
86. Giancotti FG, Ruoslahti E: Integrin signaling. *Science.* **1999, 285: 1028-1032**
87. Giebel J, de Souza P, Rune GM: Expression of integrins in marmoset (*Callitrix jacchus*) ovary during folliculogenesis. *Tissue Cell.* **1996, 28: 379-385**
88. Giebel J, Rune GM: Relationship between expression of integrins and granulosa cell apoptosis in ovarian follicles of the marmoset (*Callitrix jacchus*). *Tissue Cell.* **1997, 29: 525-531**
89. Gomez R, Simon C, Remohi J, Pellicer A: Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biol Reprod.* **2003, 68: 2164-2171**

90. Gospodarwicz D, Greenberg G, Birdwell CR: Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with control of cellular growth. *Cancer Res* **1978, 38:4155–4171.**
91. Gougeon A: Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. **1996, 17: 121–155**
92. Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP: Cellular interactions in the corpus luteum. *Seminar Reprod Endocrinol*. **1997, 15:383-393**
93. Green DR, Reed JC: Mitochondria and apoptosis. *Science*. **1998 28;281:1309-12**
94. Greenaway J, Connor K, Pedersen HG, Coomber BL, LaMarre J, Petrik J: Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. **2004, 145: 2896-2905**
95. Greenaway J, Gentry PA, Feige JJ, LaMarre J, Petrik JJ: Thrombospondin and vascular endothelial growth factor are cyclically expressed in an inverse pattern during bovine ovarian follicle development. *Biol Reprod*. **2005, 72: 1071-1078**
96. Grossmann J: Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis–anoikis”. *Apoptosis* **2002, 7: 247–260**
97. Groten T, Fraser HM, Duncan WC, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C: Cell junctional proteins in the human corpus luteum: changes during the normal cycle and after HCG treatment. *Hum Reprod*. **2006, 21: 3096-3102**
98. Goh KL, Yang JT, Hynes RO: Mesodermal defects and cranial neural crest apoptosis in alpha5 integrin null embryos. *Development*. **1997, 124: 4309-4319**
99. Hall P, Coates P, Ansari B, Hopwood D: Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* **1994, 107:3569-3577.**
100. Haskill S, Johnson C, Eierman D, Becker S, Warren K: Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and proto-oncogenes. *J Immunol*. **1988, 140: 1690-1694**
101. Hay ED: Cell Biology of Extracellular Matrix, *2nd edn*. Plenum Press, New York. **1991**

102. Hazzard TM, Molskness TA, Chaffin CL, Stouffer RL: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Mol Hum Reprod.* **1999, 5: 1115-1121**
103. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **2000, 407:770-6**
104. Honda T, Fujiwara H, Ueda M, Maeda M, Mori T: Integrin alpha 6 is a differentiation antigen of human granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **1995, 80: 2899-2905**
105. Honda T, Fujiwara H, Yamada S, Fujita K, Nakamura K, Nakayama T, Higuchi T, Ueda M, Maeda M, Mori T: Integrin α_5 is expressed on human luteinizing granulosa cells during corpus luteum formation, and its expression is enhanced by human chorionic gonadotropin *in vitro*. *Mol Hum Reprod.* **1997, 3:979-984**
106. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* **1992, 267: 26031-26037**
107. Howlett A, Bailey N, Damsky C, Paterson O, Bissell M: Cellular growth and survival are mediated by β_1 integrins in normal human breast epithelium but not in breast carcinoma. *J Cell Sci* **1995, 108:1945-1957**
108. Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A: Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process *Endocrine Reviews.* **1994, 15: 707-724.**
109. Huet C, Pisselet C, Mandon-Pepin B, Monget P, Monniaux D: Extracellular matrix regulates ovine granulosa cell survival, proliferation and steroidogenesis: relationship between cell shape and function. *J Endocrinol.* **2001, 169: 347-360**
110. Humphries MG, Newham P: The structure of cell-adhesion molecules. *Trends Cell Biol.* **1998, 8:78-83**
111. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF: Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol.* **1995, 7:697-706**
112. Hynes RO: Fibronectins. **1990, New York: Springer-Verlag**
113. Hynes RO: Integrins: Versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* **1992, 69:11-25**
114. Ingber DE: Fibronectin controls capillary endothelial cell growth by modulating cell shape. *Proc Natl Acad Sci USA* **1990, 87:3579-3583.**

115. Jenner, P: Clues to the mechanism underlying dopamine cell death in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry Suppl*, **1989**, **22-8**.
116. Juliano R: Cooperation between soluble factors and integrin-mediated cell anchorage in the control of cell growth and differentiation. *Bioassays*. **1996**, **18:911-917**
117. Juliano RL: Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: Functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2002**, **42: 283–323**
118. Kaczmarek MM, Schams D, Ziecik AJ: Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology-an overview. *Reprod Biol*. **2005**, **5: 111-136**
119. Kamat BR, Brown LF, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF: Expression of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by human granulosa and theca lutein cells. Role in corpus luteum development. *Am J Pathol*. **1995**, **146: 157-165**
120. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. **1972**, **26: 239–257**
121. Kerr JFR, Winterford CM: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. **1994**, **73: 2013-2026**
122. Kimura KI, Truman JW: Postmetamorphic cell death in the nervous and muscular systems of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci*. **1990**,**10:403-1**.
123. King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tsihchlis PN, Brugge JS: Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT na Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. *Mol Cell Biol*. **1997**, **17: 4406-4418**
124. Koos R: Ovarian angiogenesis. In: Adashi E, Leung P, eds. *The ovary*. New York: Raven Press. **1993**, **pp 433-453**
125. Koos RD: Increased expression of vascular endothelial growth/permeability factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimulus: potential roles in follicle rupture. *Biology of Reproduction* **1995**, **52: 1426-1435**.
126. Krussel JS, Behr B, Milki AA, Hirchenhain J, Wen Y, Bielfeld P, Lake Polan M: Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA splice variants

- are differentially expressed in human blastocysts. *Mol Hum Reprod.* **2001, 7: 57-63**
- 127.** Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly K, Tao XJ, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL: Analysis of apoptosis and expression of Bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ.* **1998, 5: 67-76**
- 128.** Kumar CC: Signaling by integrin receptors. *Oncogene.* **1998, 17: 1365-1373**
- 129.** Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell.* **1996, 84:359-369**
- 130.** Le Bellego F, Pisselet C, Huet C, Monget P, Monniaux D: Laminin-alpha6beta1 integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. *J Endocrinol.* **2002, 172: 45-59**
- 131.** Lebovic DI, Mueller MD, Taylor RN: Vascular endothelial growth factor in reproductive biology. *Curr Opin Obstet Gynecol.* **1999, 11: 255-260**
- 132.** Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA, Stouffer RL: Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells *in vitro.* *Hum Reprod.* **1997, 12:2756-2761**
- 133.** Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA: Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* **1992, 90: 188-195**
- 134.** Levin ER, Rosen GF, Cassidenti DL, Yee B, Meldrum D, Wisot A: Role of vascular endothelial cell growth factor in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Invest.* **1998, 102: 1978-1985**
- 135.** Lewis JG, Adams DO, Fan S: Selective sensibility of macrophages to cytotoxicity by inhibitors of macromolecular synthesis: induction of apoptosis. *Journal of Leukocyte Biology.* **1995, 57: 635-642**
- 136.** Lipsett MB: Steroid hormones. In: Yen SC, Jaffe RB (eds.), *Reproductive Endocrinology.* Philadelphia: WB Saunders. **1978: 80-92**
- 137.** ^aMakrigiannakis A, Coukos G, Blaschuk O, Coutifaris C: Follicular atresia and luteolysis. Evidence of a role for N-Cadherin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2000, 900:46-55**

138. ^bMakrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Montas S, Coutifaris C: Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival *in vitro*. *Ann. N.Y Acad. Sci.* **2000, 900:16-25**
139. ^cMakrigiannakis A, Amin K, Coukos G, Tilly LJ, Coutifaris C: Regulated expression and potential roles of p53 and Wilms' tumor suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* **2000, 85:449-459**
140. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Gour BJ, Radice GL, Blaschuk O, Coutifaris C: N-Cadherin-mediated Human Granulosa Cell Adhesion Prevents Apoptosis: A role in follicular development and luteolysis. *Am J Path.* **1999, 154:1391-1406**
141. Manau D, Balasch J, Jimenez W, Fabregues F, Civico S, Casamitjana R, Creus M, Vanrell J: Follicular fluid concentrations of adrenomedullin, vascular endothelial growth factor and nitric oxide in IVF cycles: relationship to ovarian response. *Hum Reprod.* **2000, 15: 1295-1299**
142. Marley P, Armstrong DT, Gore-Langton RE: Fibronectin stimulates growth but not follicle-stimulating hormone-dependent differentiation of rat granulosa cells *in vitro*. *J Cell Physiol.* **1996, 132:226-236**
143. Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H: Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. *Reproduction.* **2002, 123: 23–30**
144. Matsubara H, Ikuta K, Ozaki Y, Suzuki Y, Suzuki N, Sato T, Suzumori K: Gonadotropins and Cytokines Affect Luteal Function through Control of Apoptosis in Human Luteinized Granulosa Cells. *J Clin Endocrinol Metab.* **2000, 85:1620-1626**
145. Matter ML, Ruoslahti E: A signaling pathway from the alpha5beta1 and alpha(v)beta(3) integrins that elevates bcl-2 transcription. *J Biol Chem.* **2001, 276: 27757-27763**
146. Mattioli M, Barboni B, Turriani M, Galeati G, Zannoni A, Castellani G: Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol Reprod.* **2001, 65: 1014-1019**
147. McGee EA, Hsueh AJW: Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* **2000, 21:200-214**

148. Menko AS, Boettiger D: Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation. *Cell*. **1987, 51: 51-57**
149. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. **1993, 4:953-961**
150. Meredith JE, Schwartz MA: Integrins, adhesion and apoptosis. *Trends Cell Biol*. **1997, 7: 146-150**
151. Mohri H: Fibronectin and Integrins Interactions. *J Invest Med*. 1996, 44:429-441
152. Monniaux D, Huet C, Le Bellego F, Fabre S, Monget P, Calderwood D: Integrins in the ovary. *Semin Reprod Med*. **2006, 24: 251-261**
153. Montgomery A, Reisfeld R, Cheresch D: Integrin avb3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Nat/Acad Sci USA* **1994, 91:8856-8860**
154. Murphy BD: Models of luteinization. *Biol. Reprod*. **2000, 63: 2-11**
155. Muzio M: Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis. *Int J Clin Lab Res*. **1998, 28 :141-7.**
156. Neil JD, Johansson ED, Knobil E: Patterns of circulating progesterone concentrations during the fertile menstrual cycle and the remainder of gestation in the rhesus monkey. *Endocrinol*. **1969, 84:45-48**
157. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weidel K, Keck C, Weich HA, Marme D, Breckwoldt M: Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. **1995, 6:1967-1971**
158. Neulen J, Raczek S, Pogorzelski M, Grunwald K, Yeo TK, Dvorak HF, Weich HA, Breckwoldt M: Secretion of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor from human luteinized granulosa cells is human chorionic gonadotrophin dependent. *Molecular Human Reproduction* 1998, 4: 203-206.
159. Nicosia RF: What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol*. **1998, 153:11-17**

160. Niswender GD, Nett TM: The corpus luteum and its control. In: Knobil E, Neil JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL, Pfaff DW, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press. 1988, pp 489-525
161. Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol*. 1975, 122: 262-263
162. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumer V, et al: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998, 95: 11709-11714
163. Ong S, Lash G, Baker PN: Angiogenesis and placental growth in normal and compromised pregnancies. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynecol*. 2000, 14: 969-980
164. Orlicky DJ, Fisher L, Dunscomb N, Miller GJ: Immunohistochemical localization of PGF 2a receptor in the rat ovary. *Prostaglandins. Leukotrienes. Essential. Fatty Acids* 1992, 46: 223-229
165. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R: The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J. Clin Endocrinol. Metabol.* 1999, 84: 3845-51
166. Pankov R, Yamada KM: Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002, 115:3861-3863
167. Peluso JJ, Pappalardo A: Progesterone and cell-cell adhesion interact to regulate rat granulosa cell apoptosis. *Biochemistry and Cellular Biology* 1994, 72: 547-551
168. Peluso JJ, Pappalardo A, Trolice MP: N-Cadherin-mediated cell contact inhibits granulosa cell apoptosis in a progesterone-independent manner. *Endocrinol*. 1996, 137: 1196-1203
169. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R: Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991, 181: 902-906
170. Pietrowski D, Keck C: Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. *Exp Clin Endocrinol Diab*. 2004, 112:208-214

171. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW: Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.* **2000**, **275**: 21785-21788
172. Polakowska R, Piacentini M, Bartlett R, Goldsmith L, Haake A: Apoptosis in human skin development: morphogenesis, periderm and stem cells. *Dev Dyn* **1994**, **3**:176-188.
173. Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodavsky I, Keshet E, Neufeld G: VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem.* **1997**, **272**: 7151-7158
174. Quirk MS, Cowan GR, Harman RM, Hu L, Porter DA: Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.* **2003**, **82**: 40-52
175. Ravindranath N, Little-Ihrig L, Phillips HS, Ferrara N, Zeleznik AJ **1992** Vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid expression in the primate ovary. *Endocrinology* **131** 254-260.
176. Redig PJ, Juliano RL: Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metast Rev.* **2005**, **24**: 425-439
177. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E: Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* **1986**, **409**:127-47
178. Reinhaller A, Kirchheimer JC, Deutinger J, Bieglmayer C, Christ G, Binder BR: Plasminogen activators, plasminogen activator inhibitor, and fibronectin in human granulosa cells and follicular fluid related to oocyte maturation and intrafollicular gonadotropin levels. *Fertil Steril.* **1990**, **54**: 1045-1051
179. Renshaw MW, Ren XD, Schwartz MA: Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J.* **1997**, **15**:16:5592-9.
180. Reynaud K, Driancourt MA: Oocyte attrition *Molecular and Cellular Endocrinology.* **2000**, **163**: 101-108
181. Rich T, Allen RL, Wyllie AH: Defying death after DNA damage. *Nature.* **2000**, **407**: 777-783
182. Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature.* **1997**, **386**: 671-674

183. Roberts WG, Palade GE: Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci.* **1995, 108: 2369-2379**
184. Robinson CJ, Stringer SE: The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. *J Cell Sci.* **2001, 114: 853-865**
185. Rodger FE, Fraser HM, Krajewski S, Illingworth PJ: Production of the proto-oncogene Bax does not vary with changing in luteal function in women. *Mol Hum Reproduction* **1998, 4: 27-32**
186. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, van Wezel IL: Extracellular matrix in ovarian follicles. *Mol Cell Endocrinol.* **2000, 163:73-79.**
187. Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF, Russell DL: Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. *Reproduction.* **2003, 126: 415-424.**
188. Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D, Makrigiannakis A: Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod. Biomed. Online.* **2005, 11:93-103**
189. Rotello R, Lieberman RC, Lepoff RB, Gerschenson LE: Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU486. *American Journal of Pathology* **1992, 140: 449-456**
190. Ruoslahti E, Peirschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* **1987, 238:491-497**
191. Ruoslahti E: Integrins. *J Clin Invest* **1991, 87: 1-5**
192. Ruoslahti E, Reed JC: Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell.* **1994, 77:477-478**
193. Salvesen GS, Duckett CS: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002, 3: 401-410**
194. Sammande J: Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum-free medium: the effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. *J Steroid Biochem Mol Biol.* **1991, 38:189-196**
195. Sato K, Katagiri K, Hattori S, Tsuji T, Irimura T, Irie S, Katagiri T: Laminin 5 promotes activation and apoptosis of the T-cells expressing alpha3-beta1 integrin. *Exp Cell Res.* **1999, 247: 451-460**
196. Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ: Signaling through focal adhesion kinase. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1999, 71: 435-478**

197. Schipper I, Fauser BCJ, van Gaver EBO, Zarutskie PW, Dahl KD: Development of a human granulosa cell culture model with follicle stimulating hormone responsiveness. *Hum Reprod.* **1993, 8: 1380-1386**
198. Schwartz MA: Integrins oncogenes, and anchorage independence. *J Cell Biol.* **1997, 139:575-578**
199. Scott G, Liang H: pp125FAK in human melanocytes and melanoma: expression and phosphorylation. *Exp Cell Res.* **1995, 219:197-203**
200. Seewaldt VL, Mrozek K, Sigle R, Dietze EC, Heine K, Hockenbery DM, Hobbs KB, Caldwell LE: Suppression of p53 function in normal human mammary epithelial cells increases sensitivity to extracellular matrix-induced apoptosis. *J Cell Biol.* **2001, 155: 471-486**
201. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF: Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science.* **1983, 219: 983-985**
202. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: Regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1997, 94:13612-13617**
203. Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG: Cell adhesion: regulation of force on extracellular matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* **1998, 8:51-54**
204. Shibuya M, Ito N, Claesson-Welsh L: Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr Top Microbiol Immunol.* **1999, 237: 59-83**
205. Shikone T, Yamoto M, Kokawa K, Yamashita K, Nishimori K, Nakano R: Apoptosis of human corpora lutea during cyclic luteal regression and early pregnancy. *J Clin Endocrinol. Metabol.* **1996, 81: 2376-2380**
206. Shimizu T, Jiang JY, Sasada H, Sato E: Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. *Biol Reprod.* **2002, 67: 1846-1852**
207. Shimizu T, Jiang JY, Iijima K, Miyabayashi K, Ogawa Y, Sasada H, Sato E: Induction of follicular development by direct single injection of vascular endothelial growth factor gene fragments into the ovary of miniature gilts. *Biol Reprod.* **2003, 69: 1388-1393**

-
-
208. Shore VH, Wang TH, Wang CL, Torry RJ, Caudle MR, Torry DS: Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta*. **1997, 8:657-665**
209. Singhvi R, Kumar A, Lopez JP, Stephanopoulos GN, Wang DI, Whitesides GM, Ingber DE: Engineering cell shape and function. *Science*. **1994, 264: 696-698**
210. Smith SK: Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends Endocrinol Metab*. **2001, 12: 147-151**
211. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, Zeilliner R: Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. **2002, 8: 253-2259**
212. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM: Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* **2001, 32:567-575**
213. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, Cullen L, Cory S, Adams JM: The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci*. **2000, 917:541-8.**
214. Stromblad S, Becker JC, Vebra M, Brooks PC, Cheresh DA: Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta 3 during angiogenesis. *J Clin Invest*. **1996, 98: 426-433**
215. Stupack DG, Cheresh DA: Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci*. **2002, 115:3729-3738**
216. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H: Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocr. Metabol*. **2000, 85:4379-4386**
217. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocr. Metabol*. **2000, 85: 3919-3924**

218. Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Nagura H: Cyclic changes of vasculature and vascular phenotypes in normal human ovaries. *Hum Reprod.* **1998, 13: 953-959**
219. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y: Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **1998, 39:1028-1035**
220. Tamanini C, De Ambrogi M: Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Dom Anim* **2004, 39:206-216**
221. Tamkun JW, Desomine DW, Fonda D, Patel RS, Buck C, Horwitz AF, Hynes RO: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* **1986, 46: 271-282**
222. Tamura H, Greenwald GS: Angiogenesis and its hormonal control in the corpus luteum of the pregnant rat. *Biol Reprod.* **1987, 36: 1149-1154**
223. Tao YX, Lei ZM, Hofmann GE and Rao CV: Human intermediate trophoblasts express chorionic gonadotropin/luteinizing hormone receptor gene. *Biol Reprod.* **1995, 53: 899-904**
224. Taylor PD, Hillier SG, Fraser HM: Effects of GnRH antagonist treatment on follicular development and angiogenesis in the primate ovary. *J Endocrinol.* **2004, 183: 1-17**
225. Tilly JL, Billig H, Kowalski KI, Husueh AJW: Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology* **1992, 6: 1942-1945**
226. Tilly JL: Apoptosis and ovarian function. *Reviews of Reproduction* **1996, 1: 162-172**
227. Tilly JL: Commuting the death sentence: how oocytes strive to survive. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001, 2: 838-848**
228. Tsafiriri A, Chun S, Reich R: Follicular rupture and ovulation. In: Adashi E, Leung P, eds. *The ovary. New York. Raven Press.* **1993, pp 227-244**
229. Ullrich A, Schlessinger J: Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* **1990, 61: 203-212**

230. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI, Tapanainen JS: Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol.* **2002, 30:191-200**
231. Vaskivuo TE, Tapanainen JS: Apoptosis in the human ovary. *Reproductive BioMedicine Online.* **2003, 6: 24-35**
232. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, Stenback F, Heinkiheimo M, Tapanainen JS: Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins and transcription factor GATA-4. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* **2001, 86: 3421–3429.**
233. Vaux DL, Weissman IL: Neither macromolecular synthesis nor myc is required for cell death via the mechanism that can be controlled by bel-2. *Molecular and Cellular Biology* **1993, 13: 7000-7005**
234. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Conolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* **2000, 102: 43-53**
235. Vinatier D, Dufour Ph, Subtil D: Apoptosis: A Review article programmed cell death involved physiology in ovarian and uterine. *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology.* **1996, 67: 85-102**
236. Walz A, Keck C, Weber H, Kissel C, Pietrowski D: Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system. *Mol Reprod. Dev.* **2005, 72:98-104**
237. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C-H: Different signal transduction properties of KDR and Flt-1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* **1994, 269:26988-26995**
238. Wary K, Mainiero F, Isakoff S, Marcantonio E, Giancotti F: The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* **1996, 87:733-743**
239. Wayner EA, Orlando RA, Cheresch DA: Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol.* **1991, 121:171-178**

-
-
240. Wehrle-Haller B, Imhof BA: Integrin-dependent pathologies. *J Pathol.* **2003, 4:481-7**
241. Williams L, Bell L: Asynchronous development of the rat colon. *Anat Embryol.* **1991, 183: 573-578**
242. Wulff C, Dickson SE, Duncan WC, Fraser HM: Angiogenesis in the human corpus luteum: Simulated early pregnancy by hCG treatment is associated with both angiogenesis and vessel stabilization. *Hum Reprod.* **2001, 16: 2515-2524**
243. Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM: Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology.* **2002, 143: 2797-2807**
244. Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD: Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* **1981 13:681-92.**
245. Wyllie AH: Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Reviews.* **1992, 11: 95-103**
246. Yamada, KM, Clark RAF **1996** Provisional matrix. In *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair* (ed. R. A. F. Clark), pp. 51-93. New York: Plenum Press.
247. Yuan W, Giudice LC: Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab.* **1997, 82:3148-3155**
248. Yan Z, Neulen J, Raczek S, Weich HA, Keck C, Grunwald K, Breckwoldt M: Secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) permeability factor (VPF) production by luteinized human granulosa cells in vitro; a paracrine signal in corpus luteum formation. *Gynecol Endocrinol.* **1998, 12: 149-153**
249. Zeleznik AJ, Schuler HM, Reichert LE Jr: Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology.* **1981, 109: 356-362**
250. Zimmermann RC, Xiao E, Husami N, Sauer MV, Lobo R, Kitajewski J: Short-term administration of antivascular endothelial growth factor antibody

- in the late follicular phase delays follicular development in the rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab.* **2001, 86: 768-772**
- 251.** Zimmermann RC, Hartman T, Kavac S, Pauli SA, Bohlen P, Sauer MV, Kitajewski J: Vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated angiogenesis is essential for gonadotropin-dependent follicle development. *J Clin Invest.* **2003, 112: 659-669**
- 252.** Zhang Z, Vuori K, Reed J, Ruoslahti E: The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and upregulates bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995, 92:6161-6165**
- 253.** Zhau M, Zhao H, Han ZC: Signaling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol.* **2004, 19:973-983**
- 254.** Zhu L, Chou SH, Reid BR: A single G-to-C change causes human centromere TGGAA repeats to fold back into hairpins. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1996, 93: 12159-64**
- 255.** Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P and Lang U: Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. *Placenta.* **1998 19: 587–593**
- 256.** Zygmunt M, Herr F, Keller-Schoenwetter S, Kunzi-Rapp K, Munstedt K, Rao CV, Lang U and Preissner KT (2002) Characterization of human chorionic gonadotropin as a novel angiogenic factor. *J Clin Endocrinol Metab* **2002, 87: 5290–5296.**
- 257.** Zygmunt M, McKinnon T, Herr F, Lala PK, Han VKM: HCG increases trophoblast migration in vitro via the insulin-like growth factor-II/mannose-6 phosphate receptor. *Mol Hum Reprod.* **2005, 11: 261-267**

Epithelial and Mesenchymal Cell Biology

Luteogenic Hormones Act through a Vascular Endothelial Growth Factor-Dependent Mechanism to Up-Regulate $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ Integrins, Promoting the Migration and Survival of Human Luteinized Granulosa Cells

Alexandra Rolaki,* George Coukos,[†]
Dimitris Loutradis,[‡] Horace M. DeLisser,[§]
Christos Coutifaris,[†] and Antonis Makrigiannakis*

From the Laboratory of Human Reproduction,* Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece; the Division of Human Reproduction,[†] Department of Obstetrics and Gynaecology, and the Division of Pulmonary, Allergy, and Critical Care,[§] University of Pennsylvania Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania; the Department of Obstetrics and Gynaecology,[‡] Medical School, University of Athens, Athens, Greece

The formation of the corpus luteum (CL) is critical for the establishment of a successful pregnancy. After ovulation, the CL develops from the remnants of the ovulated ovarian follicle. This process, which involves varying cell-matrix interactions, is poorly characterized. To understand the role and potential regulation of cell-matrix interactions in the formation of the CL, we investigated the expression and activity of the matrix protein fibronectin (FN) and several of its integrin receptors on luteinized granulosa cells (GCs). *In situ*, FN and several FN-binding integrins were detected around luteinizing GCs during the early luteal phase, although expression declined in the late luteal phase. *In vitro*, GCs released FN, and stimulation of these cells with human chorionic gonadotropin increased the surface expression of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$. Up-regulation of these proteins on GCs was reproduced by stimulation with vascular endothelial growth factor (VEGF) and was inhibited by anti-VEGF antibody. Lastly, expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ mediated adhesion to FN, facilitated migration, and prevented apoptosis. These data suggest that *in vivo* luteogenic hormones, in part through a VEGF-dependent mechanism, stimulate selected integrin-matrix adhesive interactions that promote the motility and survival of GCs and thus contrib-

ute to the formation and preservation of the CL. (Am J Pathol 2007, 170:1561–1572; DOI: 10.2353/ajpath.2007.060926)

At the onset of the adult female reproductive life, the normal ovary carries several hundreds of thousands of primordial follicles,¹ which are formed during embryonic life. At the beginning of every normal menstrual cycle, a cohort of these primordial follicles begins to grow, but only one follicle will complete the maturation cycle and become dominant, developing into a large preovulatory follicle. Late in its maturation, the dominant follicle produces increasing amounts of estradiol, which provides the crucial stimulus for a surge in luteinizing hormone (LH) that completes the maturation of the dominant follicle and triggers the rupture of the follicle and release of the oocyte (ovulation).

After expulsion of the oocyte, structural changes of granulosa and thecal cells are provoked, resulting in transformation of the collapsed follicle into a highly vascularized endocrine gland, the corpus luteum (CL). The main hormone product of the CL is progesterone, which induces the necessary endometrial modifications required for the acquisition of a receptive state, an anticipation of embryo implantation. However, the CL has a short life span, degenerating over the course of 2 weeks into a fibrous hormonally inactive residue. During corpus luteum regression, granulosa and lutein cells undergo apoptosis, a mechanism modulated by many different factors.^{2,3} If conception and successful implantation of

Supported by the National Institutes of Health (grants HD-31903 to C.C. and HL-03382 to H.M.D.) and by the Alexander Onassis Foundation (to A.M.).

Accepted for publication January 30, 2007.

Address reprint requests to Antonis Makrigiannakis, M.D., Ph.D., Laboratory of Human Reproduction, Department of Obstetrics and Gynaecology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71110, Greece. E-mail: makrigia@med.uoc.gr.

Table 1. VEGF Release from GCs

Condition	VEGF concentration (pg/ml)
Control	40 ± 3
(+) hCG	180 ± 7
(+) hCG/(+) anti-VEGF	50 ± 2

The concentration of VEGF in the media from unstimulated GCs and GCs stimulated with hCG in the absence or presence of anti-VEGF antibody was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Inclusion of anti-VEGF antibody neutralized more than 90% of the stimulated release of VEGF. Data are the mean of two samples done in duplicate.

the embryo occur, the corpus luteum is preserved for an additional 8 to 12 weeks. This is a critical condition for the establishment and maintenance of pregnancy because the CL is the main source of vital steroidogenic hormones supporting the gestation. The extended life of the CL is accomplished by the trophoblastic production of the luteotropic hormone human chorionic gonadotropin (hCG)⁴ through the same receptor as LH.⁵ Although some of the biochemical and endocrine events characterizing the formation and regression of CL have been well established,^{6,7} the molecular aspects underlying the migration and survival of luteinized granulosa cells (GCs) and the endocrine/paracrine mechanisms by which LH and hCG act on GCs to transform the ruptured follicle into the CL are not well characterized.

A number of studies have established for many cell types that the binding of cell surface integrins to their ligands in the extracellular matrix facilitates cell migration, proliferation, and survival.⁸⁻¹¹ It has been reported that human GCs express the $\alpha_5\beta_1$ integrin and its ligand fibronectin (FN),¹² but it is unknown whether this or other integrin-matrix interactions have important functional consequences for GCs. It has also been demonstrated that GCs produce vascular endothelial growth factor (VEGF)¹³⁻¹⁷ in response to stimulation with hCG. This activity was confirmed by us as well (Table 1). Moreover, VEGF has been reported to increase the expression of integrins in other cell systems.^{18,19} Expression of VEGF and its receptor (Flt-1) has been previously reported in human lutein cells in functioning corpora lutea.²⁰ Recently, mRNA for VEGF and its receptors Flt-1 and KDR/Flk-1 was detected in human corpora lutea during the luteal phase.²¹ We therefore investigated the expression of selected FN-binding integrins on luteinizing GCs, the potential regulation of that expression by luteogenic hormone, and the possible involvement of mitogenic VEGF. In addition, we studied the involvement of these receptors in promoting the adhesion, the migration, and survival of GCs.

Materials and Methods

Reagents, Antibodies, Ligands, and Chemicals

All reagents were of analytical grade and were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), unless otherwise stated. The following monoclonal antibodies (mAbs) were obtained from Chemicon Interna-

tional Inc. (Temecula, CA): blocking mAbs to the integrin $\alpha_5\beta_1$ (JBS5), $\alpha_v\beta_3$ (LM 609), and $\alpha_v\beta_5$ (PIF6) receptors; anti- $\alpha_5\beta_1$ -integrin-activating mAb (HA5); anti-FN; anti-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (P2B1); and anti-human leukocyte antigen-DR. mAb to Flt-1 (VEGF receptor-1 [VEGFR-1]) was obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA). Anti-human VEGF-neutralizing antibody and a second anti-Flt-1 antibody were obtained from R&D Systems Inc. (Minneapolis, MN). Goat anti-serum to mouse whole IgG and nonimmune murine IgG1 were purchased from Cappel Research Products (Durham, NC). Antibodies were used at a concentration of 10 μ g/ml purified IgG. Human laminin-1 was purchased from GIBCO BRL Life Technologies (Grand Island, NY). Purified human FN, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$ proteins were purchased from Chemicon International Inc. Purified Flt-1 peptide antigen was obtained from Santa Cruz Biotechnology.

Cell Culture and Treatments

Human GCs were isolated from 16 patients, aged 25 to 43 years old, undergoing *in vitro* fertilization/embryo transfer. These cells had been exposed *in vivo* to a follicular recruitment regimen including a gonadotropin-releasing hormone agonist (Lupron) for pituitary suppression and purified follicle-stimulating hormone (Fertinex; Serono, Randolph, MA) for follicular stimulation. Moreover, all patients had received a single dose of purified hCG (10,000 IU) 36 hours before follicular aspiration. The present study was approved by the Hospital of University of Pennsylvania, and informed consent was obtained from all patients before tissue collection.

The follicular fluid was collected and centrifuged. The sedimented cells were resuspended in calcium- and magnesium-free Hanks' balanced salt solution (Gibco BRL), overlaid on Ficoll-Paque (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden), and centrifuged at 400 \times g for 30 minutes. The cells were collected from the interphase and cultured in Hams F-12/Dulbecco's modified Eagle's medium [1:1 (v/v); Gibco BRL] media supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin (10 IU/ml), streptomycin (0.05 mg/ml), and Fungizone (0.25 mg/ml), as previously described.²² In every culture dish, 2 \times 10⁵ cells were plated, which were treated with the usual pharmacological dose of VEGF (100 ng/ml) and with urinary derived hCG (1 IU/ml) without and with anti-human VEGF-neutralizing antibody (6 μ g/ml), in serum-free Hams F12/Dulbecco's modified Eagle's medium [1:1 (v/v)] medium with 0.2% bovine serum albumin (BSA) and 10 mmol/L HEPES. The cells were cultured for 48 to 72 hours in media containing hCG to develop an hCG dose response before being treated with antibodies. The ratio of contaminating monocytes, identified by the anti-CD14 mAb (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) was <1.6%. Each experiment was performed on at least three separate occasions with different cell preparations to ensure consistency of the findings.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded human ovarian tissue sections were deparaffinized at 70°C in xylene, rehydrated, and rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4). Sections were treated with 0.1% hydrogen peroxide for 30 minutes at 20°C, washed in PBS, and digested with prewarmed pepsin (0.65 mg/ml in PBS) at 40°C for 5 minutes. They were preincubated with 5% blocking serum (normal goat serum; Vector Laboratories, Burlingame, CA) and then incubated with the primary antibody (10 µg/ml) for 1 hour at room temperature. Localization of the primary antibody was performed by incubation of the sections with a biotinylated anti-mouse IgG antibody, and then biotin was detected using an avidin-biotin-peroxidase kit (Vector Laboratories) with diaminobenzidine as the chromogenic substrate. Negative control sections were processed in an identical manner by substitution of the primary antibody with a purified mouse IgG fraction and preabsorption of the primary antibody with the target antigen to assess the specificity of the primary antibody. Various samples of archival ovarian tissue specimens at various phases of the follicular cycle were selected from patients who had undergone oophorectomy as part of pelvic operations for benign gynecological disease. Dating was based on endometrial tissue specimens from the same patients, according to Noyes criteria.²³

The intensity and distribution patterns of the staining reaction were evaluated by two blinded, independent observers using the semiquantitative immunoreactive score, as previously described.²⁴ The immunoreactive score was calculated by multiplication of optical staining intensity (graded as 0, no; 1, weak; 2, moderate; and 3, strong staining) and the percentage of positive stained cells (0, no staining; 1, <10% of the cells; 2, 11 to 50% of the cells; 3, 51 to 80% of the cells; and 4, >81% of the cells).

Flow Cytometric Analysis of Human Luteinizing GCs

Flow cytometry was performed as described elsewhere.²² The isolated human GCs were washed in 0.1% BSA/PBS, centrifuged, and incubated with the monoclonal anti-FN antibody and the mAbs anti- $\alpha_5\beta_1$ (HA5), anti- $\alpha_v\beta_3$ (LM609), and anti- $\alpha_v\beta_5$ (PIF6); the purified mouse IgG3 (control, 100 µg/ml) for 1 hour at 4°C; or the integrin peptide for 30 minutes in room temperature. The cells were then incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti-mouse IgG, for 30 minutes at 4°C in the dark, rinsed in PBS, and analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Coulter Corporation, Hialeah, FL). The ratio of contaminating monocytes, identified by the anti-CD14 mAb (Becton Dickinson), was <1.6%.

Immunofluorescence

Sterile glass coverslips were coated with extracellular matrix ligands as previously described, with minor modifications.²³ In brief, the coverslips were incubated over-

night with FN (50 µg/ml), vitronectin (20 µg/ml), or laminin (20 µg/ml) in PBS at 4°C and washed with PBS, and the GCs were plated onto them. Cells grown on coverslips were washed twice in prewarmed (37°C) Dulbecco's modified Eagle's medium and twice in prewarmed PBS containing 1.5 mmol/L Ca²⁺ and fixed in 100% methanol (-20°C for 5 minutes). Cells were incubated in 10% normal goat serum (30 minutes at room temperature) and then with the primary antibodies (2 hours at room temperature) at 10 µg/ml in 10% goat serum. A fluorescein-conjugated goat anti-mouse secondary antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA) was used at 1:200 (30 minutes at room temperature). Negative control sections were processed in an identical manner by substitution of the primary antibody with PBS. Coverslips were mounted on glass slides with Fluormount G (Fisher Scientific, Malvern, PA) containing 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Polysciences Inc., Warrington, PA) to stabilize fluorescence and photographed with a Nikon microscope (Tokyo, Japan).

Adhesion Assays

Tissue culture plastic dishes (100 and 60 mm; Corning Co., Corning, NY) or sterile glass coverslips were coated with extracellular matrix ligands as previously described, with minor modifications.²³ In brief, tissue culture plastic dishes or coverslips were incubated with 50 µg/ml FN in PBS or 100 µg/ml poly-L-lysine in PBS for 16 hours at 4°C. Plates were then washed three times with PBS and blocked with 1% heat-denatured BSA/PBS for 1 hour at room temperature. GCs were starved with methionine-free media for 2 hours and subsequently incubated with [³⁵S]methionine-containing media overnight. GCs were subsequently harvested by short exposure to trypsin, washed with serum-free media containing soybean trypsin inhibitor, centrifuged, and resuspended in media containing 1% fetal bovine serum. Cells (5 × 10³) were seeded on the different coated plates and allowed to interact with them for 30 minutes at 37°C. Cells were then washed in PBS and lysed with Tris-HCl media containing 1% sodium dodecyl sulfate. Lysates were then transferred in scintillation vials, and radioactivity was counted. Estimation of adhesion was performed in a similar manner by calculating the amount of radioactivity in each well.

Migration Assays

Time-lapse video microscopy was performed as previously described.²² Human GCs were cultured in serum-free medium. For these studies, slides obtained from Lab-Tek (Micro Video Instruments, Arrow, MA), which were sealed with a mixture of petroleum jelly and paraffin (20:1) to maintain pH of the medium, were coated with FN (10 µg/ml) for 1 hour at 37°C and blocked with 2% BSA for 1 hour at 37°C. The cells were plated on the slides at a density of 0.5 × 10⁵ cells and then placed in a 37°C-humidified Plexiglas microscope culture chamber (Nikon). A field containing several GCs was selected and

observed under phase contrast for 7 hours. Motile activity was studied by measuring the total distance covered by the migrating cells using time-lapse video microscopy. Sequential images were collected at 1-hour intervals. A minimum of 70 cells were studied in three separate experiments for each condition.

Cell Adhesion to Immobilized Anti-Integrin Antibodies

To evaluate the effects of individual integrins, plastic dishes were first coated with 50 $\mu\text{g/ml}$ goat anti-mouse IgG in PBS, at 37°C for 2 hours, rinsed with PBS, blocked with 1% heat-denatured BSA/PBS at 37°C for 1 hour, and then incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal antibodies raised against $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ integrin, or HLA-DR at a concentration of 40 $\mu\text{g/ml}$ in PBS. GCs were harvested with ethylenediamine tetraacetic acid, washed, and resuspended in adhesion buffer (20 mmol/L HEPES, 140 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl_2 , 2 mmol/L MgCl_2 , and 5 mmol/L sodium pyruvate, pH 7.4). Cells were then allowed to attach to antibody-coated dishes at 37°C.

Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling Assay

Apoptosis was detected by *in situ* 3'-end labeling of DNA fragments *in vitro*. DNA fragments were labeled and detected by use of the reagents and procedures provided in the ApopTag *in situ* apoptosis detection kit (Oncor, Gaithersburg, MD). In brief, GCs grown on ligand-coated coverslips in serum-free medium for various time points were fixed in 10% buffered formalin and washed twice in PBS. The cells were then incubated in a humidified chamber at 37°C for 1 hour in the presence of terminal deoxynucleotidyl transferase and digoxigenin-11 dUTP and dATP, washed in buffer, and incubated with anti-digoxigenin-fluorescein antibody for 30 minutes at room temperature. The cells were then washed in buffer and observed under epifluorescence and bright-field optics. The nuclear structures of individual cells were stained with propidium iodide. The number of terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL)-positive nuclei was counted in an average of 12 randomly selected high-power fields ($\times 40$), and the results were expressed as percentage of positive cells. An average of 250 cells was counted for each coverslip. If size and position of positively stained nuclear fragments suggested that they were remnants of a single cell, they were recorded as one cell.

Flow Cytometric Analysis of DNA Content

Detection of apoptosis by flow cytometric analysis of DNA content was performed as previously described.²² Trypsin-generated GC suspensions (including floating cells) or cells from suspension cultures (minimum 10^6) were fixed in 70% ethanol for at least 16 hours, treated

with RNase A (500 $\mu\text{g/ml}$ for 30 minutes at room temperature; Sigma), stained with propidium iodide (PI 20 $\mu\text{g/ml}$), and analyzed using an EPICS XL flow cytometer (Coulter Corporation). Data were analyzed using a Cellfit program (Wistar Institute, Philadelphia, PA). Cells that contained less than 2n DNA content in the cell cycle analysis profile were considered to be apoptotic.

Determination of VEGF Concentration

The concentration of VEGF in the media of cultured GCs was determined by enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical Analysis

In TUNEL assays, statistical comparisons between the different treated groups were performed using Student's *t*-test. In adhesion and migration experiments, the differences among the mean values for different groups were evaluated by one-way analysis of variance followed by Student's *t*-test. In the flow cytometric analysis, the differences of positivity rate and mean fluorescence intensity of integrins $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$ and fibronectin expression on GCs were analyzed by the Mann-Whitney test. Data are expressed as mean \pm SE, and *P* values < 0.05 were considered to be significant.

Results

Expression of FN and Several of Its Integrin Receptors on GCs during the Menstrual Cycle

To determine the expression of FN and three of its integrin receptors, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$, during the CL formation, immunohistochemical staining was performed on ovarian tissue from different phases of luteogenesis (Figure 1). For these studies, well-characterized antibodies were used (see Materials and Methods), and the binding of each was determined to be specifically inhibited by preabsorption with the target antigen. No staining was detected in small preantral follicles, whereas there was a clear association of all these molecules with CL formation. In the CL of the early luteal phase (menstrual cycle day 15 to 18, $n = 14$), FN was detected in the matrix, and $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and, to a much lesser extent, $\alpha_v\beta_5$ were expressed on luteinizing GCs, expression that was reduced or absent in the late luteal phase (days 24 to 28, $n = 12$). These data suggest that CL formation is associated with deposition of FN in the matrix surrounding GCs along with expression of FN binding integrins by these cells.

Expression by GCs of FN and Its Receptors $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$ Integrins in Vitro

To confirm the immunohistochemical data, expression of FN and $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, and $\alpha_v\beta_5$ integrins on freshly isolated luteinizing GCs was assessed by flow cytometry (Figure 2).

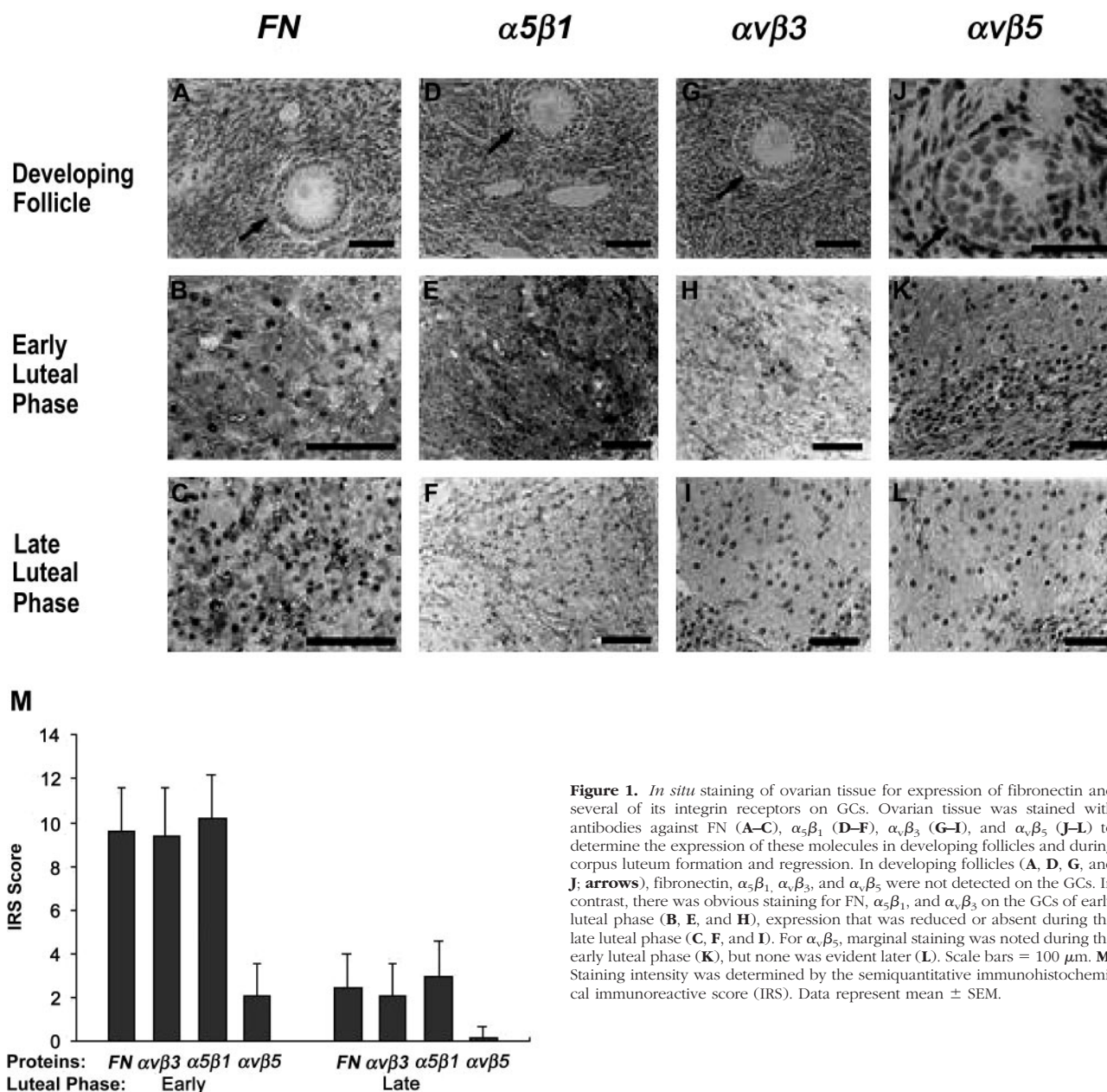


Figure 1. *In situ* staining of ovarian tissue for expression of fibronectin and several of its integrin receptors on GCs. Ovarian tissue was stained with antibodies against FN (A–C), $\alpha_5\beta_1$ (D–F), $\alpha_V\beta_3$ (G–I), and $\alpha_V\beta_5$ (J–L) to determine the expression of these molecules in developing follicles and during corpus luteum formation and regression. In developing follicles (A, D, G, and J; arrows), fibronectin, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_V\beta_5$ were not detected on the GCs. In contrast, there was obvious staining for FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_V\beta_3$ on the GCs of early luteal phase (B, E, and H), expression that was reduced or absent during the late luteal phase (C, F, and I). For $\alpha_V\beta_5$, marginal staining was noted during the early luteal phase (K), but none was evident later (L). Scale bars = 100 μ m. **M:** Staining intensity was determined by the semiquantitative immunohistochemical immunoreactive score (IRS). Data represent mean \pm SEM.

These cells have been previously exposed to high doses of circulating hCG *in vivo* (see Materials and Methods) and display features of luteinized granulosa cells (GCs).¹ There was significant expression of the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$ integrins on freshly isolated GCs (detected on $61 \pm 10\%$ and $38 \pm 5\%$ of cells, respectively; $n = 16$), whereas a much lower percentage of cells ($8.8 \pm 1\%$; $n = 16$) expressed $\alpha_V\beta_5$ integrin. FN was also detected on the surface of GCs (expressed on $52\% \pm 10\%$ of cells; $n = 16$), suggesting that some of the integrin receptors were occupied by FN.

Surface expression of FN and its receptors $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_V\beta_5$ was further assessed by immunofluorescence staining of GCs cultured on various matrix proteins under serum-free conditions (Figure 2). FN was detected on the surface of GCs plated on vitronectin or laminin, but it was localized mainly on the projections of the cells. Because

these cells were cultured in the absence of serum, these data suggest that GCs secrete FN, some of which becomes associated with the cell surface. $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_V\beta_3$ integrins were also expressed on the surface of GCs, whereas a lower percentage of cells expressed $\alpha_V\beta_5$ (a number of cells expressing the protein is shown). As has been previously reported in other cell types,^{25,26} focal adhesion formation was noted with $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$ but not $\alpha_V\beta_5$.

hCG Increases the Surface Expression of FN and Its Receptors $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$ on GCs

We next investigated the effect of hCG on the expression of FN and its integrin receptors on luteinizing GCs by culturing these cells in the absence or presence of hCG

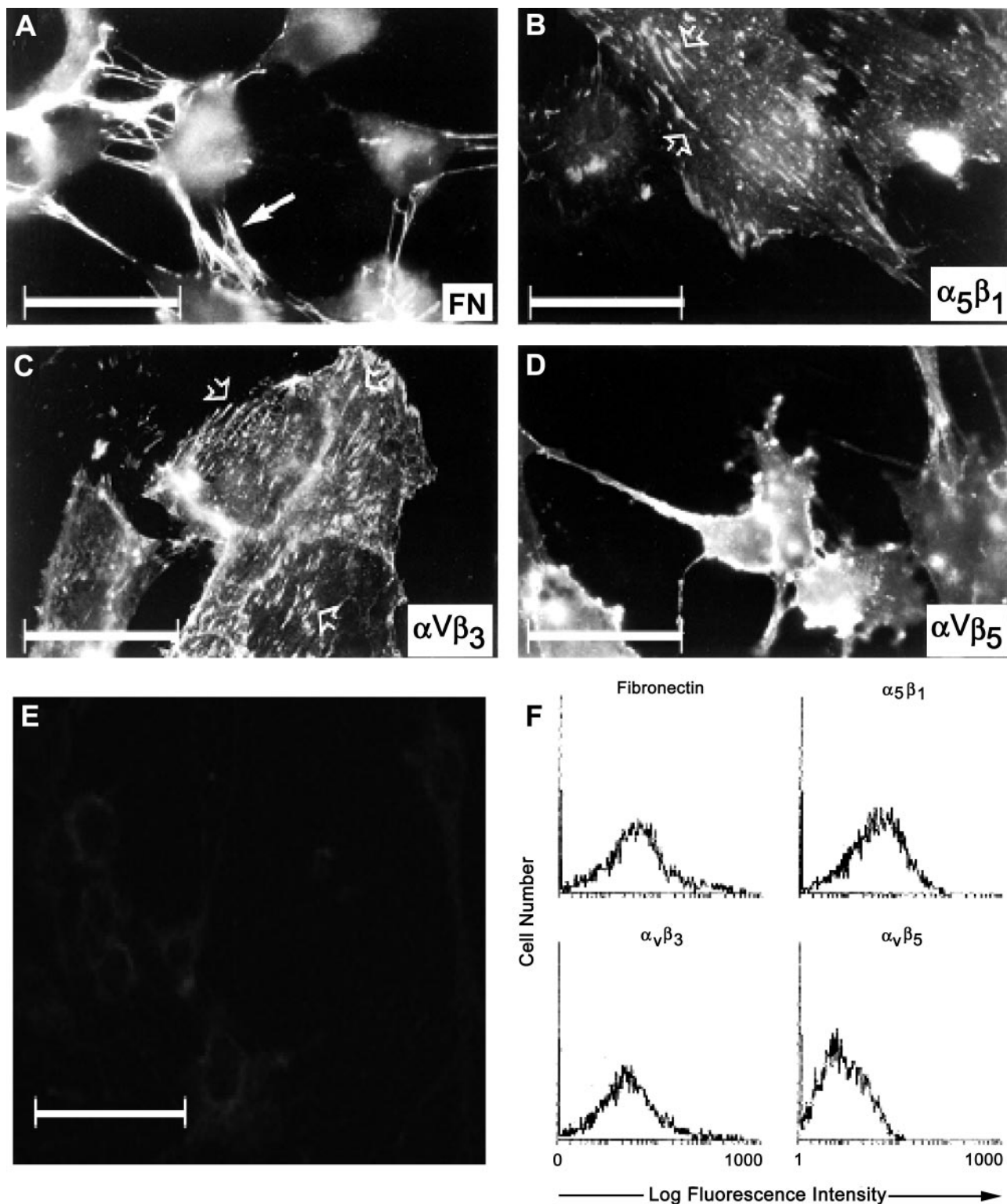


Figure 2. GC surface expression of FN and three fibronectin-binding integrin receptors, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_V\beta_5$. Immunofluorescence staining of GCs cultured on vitronectin (A) or fibronectin (B–E) under serum-free conditions and stained for FN (A), $\alpha_5\beta_1$ (B), $\alpha_V\beta_3$ (C), and $\alpha_V\beta_5$ (D) is shown. E: Negative control is also shown (without the primary antibody). For GCs plated on vitronectin, FN was detected on the surface of these cells on their filopodia (arrows). $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_V\beta_5$ integrins were also expressed on the surface of GCs plated on FN, but only $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$ formed focal adhesions (arrowheads). Scale bars = 20 μ m. F: The surface expression of FN, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_V\beta_3$, and $\alpha_V\beta_5$ on human GCs was also determined by flow cytometry. Filled and unfilled tracings represent, respectively, the background staining and staining for the targeted protein. Fibronectin was also detected on the surface of GCs and along with significant expression of the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_V\beta_3$ integrins. A small percentage cells expressed $\alpha_V\beta_5$. These data are representative of more than 10 independent experiments.

for 48 to 72 hours. As assessed by flow cytometry, levels of surface expression of these proteins in unstimulated cells did not differ significantly from that seen on freshly isolated cells. In contrast, stimulation with hCG led to a significant increase in the number of cells expressing FN compared with untreated controls (88 ± 3.6 versus $52 \pm 2.7\%$ of cells, $P < 0.05$), $\alpha_5\beta_1$ compared with control (90 ± 2.5 versus $60 \pm 1.9\%$, $P < 0.05$), and $\alpha_v\beta_3$ compared with control (78 ± 1.0 versus $38 \pm 3.2\%$, $P < 0.05$) but had no effect on $\alpha_v\beta_5$ expression compared with control (8.8 ± 1.8 versus $8.0 \pm 1.7\%$). In addition, exposure to hCG was followed by an up-regulation of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ as indicated by a two- to fourfold increase in the mean fluorescence intensity.

VEGF Increases the Expression of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ on Cultured GCs

We next investigated the effect of VEGF on the expression of FN and its integrin receptors on GCs by culturing these cells in the absence or presence of VEGF₁₆₅. As determined by flow cytometry, stimulation with VEGF₁₆₅ increased the number of cells expressing FN on the cell surface compared with control (75 ± 2.2 versus $50 \pm 2\%$, $P < 0.05$), $\alpha_5\beta_1$ compared with control (74 ± 3.2 versus $55 \pm 2.4\%$, $P < 0.05$), and $\alpha_v\beta_3$ compared with control (68 ± 2 versus $38 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$) without changes in $\alpha_v\beta_5$ (8.8 ± 1 versus $8.7 \pm 1\%$, $P < 0.05$). In addition, FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ expression was also increased by approximately two- to fourfold as indicated by an increase in the mean fluorescence intensity.

Anti-VEGF Antibody Inhibits the Increase in Expression of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ Induced by hCG

Given our findings that both hCG and VEGF increase the expression of FN and FN-binding integrins on the surface of GCs, we investigated whether the effects of hCG might be mediated by VEGF (Figure 3). GCs stimulated with hCG were therefore cultured in the absence or presence of neutralizing antibody against VEGF. This antibody, which is able to neutralize more than 90% of the VEGF released in response to hCG stimulation (Table 1), almost completely inhibited the hCG-induced up-regulation of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ on GCs (Figure 3). After addition of VEGF antibody (100 ng/ml), the effects of anti-VEGF were inhibited (data not shown). Together these data suggest that hCG increases the expression of these integrin receptors, at least in part, in an autocrine/paracrine manner through the secretion of VEGF from GCs and its subsequent binding to VEGFR on GCs. Supporting this proposal are the previous reports²¹ and our findings that GCs express the VEGF receptor (Fit-1) *in vitro* and *in situ* (data not shown).

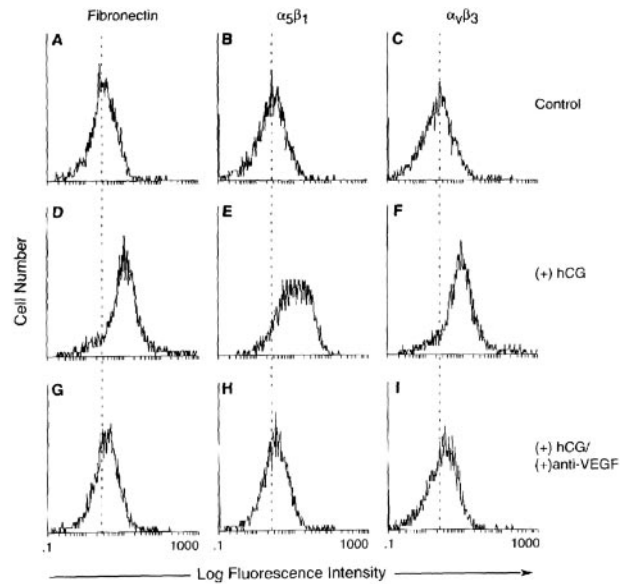


Figure 3. Effect of anti-VEGF antibody on the changes in expression of fibronectin, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ induced by hCG. Flow cytometry was used to assess the expression of fibronectin (A, D, and G), $\alpha_5\beta_1$ (B, E, and H), and $\alpha_v\beta_3$ (C, F, and I) on unstimulated, control GCs (A–C) and GCs stimulated with hCG in the absence (D–F) or presence of antibody against VEGF (G–I). The dotted line indicates the peak fluorescence intensity of the control cells. Using this as a reference, hCG increased the expression of all three proteins ($P < 0.05$, compared with control), an effect that was inhibited by inclusion of anti-VEGF antibody. Control antibody that bound to GCs did not have any effect (data not shown). These data are representative of three independent experiments.

Adhesion of GCs to FN Is Inhibited by Antibody to $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$

To access the functional significance of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ expression on GCs, we studied the adhesion of these cells to plastic surfaces coated with purified FN or with poly-L-lysine (PLL) for an integrin-independent cell adhesion. It was observed that the adhesion of GCs to FN was significantly greater than adhesion to uncoated or PLL-coated surfaces and was inhibited by antibodies against $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ (Figure 4). Antibody against $\alpha_v\beta_5$ was not inhibitory. After stimulation with hCG, there was 1.5- to

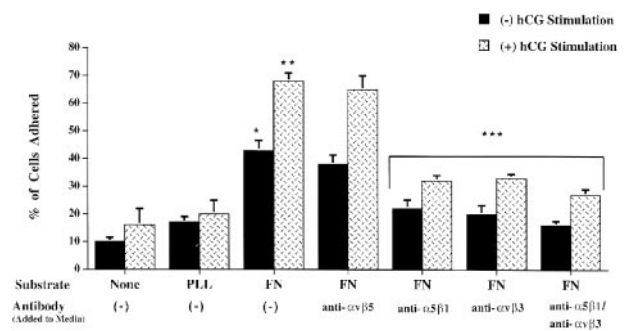


Figure 4. Adhesion of GCs to fibronectin. The adhesion of unstimulated GCs and GCs stimulated with hCG to uncoated plastic surfaces or plastic surfaces coated with PLL or FN was studied. For unstimulated GCs, there was significantly more adhesion to the FN surface than to the uncoated or PLL surfaces ($*P < 0.05$), adhesion that was significantly increased following stimulation with hCG ($**P < 0.05$). The adhesion mediated by both unstimulated and stimulated cells was inhibited by the inclusion in the media of antibody against $\alpha_5\beta_1$ and/or $\alpha_v\beta_3$ ($***P < 0.05$) but not against $\alpha_v\beta_5$.

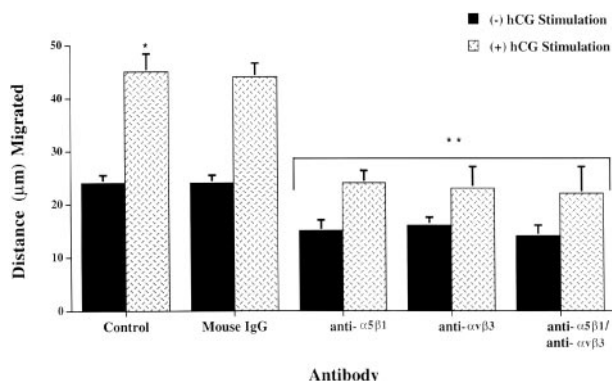


Figure 5. Migration of GCs on fibronectin. The migration of unstimulated GCs and GCs stimulated with hCG on plastic surfaces coated with fibronectin was studied. Stimulation of GCs in the absence of antibody (control) with hCG significantly increased the migratory activity of GCs compared with unstimulated cells (* $P < 0.05$). The movements of both unstimulated and stimulated GCs were inhibited by antibody against $\alpha_5\beta_1$ and/or $\alpha_v\beta_3$ (** $P < 0.05$) but not by mouse IgG.

2.0-fold increase in the adhesion of GCs to FN with a comparable pattern of antibody inhibition.

hCG Stimulates GCs Migration on FN That Is Inhibited by Antibody to $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$

Given the finding that both $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ mediate adhesion of GCs to FN, we investigated whether these integrins were also involved in the migration of GCs on FN, phenomena very much dependent on integrin-matrix adhesion. Time-lapse video microscopy was used to follow the random motile activity of GCs plated on FN. We observed that stimulation with hCG increased the migratory behavior of GCs, consistent with the hCG-induced increase in integrin expression, and that compared with control, antibody against $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ either singly or combined significantly inhibited the migratory activity of these cells (Figure 5).

$\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ Integrin-Dependent Adhesion of GCs Inhibits Apoptosis

Integrin-mediated attachment to matrix has been shown to protect cells against the process of programmed cell death or apoptosis.^{27,28} We therefore investigated the activity of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins in promoting the survival of GCs cultured in the absence of serum, conditions known to induce apoptosis^{22,29} (Figure 6; Table 2). Cell survival was studied either by *in situ* detection of DNA fragmentation using the TUNEL assay or flow cytometric analysis of DNA content. GCs cultured in the absence of a substratum or on PLL underwent significant apoptosis after 24 hours under serum-free conditions (Figure 6). In contrast, GCs grown on FN without serum showed significantly lower rates of apoptosis at 24 hours ($P < 0.05$ versus PLL). Co-incubation with blocking antibodies (included in the media) against $\alpha_5\beta_1$ and/or $\alpha_v\beta_3$ increased apoptosis ($P < 0.05$). Very similar results were obtained by flow cytometric analysis of DNA content (Table 2). In additional experiments, using activated anti- $\alpha_5\beta_1$ and/or

anti- $\alpha_v\beta_3$ antibodies to mimic specific ligand binding, the levels of apoptosis were comparable with that seen by GCs plated on FN. Together these data suggest that *in vivo*, the adhesion of GCs to FN through the $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrins prevents apoptosis and thus may promote their survival (Figure 7).

Discussion

Increasing evidence indicates the contribution of cell-cell adhesion to the maturation and integrity of the human CL.^{22,30} However, the interactions of luteinized granulosa cells with the extracellular matrix during CL formation are not well understood. Therefore, the expression and activity of the matrix protein FN and several of its integrin receptors on human GCs were investigated. *In situ*, FN was detected around GCs, whereas several FN-binding integrins along with the VEGFR, Flt-1, were expressed on the surface of these cells in association with formation of the CL. *In vitro*, GCs released FN, and stimulation of these cells with the luteogenic hormone hCG or VEGF increased the surface expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ and the amount of FN associated with the cell surface. Furthermore, the hCG-induced up-regulation of FN, $\alpha_5\beta_1$, and $\alpha_v\beta_3$ on the surface of GCs was inhibited by anti-VEGF antibody. Lastly, expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ mediated adhesion to FN that promoted the migration and survival of GCs.

A critical prerequisite for the establishment of pregnancy is the formation of the CL remnants of the ruptured follicle after release of the oocyte. Consistent with this are the observations from immunostaining of ovarian tissue that FN, a matrix protein involved in many of the morphological and cytological changes of development and tissue repair,³¹ accumulates within the granulosa cell layer during the early luteal phase (Figure 1). GCs may be a source of some of the FN found in the CL as cultured GCs were found *in vitro* to secrete matrix containing FN (Figure 2).

The best-defined membrane receptor mediators of cellular interactions with the extracellular matrix are the integrins, a family of adhesion molecules.¹⁰ Several integrins, such as $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, have been reported to mediate adhesion to FN.³² In a pattern that temporally mirrored the accumulation of FN, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ were expressed on GCs during the initial stages of CL formation but not during the late luteal phase preceding regression of the organ (Figure 1). Our data extend the observations by Honda et al,¹² who in a more limited study reported a similar pattern of expression for FN and the α_5 subunit during the menstrual cycle. Furthermore, these data suggest that the surge in LH at the time of ovulation results in the accumulation of FN in the matrix with concomitant up-regulated surface expression of FN-binding integrins on GCs. Supporting this suggestion are our *in vitro* data that stimulation of cultured GCs with hCG increases their expression of $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ but not $\alpha_v\beta_5$.

VEGF is a potent migration-stimulating mitogenic factor of endothelial cells *in vitro* and has been convincingly established as one of the principal mediators *in vivo* of

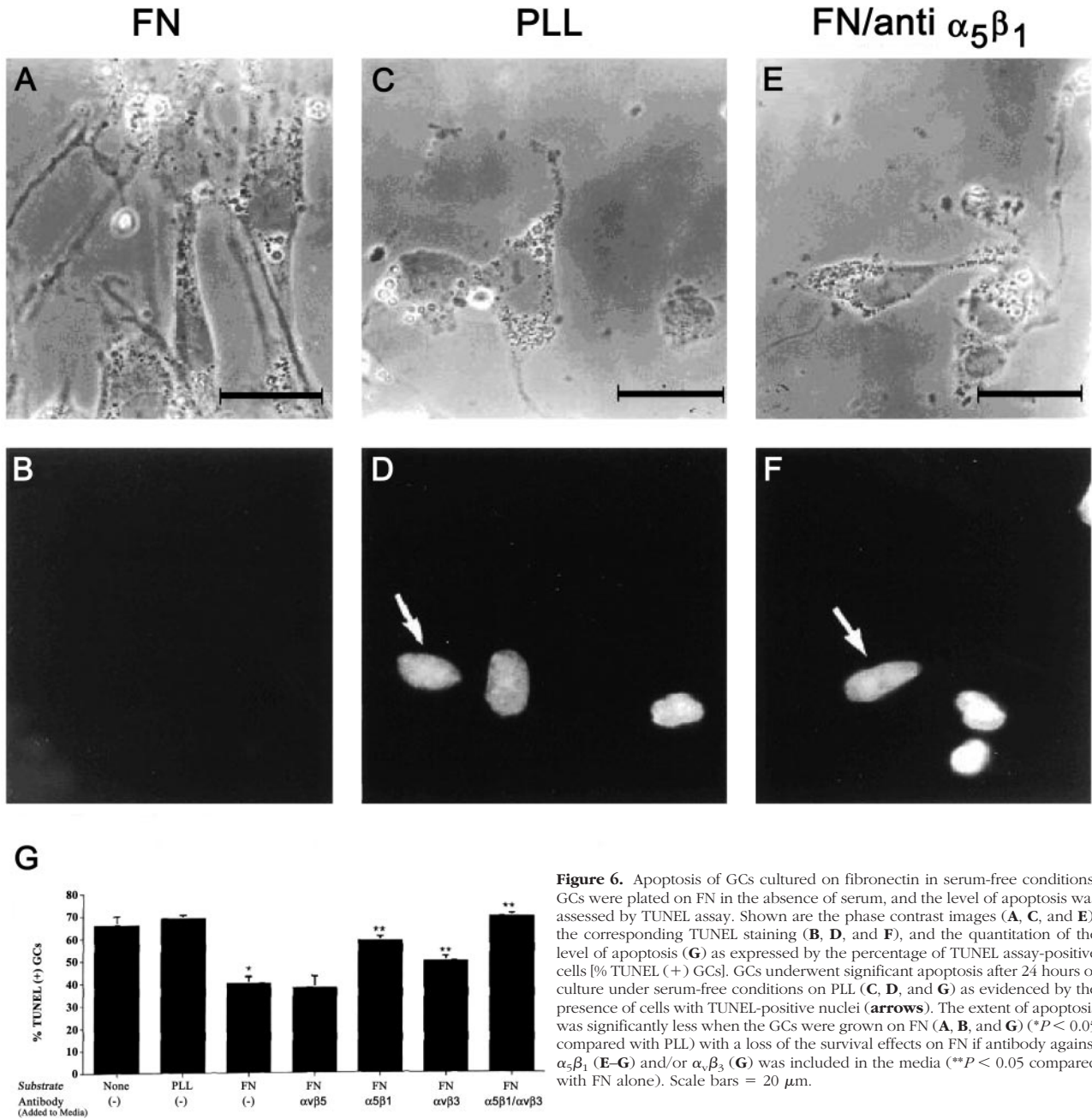


Figure 6. Apoptosis of GCs cultured on fibronectin in serum-free conditions. GCs were plated on FN in the absence of serum, and the level of apoptosis was assessed by TUNEL assay. Shown are the phase contrast images (**A**, **C**, and **E**), the corresponding TUNEL staining (**B**, **D**, and **F**), and the quantitation of the level of apoptosis (**G**) as expressed by the percentage of TUNEL assay-positive cells [% TUNEL (+) GCs]. GCs underwent significant apoptosis after 24 hours of culture under serum-free conditions on PLL (**C**, **D**, and **G**) as evidenced by the presence of cells with TUNEL-positive nuclei (**arrows**). The extent of apoptosis was significantly less when the GCs were grown on FN (**A**, **B**, and **G**) ($*P < 0.05$ compared with PLL) with a loss of the survival effects on FN if antibody against $\alpha_5\beta_1$ (**E–G**) and/or $\alpha_v\beta_3$ (**G**) was included in the media ($**P < 0.05$ compared with FN alone). Scale bars = 20 μm .

vasculogenesis and angiogenesis.^{33,34} Human VEGF may exist in one of five different isoforms of 121, 145, 165, 189, and 206 amino acids, with VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ being the most abundant variants.³⁵ It has been previously reported that suppression of VEGF in the developing follicle is associated with inhibition of follicular angiogenesis and antral follicular development, which results in the inhibition of ovulation.³⁶ Furthermore, recent studies have shown that suppression of VEGF at the early and mid-luteal phase in primates caused no marked morphological change in steroidogenic cells, but the secretion of the main hormonal product of these cells was significantly reduced, and the concentration of follicle-stimulating hormone and LH in the serum was increased.^{37,38}

Our findings that 1) VEGF₁₆₅ or hCG stimulation of GCs triggers the release of FN and increases $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$ integrin surface expression (Figure 2), and 2) anti-VEGF antibody prevented the up-regulation in expression of these molecules after stimulation with hCG (Table 1) suggest that some of the effects of hCG on GCs may be mediated in an autocrine/paracrine manner through hCG-induced release of VEGF and its subsequent binding to the Flt-1 receptor on GCs, whereas the integrity and morphology of these cells are normally maintained. Supporting this proposal are the previous reports that hCG regulates expression of VEGF in GCs^{13–17} and that Flt-1 is expressed in granulosa lutein cells and endothelial cells in human corpora lutea.²¹ We also confirmed GC

Table 2. Apoptosis of GCs Cultured on Fibronectin in Serum-Free Conditions Assessed by Flow Cytometric Analysis of DNA Content

Substrate	Antibody (added to media)	% Cells in sub-G ₀
(-)	(-)	70 ± 1
PLL	(-)	74 ± 5
FN	(-)	40 ± 3*
FN	α _v β ₅	41 ± 2
FN	α ₅ β ₁	60 ± 1 [†]
FN	α _v β ₃	51 ± 1 [†]
FN	α ₅ β ₁ /α _v β ₃	68 ± 2 [†]

GCs were plated on FN in the absence of serum, and the level of apoptosis was assessed by flow cytometric analysis of DNA content. The number of cells in sub-G₀ phase represents an index of the number of apoptotic cells. The extent of apoptosis was significantly less when the GCs were grown on FN (**P* < 0.05 compared with PLL) with a loss of the survival effects of FN when antibodies against α₅β₁ and/or α_vβ₃ were included in the media ([†]*P* < 0.05 compared with FN alone).

surface expression of Flt-1 receptor using *in situ* staining of ovarian tissue (data not shown). We would note that our data do not exclude the possibility that some of the effects of hCG on FN secretion and integrin expression may occur independently of VEGF and/or that VEGF derived from other cell types may modulate the behavior of GCs.

The induced expression of α₅β₁ and α_vβ₃ on GCs is functionally significant. *In vitro*, the adhesion of luteinized GCs to FN was mediated by α₅β₁ and α_vβ₃, with the GCs having the capacity to use either integrin to adhere to a FN substrate (Figure 4). Even by using both antibodies anti-α₅β₁ and anti-α_vβ₃, the inhibition of the adhesion to FN was not complete (Figure 4). Therefore, it is suggested that part of the effects of hCG on GC adhesion to FN is mediated through other factors that need to be further investigated. These observations are consistent with the many previous reports that have established the importance of integrins in cell matrix adhesion.^{39,40} For a

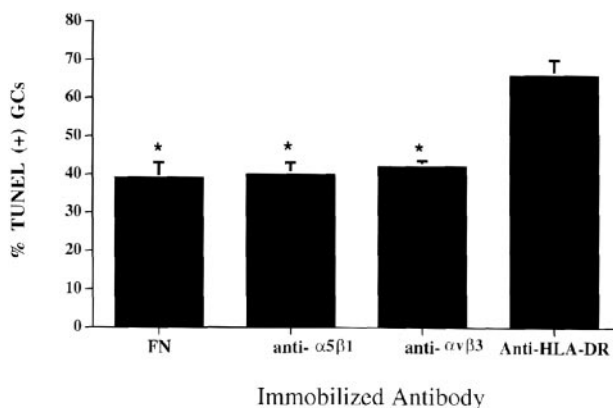


Figure 7. Apoptosis of the GCs cultured on immobilized anti-integrin antibody in serum-free conditions. GCs were plated on plastic surfaces bearing activated anti-α₅β₁ or -α_vβ₃ antibodies in the absence of serum, and the level of apoptosis was assessed by determining the level of apoptosis as expressed by the percentage of TUNEL assay-positive cells [% TUNEL (+) GCs]. Under these conditions, the level of apoptosis after attachment to α₅β₁ and α_vβ₃ antibodies was comparable with that observed after attachment to FN and was significantly different from that seen with control antibody to HLA-DR (**P* < 0.05 compared with anti-HLA-DR).

variety of cell types, this integrin-mediated adhesion and the subsequent intracellular signaling cascades that are triggered are intimately involved with cell processes such as locomotion, division, and survival.

Cell motility involves a continuous cyclical process^{9,41} that begins with the cell, at its leading edge, extending membrane processes, lamellipodia (broad, flat protrusions) or filopodia (thin needle-like projections), with subsequent attachment to the substratum through integrin receptors. Dissolution of cell-matrix contacts at the rear of the cell with subsequent detachment completes the process. Integrin-dependent cell-matrix adhesive interactions thus play a central role in cell migration as they couple interactions with the substratum to cytoskeletal elements within the cell.^{40,42} Our observation that FN concentrates along filopodia of GCs (Figure 2) and our finding that the motility of GCs on FN is inhibited by antibodies against α₅β₁ and α_vβ₃ (Figure 5) suggest that in the context of an FN-rich matrix, GCs *in vivo* are able to use these integrins to form adhesive contacts that promote cell movement. However, the migrating activity of GCs on FN was not completely inhibited by anti-α₅β₁ and anti-α_vβ₃ antibodies (Figure 5); thus it is assumed that, at least in part, the effects of hCG on GCs movements may occur independently of integrins, presumably through different adhesion molecules that are expressed on the surface of these cells. These suggestions are consistent with the recent study, which provides evidence that α₅ integrin regulates trophoblast migration through binding with FN of the extracellular matrix.⁴³

In addition to its role in cell migration, it has long been recognized that integrin-mediated matrix attachment is also critically important for their survival.^{11,44} This has been demonstrated in studies that have shown that epithelial or endothelial cells undergo apoptosis when detached from substrate.^{27,28} Apoptosis after loss of cell anchorage (anoikis) is related to development and tissue homeostasis. Integrins enhance cell preservation through their interaction with the extracellular matrix.⁴⁵ The exact mechanisms mediating integrin-induced inhibition of apoptosis are largely unknown. Indirect evidence, however, suggests the existence of postreceptor pathways activated after integrin occupancy that up-regulate survival factors (eg, Bcl-2)^{28,46} and/or inhibit apoptosis-promoting molecules (eg, Bax or interleukin-1β converting enzyme).⁴⁷

The CL is a very short-lived endocrine organ. In the absence of an implanted embryo releasing hCG, the CL undergoes rapid regression. There is compelling evidence that this process is mediated by apoptosis of the luteal cells.^{22,29,48,49} Prevention of GCs and thecal cell apoptosis is thus highly likely to be fundamental to the preservation of the corpus luteum and the establishment of a viable pregnancy. In this report, we show that engagement of α₅β₁ and α_vβ₃ integrins through luteinized granulosa cell binding to FN or activated anti-integrin antibody, which mimic specific ligand binding, inhibits apoptosis induced by serum starvation (Figures 6 and 7). *In vitro*, hCG prevents apoptosis of cultured rat preovulatory follicles⁵⁰ and rabbit CL.⁵¹ Thus *in vivo*, after blastocyst implantation, trophoblast-derived hCG may enhance

integrin-dependent interactions between FN and GCs that maintain the corpus luteum during early gestation.⁵²

In conclusion the following model is proposed. The binding of luteogenic hormone (LH or hCG) to GCs triggers their release of VEGF and induces the surface expression of VEGFR on these cells. The released VEGF (and possibly VEGF from other sources) in turn binds to the newly expressed VEGFR on the GCs, stimulating the secretion of FN into the surrounding matrix and up-regulating the surface expression of at least two FN-binding integrins, $\alpha_5\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$. Subsequent interactions between FN and these integrins trigger adhesive events and intracellular signaling cascades involved in promoting the migration and survival of GCs, activities that contribute ultimately to the formation and/or persistence of the corpus luteum.

References

1. Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Reynolds LP: Cellular interactions in the corpus luteum. *Seminars Reprod Endocrinol* 1997, 15:383–393
2. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Montas S, Coutifaris C: Progesterone is an autocrine/paracrine regulator of human granulosa cell survival in vitro. *Ann NY Acad Sci* 2000, 900:16–25
3. Rolaki A, Drakakis P, Millingos S, Loutradis D, Makrigiannakis A: Novel trends in follicular development, atresia and corpus luteum regression: a role for apoptosis. *Reprod Biomed Online* 2005, 11:93–103
4. Neill JD, Johansson ED, Knobil E: Patterns of circulating progesterone concentrations during the fertile menstrual cycle and the remainder of gestation in the rhesus monkey. *Endocrinology* 1969, 84:45–48
5. Funaro A, Sapino A, Ferranti B, Horenstein AL, Castellano I, Bagni B, Garotta G, Malavasi F: Functional, structural and distribution analysis of the chorionic gonadotropin receptor using murine monoclonal antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88:5537–5546
6. Makrigiannakis A, Amin K, Coukos G, Tilly LJ, Coutifaris C: Regulated expression and potential roles of p53 and Wilms' tumor suppressor gene (WT1) during follicular development in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:449–459
7. Walz A, Keck C, Weber H, Kissel C, Pietrowski D: Effects of luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin on corpus luteum cells in a spheroid cell culture system. *Mol Reprod Dev* 2005, 72:98–104
8. Ruoslahti E, Reed JC: Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 1994, 77:477–478
9. Huttenlocher A, Sandborg RR, Horwitz AF: Adhesion in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7:697–706
10. Clark EA, Brugge JS: Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995, 268:233–239
11. Frisch SM, Ruoslahti E: Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9:701–706
12. Honda T, Fujiwara H, Yamada S, Fujita K, Nakamura K, Nakayama T, Higuchi T, Ueda M, Maeda M, Mori T: Integrin α_5 is expressed on human luteinizing granulosa cells during corpus luteum formation, and its expression is enhanced by human chorionic gonadotropin in vitro. *Mol Hum Reprod* 1997, 3:979–984
13. Neulen J, Yan Z, Raczek S, Weidel K, Keck C, Weich HA, Marme D, Breckwoldt M: Human chorionic gonadotropin-dependent expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in human granulosa cells: importance in ovarian hyperstimulation syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1995, 6:1967–1971
14. Lee A, Christenson LK, Patton PE, Burry KA, Stouffer RL: Vascular endothelial growth factor production by human luteinized granulosa cells in vitro. *Hum Reprod* 1997, 12:2756–2761
15. Artini RG, Fasciani A, Monti M, Luisi S, D'Ambrogio G, Genazzani AR: Changes in vascular endothelial growth factor levels and the risk of ovarian hyperstimulation syndrome in women enrolled in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 1998, 70:560–564
16. Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH: Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998, 4:336–340
17. Pietrowski D, Keck C: Differential regulation of ANG2 and VEGF-A in human granulosa lutein cells by choriogonadotropin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2004, 112:208–214
18. Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiun AP, Detmar M: Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997, 94:13612–13617
19. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y: Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998, 39:1028–1035
20. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R: The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84:3845–3851
21. Endo T, Kitajima Y, Nishikawa A, Manase K, Shibuya M, Kudo R: Cyclic changes in expression of mRNA of vascular endothelial growth factor, its receptor flt-1 and KDR/flk-1 and Ets-1 in human corpora lutea. *Fertil Steril* 2001, 76:762–768
22. Makrigiannakis A, Coukos G, Christofidou-Solomidou M, Gour BJ, Radice GL, Blaschuk O, Coutifaris C: N-Cadherin-mediated human granulosa cell adhesion prevents apoptosis: a role in follicular development and luteolysis. *Am J Pathol* 1999, 154:1391–1406
23. Noyes RW, Hertig AT, Rock J: Dating endometrial biopsy. *Am J Obstet Gynecol* 1975, 122:262–236
24. Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, Heicke B, Scheidt E: Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986, 409:127–147
25. Scott G, Liang H: pp125FAK in human melanocytes and melanoma: expression and phosphorylation. *Exp Cell Res* 1995, 219:197–203
26. Wayner EA, Orlando RA, Cheresch DA: Integrins $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ contribute to cell attachment to vitronectin but differentially distribute on the cell surface. *J Cell Biol* 1991, 113:919–929
27. Meredith JE, Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993, 4:953–961
28. Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 1994, 124:619–626
29. Breckwoldt M, Selvaraj N, Aharoni D, Barash A, Segal I, Insler V, Amsterdam A: Expression of Ad4-BP/cytochrome 450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long term cultures of human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1996, 2:391–400
30. Makrigiannakis A, Coukos G, Blaschuk O, Coutifaris C: Follicular atresia and luteolysis: evidence of a role for N-cadherin. *Ann NY Acad Sci* 2000, 900:46–55
31. Pankov R, Yamada KM: Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 2002, 115:3861–3863
32. Aota S, Yamada KM: Fibronectin and cell adhesion: specificity of integrin-ligand interaction. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1995, 70:1–21
33. Nicosia RF: What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis? *Am J Pathol* 1998, 153:11–17
34. Tamanini C, De Ambrogi M: Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Domest Anim* 2004, 39:206–216
35. Stouffer RL, Martinez-Chequer JC, Molskness TA, Xu F, Hazzard TM: Regulation and action of angiogenic factors in the primate ovary. *Arch Med Res* 2001, 32:567–575
36. Wulff C, Wilson H, Wiegand SJ, Rudge JS, Fraser HM: Prevention of thecal angiogenesis, antral follicular growth, and ovulation in the primate by treatment with vascular endothelial growth factor Trap R1R2. *Endocrinology* 2002, 143:2797–2807
37. Fraser HM, Wilson H, Morris KD, Swanston I, Wiegand SJ: Vascular endothelial growth factor trap suppresses ovarian function at all stages of the luteal phase in the macaque. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90:5811–5818
38. Fraser HM, Dickson SE, Lunn SF, Wulff C, Morris KD, Carroll V, Bicknell R: Suppression of luteal angiogenesis in the primate after neutralization of vascular endothelial growth factor. *Endocrinology* 2000, 141:995–1000

39. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992, 69:11–25
40. Wehrle-Haller B, Imhof BA: Integrin-dependent pathologies. *J Pathol* 2003, 200:481–487
41. Lauffenburger DA, Horwitz AF: Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996, 84:359–369
42. Sheetz MP, Felsenfeld DP, Galbraith CG: Cell adhesion: regulation of force on extracellular matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol* 1998, 8:51–54
43. Coutifaris C, Omigbodun A, Coukos G: The fibronectin receptor α_5 integrin subunit is upregulated by cell-cell adhesion via a cyclic AMP-dependent mechanism: implications for human trophoblast migration. *Am J Obstet Gynecol* 2005, 192:1240–1255
44. Stupack DG, Cheresh DA: Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002, 115:3729–3738
45. Zhan M, Zhao H, Han ZC: Signaling mechanisms of anoikis. *Histol Histopathol* 2004, 19:973–983
46. Zhang Z, Vuori K, Reed JC, Ruoslahti E: The $\alpha_5\beta_1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, 92:6161–6165
47. Kugu K, Ratts V, Piquette G, Tilly K, Tao XJ, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL: Analysis of apoptosis and expression of Bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. *Cell Death Differ* 1998, 5:67–76
48. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H: Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000, 85:4379–4386
49. Vaskivuo TE, Ottander U, Oduwole O, Isomaa V, Vihko P, Olofsson JI, Tapanainen JS: Role of apoptosis, apoptosis-related factors and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases in human corpus luteum regression. *Mol Cell Endocrinol* 2002, 30:191–200
50. Chun SY, Billig H, Tilly J, Furuta I, Tsafriri A, Hsueh AJ: Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 1994, 135:1845–1853
51. Dharmarajan AM, Hisheh S, Singh B, Parkinson S, Tilly KI, Tilly JL: Antioxidants mimic the ability of chorionic gonadotropin to suppress apoptosis in the rabbit corpus luteum in vitro: a novel role for superoxide dismutase in regulating bax expression. *Endocrinology* 1999, 140:2555–2561
52. Yuan W, Giudice LC: Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82:3148–3155