

# Fetal Membranlarda Fibronektin ve İzofomlarının Dağılımı: Biyokimyasal bir analiz

## THE DISTRIBUTION OF FIBRONECTIN AND ITS IZOFORMS IN FETAL MEMBRANES: A BIOCHEMICAL ANALYSIS

Ayşe Yasemin DEMİR\*

\*Dr., Maastricht Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü, Maastricht, HOLLANDA

### Özet

Maternal dokuların invazyonu esnasında fetal trofoblast hücreleri tümör matrislerine benzeyen bir matris (matris-tip fibrinoid) salgılar. Bu matriste bulunan fibronektin izofomlarının (Fni) trofoblast invazyonu esnasında önemli roller oynadıkları düşünülmektedir. Ayrıca yine bu matriste yer alan ve "i" kan grubu antijenini taşıyan fibronektin benzeri küçük moleküllerin, annenin immün cevabını baskıladıkları yönünde spekülasyonlar vardır. Bu çalışmanın amacı maternal ve fetal dokular tarafından plasentasyon esnasında üretilen diğer matrisler ile trofoblast matrisi arasındaki farklılıkların ortaya konmasıdır. Özellikle ekstrasellüler matrislerde Fni dağılımlarına odaklanıldı. Ayrıca "i" kan grubu antijenini taşıyan küçük fibronektin benzeri moleküllerin matris-tip fibrinoidinden izolasyonu ve karakterizasyonu hedeflendi. İnsan term plasentasının farklı bölgelerinden örnek dokular alındı ve biyokimyasal yöntemler kullanılarak, Fni (genel, hücresel ve onkofetal) belirlendi. Ayrıca bu dokulardaki matris elemanları çok basamaklı bir protokol ile ekstrakte edildi. Fni varlığı SDS-PAGE ve Western blot yöntemleri ile gösterildi. Elde edilen sinyaller dansitometrik ölçümler olarak taranmış ve değerlendirildi. Fetal membranlardan hazırlanan ekstraktlarda ufak fibronektin benzeri olan "i" kan prekürsör antijenini taşıyan proteinler jelatin-agaroz kolon kromatografisi ve afinite kromatografileri ile ayrıştırılmaya çalışıldı. Hemen hemen çalışılan tüm örnek dokularda farklı Fni ait reaktivite ve aktiviteler saptandı. Bu moleküller değişen oranlarda ve beraber ekstrakte edilebilmişlerdir. Hücresel ve onkofetal fibronektinler için en güçlü reaksiyonlar özellikle trofoblastların, maternal dokuları invaze ettikleri bölgelerde bulundu. "i" kan grubu antijenini taşıyan küçük fibronektin benzeri moleküllerin biyokimyasal izolasyonu ve purifikasyonunda kullanılan yöntemlerle elde edilen verilerin anlamlılıkları spesifikite açısından literatür bilgileriyle kıyaslanarak tartışıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Fibronektin, Plasenta, Trofoblast, İnvazyon, Ekstrasellüler matris

T Klin Tıp Bilimleri 2002, 22:449-460

### Summary

During the invasion process, trophoblast cells secrete a tumor-like matrix (matrix-type fibrinoid). Fibronectin isoforms (Fni) seem to play an important role during trophoblast invasion. Besides, there are speculations that small fibronectin like molecules carrying antigenic epitope of "i" blood precursor suppress the immune system of the mother. The aim of the present study was to analyze the differences between the other types of matrices produced by maternal and fetal tissues and the tumor-like matrix produced by trophoblast. The main concern was focused on the distribution of Fni in the extracellular matrices. On the other hand, it was also aimed to isolate and characterize small fibronectin like molecules carrying antigenic epitope of "i" blood precursor. Tissue samples were collected from different sites of human term placenta by using immunohistochemistry the expression of Fni (general, cellular and oncofetal) were determined. Besides, matrix components of these tissues were extracted with a multi-step extraction protocol. The presence of Fni were demonstrated by SDS-PAGE and Western blots. The signals from immunoreactivities and enzymatic activities were detected by scanalytics system. The extractions from fetal membranes were applied on gelatine agarose and affinity columns to isolate and purify the small fibronectin like molecules carrying antigenic epitope of "i" blood precursor. In nearly all tissues reactivities and activities for Fni were determined. These molecules were co-extracted from all tissues in variable degrees. Strongest reactivities for cellular and oncofetal fibronectin was found, in particular, in areas, where invasive fetal trophoblast cells invade maternal tissues. The results obtained during the isolation and purification of small fibronectin like molecules carrying antigenic epitope of "i" blood precursor were discussed regarding to their specificity and their relevance reported in the literature.

**Key Words:** Placenta, Extravillous trophoblast, Invasion, Extracellular matrix, Fibronectin

T Klin J Med Sci 2002, 22:449-460

### Fetal Membranların Genel Yapısı

Gebeliğin gerçekleşmesiyle başlayan plasentasyon, embriyonun devamı ve sağlığı için gerekli olan plasental yapının tam ve sağlıklı olarak gelişmesi için gereklidir. İnsan plasentanın gelişimi, diğer bir tanımlamayla; blastosistin endometriyum epiteline tutunması, stabil

kontaktlar kurarak endometriyumda gelişimine devam etmesi ile başlar (1). Gelişme sürecinde fetal membranlar, plasental villus ağacını saran disk benzeri membranöz bir kese oluşturur. Bu kesenin kalınlaşması ile termdeki plasentanın diskoidal, villöz ve hemokoriyal yapıları oluşur (1,2).

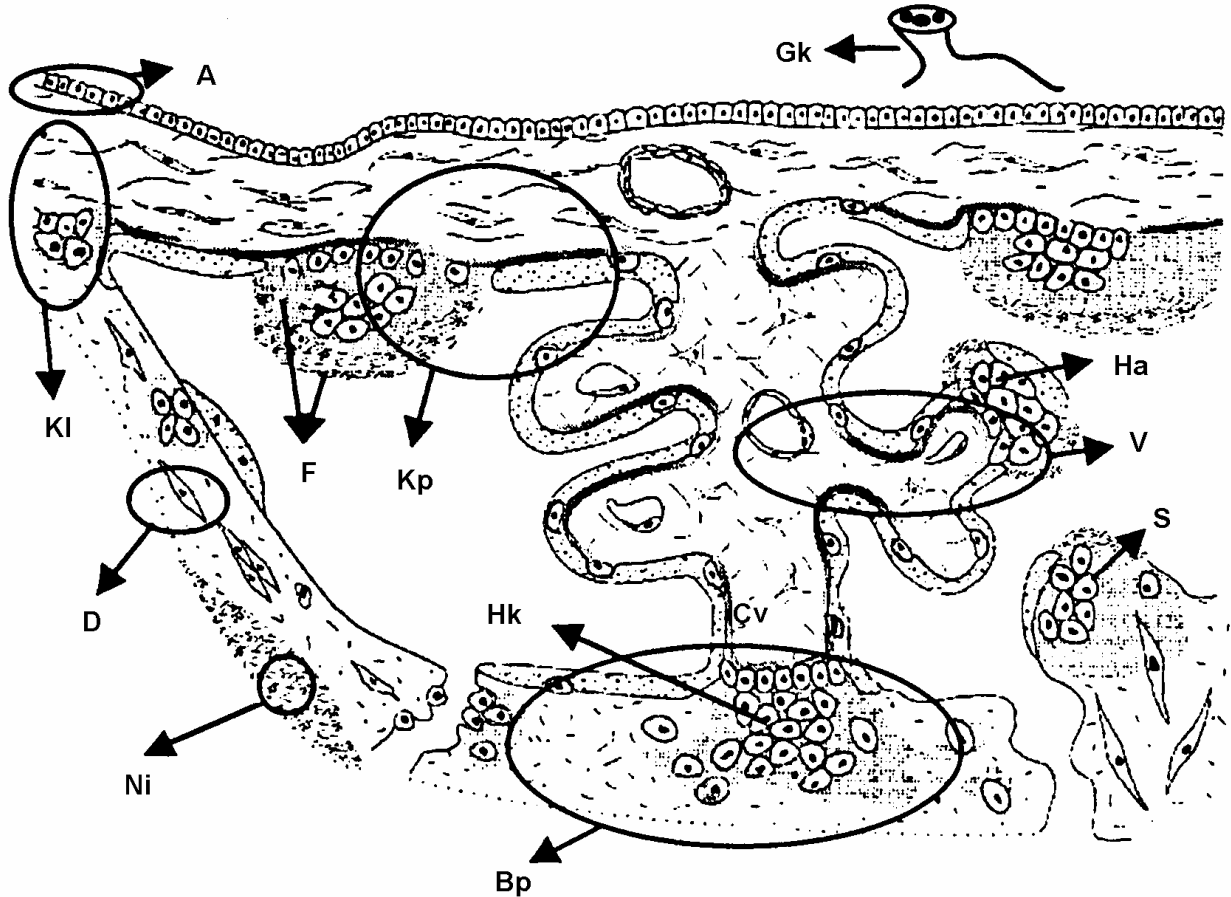
Koryonik ve bazal plakları intervillöz boşluğu sararak plasenta için bir tavan ve taban oluşturur. Maternal kan bu intervillöz boşluğu perfüze ederek plasental villusların trofoblastik yüzeylerinin çevresinde dolaşır. Bu villusların yapısı, tıpkı koryonik plaktan doğan ve intervillöz boşluğa doğru uzanan bir ağaca benzer. Fetal damarlar villusların içine yerleşmiş olup, koryonik plak ve umbilikal kordon aracılığı ile fetal dolaşıma bağlanmışlardır. Plasentanın kenarında koryonik plak ve bazal plak birleşerek koryon leveyi oluşturur ve intervillöz boşluğu kapatırlar (1). İnsan term plasantasının klasik rutin kesitlerinde, yukarıda belirtilen bu yapılar ve hücre toplulukları çizimle şematize edilmiş şekillerle gösterilmektedir (Şekil 1).

Amniyon, koryonik plak ve koryon leve üzerinde, amniyon boşluğu doğru yer alıp, tek katlı küboidal veya prizmatik epitelden oluşur. Bu hücreler, kompakt bir bazal membran üzerine yerleşmiştir ve bu bazal membran aracılığıyla alttaki tabakayı oluşturan ve fibroblast tabakası olarak adlandırılan amniyonik mezenkime tutunur. Amniyon ve koryon arasında bulunan ve tek tük fibroblast

içeren süngerimsi ara tabaka, koryonik mezenkimle (koryonik plak veya koryon leveye ait olan) devam eder.

Koryonik plak ve koryon levede bulunan trofoblast hücreleri, değişik matrikslerle doldurulmuş bir sistemle birbirlerinden ayrılırlar. Bu hücreler tarafından salgılanıp içine gömüldükleri bu matriksler matriks-tip ve fibrin-tip fibrinoid olarak adlandırılmaktadırlar (Şekil 2). Fibrin-tip fibrinoid ayrıca maternal kan ile temasın olduğu bölgelerde yerleşmiştir.

Maternofetal ve fetomaternal alışverişte (örn. Gaz değişimi, emilim, dışarı atım, metabolik, katabolik, immünojenik ve hematopoietik değişimler) plasental villuslar en önemli rolü oynarlarken fetal membranların (amniyon ve koryon leve) katkısı oldukça sınırlıdır (3). Fonksiyon gereği değişik tipte villuslar (stem, çapa, immatür, matür ve terminal) (4). Yapı ve fonksiyon farklılıklarına rağmen, değişik tipteki villusların ortak bir noktası vardır; bu, villus stromasını intervillöz aralıklardaki anne kanından ayıran trofoblastik tabakalardır. Bu



**Şekil 1.** Termdeki insan plasantasının kenar kısmından bir kesitin genel çizimi görülmektedir. Fetal membranların hemen hemen tamamına yakını bu şekilde gösterilmeye çalışıldı. Amniyon (A), koryon leve (KI), koryonik plak (Kp), villus dokusu (V), plasental fibrinoid (F), hücre kolonları (Hk), çapa villuslar (Çv), hücre adacıkları (Ha), septa (S), bazal plak (Bp), desidua bazalis (D), göbek kordonu (Gk), Nitabuch'un fibrinoidi (Ni) (Benirschke ve Kaufmann'dan, 1995, değiştirilerek).

tabakalar, sinsisyotrofoblast ve stiotrofoblasttan oluşmuştur.

Diğer taraftan, villus formasyonunda görev almayan trofoblast hücreleri, ekstravillöz trofoblast hücreleri (EVT) olarak adlandırılır. Bu hücrelerin yer aldığı plasentanın diğer bölümleri; koryon leve, koryonik plak, hücre kolonları, plasental septa, bazal plak ve hücre adalarıdır. Bu hücrelerin bir özelliği; matriks-tip fibrinoidinin içine gömülmüş olmalarıdır (Şekil 2).

Reseptörler, integrinler ve matriks molekülleri üzerine yapılmış çalışmalar villus sinsisyumunun tabanını oluşturan sitotrofoblast hücreleri (Langhans hücreleri) ile EVT kök hücreleri arasında bir fark ortaya koymamaktadır (5-7). Trofoblastik kök hücreleri buldukları yerde maternal kanla karşılaştıkları zaman sinsisyal bir değişime uğrarlar ve villus sinsisyotrofoblastını oluştururlar. Ancak, bu kök hücreler fibrin veya diğer ekstravillus molekülleri ile karşılaştıkları zaman EVT hücrelerini oluştururlar ve invazif bir fenotip kazanırlar (7).

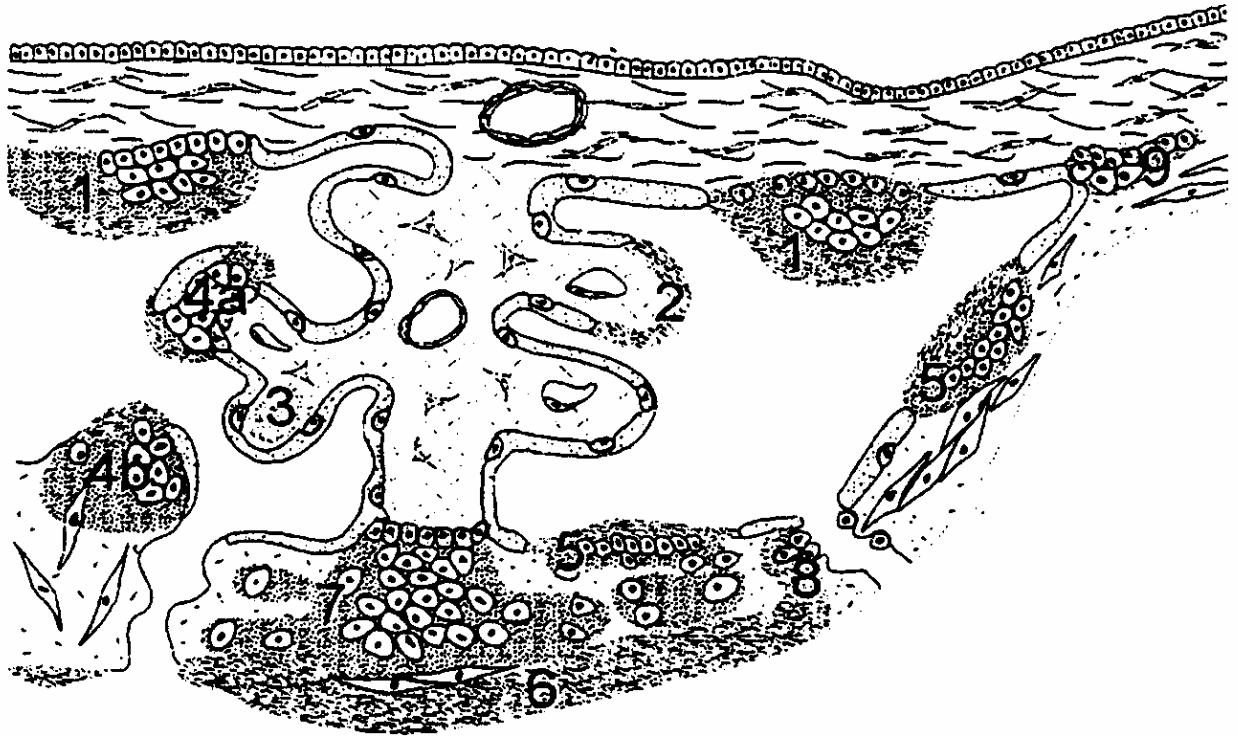
Çapa villuslar, villus gövdelerini bazal plağa veya hücre kolonları aracılığı ile plasental septaya bağlayan yapılardır. Hücre kolonları ise çok tabakalı sitotrofoblastlardan oluşmuş ve kesintili bir sinsisyotrofoblast tabakası ile çevrelenmişlerdir.

Hücre adaları villus ağacından doğarak koryonik plağa tutunmuş hücre kolonları olarak düşünülebilir. Tıpkı hücre kolonlarındaki gibi EVT burada da matriks-tip fibrinoidine gömülmüşlerdir. İki yapı arasındaki fark, hücre adaları maternal endometriyum ile temas haline gelmezken, hücre kolonlarında EVT, proliferatiften invazif karaktere doğru oryantasyon göstermişlerdir. Ayrıca, hücre kolonları intervillöz boşluktan fibrin-tip fibrinoidi vasıtasıyla ayrılmıştır.

Bazal plak, intervillöz boşluğun tabanını oluşturur. Bazal plağın dip tabakası, Nitabuch'un fibrinoidi olarak adlandırılan, uteroplasental fibrinoiddir. Bazal plağın derinliklerinde maternofetal bölgedeki karışımda, "savaş alanında", lokalize olmuştur ve çok değişik şekillerde kesintiler gösteren ağırsız lamelimsi bir yapıdadır. Fibrinojen, hücrelerin sekresyon ve dejenerasyon ürünleri ile heparan sülfat proteoglikanlardan oluşmuştur (8).

Göbek kordonu amniyotik epitel ile çevrelenmiş olup merkezdeki bağ dokusuna sıkıca yapıştığı için fetal membranlardan kolaylıkla ayrılamaz. Bağ dokusu (Wharton jeli) açık zincir polisakaridlerden (hiyaluronik asit, glikozil ve mannozil grupları içeren karbonhidrat grupları) ve farklı matriks moleküllerinden oluşmuştur (9).

Plasental fibrinoid hücresiz, yoğun bir şekilde boyanan, eozinofilik bir madde olup plasentanın değişik



Şekil 2. Plasental fibrinoidin dağılımı ve tiplendirilmesini gösteren çizim. Fibrinoidin bulunduğu bölgenin özelliğine göre isimlendirilmesi yapıldı. 1-Langhans çizgisi, 2-Perivillöz fibrinoid, 3-Intervillöz fibrinoid, 4a-Hücre adacığının fibrinoidi, 4b-Septa fibrinoidi, 5-Rohr çizgisi, 6-Nitabuch fibrinoidi, 7-Hücre kolonu fibrinoidi, 8-Intramural fibrinoid, 9-Koriyon leve fibrinoidi (Kaufmann ve ark.'dan, 1997, değiştirilerek).

bölgelerinde bulunabilir; intervillöz yüzeylerde (perivillöz) ve villuslarda (intravillöz), koryonik plağın alt kısımları olan intervillöz yüzeylerde (Langhans'ın fibrinoidi), bazal plağın yüzeyinde (Rohr'un fibrinoidi), maternofetal birleşme bölgesinin derinliklerinde (Nitabuch'un fibrinoidi), hücre kolonları, hücre adacıkları ve septumdaki ekstrasellüler matriksde bulunur (Şekil 2). Yeni bulgular plasental fibrinoidin hem yapı hem de birleşim açısından farklı iki bölüme ayrıldığını göstermektedir: matriks-tip fibrinoidi ve fibrin-tip fibrinoidi (10).

### Plasental Fibrinoid

Literatürde "plasental fibrinoid" terimi yapısal olarak hücresiz, homojen, parlak, asidik boyanabilen ve plasentalın özelliştirmiş ekstrasellüler matriksleri için kullanılmaya başlanmış klasik bir tanımlamadır (1). Yapı, kompozisyon ve fonksiyon bakımından iki farklı fibrinoid tipi birbirinden ayrılabilir. Bunlar matriks-tip fibrinoidi ve fibrin-tip fibrinoididir (10,11).

İmmünohistokimyasal olarak fibrin-tip fibrinoidi çoğunlukla fibrin ama farklı fibronektin izoformları ile reaksiyon vermektedir. Muhtemelen maternal kan koagülasyonunun bir ürünüdür (10). Matriks-tip fibrinoidinden vital hücrelerin yokluğu ile ayırtılabilir. Plasentalın mekanik anlamda stabilizasyonu, intervillöz boşluktaki kan akımının düzenlenmesi, villus ağacına şekil verilmesi ve maternofetal transfer prosedürlerine katılım gibi bazı fonksiyonlarda görev aldığı düşünülmektedir (11). Maternofetal birleşme bölgesinin büyük bir bölümünü de (Nitabuch'un fibrinoidi) fibrin-tip fibrinoidi oluşturur. Matriks-tip fibrinoidi EVT tarafından salgılanan özelleşmiş bir matrikstir. Fibrin-tip fibrinoidin aksine maternal kanla yüzleşmediği gibi ya fibrin-tip fibrinoidi ya da başka dokularca maternal kandan ayrılmıştır. İnvazif karakterdeki EVT bu matriksi salgılamaktadır. Koryon leve, koryonik plak, hücre adaları ve plasental septa, trofoblastik hücre kolonlarının derin invazif kısımları, bazal plağın derinliklerine kadar invaze olmuş EVT'nin çevresi gibi bölgelerde görülür. Matriks-tip fibrinoidinin kompozisyonu ve yapısı dikkate alındığı zaman bu bölgeler arasında fark yoktur (7,11). Bu bölgeler içerisinde en çok incelenmiş olanı hamileliğin birinci trimesterindeki hücre kolonlarıdır (Şekil 2). Burada matriks tipi, miktarı, kompozisyonu ve yerleşimi oldukça iyi incelenmiştir.

Bazal lamina ile ilişkisini yitirmiş olan daha ileri proliferatif trofoblastlarca ekstrasellüler matriksin salgılandığı saptanamamıştır (5,10,12). Maternofetal birleşim zonuna doğru EVT proliferatif fenotipten invazif fenotipe kayarlar, intersellüler aralıklar birbirlerinden açılır. Ekstrasellüler matriks salgısı da buna paralel olarak artar. Matriks salgısı artık bazal plazmalemma boyunca polarize bir tarzda olmayıp, trofoblastın tüm yüzeyini

kaplayacak şekildedir ve matriks-tip fibrinoidin tipik yapısı olan mozaik ve yama tarzını sergilemektedir.

Matriks-tip fibrinoidin moleküler ve ultrastrüktürel analizinde üç tip farklı materyalin olduğunu göstermektedir (13,14). Bazal lamina benzeri yamalar; kollajen tip IV ve laminin antikorları ile pozitif reaksiyon verirken fibronektin, vitronektin ve heparan sülfat ile negatifirler. Parlak, homojen ve amorf madde benzeri yamalarda ise heparan sülfat, vitronektin moleküllerinin bulunduğu, hiyaluronan ve kondroitin sülfatın ise mevcut olmadığı gösterilmiştir. İnce fibriller ağ tarzındaki yamaların ise fibronektinin değişik izoformları (genel, hücresele ve onkofetal) ve kan grubu antijeni "i" ile immunopozitivite verdikleri gösterilmiştir. Bu matriks komponentlerinin karakteristik dağılımlarının yanısıra, hücre kolonlarında matriks degradasyonundan sorumlu enzimler; matriks proteinazları da eksprese edilmektedir (15).

### Ekstrasellüler Matriks Komponentleri

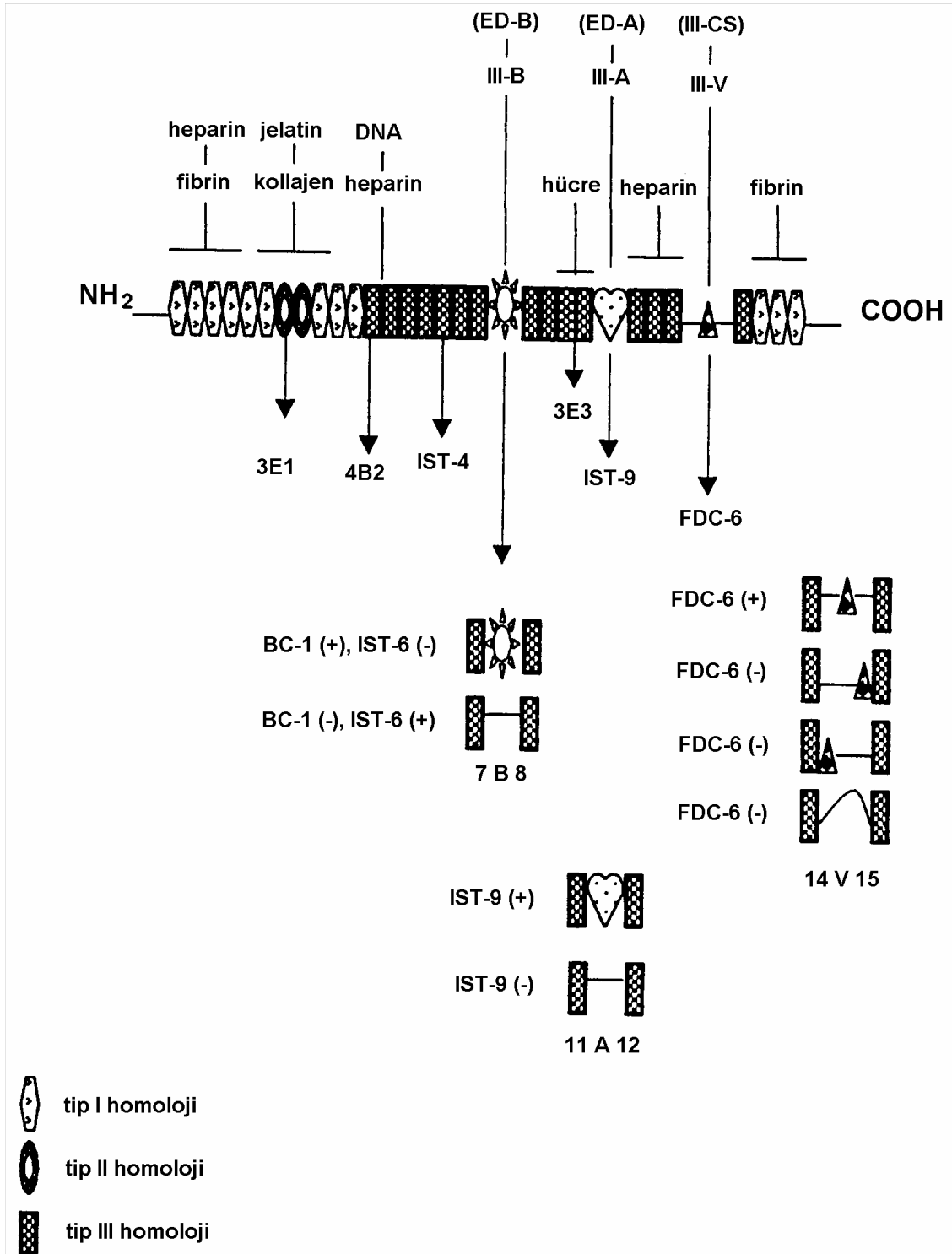
#### Fibronektin

Fibronektinler adhezif glikoproteinler olup üç homolog tekrar ünitesinden (tip I, II, III) oluşur. Bu üniteler tip I, tip II ve tip III olarak adlandırılmaktadır. Bir fibronektin molekülünde 12 tip I bölgesi, 2 tip II bölgesi ve 15-17 tip III bölgesi vardır. Bu modüler üniteler farklı fonksiyonları gösterecek olan domeynlerin temel yapı bloklarını oluştururlar (Şekil 3). Örneğin; tip I modülleri heparin ve fibrine bağlanan domeynlerin yapısında, tip II modülleri kollajen veya jelatine bağlanan domeynlerin yapısında ve tip III modülleri hücrelere, DNA ve heparine bağlanan domeynlerin yapısında kullanılmaktadır (15-17).

Fibronektin molekülü 250-280kD molekül ağırlığındaki ve karboksil terminalinde disülfid köprüleri ile birbirine bağlanan iki subunitten oluşmuştur. Vücut sıvılarında fibronektinler çözünebilen protomerler halinde iken ekstrasellüler matrikslerde polimerik fibriller formlarda bulunmaktadırlar (18).

Bu moleküllerin çok farklı fonksiyonları vardır, bunların arasında normal hücre morfolojisinin kurulması ve devam ettirilmesinde, hücre migrasyonunda, homeostaz ve trombozda, yara iyileşmesinde ve onkojenik transformasyonda rol oynarlar (17).

Sadece bir gen tarafından kodlanmasına rağmen fibronektinin 20'nin üzerinde değişken formları vardır. Bu farklılıklar post-translasyonel modifikasyonlar (örn. Glikolizasyonlar) ve mRNA prekürsöründeki üç genel bölgenin (IIICS, ED-A ve ED-B) alternatif splayinge maruz kalması ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 3). Plazma fibronektini alternatif splaying domeynlerini içermezken, hücresele izoformlar primer transkriptte ED-A domeynini içerirler (19).



Şekil 3. Fibronektin molekülü. Doku ve antikorların bağlandıkları farklı noktalar gösterilmiştir. Ayrıca farklı splein variantları [IST-9 (+), BC-1 (+), FDC-6 (+)] belirtilmiştir (Johansson ve ark.'dan değiştirilmiştir).

Transforme olmuş hücrelerde ve malignitelere fibronektinin primer transkriptindeki alternatif splicing domeynleri deregüle olurlar (19). Normal doku ve hücelere nazaran transforme hücelerde ve tümör

dokularında III-A (ED-A), III-B (ED-B) ve III-V (IIICS) domeynlerini içeren fibronektin izoformları çok daha yüksek derecede eksprese edilirler (20,21). Özellikle III-B ve III-V sekanslarını içeren fibronektinler hemen hemen

sadece fetal ve tümör dokuları ile iyileşmekte olan yaralarda üretilir (22-24). Ayrıca Huppertz ve arkadaşları (14,15) matriks-tip fibrinoidindeki fibriler ağların immunohistokimyasal olarak genel (IST-4, IST-6), hücresele (IST-9) ve onkofetal fibronektin izoformları (BC-1, FDC-6) ile reaktif olduğunu göstermişlerdir (Şekil 3).

### Matriks-Tip Fibrinoidinde Fibronektin Benzeri Protein

Matriks-tip fibrinoidinde ayrıca fibronektin antikorları ile reaktif ufak fibriller de bulunmaktadır. Bu fibrillerin, karbonhidrat yapısında olan kan grubu prekürsörlerinden "i" antijenine karşı olan antikorlarla reaktivitesi rapor edilmiştir (12) ve reaktivitenin fibrillerle ilişkili olması matriks-tip fibrinoidindeki fibronektin molekülü ile ilişkilerin olduğunu düşündürmektedir. Esasen "i" antijeni onkofetal bir epitop olup tüm insan fetuslarında üretilmektedir. Fibronektin molekülü ile de ilişkili olabilecek bu glikozillenmenin, maternal dokulara invaze olan fetal hücreleri maskeleyiği ve anneden kaynaklanan immün cevabı baskılandığı yönünde spekülasyonlar vardır (12,25).

Amaç, bu çalışmada bir tümör matriksi olan ve EVT hücrelerince salgılanan matriks-tip fibrinoidi ile fetal ve maternal kökenli diğer plasental matriksler arasındaki farkların ortaya konmasıdır. Bu farklar; trofoblast migrasyonu ve farklılaşmasındaki muhtemel rolleri nedeniyle onkofetal formlar da dahil olmak üzere fibronektin izoformları ve trofoblast invazyonu esnasında matriks düzenlenmesi ile sınırlandı.

Bu çalışmanın diğer bir kolunu da özellikle annenin immün cevabının baskılanmasında önemli rol oynayabileceği düşünülen "i" kan grubu antijenini taşıyan ekstrasellüler matriks proteinlerinin, matriks-tip fibrinoidinden izolasyonu ve karakterizasyonu oluşturdu. Bu proteinlerin biyokimyasal izolasyonları ve pürifikasyonlarında kullanılan yöntemler sonucu elde edilen verilerin anlamlılıkları spesifikite açısından araştırılarak literatürde rapor edilen sonuçlarla (26) tartışıldı.

## Materyel ve Metodlar

### Biyokimyasal Analizler

Vajinal doğum veya sezaryenle sona ermiş normal hamileliklerden elde edilen normal term plasentalar (n=7) kullanıldı. Buz üzerinde laboratuvara transfer edilen organdan 5-10 g'lık doku örnekleri aşağıda anlatılan şekillerde farklı bölgelerden alındı (Şekil 1; daire içine alınmış bölgeler). Disseke edilen dokular ayrıldı ve doku örnekleri daha sonra tampon içerisinde (PBS, pH 7.4, %5 sükröz) sıvı nitrojende dondurularak deneylerin başlangıcına kadar -35°C'de saklandı.

### Ekstraksiyonlar

Matriks komponentlerinin ekstraksiyonu buz üzerinde ve dializ aşamasına kadar proteaz inhibitörlerinin varlığında uygulandı (Protease Inhibitor Coctail; Boehringer Mannheim). Protokolün işleyişi Tablo 1'de verilmiştir. Farklı tamponlar sayesinde farklı özellikler taşıyan proteinler birbirinden ayrılabilir.

**Tablo 1.** Ekstrasyon aşamalarında kullanılan solüsyonlar ve şartları belirten çizelge

Basamaklar	Solüsyonlar	Koşullar
Doku örneklerinin çözülmesi	PBS, pH 7.4, %5 sükröz	Oda sıcaklığı
Santrifügasyon		1000 xg, 15 dakika, 4°C
Komple homojenizasyon	Lizis tamponu	5 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 1 saat, 4°C
Peletin resüspansiyonu	Yıkama tamponu	6-10 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 1 saat, 4°C
Berrak bir süpernatant elde edilinceye kadar son iki basamağın tekrarı		
Pelletin resüspansiyonu	Lizis tamponu	4-8 ml/g pellet
Santrifügasyon		20000 xg, 30 dakika, 4°C
Pelletin resüspansiyonu	Ekstraksiyon tamponu	6-10 ml/g pellet
İnkübasyon		10 dakika, oda sıcaklığı
Santrifügasyon		50000 xg, 90 dakika, 4°C
Süpernatantların diyalizi	PBS, pH 7.4 (sadece son basamaktan elde edilen süpernatant PBS, pH 7.4, 2M üre, 5mM DTT, 1mM PMSF'te diyalize edildi)	Gece boyunca, 4°C
Lizis tamponu:	100mM Tris-maleik asid, pH 6.8, 5mM EDTA, 5mM DTT	
Yıkama tamponu:	Lizis tamponuna ek olarak %2 Triton X-100	
Ekstraksiyon tamponu:	50mM Tris/maleik asid, pH 6.0, 8M guanidin hidroklorid, 5mM EDTA, 5mM DTT, 10mM etilmaleimid	

Tüm süpernatantlar santrifügasyon basamağından sonra toplandı ve -35°C'de saklandı.

Protein tayini, jelatin-agaroz kolonu, sodyum dodesil sülfat (SDS)-poliakrimalid jel elektroforezi (PAGE) ve Westen-Blot, jelatin substratlı natürel SDS-PAGE (Zimografi) yöntemleri ve uygulama protokoller belirlendi ve uygulandı (detay için kaynak 26).

### Sonuçlar

#### Fibronektinlerin Değerlendirme Parametreleri

Ekstraksiyon sırasında matriks proteinleri, ekstraksiyon tamponun (50 mM Tris/HCl, pH 6.0, 8M guanidinhidroklorid, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 10 mM etilmaleimid) uygulanması ile buldukları matriksten izole edildi (Tablo 1). Bu protokoldeki son basamaktan elde edilen süpernatantlar fibronektin izoformlarının Western blotlarda kantitatif değerler için kullanıldı (Şekil 4) ve aynı blot membranı üzerinde her bir bandın optik dansitesi analize edilerek entegrasyon hesapları (integrated optical densities; int. OD) yapıldı ve bir ekstrakt bir diğeri ile kıyaslandı.

#### Genel Fibronektinler (IST-4, IST-6, 3E1, 4B2)

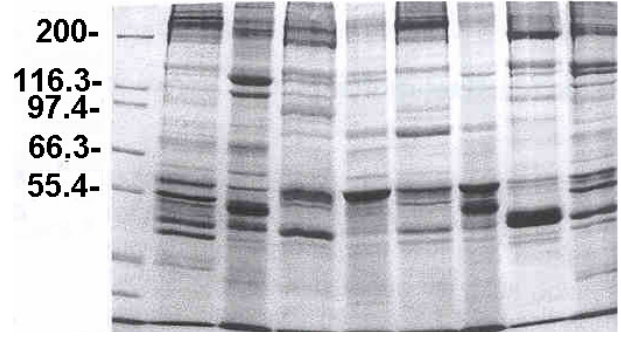
Kantitatif değerler genel bir tablo halinde (Tablo 2) immünoreaksiyon dereceleri de semikantitatif olarak ayrı bir tabloda (Tablo 3) gösterilerek kıyaslandı.

#### IST-4 (III-5 domeynine sahip tüm fibronektinlere karşı geliştirilmiş bir antikor)

Bu antikorla olan immünoreaktivite en yüksek sinyali koryon leve ekstraktlarında verdi. Bunu sırasıyla amniyon, koryonik plak, bazal plak, villus dokusu, göbek kordonu ve desidua izledi. Son dört ekstraksiyonda sinyal birbirine çok yakındı. En zayıf sinyal Nitabuch'un fibrinoidinden hazırlanan ekstraktlarda gözlemlendi.

#### IST-6 (III-7/8 domeynine sahip, III-B domeyninden yoksun fibronektinleri tanır)

Bu antikorla elde edilen en yoğun sinyal amniyon ve koryon leve ekstraktlarında gözlemlendi. Koryon plakta



Şekil 4. Farklı plasental bölgelerden elde edilen ekstraktların birbirlerinden ayrıldıkları temsili SDS-PAGE jeli sonuçlarını gösteren mikrograf. Soldan sağa doğru moleküler ağırlık standartları (200kD, 116.3kD, 97.4kD, 66.3kD, 55.4kD), amniyon, bazal plak, koryonik plak, desidua bazalis, koryon leve, Nitabuch'un fibrinoidi, göbek kordonu ve villus dokusu.

gözlenen sinyal ilk iki ekstrakttaki sinyalin yoğunluğuna oldukça yakındı. Desidua, göbek kordonu ve Nitabuch'un fibrinoidinden elde edilen reaksiyon sinyalleri ise daha zayıftı. Bu üç reaksiyondaki sinyaller birbirine oldukça yakınken villus dokusundan elde edilen ekstraktlardaki sinyal en zayıf sinyal olarak belirlendi.

#### 3E1 (heparine bağlanan domeyni, yani tüm fibronektinleri tanır)

Bu antikorla değişik ekstraktlardan elde edilen reaktivite birbirine çok yakındı. Ekstratlar içerisinde koryon leve ve amniyon, koryonik plak ve Nitabuch'un fibrinoidinden bir miktar daha güçlü sinyal verirken bunları göbek kordonundan elde edilen sinyal izledi. Bazal plak, desidua ve villus dokusundaki dansite sonuçları ise bu serinin son bölümünü oluşturdu. Ayrıca bu antikorla 41-43kD molekül ağırlığında bantlar tespit edildi. Dansite analizleri yoğunundan zayıfa doğru şu sırayı takip etti; villus,

**Tablo 2.** Farklı ekstraksiyonlardaki immünoreaktivite kıyaslanması. Herbir farklı doku örneğinde aynı antikorla elde edilen immünoreaktivite yatay yönde sıralanmış olup birbirleri ile kıyaslanabilir. Dikey yönde bu kıyaslama mümkün değildir, çünkü herbir antikor için farklı bir jel ve blot kullanılmış olup reaksiyon dereceleri farklıdır. Değerler triple ölçümler sonucunda elde edilmiş ortalamalardır.

Antikor	Farklı ekstraktlardaki immünoreaktivite (int. OD)							
	Amniyon	Bazal plak	Koryonik plak	Desidua	Koryon leve	Nitabuch'un fibrinoidi	Göbek kordonu	Villus dokusu
IST-4	0.19	0.11	0.14	0.09	0.46	0.07	0.10	0.10
IST-6	1.53	0.51	1.35	0.24	1.47	0.20	0.23	0.08
3E1	0.49	0.38	0.46	0.35	0.50	0.46	0.45	0.19
3E1 (41-43kDa)	0.23	0.15	0.24	0.19	0.43	0.37	0.09	0.66
4B2	4.65	0.78	3.58	0.48	13.10	0.19	1.35	1.76
3E3	1.63	0.75	1.34	1.14	3.49	1.08	0.94	0.43
IST-9	0.09	0.03	0.14	0.07	0.51	0.13	0.09	0.08
FDC-6	1.64	0.53	1.42	0.74	8.14	0.62	0.07	0.26

**Tablo 3.** Farklı plasenta bölgelerinde, farklı antikoklarla elde edilen immünoreaktiviteler semikantitatif olarak verilmiştir. +/-: zayıf reaksiyon, +: pozitif reaksiyon, ++: belirgin reaksiyon, ~: düzensiz reaktivite, \*: belirlenmedi. A: amniyon (e: epitel, bm: bazal membran, m: mezenkim), Bp: bazal plak (D: desidua, ET:EVT), Kp: koryonik plak (m: mezenkim, ET: EVT), KI-ET: koryon levedeki ekstravillöz trofoblastlar, Ha-ET: hücre adalarındaki EVT, Hk-ET: hücre kolonlarındaki EVT, V: değişik tipteki villuslar (Çv: çapa villuslar, kç: küçük kalibrasyondaki villuslar, by: büyük kalibrasyondaki villuslar, s: stroma, tk: trofoblastik kabuk, bya: büyük arter duvarları).

Antikor	Farklı plesantal bölgeler														
	A			Bp		Kp		KI ET	Ha ET	HK ET	V				
	e	bm	m	D	ET	m	ET				Çv	kç	by		
													s	tk	bya
IST-4	-	+/-	-	+	++	*	++	++	++	++	*	-	+	-	-
IST-6	-	-	-	+	++	*	++	++	++	++	*	-	+	-	-
3E1	-	+	+	-	~	*	+/-	+/-	-	*	++	*	++	*	+
4B2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3E3	-	+	+	+/-	+/-	+	+	-	*	*	*	*	+	-	*
IST-9	-	+/-	-	+	++	*	++	++	++	++	*	-	+	-	-
FDC-6	-	+	-	+	+	+/-	++	++	+	*	*	*	-	-	*

koryon leve, Nitabuch'un striası, koryonik plak, amniyon, desidua, bazal plak ve umbilikal kordon.

#### **4B2 (jelatine bağlanan domeyni, yani tüm fibronektinleri tanıır)**

Bu antikor en güçlü reaksiyonu koryon leveden hazırlanan ekstratlarda verirken, bu sinyali amniyon, koryonik plak, villus, umbilikal kord, bazal plak ve Nitabuch'un fibrinoidinde izled.

#### **Hüresel Fibronektinler (3E3, IST-9)**

##### **3E3 (hüresel fibronektinlerin hücreye bağlanan domeynini tanıyan antikor)**

Bu antikor en güçlü olarak koryon leve ekstraktı ile reaksiyon verirken bunu amniyon ve koryonik plak izledi. Benzer sinyaller desiduada ve Nitabuch'un fibrinoidinde gözlenirken, daha zayıf sinyaller göbek kordonu, bazal plak ve villus dokusunda belirlendi.

##### **IST-9 (III-A domeynine sahip hüresel fibronektinleri tanıır)**

En güçlü reaksiyon koryon levede bulunurken bunu koryonik plak ve Nitabuch'un fibrinoidinin birbirine çok yakın olan reaktiviteleri izledi. Amniyon ve göbek kordonunun verdiği sinyaller ise birbirlerine çok yakınken koryonik plak ve Nitabuch'un fibrinoidinden daha zayıftı. Villus dokusu, desidua ve bazal plaktan elde edilen sinyaller ise keza daha zayıftı.

#### **Onkofetal Fibronektinler (FDC-6)**

##### **FDC-6 (Onkofetal fibronektinlerdeki O-glikolize III-CS domeynini tanıır)**

Bu antikorun koryon levede verdiği biyokimyasal reaksiyon oldukça zayıf olup hemen hemen benzeri

kuvvetteki sinyaller amniyon ve koryonik plaktan hazırlanan ekstratlarda elde edildi. Desidua, Nitabuch'un fibrinoidi, bazal plak, villus dokusu ve göbek kordonundan hazırlanan ekstratların verdiği sinyaller azalan bir yoğunluktan yukarıda belirtilen ekstratları takip etti.

#### **“i” Epitopunu Taşıyan Fibronektin Benzeri Proteinler**

Koryon leve ekstratlarının iki farklı üre uygulamasının ardından jelatin agaroz kolonlarından elüsyonlarına ait sonuçlar gösterildi. Bazı durumlarda nonspesifik bağlanan proteinler (fraksiyon 1, 2 ve 3) kolondan uzaklaştırıldıktan sonra kolona spesifik bağlanan proteinlerin 1.8 M ve 6 M üre ile (sırasıyla fraksiyon 4 ve 5) elüsyonları ve Western blot uygulamaları gösterildi ve sırası ile IST-4, BC-1 ve anti-i antikokları ile elde edilen sonuçlar verilmiştir. Bu blotlarda 50-60kD moleküler ağırlığına sahip ve her üç antikor ile de pozitif olan ufak protein/proteinler görülmektedir. Bu ufak fibronektin benzeri proteinler 0M'dan 6 M'a doğru giden lineer üre gradienti altında 1.7 M ve 2.5 M üre konsantrasyonlarında elüe edilirken (fraksiyon 1), büyük fibronektinlerin 2.1 M ve 4 M üre konsantrasyonları arasında (fraksiyonlar 2-5) kolondan elüe edildi. Ancak anti-i ile pozitif reaksiyon veren proteinlerin daha da ileri pürifikasyonu ve sekansını olumlu sonuç vermemiştir. Bu nedenle kullanılan ikinci antikorun nonspesifik bağlanma göstermiş olabileceği düşünülerek Western blotlarda kullanılan protokolda ilk aşamalardan biri olan nonspesifik bağlanmanın bloke edildiği aşamada değişiklikler yapılmıştır. Bunlardan en önemlisi farklı konsantrasyonlarda BSA veya yağsız sütün bloklayıcı solüsyonuna ilavesi olup, elde edilen sonuçlar bu çalışmada gösterilmekle beraber ufak fibronektin diye adlandırılan küçük protein/proteinler bir daha tespit



edilememiştir. Sonuçta ise bu deneylerde alınan negatif sonuçlar nedeniyle immünohistokimyasal olarak gösterilen (13) bu protein/proteinlerin pürifikasyonu ile ilgili deneylere daha fazla devam edilmedi.

## Tartışma

### Ekstrasellüler Matrikslerde Fibronektin İzofomları

Farklı plasental bölgelerin yapısal ve moleküler kompozisyonundaki farklılıklara bağlı olarak, farklı ekstrasellüler matrikslerde fibronektin izofomlarının dağılımında farklılıklar göstermeleri doğal olarak beklenir.

İnsan amniyon epitel hücrelerinin hem hücreSEL hem de onkofetal fibronektinleri salgıladıklarını ve bunun hemen altındaki ekstrasellüler matrikste depolandıklarını (26), bu salgılama faaliyetinin hormonal kontrol altında olduğunu gösteren çalışmaların yanısıra, bu moleküle bağlı fibronektin reseptörü (integrin  $\alpha 5\beta 1$ ) de amniyon epitelinde bulunduğu ve amniyotik mezoderimde hücreSEL fibronektinin varlığı gösterilmiştir (28).

İmmünohistokimyasal ve biyokimyasal sonuçlar, amniyonik bazal membranın, özellikle hücreSEL fibronektinleri (III-A domeynine sahip fibronektinler) ve normal fibronektinleri (III-5 domeynine ve heparine bağlanan domeynine sahip fibronektinler) eksprese ettikleri ve bazı onkofetal fibronektinleri (O-glikolize III-CS ve III-B domeynine sahip) içerdikleri biyokimyasal olarak amniyonda da gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları fibronektinlerin amniyonda varlığını rapor eden mevcut literatüre (28) yeni yaklaşımlar getirmekte ve yeni bulgular eklemektedir.

Biyokimyasal verilerimiz literatürle paralellik göstererek genel, hücreSEL ve onkofetal fibronektin izofomlarının bazal plakta varlığı tartışılmıştır (24,29-31). Özellikle hücre kolonlarının distal bölümlerinde bulunan fibronektin izofomlarının EVT arasında belirgin olarak spot şeklinde gösterildiği bu çalışmanın sonuçları ile belirlendi ve bu sonuçlar daha önceki bulgularla paralellik vermektedir (10,12,14,32). Diğer yandan, hücre kolonlarında fibronektin ve fibronektin reseptörünün koekspresyonu rapor edilmiştir (5). Kanımıza göre, EVT hücre kolonlarında yer alan fibronektin, büyük ihtimalle trofoblastın maternal dokulara adezyonunu arttırmakta ve trofoblast migrasyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, uterus duvarındaki trofoblast kümelerinin de  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$  ve  $\beta 1$  reseptörlerini eksprese ettikleri halde, ekstrasellüler matrikslerinin gösterilememiş olması (hızlı turnover nedeni ile), EVT primer olarak maternal hücre ve matrikslerle etkileşim halinde olduğunu savunmakta (5,33) ve bu çalışmanın sonuçları ile de destek bulunmaktadır.

Western blot analizleri, koryonik plakta üç fibronektin izofomunun varlığını ortaya koymaktadır:

genel, hücreSEL ve onkofetal. EVT'nin matrikslerindeki yama tarzı görünümüne üç izofomla da gözlenmiştir. Bu sonuçlar daha önceki değerlendirmelerle uyum içerisindedir (11,14,34).

İmmünohistokimyasal tekniklerle bazal plaktaki desidua dokusundan elde edilen sonuçlar (34) ile Western blotlarla fetal membranlarda alınan desidua dokusuna ait sinyaller kıyaslandığında her iki teknikte de sonuçlar birbirine paralellik ve üç fibronektin izofomunun varlığı gösterilmiştir. Önceki çalışmalarda hücre membranlarında (33) perisellüler matrikste (29,33) ve desidual hücrelerin sitoplazmasında fibriller ve noktasal tarzda fibronektinin varlığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın orjinal diğer bir yönü, trofoblast hücrelerince invaze edilmiş olan desiduada, III-B veya O-glikozillenmiş III-V domeynine sahip onkofetal fibronektinlerin gösterilmiş olmasıdır (24,33). Desidual hücrelerde ayrıca fibronektin reseptörleri eksprese edilmektedir ( $\alpha 3\beta 1$ ; ve  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$ ) (32,33). Sunulan çalışmanın sonuçları, fibronektin izofomlarının desidual matrikste EVT migrasyonuna karşı cevaben fibronektin izofomlarını depoladıklarını göstermektedir.

Plasentanın koryon leve bölgesinden elde edilen immünohistokimyasal sonuçlar genelde koryonik plaktaki immünoreaktivite ile paralellik göstermiştir. Western blotlarda en yoğun sinyaller bu dokudan hazırlanan ekstratlardan elde edilmiştir. Bunun nedeni EVT'nin bu bölgede yoğun olarak depolanmış olmasıdır. Bu sonuçlar koryon levenin daha ziyade genel, hücreSEL ve onkofetal fibronektinlerden oluştuğunu ve farklı fibronektin izofomlarının koryo-desidual etkileşimde önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Beta zincirinden yoksun fibrinopeptidin yanısıra, çok çeşitli 105kD molekül ağırlığı üzerindeki polipeptidler. Nitabuch'un fibrinoidinde rapor edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen Western blot sonuçları genel ve hücreSEL fibronektin izofomlarının oldukça dominant olduğunu, onkofetal izofomunun ve jelatine bağlanan domeyni içeren fibronektin izofomunun ise sırasıyla çok düşük ve belirlenemeyecek kadar düşük seviyelerde olduğunu göstermiştir.

Fibronektinin göbek kordonunda venöz ve arteriyel endotel tarafından sentez edildiği (35) bildirilmiştir. Bu çalışmada Western blotlardan elde edilen sonuçlar genel ve hücreSEL fibronektin izofomlarının göbek kordonu ekstratlarından elde edilebileceğini gösterilmiş ancak, onkofetal izofomlar belirlenememiştir.

Termdeki plasentada koryonik villusların stromasında (30,35) ve damar duvarlarında (35,36) fibronektin immünoreaktivitesi gösterilmişken trofoblastik bazal membranda immünoreaktivite gösterilememiştir (34-36). Bu raporlara paralel olarak bu çalışmada da büyük villusların stromalarında ve fetal damarların çevrelerinde

genel ve hücresele fibronektin izoformları bulunurken bu izoformların trofoblastik kabukta ve diğer villus tiplerinde varlığı belirlenememiştir. Ayrıca, villus stromasında O-glikozillenmiş domeyni olan onkofetal fibronektin izoformunun varlığı da belirlenememiştir (III-B domeynine sahip onkofetal fibronektin) (36).

### **Fibronektin ve Matris Metalloproteinazlarının Arasındaki İlişki**

Hücrelerin adezif temaslar vasıtasıyla ekstrasellüler matris molekülleri (fibronektin, laminin, kollajen, tenasin, vitronektin, vb.) ile ilişkiler kurmaları sonucu sinyal transdüksiyonu gerçekleşir (37). Bu etkileşimler gen ekspresyonunda ve hücre fenotipindeki değişikliklerle ve hücresele davranışın düzenlenmesi ile (örneğin; hücre adezyonu, yayılma, farklılaşma ve migrasyon) sonuçlanır (26,38).

Bunlara paralel olarak bazı hücre katlarında matris metalloproteinazların ekspresyonunun hücre matris etkileşimlerinden kaynaklandığı rapor edilmiştir (14,38). Bunların yanısıra çeşitli ekstrasellüler substratların jelatinaz ekspresyonuna olan potansiyel etkisi de bazı raporlarda vardır. Bu noktada farklı hücre katlarında fibronektin ve fibronektin fragmanlarının bazı jelatinazlar üzerine örneğin MMP-9 (15,39) indüktif etkisini gösterirken, MMP-2 üzerinde etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Diğer yandan insan preimplantasyon embriyolarının biyokimyasal ve morfolojik gelişimlerinde onkofetal fibronektinler gibi bazı spesifik ekstrasellüler proteinlerin embriyonik sekresyonu oldukça önemlidir. Ekstrasellüler matris proteinleri (adult tipi fibronektinler veya trofoblast türevi onkofetal fibronektinler) insan embriyolarının başarılı implantasyonları için gereken adezif ve degradatif (MMP-2 üzerinden) özelliklerin kazanılmasında rol oynamaktadırlar. Fibronektinlerin etkileri sadece jelatinazlar ile sınırlı olmayıp MMP-3 gen ekspresyonuna, kollajenaz genine (40) ve serin proteazlarına kadar uzanmaktadır.

Ayrıca çeşitli hücre katlarında fibronektin reseptörünün indüksiyonu metalloproteinazların artması veya azalması ile sonuçlanmıştır. MMP ekspresyonunu ve fokal kontakt alanını düzenleyen sinyaller bağımsız bir şekilde düzenlenmekte olup  $\alpha 5\beta 1$  ve  $\alpha 4\beta 1$  integrinlerinin kooperasyonları, fibronektine cevap olarak ekstrasellüler matrisi düzenleyen genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde en büyük rolü oynamaktadır (40). EVT hücreleri düşük miktarlarda jelatinazlarla en iyi tanımlanan fibronektin reseptörü olan  $\alpha 5$  (5,41) integrin subuniti aktive edildiğinde yüksek miktarlarda fibronektin (6) salgılamaktadır. Diğer taraftan, ovaryum kaynaklı kanser hücreleri (SAOV) ile kondisyone edilen peritoneal stroma hücrelerindeki MMP-9 seviyesindeki artış,  $\alpha 5$  antikoru ile

inhibe edilebilirken, bu etki fibronektin eklenmesi ile tersine çevrilmiştir (39). Ayrıca fibronektin reseptörünün uyarılması stromelizin ve kollajenaz mRNA'larında birikme ile sonuçlanmıştır (41).

Diğer yandan, bazı ekstrasellüler matris moleküllerin spesifik olarak matris metalloproteinazları ve bu moleküllerin inhibitörleri olan TIMP'ler ile ilişkide oldukları gösterilmiştir (15). EVT tipik matrisleri olan matris tip fibrinoidinde MMP'lar ve TIMP'ler belirli substratlarla beraber immünlokalize edilmişlerdir. Bunların arasında hücresele ve onkofetal fibronektin izoformları matris tip fibrinoidinde fibriller ağlar içerisinde yama biçiminde bir şekil alırlarken, MMP-2, -3 ve -9 ile immünopozitivite (15) göstermişlerdir. Ayrıca TIMP-1 ile fibronektin miktarı arasında ters bir korelasyon rapor edilmiştir.

Çalışmamızda fibronektin izoformlarının ve matris metalloproteinazlarının kompozisyonları geniş bir şekilde incelenmiştir. Sonuçlar, farklı fibronektin izoformlarının (genel, hücresele ve onkofetal) ve MMP'lerin (MMP-2, -3, -9) aynı ekstrasellüler matrislerde lokalize olduklarını ve aynı plasental bölgelerden ekstre edilebileceklerini göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, fibronektin trunkasyonun hücre-hücre, hücre-matris etkileşmesi sürecinde sinyal transdüksiyon mekanizmaları aracılığıyla biyomoleküler bilgi transferinde rol oynayabileceğini düşündürülebilir. Hücreler bu transfere belli şekillerde karşılık verirler. Bunlardan biri MMP ekspresyonunda ve sekresyonundaki değişikliklerdir. Bu enzimler beraber çalışarak ekstrasellüler matristeki farklı substratlar üzerine etki gösterirler, tabii ki fibronektine de. Tüm bunların sonucu olarak fibronektine bağlanan bölgenin konformasyonu değişebilmekte ve proteinaz kaskadının; metalloproteinazlar ve serin proteazlarının uyarılması sonucu ekstrasellüler matrisin fibronektinler de dahil daha çok sindirimi gündeme gelmektedir (41). Matris moleküllerinin, fibronektin fragmanlarının, metalloproteinazların uyarılması sonucu doku remodülasyon aktivitesini düzenledikleri (39) sonucuna varılmaktadır.

Diğer taraftan, Zhu ve arkadaşları (25, 42,43), fibronektin tipinin ve glikozillenme derecesinin biyolojik aktivitede etkili olduğunu bildirmişlerdir. Plasental fibronektinin yüksek molekül ağırlıklı polilaktozamin karbonhidratlara sahip olması, bu molekülün jelatine bağlanmasını zayıflatmaktadır. Ek karbonhidrat rezidüleri aynı zamanda proteinazlara olan direncin artmasına neden olmaktadır. Özellikle onkofetal fibronektin molekülünün (FDC-6) mevcut olduğu matrislerde, onkofetal olarak glikozillenmiş epitop, maternal proteinaz saldırısına karşı fibronektin molekülünü korumaktadır. Ayrıca, aynı matrislerde fibronektin moleküllerinin kan grubu antijenlerinden olan "i" ile olan ilişkisi de, yine bir karbonhidrat yapısı (laktozamin) olan bu epitopun yukarıda

belirtilen noktalarda rol oynayabileceği gibi, anne-fetus arasındaki immünolojik bariyerin sessiz hale getirilmesinde de etkin olabileceğini düşündürmektedir (11,14,44). Diğer taraftan çalışmamızda, gerek jelatin kromotografisinde, gerekse Western blot analizinde bu molekülün izolasyonundaki güçlükler, biyomolekülün incelenemesi için daha farklı metodolojik yaklaşımların gerekli olduğunu göstermektedir.

### Yeni Yönelimler ve Ufuklar

Plasental matrikslerde, fibronektin ve matriks metalloproteinazlarının yanısıra, özellikle maternal ve fetal kanın ve matriksler dışında plasental dokuyu oluşturan diğer pek çok molekülün varlığı, istenilen molekülün saf olarak biyokimyasal izolasyonunu zorlaştırmaktadır (26). Ayrıca, trofoblast invazyonu açısından matriks-tip fibrinoidindeki onkofetal moleküllerin muhtemel önemli rolleri göz önünde tutulduğunda, bu moleküllerin konsantrasyonu bir şekilde plasentadan izolasyonları da pek imkân dahilinde görünmemektedir. Bu noktada, istenilen matriks molekülünü salgılayan hücre tipini izole edip kültürde yaşatmak bir çözüm olabilir. Böylelikle diğer hücre ürünleri olmadan tek bir hücre tipinin ürettiği moleküller, biyokimyasal olarak kültür süpernatantlarından kolaylıkla izole edilebilir. Fakat, matriks-tip fibrinoidini üreten hücrelere bakıldığında, EVT'ni izole edip in vitro üretmek ve kültürde yaşamlarını sağlamak, farklılaşmış ve proliferasyon olmayan bu hücreler için oldukça kısa bir süre için mümkün olabilir (43,45).

Bu analitik probleme bir çözüm olarak hibridoma tekniği gündeme gelmektedir. Trofoblast hücrelerine genetik olarak benzerlikler gösteren ve proliferasyon kabiliyetine sahip olan tümör hücrelerinin (koryokarsinoma hücreleri), bu özelliklerinin EVT hücrelerine aktarılması ile trofoblast/tümör hibridoma kültüründe, matriks moleküllerinin in vitro olarak üretilmesi mümkündür. Hibridoma tekniği sayesinde kısaca trofoblast hücreleri immortalize edilebilmektedir. Hibridleme yolu ile HGPRT-pozitif (hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz-pozitif) trofoblastların ekstrasellüler matriks moleküllerini ekspres etme kabiliyeti hibridomlara aktarıldığı gibi HGPRT-negatif (hipoksantin-guanin-fosforibozil transferaz-negatif) ve ekstrasellüler matriks moleküllerini ekspres edemeyen tümör hücrelerinin proliferasyon kabiliyeti hibridomalara aktarılabilir (46,47). Füzyona uğramayan trofoblast hücreleri kendiliklerinden öldükleri gibi tümör hücreleri de seçici koşullar altında ortamdaki uzaklaştırılmakta, böylece sadece hibridomalar kültürde kalmaktadır.

Diğer taraftan hibridomaların ekspres ve sekrete ettikleri matriks moleküllerinin izole ve karakterize edilmesi, yapılarındaki farklılıkların trofoblast invazyonunda ne gibi roller oynadığının belirlenip, hangi koşullar altında artıp azaldıklarının incelenmesi ile,

öncelikle plasentasyondaki pek çok fizyolojik ve patofizyolojik durum daha iyi anlaşılacaktır.

Diğer taraftan trofoblast farklılaşması ve invazyonunu kontrol eden moleküler mekanizmalar halen daha çok iyi anlaşılabilmiş değildir. Bunun bir yolu cDNA kütüphanelerinin diferansiyel taranmasıdır. Bu yönde yapılan çalışmaların bazılarında trofoblast hücrelerinin farklılaşmasında düzenleyici rol oynayabilecek genler belirlenmiştir (47,48). Bu genlerin protein düzeyinde okunmuş şekillerinin anlaşılması çok emekli çalışmaları gerektirse de kaçınılmaz bir yoldur.

### Teşekkür

*Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen AI yurtdışı doktora bursu ile başarılı doktora tezinin bir bölümünün özetidir. Araştırmacı Kuruma, bu desteğinden dolayı teşekkür eder.*

### KAYNAKLAR

1. Benirschke K, Kaufmann P. Pathology of the human placenta, 3rd ed. New York: Springer, 1995.
2. Leiser R, Kaufmann P. Placental structure: in a comparative aspect. *Exp Clin Endocrinol* 1994; 102:122-34.
3. Kaufmann and Scheffen I. Placental development: in neonatal and fetal medicine-physiology and pathophysiology. R Polin and W Fox editors. Saunders, Orlando, FL, 1997: 1:45-55.
4. Demir R, Kosanke G, Kohlen G, Kertschanska S, Kaufmann P. Classification of human placental stem villi: structural and functional aspects-a review. *Microsc Res Tech* 1997; 38:29-41.
5. Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ. Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. *J Clin Invest* 1992; 89:210-22.
6. Bischof P, Haeggeli L, Campana A. Gelatinase and onkofetal fibronectin secretion is dependent on integrin expression on human cytotrophoblasts. *Hum Reprod* 1995; 10:734-42.
7. Kaufmann P, Castellucci M. Extravillous trophoblast in the human placenta. *Trophob Res* 1997; 10:21-65.
8. Sutcliffe RG, Davies M, Hunter JB, Waters JJ, Parry JE. The protein composition of the fibrinoid material at the human uteroplacental interface. *Placenta* 1982; 3:297-308.
9. Nanaev AK, Kohlen G, Milovanov AP, Domogatsky SP, Kaufmann P. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 1997; 18:53-64.
10. Frank HG, Malekzadeh F, Kertschanska S, Crescimanno, Castellucci M, Lang I, Desoye G, Kaufmann P. Immunohistochemistry of two different types of placental fibrinoid. *Acta Anat* 1994; 150:55-68.
11. Kaufmann P, Huppertz B, Frank HG. Review: The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Ann Anat* 1996; 178:485-501.
12. Frank HG, Huppertz B, Kertschanska S, Blanchard D, Roelcke D, Kaufmann P. Anti-adhesive glycosylation of fibronectin like molecules in human placental matrix-type fibrinoid. *Histochem Cell Biol* 1995; 104:317-29.
13. Kertschanska S, Frank HG, Huppertz B, Funayama H, Kaufmann P. Immunocytochemistry of matrix-type fibrinoid in the human placenta. *Placenta* 1995; 16:34.
14. Huppertz B, Kertschanska S, Franks HG, Caus G, Funayama H, Kaufmann P. Extracellular matrix components of the placental extravillous trophoblast: immunocytochemistry and ultrastructural distribution. *Histochem Cell Biol* 1996; 106:291-301.

15. Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 1998; 291:133-48.
16. Kornblihtt AR, Umezawa K, Vibe-Pedersen K, Barelle FE. Primary structure of human fibronectin: differential splicing may generate at least 10 polypeptides from a single gene. *EMBO J* 1985; 4:1755-59.
17. Johansson S, Svineng G, Wennerberg K, Armulik A, Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front Biosci* 1997; 2:126-46.
18. Yamada KM. Fibronectins: Structure, functions and receptors. *Curr Opin in Cell Biol* 1989; 1:956-63.
19. Zardi L, Carnemolla B, Siri A, Petersen TE, Paoletta, Sebastio G, Baralle E. Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 1987; 6:2337-42.
20. Castellani P, Viale G, Dorcaratto A, Nicolo G, Kaczmarek J, Querze G, Zardi L. The fibronectin isoform containing the ED-B oncofetal domain: a marker of angiogenesis. *Int J Cancer* 1994; 59:612-8.
21. Matsuura H, Hakomori S. The oncofetal domain of fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6: Its presence in fibronectins from fetal and tumour tissues and its absence in those from normal adult tissues and plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6517-21.
22. Matsuura H, Takio K, Titani K, Greene T, Lavery SB, Salyan MEK, Hakomori S. The oncofetal structure of human fibronectin defined by monoclonal antibody FDC-6. Unique structural requirement for the antigenic specificity provided by a glycosylhexapeptide. *J Biol Chem* 1988; 263:3314-22.
23. Laitinen L, Vartio T, Virtanen I. Cellular fibronectins are differentially expressed in human fetal and adult kidney. *Lab Invest* 1991; 64:492-8.
24. Feinberg RF, Kliman HJ, Lockwood CJ. Is oncofetal fibronectin a trophoblastic glue for human implantation. *Am J Pathol* 1991; 138:537-43.
25. Zhu BCR, Fisher SF, Pande H, Calaycay J, Shively JE, Laine RA. Human placental (fetal) fibronectin: increased glycosylation and higher protease resistance than plasma fibronectin. *J Biol Chem* 1984; 259:3962-70.
26. Demir-Weusten AY. Extrazelluläre Matrices in der reifen menschlichen Placenta: Verteilung von Fibronectin-Isoformen und Matrixmetalloproteinasen (Ph.D. Thesis). RWTH Universität, Medizin Fakultät, Aachen, Germany, Juni, 1999.
27. Damsky C, Sutherland A, Fisher S. Extracellular matrix 5: adhesive interactions in early mammalian embryogenesis, implantation and placentation. *FASEB J* 1993; 7:1320-29.
28. Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ. Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. *Development* 1994; 120:3657-66.
29. Aplin JD, Hughes RC. Complex carbohydrates of the extracellular matrix structures, interactions and biological roles. *Biochim Biophys Acta* 1982; 694:375-418.
30. Manabe R, Oh-e N, Maeda T, Fukuda T, Sekiguchi K. Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol* 1997; 139:295-307.
31. Guller S, Kong L, Wozniak R, Lockwood CJ. Reduction of extracellular matrix protein expression in human amnion epithelial cells by glucocorticoids: a potential role in preterm rupture of the fetal membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2244-50.
32. Aplin JD, Campbell S, Foden LJ. Adhesion of human amnion epithelial cells to extracellular matrix. Evidence for multiple mechanisms. *Exp Cell Res* 1984; 153:425-38.
33. Earl U, Estlin C, Bulmer JN. Fibronectin and laminin in the early human placenta. *Placenta* 1990; 11:223-31.
34. Rukosuev VS. Immunofluorescent localization of collagen types I, III, IV, V, fibronectin, laminin, entactin and heparan sulphate proteoglycan in human immature placenta. *Experientia* 1992; 48:285-7.
35. Blankenship TN, Enders AC, King BF. Distribution of laminin, type IV collagen, and fibronectin in the cell columns and trophoblastic shell of early macaque placentas. *Cell Tissue Res* 1992; 270:241-8.
36. Blankenship TN, King BF. Developmental changes in the cell columns and trophoblastic shell of the macaque placenta: an immunohistochemical study localizing type IV collagen, laminin, fibronectin and cytokeratins. *Cell Tissue Res* 1993; 274:457-66.
37. Korhonen M, Virtanen I. The distribution of laminins and fibronectins is modulated during extravillous trophoblastic cell differentiation and decidual cell response to invasion in the human placenta. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(4):569-81.
38. King BF, Blankenship TN. Ultrastructure and development of a thick basement membrane-like layer in the anchoring villi of macaque placentas. *Anat Rec* 1994; 238:498-506.
39. Yamaguchi Y, Isemura m, Yosizawa Z, Kurosawa K, Yoshinaga K, Sato A, Suzuki M. Changes in the distribution of fibronectin in the placenta during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 152:715-8.
40. Nanaev AK, Milovanov AP, Domogatsky SP. Immunohistochemical localization of extracellular matrix in perivillous fibrinoid of normal human term placenta. *Histochem* 1993; 100:341-6.
41. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J Biol Chem* 1991; 266:14831-834.
42. Seftor RE, Seftor EA, Stetler-Stevenson WG, Hendrix MJ. The 72kD type IV collagenase is modulated via differential expression of  $\alpha_2\beta_1$  and  $\alpha_1\beta_1$  integrins during human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 1993; 53:3411-15.
43. Kapila YL, Kapila S, Johnson PW. Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. *Matrix Biol* 1996; 15:251-61.
44. Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z. The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell* 1994; 5:439-53.
45. Werb Z, Tremble PM, Behrendtsen O, Crowley E, Damsky CH. Signal transduction through the fibronectin receptor induces collagenase and stromelysin gene expression. *J Cell Biol* 1989; 109:877-89.
46. Zhu BCR, Laine RA. Polylactosamine glycosylation on human fetal placental fibronectin weakens the binding affinity of fibronectin to gelatin. *J Biol Chem* 1985; 260:4041-45.
47. Loke YW, King A. Trophoblasts interaction with extracellular matrix. In: *Human implantation: cell biology and immunology*. Cambridge University Press, 1985: 151-79.
48. Gaus G, Funayama H, Huppertz B, Kaufmann P, Frank HG. Parent cells for trophoblast hybridization I: Isolation of extravillous trophoblast cells from human term chorion laeve. *Trophoblast Res* 1997; 10:181-90.

---

**Geliş Tarihi:** 11.06.2001

**Yazışma Adresi:** Dr. Ayşe Yasemin DEMİR  
Maastricht Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Bölümü  
Maastricht, HOLLANDA