

Ολυμπία Γιαννακοπούλου

Μελέτη των προτύπων έκφρασης του πλακουντιακού mTOR σε πλακούντες γυναικών με διαβήτη κύησης.

Περίληψη

Σκοποί

Η πρωτεΐνη mTOR είναι μια κινάση σερίνης που παίζει κυρίαρχο ρόλο ως κεντρικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης, του πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης αλληλεπιδρώντας με ποικίλες πρωτεΐνες, διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης καθώς και στην εμφάνιση και την εξέλιξη παθολογικών καταστάσεων, όπως διαβήτη και καρκίνο. Μέχρι σήμερα λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει το mTOR στον πλακούντα. Στον πλακούντα, η πρωτεΐνη mTOR λειτουργεί ως αισθητήρας και μεταφορέας θρεπτικών συστατικών στο έμβρυο. Ο ανθρώπινος πλακούντας στο διαβήτη κύησης παρουσιάζει πολλές αλλοιώσεις, όπως ανωριμότητα λαχνών, οίδημα λαχνών, πάχυνση της βασικής μεμβράνης, μειωμένη λειτουργικότητα του πλακούντα και υπερανάπτυξη του πλακούντα. Η φυσιολογική ανάπτυξη και επιβίωση του εμβρύου στηρίζεται στη σωστή ανάπτυξη και λειτουργικότητα του πλακούντα. Μελέτες σε ζωϊκά μοντέλα έχουν αναδείξει ότι η πλακουντιακή mTOR υπερεκφράζεται σε κύσεις γυναικών με διαβήτη κύησης. Σκοπός της εργασίας ήταν να διερευνήσουμε την έκφραση του mTOR και του p-mTOR και ο κυτταρικός εντοπισμός τους σε πλακούντες γυναικών με ΔΚ και χωρίς ΔΚ καθώς και η μελέτη επίδρασης του ΔΚ στην ενεργοποίηση της πλακουντιακής mTOR.

Υλικά και μέθοδοι

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν έγκυες γυναίκες που εμφάνισαν ΔΚ (n=40) και τα νεογνά τους και έγκυες γυναίκες χωρίς ΔΚ (n=33) και τα νεογνά τους. Χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές της ανοσοϊστοχημείας και του Western Blot με αντισώματα έναντι του mTOR και του p-mTOR σε φυσιολογικούς και διαβητικούς πλακούντες. Η γλυκόζη των εμβρύων προσδιορίστηκε σε δείγμα ορού από ομφαλοπλακουντιακό αίμα και τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά των νεογνών καταγράφηκαν στη γέννηση. Ως θετικός μάρτυρας για την έκφραση 100% του mTOR και PmTOR χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από καρκίνο μαστού. Στις ποσοτικές συγκρίσεις μεταξύ των 2 ομάδων χρησιμοποιήθηκε το h-score το οποίο περιλαμβάνει το ποσοστό των χρωνόμενων κυττάρων που εκφράζουν την πρωτεΐνη πολλαπλασιασμένο επί την ένταση της χρώσης. Η κυτταροπλασματική ένταση έκφρασης mTOR και του p-mTOR κυμαινόταν από μειωμένη έως υψηλή. Μόνο κύτταρα με μέτρια και έντονη χρώση θεωρήθηκαν θετικά. Το μέγιστο ποσοστό κυτταροπλασματικής έκφρασης αξιολογήθηκε σε hot spot περιοχές εκτιμώντας το λιγότερο 100-200 κύτταρα.

Αποτελέσματα

Η ανοσοϊστοχημική ανάλυση έδειξε ότι και οι δύο μορφές του mTOR, ολικό και φωσφορυλιωμένο (PmTOR), εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό στους τροφοβλάστες και σε μικρότερο στις συγκυτιοτροφοβλάστες στον πλακούντα των γυναικών και των δυο ομάδων. Παρατηρήθηκε έκφραση mTOR και του p-mTOR σε πλακούντες με ΔΚ και σε πλακούντες χωρίς ΔΚ σε όλα τους τους τύπους κυττάρων (τροφοβλάστες, στρωματικά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και συγκυτιοτροφοβλάστες). Μεγαλύτερη έκφραση (H-score) mTOR προσδιορίστηκε στους πλακούντες των γυναικών με διαβήτη κύησης σε σύγκριση με τις γυναίκες χωρίς διαβήτη κύησης (P<0.009) και η ανάλυση με Western Blot έδειξε μεγαλύτερη έκφραση της ενεργοποιημένης μορφής p-mTOR (p=0.047) στην ομάδα με ΔΚ. Επιπλέον, η

έκφραση του mTOR στην ομάδα με διαβήτη κύησης ήταν αυξημένη στις συγκυτιοτροφοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα σε σχέση με τους αντίστοιχους τύπους κυττάρων στην ομάδα χωρίς διαβήτη κύησης ($p < 0.001$), ενώ η έκφραση του φωσφορυλιωμένου-mTOR ήταν μειωμένη στα κύτταρα του στρώματος στο διαβήτη κύησης ($p = 0.004$). Καμία διαφορά δεν εντοπίστηκε στους τροφοβλάστες ή τα ενδοθηλιακά κύτταρα μεταξύ των δυο ομάδων γυναικών που μελετήθηκαν, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενεργοποίηση αυτής της κινάσης ρυθμίζεται από πολύ συγκεκριμένους παράγοντες, ενώ είναι ανεξάρτητη από αλλαγές στα συνολικά επίπεδα κινασών. Η αύξηση των επιπέδων mTOR οδήγησε σε ελαττωμένο λόγο PmTOR/mTOR στις συγκυτιοτροφοβλάστες της ομάδας με διαβήτη κύησης σε σχέση με την ομάδα χωρίς διαβήτη κύησης ($p < 0.001$). Παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη ήταν πειραματική προτείνεται η συνέχιση της έρευνας με τη πειραματική μελέτη περισσότερων πλακουντιακών μορίων για να αποσαφηνιστεί πλήρως η σημασία του μονοπατιού mTOR και ο ρόλος του στο διαβήτη κύησης.

Συμπέρασμα

Η έκφραση mTOR/PmTOR στον πλακούντα ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο στους διάφορους κυτταρικούς τύπους και επηρεάζεται από την υπεργλυκαιμία του διαβήτη κύησης.

ABSTRACT

Profiling of activation patterns of placental mTOR in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus.

Background and aim

The mammalian target of rapamycin mTOR is a serine kinase that serves as a central regulator of cell growth, proliferation, and survival by interacting with various proteins and is critically involved in the onset and progression of diabetes, cancer and ageing. To date, few studies implicated mTOR in placenta. Placental mTOR is involved in nutrient sensing and transfer to the fetus. Human placenta in gestational diabetes mellitus (GDM) shows several alterations including villous immaturity, villous idema, thickening of the basement membrane, impaired placental function, and overgrowth. Normal fetal growth and survival depends on proper development and function of the placenta. Animal models suggests that placental mTOR is upregulated in pregnancies complicated by GDM. Our aim was to characterize the expression and cellular localization of mTOR and phospho-mTOR (p-mTOR) in GDM and non GDM placenta and whether the activated fraction is affected by GDM.

Materials and methods

Our study consisted of GDM-mothers ($n=40$) and their infants and mothers ($n=33$) with normal pregnancies (non GDM) and their infants. Immunohistochemistry (IHC) and Western Blot (WB) were performed with antibodies against mTOR and p-mTOR (Ser 2448) in normal and diabetic placentas. At delivery, fetal glucose was measured in cord blood and newborn anthropometric characteristics were also determined. As a positive marker to the 100% expression breast carcinoma samples were used. Quantitive comparisons between groups of samples was based on Histo-score (H-score, which was the percentage of stained cells (labelling index) multiplied by staining intensity. Cytoplasmic p-mTOR and mTOR staining intensity ranged from low to high. Only moderately and strongly stained cells were considered as positive. The maximum percentage of cytoplasmic expression was evaluated in hot spot areas by estimating at least 100-200 cells.

Results

Immunohistochemical analysis IHC showed that both **total and activated mTOR were predominantly expressed in trophoblasts and to a lesser extent in syncytiotrophoblasts** in both GDM and non-GDM placentas. mTOR and p-mTOR were expressed in GDM and non-GDM placentas in all cell types (trophoblasts, stromal cells, endothelial cells and syncytiotrophoblasts). GDM placentas exhibited a higher mTOR H-score compared to non-GDM ($p < 0.009$) placentas, and WB analysis showed a higher p-mTOR signal intensity ($p = 0.047$) in the same group. **mTOR expression was increased in both GDM syncytiotrophoblasts and endothelial cells compared to non-GDM ($p < 0.001$), whereas a reduced signal was detected in stromal p-mTOR ($p = 0.004$)**. No difference was found in trophoblasts or endothelial cells between the two study groups suggesting that activation of this kinase is tightly regulated and is relatively independent of changes in total kinase levels. The upregulation of the total mTOR levels led to a decreased p-mTOR/total mTOR ratio in GDM syncytiotrophoblasts compared to non-GDM ($p < 0.001$). Although, this was an experimental study it is proposed to continue the research with more molecules in order to fully clarify the mTOR pathway and its role in GDM.

Conclusion

Placental mTOR and p-mTOR expression is differentially regulated across different placental cell types and is sensitive to hyperglycaemia associated with gestational diabetes mellitus.