



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

***«Επίδραση της BMP 2 και του ανταγωνιστή της στη
στεροειδογένεση σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα»***

Κλεοπάτρα Ρήγα
Βιολόγος

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2014
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσίνης

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος Αναπληρωτής Καθηγητής

Ασπασία Τσέζου Καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία με θέμα «Επίδραση της BMP 2 και του ανταγωνιστή της στη στεροειδογένεση σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα» πραγματοποιήθηκε, στο πλαίσιο της πτυχιακής εργασίας του μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιολογία της Αναπαραγωγής» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου κ. καθηγητή Ιωάννη Ε. Μεσσήνη για τη συνεχή καθοδήγηση, την αμέριστη υποστήριξη, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις διδακτορικές φοιτήτριες Κατσιάνη Ελένη και Σαμαρά Αθανασία για την πολύτιμη βοήθεια τους σχετικά με το υλικό αλλά και με την διευθέτηση της πτυχιακής μου εργασίας καθώς και τον κ. Ηλία Ζιντζαρά, καθηγητή Βιομαθηματικών-Βιομετρίας για την πολύτιμη βοήθειά του στη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τη συναδελφό μου Χριστίνα Σίνη καθώς και την οικογένειά μου για την καθημερινή τους συμπαράσταση, την υπομονή τους και την θετική τους συμβολή για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη-2 (BMP-2) ανήκει στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού-β (TGF-B). Η BMP-2, εκφράζεται στα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας επηρεάζοντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την παραγωγή των στεροειδών ορμονών.

Η δράση της BMP-2, μέχρι τώρα, έχει μελετηθεί κυρίως σε πειραματόζωα σε ότι αφορά το ρόλο της στη στεροειδογένεση.

Σκοπός της μελέτης ήταν να καθοριστεί η δράση της BMP-2 στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων αλλά και η ανασταλτική δράση του ανταγωνιστή της (Gremlin-1). Προσδιορισμός των επιπέδων της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο υπερκείμενο καλλιεργίων ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε μέσω ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA), μετά την επώαση με διαφορετικές συγκεντρώσεις BMP-2 (0,5ng/ml, 5ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 500ng/ml) και ανταγωνιστή της ορμόνης Gremlin-1 (50ng/ml, 500ng/ml, 1μg/ml, 2μg/ml) για 48 ώρες. Στη συνέχεια καλλιέργειες επωάστηκαν με τη προσθήκη του αναστολέα Gremlin-1 στους εξής συνδυασμούς: ομάδα ελέγχου, BMP-2, BMP-2+ gremlin-1, BMP-2+FSH, BMP-2+gremlin-1+FSH, FSH για 48 ώρες.

Οι στατιστικές αναλύσεις έδειξαν χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ότι BMP-2 τείνει να αυξήσει την παραγωγή της οιστραδιόλης στις καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων που επωάστηκαν για 48 ώρες. Σε ότι αφορά την παραγωγή προγεστερόνης, παρατηρήθηκε πως η BMP-2 αυξάνει την παραγωγή της. Επιπλέον το Gremlin-1 δεν έδωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης αλλά μόνο ενδείξεις ότι αναστέλλει τη δράση της BMP-2 σε συνδυασμό με την FSH.

Η BMP-2 είναι σημαντική για την στεροειδογένεση στην ανθρώπινη ωοθήκη. Συμμετέχει στην ωοθυλακιογένεση, την ωοθυλακιορρηξία και την ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων επηρεάζοντας τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Η παρούσα μελέτη αποτελεί βασική έρευνα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, για να προσδιοριστεί ο ακριβής ρόλος της BMP-2 και να υπάρξει κλινική εφαρμογή της δράσης της.

ABSTRACT

Bone morphogenetic protein -2 (BMP-2) belongs to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily. BMP-7 is expressed in granulosa cells, so she contributes to the developmental stages of ovarian follicles and to the production of steroid reproductive hormones

Nowadays, previous studies have been conducted mostly in laboratory animals in order to examine the role of BMP-2 in ovarian steroidogenesis.

The purpose of this research was to determine the effect of BMP-2 in human steroidogenesis at granulosa cells and the inhibitory action of her antagonist (Gremlin-1). The secreted estradiol and progesterone in the culture of luteinized granulosa cells was estimated using the technique of radioimmunoassay (RIA). The measures become after granulosa cells incubation with different concentrations of BMP-2 (0,5ng/ml, 5ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml, 500ng/ml) and her antagonist Gremlin-1 (50ng/ml, 500ng/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml) for 48 hours. Then, cultures were incubated with antagonist (Gremlin-1) in the following groups: control, BMP-2, BMP-2+ gremlin-1, BMP-2+FSH, BMP-2+gremlin-1+FSH, FSH for 48 hours.

The results demonstrated that BMP-2 has a tendency to increase the production of estradiol in the culture of luteinized granulosa cells. For progesterone, it is observed that BMP-2 increases her production. Furthermore, no statistically significant differences gave the action of Gremlin-1 between groups but only indications that inhibits the activity of BMP-2 when it is combined with FSH. Due to the small number of samples, these differences were not statistically significant.

In conclusion, we inferred that BMP-2 is essential for steroidogenesis in human ovaries. It is able to regulate the levels of estradiol and progesterone during follicular development, ovulation and luteinization. This study is basic research that needs further investigation to determine the exact role of BMP-2 and her clinical relevance

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
1.1 Ωογένεση.....	8
1.2 Στεροειδογένεση.....	10
1.2.1 Η βιολογική δράση των στεροειδών ορμονων.....	12
1.3 Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β ή TGF-β	12
1.4 Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins ή BMPs)	13
1.4.1 Βιολογικός ρόλος των BMPs	13
1.4.2 Ταξινόμηση και δομή των BMPs	14
1.4.3 Υποδοχείς των BMPs	15
1.4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω των BMPs.....	16
1.5 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (BMP 2)	18
1.5.1 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από την BMP-2	19
1.5.2 Ο ρόλος της BMP-2 στη στεροειδογένεση	19
1.6 Εξωκυτταρική ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs	20
1.6.1 Η Dan οικογένεια των ανταγωνιστών.....	20
1.7 GREMLIN : Ο ανταγωνιστής της BMP 2	21
1.7.1 Βιολογικός ρόλος του Gremlin.....	22
1.7.2 Ο ρόλος του Gremlin-1 στα γεννητικά κύτταρα της γυναίκας.....	22
1.8 Η ισομορφή 1 του GREMLIN	23
1.8.1 Ο ρόλος του Gremlin 1 στην αναπαραγωγή.....	24

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ.....	25
2.1 Υλικά και μέθοδοι	25
2.1.1. Τα κοκκώδη κύτταρα	25
2.2 Πειραματικό μέρος.....	25
2.2.1 Διαδικασία απομόνωσης – καθαρισμού των κοκκωδών κυττάρων.....	26
2.2.2 Καταμέτρηση και βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων.....	26
2.2.3 Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις BMP-2 και Gremlin-1 για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης δράσης το.....	28

2.2.4 Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με συνδυασμό ρμονών.....	28
2.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα σημαντικότερα όργανα της αναπαραγωγής είναι οι ωothήκες οι οποίες εμφανίζονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη ως μία πάχυνση του επιθηλίου που καλύπτει τη γεννητική ταινία. Οι κυριότερες λειτουργίες τους είναι η παραγωγή ωαρίων και ορμονών του φύλου για τη γυναίκα (Μεσσήνης 2005).

Ο καταμήνιος κύκλος στην ενήλικη ζωή της γυναίκας εξαρτάται από τα αποτελέσματα που έχουν οι στεροειδείς και μη στεροειδείς ουσίες, οι οποίες παράγονται από τις ωothήκες, στον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση (Messinis, 2006). Τα νευροενδοκρινή υποθαλαμικά κύτταρα εκκρίνουν την υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (gonadotrophin releasing hormone ή GnRH) η οποία επηρεάζει την έκκριση της ορμόνης ωρίμανσης του ωοθυλακίου ή θυλακιοτρόφο ορμόνη (Follicle stimulating hormone ή FSH) καθώς και την ωχρινοτρόφο ορμόνη (Luteinizing hormone ή LH) από τα γοναδοτρόφα κύτταρα της υπόφυσης. Με τη σειρά τους, οι γοναδοτρόφες αυτές ορμόνες ασκούν δράση στις ωothήκες και καθορίζουν τη λειτουργία αυτών καθώς και την έκκριση των ωοθηκικών ορμονών. Αυτές με τη σειρά τους ασκούν θετικές και αρνητικές επιδράσεις στον υποθάλαμο και την υπόφυση (Μεσσήνης 2005).

Οι ουσίες που παράγονται από τις ωothήκες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες. Στη μία κατηγορία ανήκουν οι στεροειδείς οιστραδιόλη (E2), προγεστερόνη (P4), ανδρογόνα και στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν οι μη-στεροειδείς ινχιμπίνη (inhibin), ακτιβίνη (activin), φολλιστατίνη (follistatin) και ο παράγοντας άμβλυνσης των γοναδοτροφινών (GnSAF) (Messinis 2006).

1.1 Ωογένεση

Η ωογένεση είναι μια δυναμική και μη διακοπτόμενη πορεία στις γυναίκες. Ξεκινά από την εμβρυϊκή ζωή και φτάνει μέχρι την εμμηνόπαυση. Τα πρώτα αρχέγονα γεννητικά

κύτταρα εμφανίζονται στο έμβρυο στο ραχιαίο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού και μετατοπίζονται στις γεννητικές κορυφογραμμές (McKD *et al.*, 1953; Smitz & Cortvrindt 2002). Στο έμβρυο εμφανίζονται μετά την 20^η εβδομάδα της κύησης μέσω συνεχών μιτωτικών διαιρέσεων. Κατά τη γέννηση ο αριθμός τους είναι περίπου 1 εκατομμύριο, ο οποίος λόγω ατρησίας φτάνει στις 400 χιλ. κατά την ήβη.

Ένα αρχέγονο ωοθυλάκιο περιέχει ένα μικρό πρωτογενές ωοκύτταρο που βρίσκεται στη φάση της διπλοταινίας στην πρόφαση I της 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης, μια μονή στοιβάδα αποπλατυσμένων ή πλακωδών προκοκκωδών κυττάρων σε στενή επαφή με το ωοκύτταρο και μια βασική μεμβράνη (Μεσσήνης 2005; Oktem & Urman 2010). Στη συνέχεια, τα κοκκώδη κύτταρα παρουσιάζουν αλλαγές στη μορφολογία τους, γίνονται κυβοειδή και έτσι τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια. Λόγω αυτών των αλλαγών, η διάμετρος του ωοθυλακίου αυξάνεται (60μm).

Η ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων συνοδεύεται από εντυπωσιακές αλλαγές στο ωάριο, το οποίο μεγαλώνει σε διάμετρο (μέχρι 120 μm) και περιβάλλεται από πολλούς στοιχείους κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων τα οποία σχηματίζουν την κοκκώδη στοιβάδα. Ο σχηματισμός αυτός ονομάζεται δευτερογενές ωοθυλάκιο και στη φάση αυτή εμφανίζεται για πρώτη φορά η διαφανής ζώνη (Μεσσήνης 2005).

Το δευτερογενές ωοθυλάκιο διακρίνεται σε προκοιλοτικό και σε κοιλοτικό ανάλογα με το αν έχει σχηματιστεί ή όχι κοιλότητα, η οποία ονομάζεται άντρο και στην οποία εναποτίθεται το ωοθυλακικό υγρό το οποίο προέρχεται από τα κοκκώδη κύτταρα. Τα κύτταρα θήκης δημιουργούν μία στιβάδα κυττάρων (έσω και έξω θήκη) περιμετρικά της κοκκώδους στιβάδας και ενδιάμεσα τους σχηματίζεται μία μεμβράνη που ονομάζεται βασική. Κατά την πορεία της ανάπτυξης του ωοθυλακίου διακρίνονται διάφορα επιμέρους στάδια μέχρι το ωοθυλάκιο να γίνει γραφιανό ή προωοθυλακιορρηκτικό ((Μεσσήνης 2005). Τα διάστημα το οποίο απαιτείται για την πλήρη ανάπτυξη του ωοθυλακίου βρέθηκε, σύμφωνα με τις μελέτες του Gougeon 1986, πως αγγίζει περίπου το ένα έτος.

Στα πρώτα στάδια ωρίμανσης του ωοθυλακίου (αρχέγονο έως δευτερογενές), δεν απαιτείται η παρουσία των γοναδοτροφινών. Μέχρι το κοιλοτικό στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων δεν είναι αναγκαία η ύπαρξη των γοναδοτροφινών, αλλά η παρουσία τους επάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (Kumar *et al.*, 1997). Για τη στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και την περαιτέρω ωρίμανσή τους έχει βρεθεί πως συμβάλλουν διάφοροι παράγοντες όπως ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α (TGF-α), η αντιμυλλεριανή ορμόνη (AMH ή MIS), ο

ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), διάφορες νευροτροφίνες, η πρωτεΐνη του ογκογονιδίου του Wilms (WT1), η πρωτεΐνη του νευροβλαστώματος (pRb), το ογκογονίδιο *myc*, ο παράγοντας των βλαστοκυττάρων (SCF) και ο αυξητικός παράγοντας των νευρικών κυττάρων (NGF)] όσο και παράγοντες του ίδιου του ωοκυττάρου με αυτοκρινή δράση, (ο αναπτυξιακός παράγοντας διαφοροποίησης (GDF-9) και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs)] (*Erickson and Shimasaki 2000; Moore and Shimasaki 2005*).

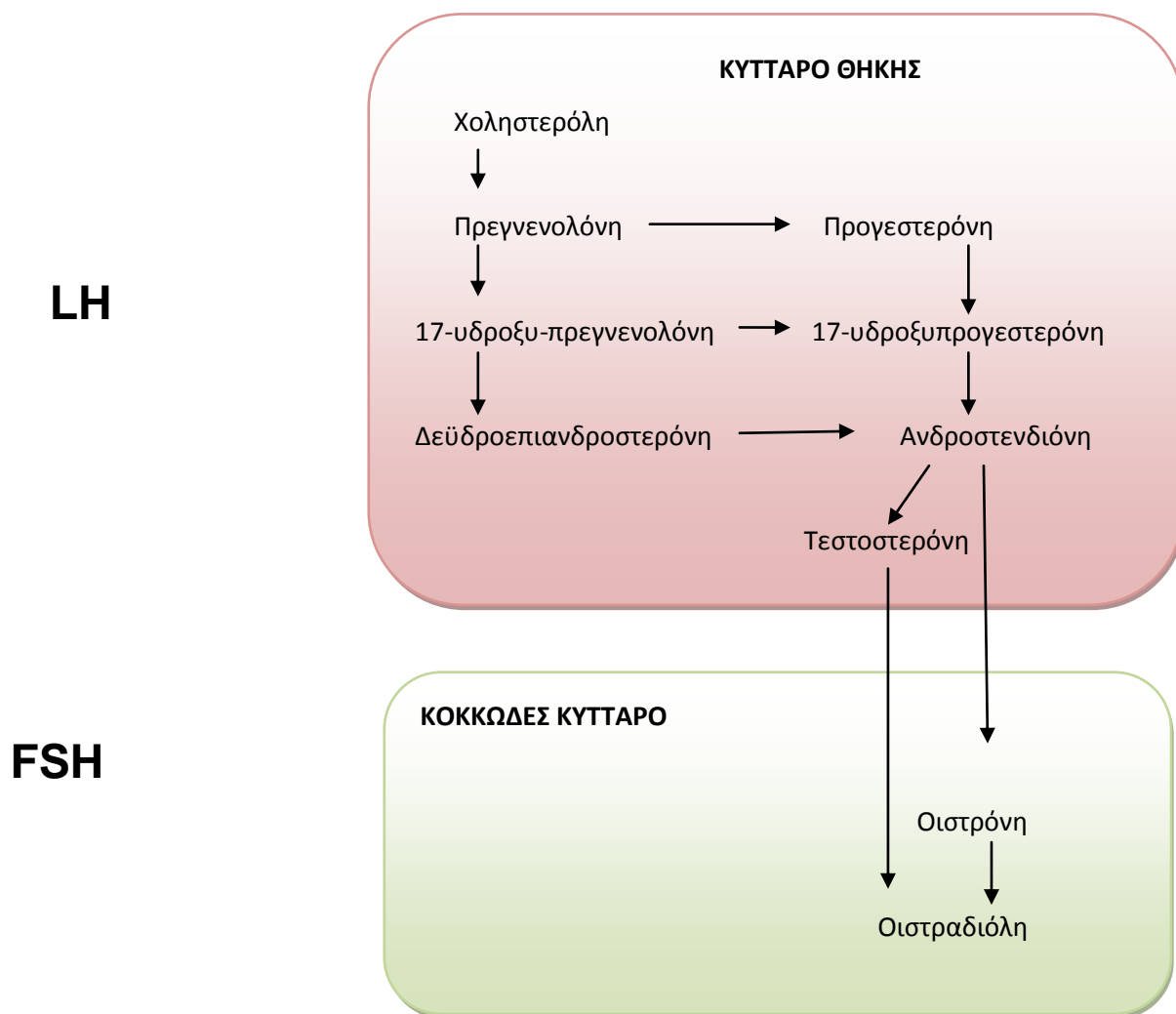
Στα επόμενα στάδια, από το κοιλοτικό μέχρι το προωθυλακιορρηκτικό λαμβάνει χώρα η κυκλική στρατολόγηση των ωοθυλακίων, η οποία σε αντίθεση με την αρχική, εξαρτάται αποκλειστικά από τις γοναδοτροφίνες. Στο τελευταίο αυτό στάδιο ωρίμανσης παρατηρείται αύξηση του όγκου του ωοθυλακικού υγρού, πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων. Η κυκλική στρατολόγηση γίνεται υπό την επίδραση της FSH με σκοπό την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Όσα ωοθυλάκια δε καταφέρνουν να ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης οδηγούνται σε ατρησία. Από τα ωοθυλάκια που θα στρατολογηθούν μόνο ένα το κατάλληλο που θα επιλεγεί για ωοθυλακιορρηξία και θα αποτελέσει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (*Μεσσήνης 2005*). Με την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου, παρουσιάζεται ενδογενής αύξηση της LH (αιχμή της LH) που είναι υπεύθυνη για τη διαδικασία της ωοθυλακιορρηξίας, κατά την οποία το ωοθυλάκιο απελευθερώνεται. Τέλος το ραγέν ωοθυλάκιο υφίσταται ωχρινοποίηση μια διαδικασία που ξεκινάει σταδιακά πριν την ωοθυλακιορρηξία και συνεχίζεται με ανερχόμενη πορεία.

1.2 Στεροειδογένεση

Οι ωοθήκες αποτελούν αδένες με δυνατότητα στεροειδογένεσης. Οι κύριες στεροειδείς ορμόνες που παράγονται είναι η προγεστερόνη, τα ανδρογόνα και τα οιστρογόνα με κύριο την οιστραδιόλη και ακολουθεί η οιστρόνη και η οιστριόλη που παράγονται ύστερα από την επίδραση των γοναδοτροφινών (LH, FSH) της υπόφυσης με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα κύτταρα της θήκης και στα κοκκώδη κύτταρα.

Η διαδικασία αυτή έχει περιγραφεί από τη θεωρία των δύο κυττάρων και δύο γοναδοτροφινών που περιγράφει πώς τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης συνεργάζονται για να συντεθούν τα ωοθηκικά στεροειδή (*Falck 1959*). Τα κύτταρα της θήκης διαθέτουν υποδοχείς για την LH, η οποία ελευθερώνεται από την υπόφυση

(Channing and Kammerman 1974). Η πρόσδεση της στους υποδοχείς επάγει την παραγωγή ανδρογόνων (Craig et al 2011). Τα ανδρογόνα μεταφέρονται στα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία με την επίδραση της FSH παράγουν αρωματάση η οποία αρωματοποιεί τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (17-β οιστραδιόλη, οιστρόνη) (Μεσσήνης 2005).



Εικόνα 1: Η στεροειδογένεση στην ωοθήκη

Η κύρια πρόδρομη ουσία κατά τη στεροειδογένεση είναι η χοληστερόλη που προέρχεται ή από το οξικό οξύ ή από τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (LDLs) (Craig et al 2011). Από το κυτόπλασμα, η χοληστερόλη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια από τις STAR (Strauss et al.1999, Christenson and Strauss 2000, Stocco 2001). Στα μιτοχόνδρια μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη από το κυτόχρωμα P450 cholesterol side-chain cleavage (CYP450scc; CYP11A1; Miller 1998, Hunukoglu 1992). Η

πρεγνενολονη διαχέεται από τα μιτοχόνδρια στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου με τη βοήθεια του ενζύμου 3β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (HSD3B; *Penning 1997*) μετατρέπεται σε προγεστερόνη ή σε DHEA από τη 17α-υδροξυλάση 17,20 δεσμολάση (CYP45017α; CYP17A1). Το HSD3B και το CYP17A1 θα καταλύσουν τη μετατροπή της DHEA και της προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη (*Hunukoglu 1992*). Η ανδροστενδιόνη μπορεί να μετατραπεί είτε σε τεστοστερόνη από την 17β-υδροξυστεροειδική δεϋδρογενάση (HSD17β) στα κύτταρα της θήκης είτε να διαχυθεί στα κοκκώδη κύτταρα. Στα κοκκώδη κύτταρα, η αρωμάτιση (CYP450arom; CYP19A1) μπορεί να μετατρέψει την ανδροστενδιόνη σε οιστρόνη και την τεστοστερόνη σε οιστραδιόλη (*Hunukoglu 1992*).

Επιπλέον τα κοκκώδη κύτταρα μπορούν να μετατρέψουν την οιστρόνη σε οιστραδιόλη μέσω της δράσης της HSD17β (*Penning 1997*) .

1.2.1 Βιολογική δράση των στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες παράγονται από τις ωοθήκες, εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος και μεταφέρονται σε όλον τον οργανισμό. Η παράγωγή τους είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία αρκετών ιστών του γυναικείου οργανισμού όπως η μήτρα, ο μαστός, ο τράχηλος, οι ωαγωγοί, ο σκελετός και ο εγκέφαλος. Κυρίως, σημαντικές είναι οι τοπικές επιδράσεις τους οι οποίες είναι απαραίτητες για την ωοθηκική λειτουργία. Άλλες σημαντικές επιδράσεις των στεροειδών ορμονών εμπλέκουν το μεταβολισμό των πρωτεϊνών των υδατανθράκων και των λιπών, την ισορροπία ύδατος και ηλεκτρολυτών, την πήκτικότητα του αίματος, την ωρίμανση των οστών και την κατανομή του λίπους (*Jamnongjit & Hammes 2006*).

1.3 Αυξητικός παραγοντας μετασχηματισμου β (*Transforming growth factor β ή TGF-β*)

Ο TGF-B ανήκει σε μια υπεροικογένεια αυξητικών παραγόντων η οποία αποτελείται από διάφορες πολυλειτουργικές κυτοκίνες όπως οι TGF-βs, οι ακτιβίνες, οι ανασταλτίνες, η AMH, οι BMPs, η μυστατίνη και άλλες. Οι πρώτες αναφορές κάνουν λόγο

για την ιδιότητα των αυξητικών παραγόντων να επάγουν την αύξηση του νεφρού των ενήλικων ποντικών (Roberts *et al.*, 1981).

Οι TGF- β s εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στην αύξηση και ανάπτυξη τόσο κατά την εμβρυική όσο και κατά την ενήλικη ζωή. Επίσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στη φλεγμονή και στην επιδιόρθωση, περιλαμβάνοντας την αγγειογένεση (Clark *et al.*, 1998).

Η δομή των TGF- β s είναι συντηρημένη. Η ταξινόμηση τους στηρίζεται στον βαθμό διατήρησης της ακολουθίας στο καρβοξυτελικό τμήμα της περιοχής σηματοδότησης (Lyons *et al.*, 1991; Kingsley 1994). Με βάση το κριτήριο αυτό ταξινομούνται οι εξής υποοικογένειες: α) η υποοικογένεια των TGF- β που περιλαμβάνει τις ισομορφές του TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) οι οποίες έχουν παρόμοιες βιολογικές ιδιότητες (Piek *et al.*, 1999), β) η υποοικογένεια των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), που αποτελείται από 20 μέλη, γ) η υποοικογένεια των αυξητικών παραγόντων διαφοροποίησης (GDFs), δ) η υποοικογένεια της ακτιβίνης/ανασταλτίνης. Επιπροσθέτως στην υπεροικογένεια των TGF- β ανήκουν η AMH ή MIS καθώς και ο nodal (Knight *et al.*, 2006).

1.4 Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins ή BMPs)

Το όνομα τους πρώτα δόθηκε το 1965 από τον Urist και τους συνεργάτες του (Urist 1965; Urist *et al.*, 1973). Πρόκειται για φυλογενετικώς συντηρημένα μορία τα οποία ανήκουν στην υπεροικογένεια των TGF- β (Bragdon *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2004). Έχει βρεθεί πως η πως η BMP οικογένεια αριθμεί πάνω από 20 μέλη τα περισσότερα από τα οποία προσδένονται στον τύπο I και II του υποδοχέα του ετεροδιμερούς σερίνης/ θρεονίνη. Η κύρια λειτουργία τους είναι ο σχηματισμός των οστών έχει όμως βρεθεί πως εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση διάφορων ιστών (Chang *et al.*, 2002; Mazerbourg *et al.*, 2005).

Τα τελευταία χρόνια έγιναν μελέτες σε διάφορους οργανισμούς για να μελετηθεί η δράση και η λειτουργία των BMPs και βρέθηκε πως το σύστημα των BMPs αποτελείται από τα ίδια ρυθμιστικά μόρια που παρέμειναν ανέπαφα κατά την εξέλιξη.

1.4.1 Βιολογικός ρόλος των BMPs

Ο ρόλος των BMPs είναι εμφανής στην αναπτυξιακή διαδικασία διάφορων ιστών και οργάνων (Merino *et al.*, 1999). Με την δράση τους ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την χημειοταξία και την απόπτωση σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους

όπως στα επιθηλιακά, μεσεγχυματικά, αιμοποιητικά και νευρικά κύτταρα (Zeisberg *et al.*, 2008). Οι BMPs μπορεί να επιδρούν είτε άμεσα στα κύτταρα στόχους είτε έμμεσα σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία (Macias *et al.*, 1997).

Καθοριστικός είναι ο ρόλος των BMPs στα οστά, στον χόνδρο, στα δόντια, στους νεφρούς, στο δέρμα, στα μαλλιά, στους μυς, στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού και νευρικού συστήματος, στον μεταβολισμό του σιδήρου και στην αγγειακή ομοιόσταση (Derynck *et al.*, 2008). Τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η διερεύνηση του ρόλου των BMPs στο αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών. Πρόκειται για ένα νέο πεδίο έρευνας και φυσικά απαιτούνται αρκετές μελέτες στο μέλλον (Shimasaki *et al.*, 2004).

1.4.2 Ταξινόμηση και δομή των BMPs

Η περιοχή σύνθεσης των BMPs είναι το εσωτερικό του κύτταρου. Αρχικά πρόκειται για μεγάλα και ανενεργά πρόδρομα μόρια τα οποία κουβαλούν ένα N-υδροφοβικό σηματοδοτικό πεπτιδίο το οποίο αποτελείται από 50-100 αμινοξέα και ο ρόλος του είναι να οδηγεί την πρωτεΐνη στο σηματοδοτικό μονοπάτι. Επίσης αποτελείται από μια προ-περιοχή και την ώριμη περιοχή (C-τελικό άκρο) (Miyazono *et al.*, 1988).

Στο σηματοδοτικό πεπτιδίο περιέχεται το σήμα που θα οδηγήσει την πρωτεΐνη στο εκκριτικό μονοπάτι. Έτσι πριν εκκριθεί η προ-πρωτεΐνη, απαιτείται η απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου. Έπειτα, ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα διασπούν την διμερή προ-πρωτεΐνη στην περιοχή RXXR με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας βιολογικά ενεργούς διμερισμένης πρωτεΐνης, η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα (Miyazono *et al.*, 1988).

Στην ώριμη μορφή τους είναι διμερή μόρια που αποτελούνται από 120 αμινοξέα, εκ των οποίων 7 είναι συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Από αυτά τα κατάλοιπα, τα έξι συμμετέχουν στον σχηματισμό του κόμπου κυστίνης και το ένα δημιουργεί μία δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των δύο υπομονάδων για τον σχηματισμό του ομοδιμερούς (Butler *et al.*, 2003; Griffith *et al.*, 2006).

Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί 20 διαφορετικά είδη BMPs τα οποία έχουν κατηγοριοποιηθεί σε υποοικογένειες σύμφωνα με την ομοιότητα που παρουσιάζουν στις αλληλουχίες και τις λειτουργίες τους. Οι υποομάδες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι εξής: BMP-2/-4, BMP-3, BMP-7/OP-1, BMP-9/BMP-10, BMP-11/GDF-8, BMP-12/BMP-13/BMP-14 και BMP-15 (Reddi *et al.*, 1998).

1.4.3 Υποδοχείς των BMPs

Οι BMPs δρουν εφόσον προσδεθούν σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Ο πρώτος υποδοχέας που κλωνοποιήθηκε ήταν ο υποδοχέας της ακτιβίνης (*Mathews et al., 1991*) που αποτελείται από μια περιοχή πρόσδεσης του εξωκυτταρικού συνδέτη, μια μοναδική διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή με ειδικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης.

Διάφορες μελέτες έχουν αποκαλύψει δύο κύριους τύπους μεμβρανοσυνδεόμενων υποδοχέων, αυτούς του τύπου I και αυτούς του τύπου II (*Cheifetz et al., 1987; Cheifetz et al., 1990*). Στους υποδοχείς τύπου I, ανήκουν επτά είδη υποδοχέων (activin receptor-like kinases 1-7 (ALK1-7)). Οι υποδοχείς αυτοί βάση της δομής και της λειτουργίας τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: την BMPR-I ομάδα που περιέχει ALK-3 (BMPR-IA) και ALK-6 (BMPR-IB), την ALK-1 ομάδα που περιέχει την ALK-1 και ALK-2 και την TβR-I ομάδα που περιέχει την ALK-4/ActR-IB, την ALK-5/TβR-I και την ALK-7 (*Kawabata et al., 1998*).

Στους υποδοχείς τύπου II έχουν κλωνοποιηθεί πέντε υποδοχείς: οι BMPR-II που είναι ειδικοί για τις BMP (*Kawabata et al., 1995 ; Liu et al., 1995; Rosenzweig et al., 1995; Nohno et al., 1995*), οι ActR-IIA (*Mathews et al., 1991*) , οι ActR-IIB (*Attisano et al., 1992*) , οι AMHR-II (*Baareeds et al., 1994; di Clemente et al., 1994*) με ειδικότητα για την αντιμυλλέρια ορμόνη και οι υποδοχείς TGFR-II που είναι ειδικοί για τον TGFβ.

Στην υποοικογένεια των BMPs το σύμπλεγμα των υποδοχέων αποτελείται από τους τύπου I (BMPR-IA και BMPR-IB) και τύπου II (BMPR-II) υποδοχείς (*Derynck 1994; Massague et al., 2000; Miyazono et al., 2001*).

Υπάρχουν δύο θεωρίες για το πρότυπο ολιγομερισμού των BMPs υποδοχέων. Η πρώτη θεωρία παρουσιάζει πρότυπο όμοιο με αυτό της ακτιβίνης και της υπεροικογένειας των TGF-β, σύμφωνα με το οποίο το μόριο συνδέτης προσδένεται αρχικά στον υποδοχέα τύπου II ο οποίος με τη σειρά του στρατολογεί τον υποδοχέα τύπου I. Σύμφωνα με τη δεύτερη θεωρία, οι συνδέτες προσδένονται πρώτα στους υποδοχείς τύπου I και μετά στρατολογούνται οι υποδοχείς τύπου II (*Liu et al., 1995 ; Moore et al., 2003 ; Nohe et al., 2002*).

Ο ολιγομερισμός οδηγεί στην φωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του τύπου II (τύπου I) υποδοχέα που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την περιοχή κινάσης του τύπου I (τύπου II) υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση γίνεται στην ενδοκυττάρια GS παραμεμβρανική

περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (*Wrana et al., 1992; Franzen et al., 1993*). Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος οδηγεί στην μετέπειτα μεταφορά του σήματος στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ανάλογα με την κυτταρική σειρά, το «κανονικό» ή το «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs (*Nohe et al., 2002*).

1.4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω των BMPs

Η ενεργοποίηση του υποδοχέα των BMPs οδηγεί στην ενεργοποίηση δύο σηματοδοτικών μονοπατιών, του «κανονικού» και του «μη κανονικού».

Στο BMP-Smad «κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται το μονοπάτι της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών. Οι BMP-s προσδένονται στον υποδοχέα, δημιουργείται ένα ετεροδιμερές σύμπλεγμα των BMPRs και φωσφορυλιώνονται περιοχές του υποδοχέα τύπου II (τύπου I) που είναι πλούσιες σε γλυκίνη/σερίνη. Αυτή η φωσφορυλίωση έχει σαν αποτέλεσμα τη φωσφορυλίωση ενός καταρράκτη σηματοδοτικών πρωτεϊνών της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών (*Miyazono et al., 2000; Heldin et al., 1997; Attisano et al., 2000; ten Dijke et al., 2002*).

Οι Smad που ενεργοποιούνται λόγω της φωσφορυλίωσης από τους υποδοχείς τύπου I είναι οι R-Smad πρωτεΐνες (receptor-activated Smad), οι οποίες περιλαμβάνουν με σειρά ενεργοποίησης τις Smad1,2,3, 5 και 8. Αυτές οι Smad πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και με τη σειρά τους δημιουργούν σύμπλοκο με την Smad4 πρωτεΐνη (common-partner Smad ή Co-Smad πρωτεΐνη) (*Lagna et al., 1996; Liu et al., 1997; Nishimura et al., 1998*).

Το σύμπλοκο R-Smad/Co-Smad που θα ενεργοποιηθεί περιέχει περιοχές με παρόμοια αλληλουχία αμινοξέων στο αμινο-τελικό και καρβοξυ-τελικό άκρο που ονομάζονται αντίστοιχα MH1 και MH2. Μετά την μετατόπιση του συμπλόκου στον πυρήνα προσδένεται με την MH1 περιοχή στις ειδικές αλληλουχίες (GCCG για τις Smad1 και TGTGC για τις Smad5) του DNA του γονιδίου στόχου. Η πρόσδεση αυτή οδηγεί στη ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων του γονιδίου στόχου (*Kusanagi et al., 2000; Lu et al., 2001*).

Η ενδοκυττάρια ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων γίνεται με τους συνενεργοποιητές (p300, OAZ, SMIF) και με τους συναναστολείς (Ski πρωτεΐνες, SNIP1 και

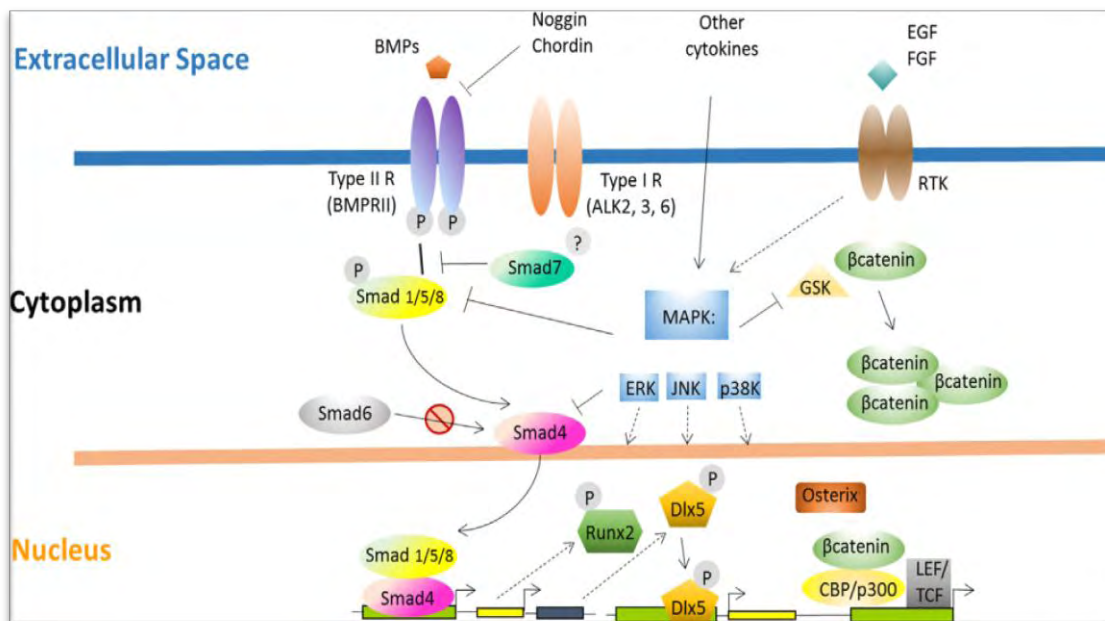
η πρωτεΐνη Tob) που ρυθμίζουν τους μεταγραφικούς παράγοντες θετικά ή αρνητικά αντίστοιχα . Η ρύθμιση γίνεται σύμφωνα με τον τύπο του συνεργοποιητή ή του συναναστολέα ο οποίος αντιδρά με την MH1 ή MH2 περιοχή του συμπλόκου (*Itoh et al., 2000; Miyazono et al., 2001;ten Dijke et al., 2002..*

Τέλος υπάρχουν ειδικές Smad πρωτεΐνες οι οποίες προσδένονται στα σηματοδοτικά μόρια της οικογένειας των Smad και αναστέλλουν την φωσφορυλίωση τους. Οι Smad6 και Smad7 πρωτεΐνες ανταγωνίζονται την φωσφορυλίωση των Smad1, Smad5 και Smad8 μέσω δράσης στον υποδοχέα τύπου II και έχουν αναγνωριστεί ως Smad αναστολείς (inhibitory Smad ή I-Smad). Επίσης, η Smad6 αναστέλλει την πρόσδεση της Smad4 στην Smad1 με αποτέλεσμα να μην δημιουργείται το σύμπλοκο R-Smad/Co-Smad (*Negarajan et al., 1999;Ishida et al., 2000*).

Στο BMP-MAPK «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι ενεργοποιείται ο BMP-μιτογόνος ενεργοποιητής των πρωτεϊνικών κινασών (BMP-mitogen- activated protein kinase ή BMP-MAPK) (*Heldin et al., 1997;Massague 1998;Itoh et al., 2000;von Bubnoff et al., 2001*). Η ενεργοποίηση αυτή γίνεται με τον ίδιο τρόπο όπως στο σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών

Με την ενεργοποίηση το σύμπλεγμα, το σήμα μεταφέρεται στην ενδοκυττάρια πρωτεΐνη μετασχηματισμού XIAP, η οποία συνδέει τον BMP υποδοχέα με την πρωτεΐνη TAB1. Αυτήν με την σειρά της, θα ενεργοποιήσει την ακόλουθη πρωτεΐνη TAK1 (*Yamaguchi et al., 1999*).

Τέλος η TAK1 μπορεί να ενεργοποιήσει δύο σηματοδοτικά μονοπάτια. Το ένα μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω του NLK μορίου (Nemo-like kinase) το οποίο αποτελεί μέλος των MAP κινασών και αναστέλλει την φωσφορυλίωση των TCF-/Lef-1 μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους θα αναστείλουν την μεταγραφή του Wnt/ β -catenin γονιδίου, που συμμετέχει στην αναπτυξιακή διαδικασία και στην καρκινογένεση (*Ishitani et al., 1999*). Το άλλο σηματοδοτικό μονοπάτι που μπορεί να ενεργοποιηθεί είναι αυτό των του p38 μιτογόνου ενεργοποιητή των κινασών με το Erk1/2 και JNK μονοπάτι, που επάγει την απόπτωση στα κύτταρα.



Εικόνα 2: Σηματοδοτικά μονοπάτια των BMPs (Carreira et al., 2014)

1.5 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (BMP-2)

BMP-2 είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη μέλος της υπερικογένειας των TGF-β. Αρχικά συντίθεται ως προ-πρωτεΐνη που γλυκοσυλιώνεται, διασπάται από πρωτεολυτικά ένζυμα και διμερίζεται για να δώσει την ώριμη ομοδιμερή προ-πρωτεΐνης που αποτελείται από 114 C-τελικά άκρα. Όπως και όλα τα μέλη της οικογένειας TGF-β, η BMP-2 περιέχει το συντηρημένο μοτίβο αναδίπλωσης της κυστίνης (McDonald & Hendrickson, 1993; Murray-Rust et al., 1993). Η αλληλουχία που προηγείται της κυστίνης της BMP-2, έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στην πρόσδεση της ηπαρίνης (Koenig et al., 1994; Ruppert et al., 1996). Σε αντίθεση με τους TGF-β παράγοντες, αυτή η αλληλουχία δεν συνδέεται ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη πυρήνα με δισουλφιδική γέφυρα. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι, η αλληλουχία αμινοξέων της BMP-2 δείχνει 92% ταυτόσημη με εκείνη της BMP-4 (Newfeld et al., 1997).

Η BMP-2, όπως οι υπόλοιπες BMPs, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των οστών και του χόνδρου (Chen et al., 2004). Έχει βρεθεί πως εμφύτευσή της σε κολλαγόνο χόνδρου προάγει τη δημιουργία νέου οστού (Geiger et al., 2003). Μαζί με την BMP-7 είναι οι κύριες οστεοεπαγωγικές BMPs οι οποίες προάγουν τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών σε ποικιλία κυτταρικών τύπων (Marie et al., 2003).

Τα τελευταία χρόνια η BMP-2 έχει αρχίσει να κερδίζει έδαφος και στον τομέα της Οδοντιατρικής (*Allegrini et al., 2004; Schlegel et al., 2006; Schliephake et al., 2005*).

1.5.1 Σηματοδοτικό μονοπάτι που ενεργοποιείται από την BMP-2

Η BMP-2 αρχικά προσδένεται σε υποδοχείς τύπου I όπως ο BMPR1A και IB (ή όπως αλλιώς ονομάζονται ALKs 3 και 6). Στη συνέχεια, στρατολογείται τύπος υποδοχέα II, όπως ο BMPR2, στο σύμπλεγμα και φωσφορυλιώνει τους υποδοχείς τύπου I (*Miyazono et al., 1999; Allendorph et al., 2006*).

Οι ενεργοποιημένοι τύπου I υποδοχείς με τη σειρά τους φωσφορυλιώνουν κάποιες ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, με τις SMAD1,5 και 8 από τις πιο χαρακτηριστικές. Άλλες φωσφορυλιωμένες R-SMADS σχηματίζουν ετεροδιμερή συμπλέγματα με τη SMAD-4. Στη συνέχεια συσσωρεύονται στον πυρήνα και δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες οι οποίοι ενεργοποιούν ή καταστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (*Massague et al., 2005; Miyazono et al., 1999; Miyazawa et al., 2002*).

1.5.2 Ο ρόλος της BMP-2 στη στεροειδογένεση

Μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα χοίρων και βοοειδών έδειξαν πως η BMP-2 προκαλούσε καταστολή της παραγωγής της προγεστερόνης (*Brankin et al., 2005; Glister et al., 2004*). Αναστολή της παραγωγής της επαγόμενης από FSH προγεστερόνης προκλήθηκε και σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών (*Inagaki et al., 2009*) και όρνιθων (*Morgan et al., 2010*). Αντιθέτως, φάνηκε πως προκαλεί αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων προβάτων (*Souza et al., 2002*).

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ανθρώπινη ωοθήκη, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το BMP-2 mRNA ανιχνεύτηκε σε πολύ μικρή ποσότητα στα αρχέγονα, πρωτογενή και δευτερογενή ωοθυλάκια ενώ παρατηρήθηκε σε μεγάλη έκφραση στα κοκκώδη κύτταρα ωοθυλακίων με άντρο. Στο ωχρο σωματίο η έκφρασή του ήταν πολύ χαμηλή. Η αποκλειστική έκφραση της BMP-2 στα ωοθυλάκια με άντρο οδηγεί εύλογα στο συμπέρασμα πως προωθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και αποτρέπει την πρόωγη ωχρινοποίηση ενώ η εξαφάνιση της έκφρασής της από το ωχρο σωματίο διευκολύνει την ωχρινοποίηση (*Shi et al., 2011*).

Στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα βρέθηκε πώς η BMP-2 αυξάνει τους υποδοχείς της FSH και την έκφραση του mRNA της αρωματάσης. Το γεγονός αυτό αυξάνει τη μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της οιστραδιόλης. Αντιθέτως, η BMP-2 μειώνει σημαντικά τους υποδοχείς της LH και την παραγωγή του ενζύμου StAR και συνεπώς μείωση της προγεστερόνης (Shi et al., 2011). Η μείωση της προγεστερόνης και γενικότερα των ανδρογόνων σχετίζεται με την μειωμένη συγκέντρωση της χοληστερόλης (μειωμένη StAR), η οποία δεν μεταφέρεται από το εξωτερικό των μιτοχονδρίων στο εσωτερικό τους ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στην στεροειδογένεση (Lee et al., 2001).

Συμπερασματικά, η BMP-2 ελέγχει τη σύνθεση των στεροειδών ορμονών στα κοκκώδη κύτταρα μέσω ρύθμισης τοπικών παραγόντων και ενδοκρινικών συστημάτων. Η έκφρασή της στα κοκκώδη κύτταρα προάγει την ωοθυλακική ανάπτυξη και αναστέλλει την πρόωγη ωχρινοποίηση και έτσι εμπλέκεται επιτυχώς στη μετάβαση από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο στο ωχρό σωματίο.

1.6 Εξωκυττάρια ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs

Υπάρχουν μόρια ανταγωνιστές τα οποία προσδένονται στις εξωκυττάρια BMPs και εμποδίζουν το σηματοδοτικό μονοπάτι αυτών. Έχουν ταυτοποιηθεί κάποιοι εξωκυτταρικοί υποδοχείς, οι οποίοι είναι : ο noggin, η χορδίνη (chordin), η φολλιστατίνη (follistatin) και το γονίδιο που σχετίζεται με την φολλιστατίνη (follistatin and follistatin related-gene), το ventroptin, τα γονίδια twisted gastrulation, τα γονίδια της οικογένειας των Dan/Cerberus, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Dan, το gremlin και το ομόλογο της στα ποντίκια drm, η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το Dan/Cerberus (PRDC), το caronte, το Dante (Dte) και το sclerastin (SOST) (Smith et al., 1992; Velenzuela et al., 1995; Zimmerman et al., 1996; Piccolo et al., 1996; Topol et al., 1997; Hsu et al., 1998; Minabe Saegusa et al., 1998; Stanley et al., 1998; Pearce et al., 1999; Piccolo et al., 1999; Tsuchida et al., 2000; Aspenberg et al., 2001; Ray et al., 2001; Sakuta et al., 2001; van Bezooijen et al., 2002).

1.6.1 Η Dan οικογένεια των ανταγωνιστών

Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma είναι μια οικογένεια εκκριτικών γλυκοπρωτεϊνών ικανές να προσδένουν τις BMPs. Έχουν βρεθεί

επτά μέλη αυτής της οικογένειας : Dan, cerberus, PRDC, dante, caronte, gremlin/ drin και sclerostin/ SOST (De Roberts, 1999 ; Stanley et al., 1998 ; Topol et al., 1997; Minabe-Saegusa et al., 1998 ; Pearce et al., 1999; van Bazooijen et al., 2002; Yokouchi et al., 1999).

Τα πεπτιδία της Dan οικογένειας παρουσιάζουν ομολογία, μια καρβοξυτελική περιοχή CR η οποία δημιουργεί ένα λειτουργικό μοτίβο στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών που ονομάζεται κόμπος κυστίνης (Pearce et al., 1999). Η δομή αυτή βοηθά να γίνεται η αναδίπλωση της πρωτεΐνης σε τέτοιο βαθμό ώστε κάποια τμήματα με υδρόφοβα κατάλοιπα να αλληλεπιδρούν και να διευκολύνουν στον σχηματισμό όμο- ή έτερο- διμερών καθώς και άλλων ποικίλων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – πρωτεΐνης (Vitt 2001).

Τα μέλη της οικογένειας Dan προσδένουν τη BMP-2 και 4 και έχουν την ικανότητα να αναστέλλουν τη BMP σηματοδότηση η οποία σε φυσιολογική κατάσταση θα αλληλεπιδρούσε με τον υποδοχέα της και θα οδηγούσε στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της (Canalis et al., 2003).

1.7 Gremlin: Ο ανταγωνιστής της BMP-2

Το Gremlin είναι μία γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 20.7 kDa και αποτελεί μέλος της differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma (DAN)/cerberus οικογένειας των BMP ανταγωνιστών.

Είναι υψηλά συντηρημένη και αρχικά αναγνωρίστηκε σαν ένας αντι-BMP παράγοντας για την ανάπτυξη του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα σε έμβρυα Xenopus (Canalis et al., 2003; Hsu et al., 1998) που παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, αύξηση και διαφοροποίηση.

Το gremlin παρουσιάζει τρεις ισομορφές: την ισομορφή 1 (gremlin-1), την ισομορφή 2 (gremlin-2) και την ισομορφή 3 (gremlin-3). Η πιο διαδεδομένη είναι η ισομορφή 1 και διαφέρει από τις άλλες δύο ισομορφές, λόγω των ελλείψεων που εμφανίζουν οι τελευταίες στα αμινοξέα 39-79 και 10-79, αντίστοιχα (Stanley et al., 1998; Merino et al., 1999; Lappin et al., 2000).

1.7.1 Βιολογικός ρόλος του *Gremlin*

Η δράση του *gremlin* είναι σημαντική κατά στην διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των διαφορετικών τμημάτων ενός ιστού.

Από τις κυριότερες λειτουργίες του κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι η εμπλοκή του στη σκελετική ανάπτυξη και την ανάπτυξη της οστικής μάζας (*Wu et al., 2003; Sutherland et al., 2004; Winkler et al., 2004; Gazzero et al., 2005*).

Το *gremlin* παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη δράση των BMPs και δρα κατά την ανάπτυξη της νευρικής πλάκας (*Hsu et al., 1998*). Μελέτες σε κοτόπουλα, έδειξαν ότι το *gremlin* ρυθμίζει την ανάπτυξη των άκρων τους (*Merino et al., 1999*).

Επίσης, συμμετέχει και στην ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων λόγω της ικανότητάς του να ελέγχει το σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs στην ωρίμανση των παραπάνω κυττάρων (*Passa et al., 2011*).

Τέλος το *gremlin* έχει βρεθεί πως σχετίζεται με κάποιες ασθένειες όπως, σχετίζεται και με κάποιες σημαντικές ασθένειες όπως η διαβητική νεφροπάθεια (*McMahon et al., 2000; Koli et al., 2006; Dolan et al., 2005; Walsh et al., 2008*) και η πνευμονική ίνωση όπου βρέθηκε υπερέκφραση του σε ποντίκια τα οποία έπασχαν από την ασθένεια αυτή (*Myllarniemi et al., 2008*).

1.7.2 Ρόλος του *gremlin* στα γεννητικά κύτταρα γυναίκας

Μελέτη σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών ενισχύει το ρόλο του *gremlin* στην ωοθυλακιογένεση. Η έκφραση του *gremlin* ήταν αυξημένη κυρίως στο δευτερογενές ωοθυλάκιο ενώ μειώνονταν σε όλα τα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης του. Στα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που γειτνιάζουν με το ωοκύτταρο η παρουσία του *gremlin* ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου. Σημαντικό είναι ότι ανεξάρτητα από την ανταγωνιστική δράση του *gremlin* στις BMPs, οι ίδιες επάγουν την παραγωγή του (*Pangas et al., 2004*). Συγκεκριμένα βρέθηκε σε κοκκώδη κύτταρα ποντικού και σε οστεοβλάστες βοοειδών πως η BMP-2 προκαλεί η ίδια την έκφραση του ανταγωνιστή της (*gremlin*).

Σε μια άλλη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ωοθυλάκια βοοειδών βρέθηκε ότι καθώς τα κοιλοτικά ωοθυλάκια αυξάνονταν σε μέγεθος, μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό

στάδιο, η ποσότητα του gremlin μειωνόταν προοδευτικά. Αυτό οδήγησε στο συμπέρασμα πως πριν την επιλογή των ωοθυλακίων, τα μικρού μεγέθους ωοθυλάκια με άντρο εμφανίζουν τη μέγιστη ποσότητα του gremlin όπου με την περαιτέρω ανάπτυξη τους η συγκέντρωση του φθίνει.

Υψηλή έκφραση του gremlin παρατηρείται τόσο στα κοκκώδη κύτταρα όσο και στα κύτταρα θήκης των μεγάλων ωοθυλακίων, ανεξάρτητα από τη παρουσία οιστρογόνων .

Στην ίδια μελέτη προσδιορίστηκε η επίδραση της LH στην παραγωγή του gremlin σε κύτταρα θήκης. Το αποτέλεσμα που βρέθηκε ήταν πως η LH σε συνδυασμό με τις BMPs επάγει την έκφραση του gremlin (*Glister et al., 2011*).

Σε μία άλλη μελέτη, σε κύτταρα θήκης βοοειδών μελετήθηκε η δράση των ανταγωνιστών, περιλαμβανομένου και του gremlin, στην παραγωγή ανδροστενδιόνης. Ο ανταγωνιστής βρέθηκε να αυξάνει τη παραγωγή της ανδροστενδιόνης των κυττάρων (*Glister et al., 2005*).

Σύμφωνα με τις παραπάνω μελέτες φαίνεται πως οι ανταγωνιστές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, όμως επιπλέον έρευνες απαιτούνται για τη πλήρη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους.

1.8 Η ισομορφή 1 του gremlin (*Gremlin-1*)

Αποτελεί μια από τις τρεις ισομορφές του γονιδίου της gremlin στον άνθρωπο (*gremlin-1*) που χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 15 στην περιοχή q13-q15 (*Topol et al., 1997; Topol et al., 2000*).

Σχηματίζει ετεροδιμερή με τις BMP-2, 4, 7 και αναστέλλει την πρόσδεσή τους στην κυτταρική επιφάνεια (*Stanley et al., 1998 ; Merino et al., 1999; Lappin et al., 2000*). Είναι σημαντικός ο ρόλος του στη ρύθμιση των BMPs κατά την ανάπτυξη του πνεύμονα, άκρων και των νεφρών καθώς και στη διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής ακρολοφίας (*Lu et al., 2001 ; Shi et al., 2001*).

Επιπλέον έχει βρεθεί από μελέτες πως το GREM-1 αλληλεπιδρά με την πρόδρομη BMP-4 πρωτεΐνη και υποεκφράζει την BMP-4 μεσολαβούμενη σηματοδότηση στους εμβρυονικούς πνεύμονες (*Sun et al., 2006*). Έχει επίσης βρεθεί πως προσδένει τον

αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF) και ρυθμίζει την αγγειογένεση (*Mitola et al., 2010*).

Τέλος, το GREM-1 φαίνεται να υπερεκφράζεται σε πολλούς ανθρώπινους όγκους όπως ο καρκίνος του τραχήλου, ενδομητρίου, πνεύμονα, ωοθηκών, νεφρών, μαστού, εντέρου και παγκρέατος χωρίς όμως να είναι ακόμα πλήρως κατανοητός ο ακριβής ρόλος του σε όλες αυτές τις περιπτώσεις (*Namkoong et al., 2006; Sha et al., 2009*).

1.8.1 Ο ρόλος του gremlin-1 στην αναπαραγωγή

Σε μια πρώτη μελέτη που έγινε σε γυναίκες με μειωμένες ωοθηκικές εφεδρείες βρέθηκε συσχέτιση του gremlin-1 σε κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε περίπου τρεις φορές περισσότερο μειωμένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου σε σχέση με φυσιολογικές γυναίκες (*Jindal et al., 2012*).

Σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας από αυτήν της αναπαραγωγής, το gremlin-1 έχει συσχετιστεί με την καλή αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων τους (*Anriaenssens et al., 2011*). Συμπερασματικά, το gremlin-1 παίζει σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακική ανάπτυξη και στην ωοκυτταρική λειτουργία αλλά είναι αναγκαίο να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος του στο ωοθυλάκιο και στην γυναικεία αναπαραγωγική φυσιολογία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδραση της BMP-2 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων.

2.1 Υλικά και μέθοδοι

2.1.1 Τα κοκκώδη κύτταρα

Ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα 3 γυναικών ηλικίας 20 έως 40 ετών χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της στεροειδογένεσης έπειτα από τη δράση της BMP-2 και του αναστολέα της Gremlin-1 σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων. Τα κοκκώδη κύτταρα απομονώνονταν από το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που υποβάλλονταν σε πρωτόκολλα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στις γυναίκες αυτές γινόνταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση χορηγώντας ανασυνδυασμένη FSH, GnRH αγωνιστή καθώς και hCG, για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων 36 ώρες πριν την ωοληψία. Αξίζει να επισημάνουμε ότι η χρησιμοποίηση του ωοθυλακικού υγρού των γυναικών γίνονταν με την πλήρη συγκατάθεση τους.

2.2 Πειραματικό μέρος

Η συλλογή του ωοθυλακικού υγρού πραγματοποιούνταν με την τεχνική της ωοληψίας. Τα κοκκώδη κύτταρα που εμπεριέχονταν σε αυτό απομονώνονταν με τη μέθοδο της καθίζησης, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Hillier και των συν., (Hillier 1991). Μετά από την κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος, απομακρύνονταν με διαδοχικά ξεπλύματα τα στοιχεία του αίματος και οι υπόλοιπες προσμίξεις του ωοθυλακικού υγρού (καθαρισμός των κυττάρων) και έπειτα γίνονταν η καθίζηση μόνο των επιθυμητών κοκκωδών κυττάρων (καθίζηση) (Hillier et al 1991). Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες.

Διαδικασία απομόνωσης - καθαρισμού των κοκκωδών κυττάρων

1. Το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που είχε συλλεχθεί, κατανέμεται ανά 6ml σε πλαστικά σωληνάρια χωρητικότητας 15ml και αραιώνεται με φωσφορικό αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffered Saline ή PBS, Thermo Scientific) σε αναλογία 3 προς 1. Το PBS έχει την ικανότητα να συμπαρασύρει και να απομακρύνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθώς και τους υπόλοιπους ανεπιθύμητους παράγοντες του ωοθυλακικού υγρού.
2. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία, προκειμένου να καθιζάνουν τα κοκκώδη κύτταρα και να δημιουργηθεί ίζημα κυττάρων.
3. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου, στο οποίο υπάρχουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οι διάφορες προσμίξεις του ωοθυλακικού υγρού. Το ίζημα που απομένει επαναδιαλύεται σε PBS και συγχρόνως γίνεται χειροκίνητος καθαρισμός του διαλύματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 5 φορές και ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση για 10λεπτά στις 800στροφές/λεπτό.
4. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο 199 (Biochrom AG). Το οποίο εμπεριέχει 10% FBS (Fetal Bovine Serum ή FBS, Biochrom AG) 2% γλουταμίνη (Sigma USA) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη (Sigma USA).
5. Τέλος, γίνεται η μέτρηση των κοκκωδών κυττάρων και η εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους.

2.2.2 Καταμέτρηση και Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων

1. Ισοποσότητες του κυτταρικού εναιωρήματος και χρωστικής μπλε του τρυπανίου (trypan blue, Gibco Intrivogen) χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των κυττάρων. Το μπλε του τρυπανίου διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και χρωματίζει μπλε τα κύτταρα. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση πλάκας Neubauer, και μικροσκοπίου αντίθετης φάσης.
2. Τα κοκκώδη κύτταρα καταμετρούνται στα τέσσερα χαρακτηριστικά πεδία της πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων καθώς και η βιωσιμότητά τους ως εξής:

Πεδίο	A	B	Γ	Δ	Μέσος όρος
Αριθμός ζώντων κυττάρων	α	β	Γ	δ	$Z = \frac{\alpha + \beta + \gamma + \delta}{4}$
Αριθμός νεκρών κυττάρων	ε	ζ	Η	θ	$N = \frac{\varepsilon + \zeta + \eta + \theta}{4}$
Συνολικός αριθμός κυττάρων	$\Sigma = \alpha + \beta + \gamma + \delta + \varepsilon + \zeta + \eta + \theta$				

Αριθμός κυττάρων/ml:

Μέσος όρος ζώντων κυττάρων(Z) x συνολικό όγκο (ml) των κυττάρων στο σωλήνα x αραιώση (=2) x 10^4

Αριθμός κυττάρων στο δείγμα:

Κύτταρα/ml x αρχικό όγκο εναιωρήματος των κυττάρων στο σωλήνα

Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων (%):

$$\frac{\text{Μέσος όρος ζώντων κυττάρων (Z)}}{\text{Συνολικό αριθμό των κυττάρων (Σ)}} \times 100$$

Πίνακας 1: Καταμέτρηση και Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων

- Τα κύτταρα διαμοιράζονται σε τρυβλία πλάκας 24θέσεων. Η συγκέντρωση των κυττάρων ανά τρυβλίο είναι 75000/ml. Οι καλλιέργειες επωάζονται σε συνθήκες 37° C και 5% CO₂.

2.2.3 Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με διαφορετικές συγκεντρώσεις BMP-2 και Gremlin-1 για προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσής δράσης τους στην παραγωγή 17-β οιστραδιόλης και προγεστερόνης:

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης δράσης της BMP-2 και του gremlin-1 στην παραγωγή 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης έγιναν δοκιμές των παρακάτω συγκεντρώσεων σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων για 48 ώρες.

BMP-2	BMP-2+ Gremlin-1
0,5 ng/ml	Control
5 ng/ml	BMP-2(50ng/ml)
50 ng/ml	BMP-2+Gremlin-1(500ng/ml)
100 ng/ml	BMP-2+Gremlin-1(1μg/ml)
500 ng/ml	BMP-2+Gremlin-1(2μg/ml)

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις ορμονών σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων

Τα αποτελέσματα της στατιστικής μελέτης της ραδιοανοσοδοκιμασίας δεν έδειξαν ιδιαίτερες στατιστικές διαφορές στις διάφορες συγκεντρώσεις της BMP-2 και του gremlin-1 στην παραγωγή της 17β-οιστροδιόλης και της προγεστερόνης. Οι συγκεντρώσεις τις οποίες επιλέξαμε για την συνέχεια του πειράματος ήταν για την BMP-2 50ng/ml και για το gremlin-1 1μg/ml οι οποίες ήταν σύμφωνες με τις βιβλιογραφικές αναφορές. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS 17.0.

2.2.4. Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με συνδυασμό ορμονών:

1. Οι καλλιέργειες υποβάλλονται σε προ-επώαση 48 ωρών στον κλίβανο με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό ώστε να προωθηθεί η επικόλληση και η ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια καλλιέργειας.

2. Με το τέλος της προ-επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο μέσο καλλιέργειας ελεύθερο ορού στο οποίο προστίθεται ανδροστενδιόνη (A4) σε συγκέντρωση 0.1M (A₄, Sigma USA), ως υπόστρωμα αρωματοποίησης.
3. Οι καλλιέργειες διαχωρίστηκαν στις παρακάτω ομάδες:

Συνδυασμοί ορμονών
Control (ομάδα ελέγχου A4)
BMP-2 (50ng/ml)
BMP-2 (50ng/ml) + Gremlin-1(1μg/ml)
BMP-2 (50ng/ml)+ FSH (10ng/ml)
BMP-2 (50ng/ml) + Gremlin-1(1μg/ml + FSH (10ng/ml)
FSH (10ng/ml)

Πίνακας 3: Συνδυασμοί ορμονών στις καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων

4. Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν στον κλίβανο για 48 ώρες.
5. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος, συλλέγονταν το υπερκείμενο για τη μέτρηση της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης με τη μέθοδο RIA.

2.3 Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων της BMP-2 και του gremlin-1 χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) καθώς και t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές. Δεδομένου ότι οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μελέτης δεν ήταν ανεξάρτητες γίνονταν συγχρόνως πολλαπλές συγκρίσεις και μετά-αναλύσεις με τη στάθμη σημαντικότητας (P) να διορθώνεται κατά Bonferroni. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζονταν ως $\alpha=5\%$. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS 17.0.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα που πήραμε μετά τη ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης δράσης της BMP-2 και του gremlin-1 στην παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης και προγεστερόνης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα:

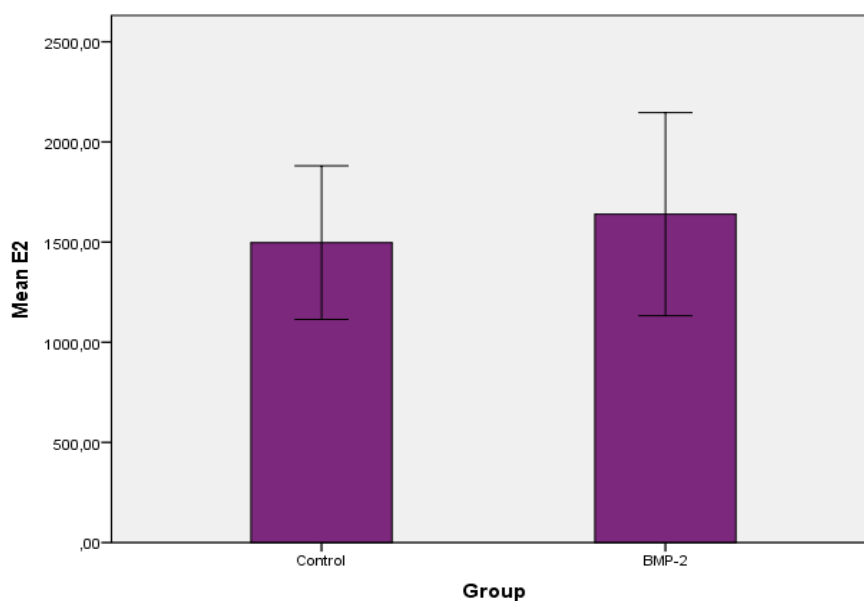
Group		Οιστραδιόλη (E2)	Προγεστερόνη (P4)
	Control	1317	140
		1373	80
		2217	188
BMP-2	0.5ng/ml	2200	60
		1030	100
		1597	182
BMP-2	5ng/ml	2147	510
		1435	140
		1627	164
BMP-2	50ng/ml	2190	506
		1100	80
		1595	150
BMP-2	100ng/ml	2564	428
		1142	520
		1605	148
BMP-2	500ng/ml	2021	540
		764	76
		1573	128
BMP-2	50ng/ml	1371	146
		1144	60
		1988	122
BMP-2 + Gremlin	gremlin (500ng/ml)	1301	172
		848	60
		2095	134
BMP-2 + Gremlin	gremlin (1μg/ml)	1321	143
		1192	83
		2160	176
BMP-2 + Gremlin	gremlin (2μg/ml)	1339	186
		1010	144
		2459	197

Πίνακας 4: Αποτελέσματα ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA)

❖ *t-test* για την ομάδα ελέγχου και την BMP-2 ως προς την έκκριση :

α) 17β-οιστραδιόλης

Group		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
E2	Control	3	1497.6667	383.48186	221.40335
	BMP2	15	1639.3333	507.29967	130.98421

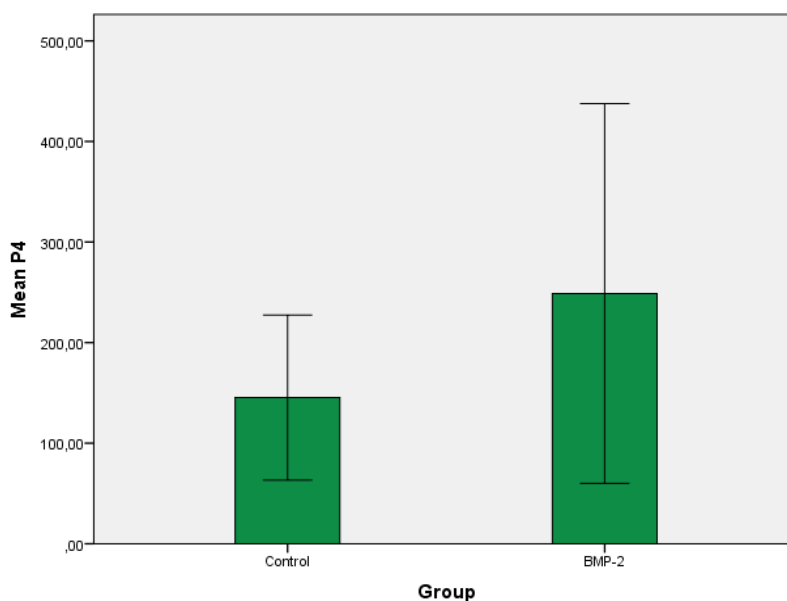


Εικόνα 3: Συσχέτιση της επίδραση της BMP-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στην παραγωγή της οιστραδιόλης (pg/ml).

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται μικρή αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης μετά την επίδραση με BMP-2 (1639,3pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (1497,7pg/ml) της τάξης του 9,4%.

β) προγεστερόνης

	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
P4	Control	3	145.3333	82.00813	47.34742
	BMP2	15	248.8000	188.78983	48.74532



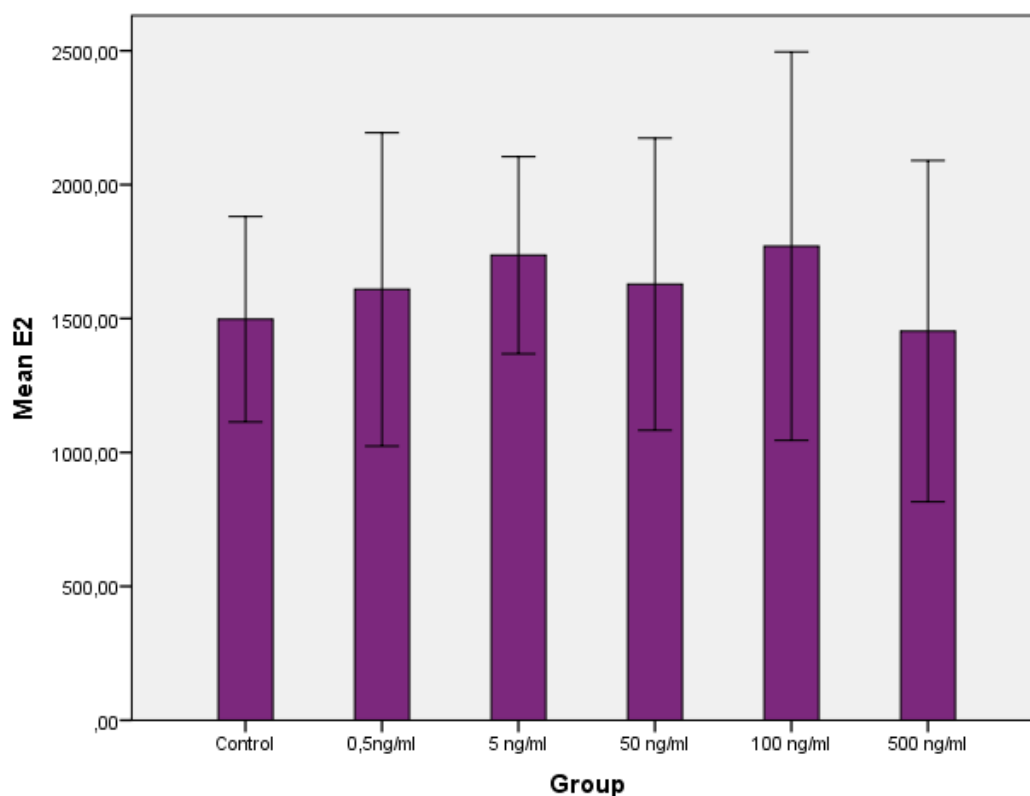
Εικόνα 4: Συσχέτιση της επίδραση της BMP-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου στην παραγωγή της προγεστερόνης (pg/ml).

Από το παραπάνω διάγραμμα φαίνεται αύξηση στην παραγωγή της προγεστερόνης μετά την επίδραση με BMP-2 (248,8pg/ml) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (145,3 pg/ml) της τάξης του 71%.

❖ *One Way Anova για σύγκριση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της BMP-2 ως προς της έκκριση της:*

α) 17β-οιστραδιόλης

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	0,5ng/ml	-111,33333	453,97573	1,000
	5 ng/ml	-238,66667	453,97573	1,000
	50 ng/ml	-130,66667	453,97573	1,000
	100 ng/ml	-272,66667	453,97573	1,000
	500 ng/ml	45,00000	453,97573	1,000
0,5ng/ml	Control	111,33333	453,97573	1,000
	5 ng/ml	-127,33333	453,97573	1,000
	50 ng/ml	-19,33333	453,97573	1,000
	100 ng/ml	-161,33333	453,97573	1,000
	500 ng/ml	156,33333	453,97573	1,000
5 ng/ml	Control	238,66667	453,97573	1,000
	0,5ng/ml	127,33333	453,97573	1,000
	50 ng/ml	108,00000	453,97573	1,000
	100 ng/ml	-34,00000	453,97573	1,000
	500 ng/ml	283,66667	453,97573	1,000
50 ng/ml	Control	130,66667	453,97573	1,000
	0,5ng/ml	19,33333	453,97573	1,000
	5 ng/ml	-108,00000	453,97573	1,000
	100 ng/ml	-142,00000	453,97573	1,000
	500 ng/ml	175,66667	453,97573	1,000
100 ng/ml	Control	272,66667	453,97573	1,000
	0,5ng/ml	161,33333	453,97573	1,000
	5 ng/ml	34,00000	453,97573	1,000
	50 ng/ml	142,00000	453,97573	1,000
	500 ng/ml	317,66667	453,97573	1,000
500 ng/ml	Control	-45,00000	453,97573	1,000
	0,5ng/ml	-156,33333	453,97573	1,000
	5 ng/ml	-283,66667	453,97573	1,000
	50 ng/ml	-175,66667	453,97573	1,000
	100 ng/ml	-317,66667	453,97573	1,000

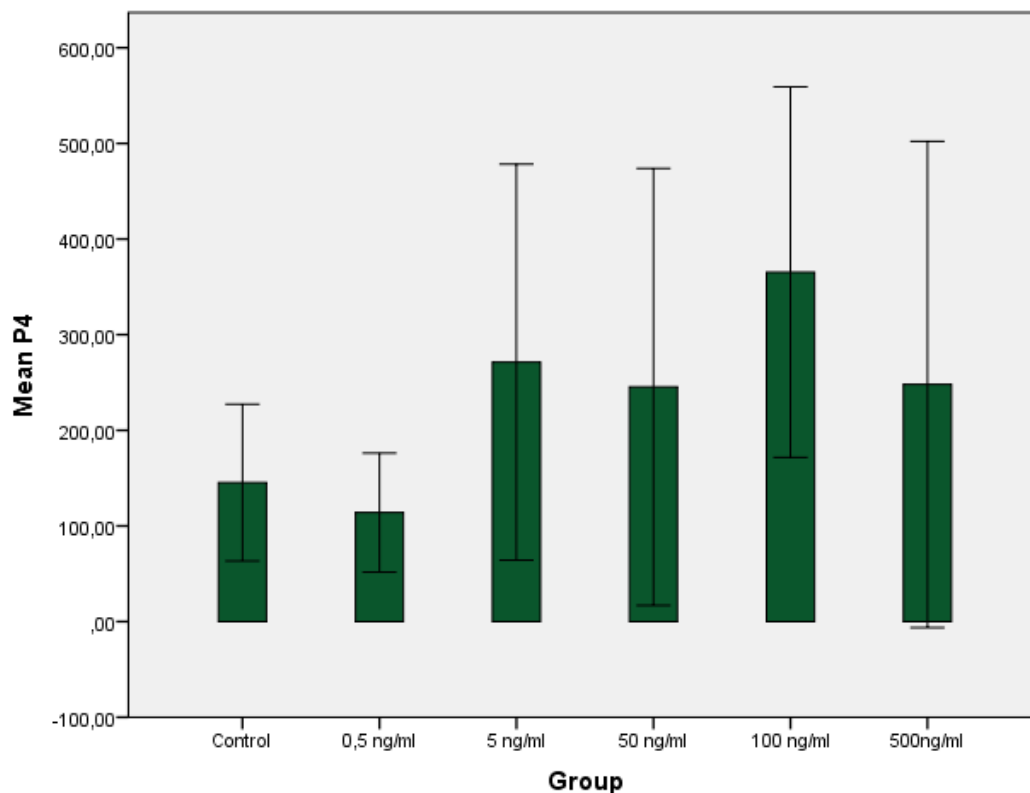


Εικόνα 5: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συγκεντρώσεων της BMP-2 στην παραγωγή της οιστραδιόλης (pg/ml).

- ❖ *One Way Anova για σύγκριση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της BMP-2 ως προς της έκκριση της:*
β) προγεστερόνης

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	0,5 ng/ml	31,33333	151,95370	1,000
	5 ng/ml	-126,00000	151,95370	1,000
	50 ng/ml	-100,00000	151,95370	1,000
	100 ng/ml	-220,00000	151,95370	1,000
	500 ng/ml	-102,66667	151,95370	1,000

0,5 ng/ml	Control	-31,33333	151,95370	1,000
	5 ng/ml	-157,33333	151,95370	1,000
	50 ng/ml	-131,33333	151,95370	1,000
	100 ng/ml	-251,33333	151,95370	1,000
	500 ng/ml	-134,00000	151,95370	1,000
5 ng/ml	Control	126,00000	151,95370	1,000
	0,5 ng/ml	157,33333	151,95370	1,000
	50 ng/ml	26,00000	151,95370	1,000
	100 ng/ml	-94,00000	151,95370	1,000
	500 ng/ml	23,33333	151,95370	1,000
50 ng/ml	Control	100,00000	151,95370	1,000
	0,5 ng/ml	131,33333	151,95370	1,000
	5 ng/ml	-26,00000	151,95370	1,000
	100 ng/ml	-120,00000	151,95370	1,000
	500 ng/ml	-2,66667	151,95370	1,000
100 ng/ml	Control	220,00000	151,95370	1,000
	0,5 ng/ml	251,33333	151,95370	1,000
	5 ng/ml	94,00000	151,95370	1,000
	50 ng/ml	120,00000	151,95370	1,000
	500 ng/ml	117,33333	151,95370	1,000
500 ng/ml	Control	102,66667	151,95370	1,000
	0,5 ng/ml	134,00000	151,95370	1,000
	5 ng/ml	-23,33333	151,95370	1,000
	50 ng/ml	2,66667	151,95370	1,000
	100 ng/ml	-117,33333	151,95370	1,000



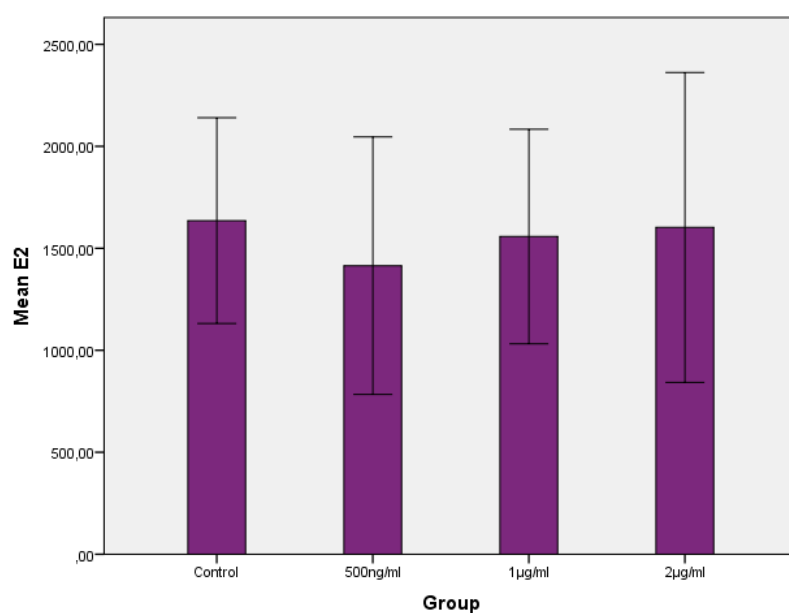
Εικόνα 6: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συγκεντρώσεων της BMP-2 στην παραγωγή της προγεστερόνης (pg/ml).

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 5 και 6) δεν προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στη βέλτιστη συγκέντρωση δράσης της BMP-2 στην παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε για τη συνέχεια του πειράματός μας χρησιμοποιήσαμε BMP-2 50ng/ml , μια συγκέντρωση η οποία ήταν σύμφωνη με τις βιβλιογραφικές αναφορές (*Morgan et al., 2010*).

❖ *One Way Anova για σύγκριση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του Gremlin-1 ως προς της έκκριση της:*

β) 17β-οιστραδιόλης

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	500ng/ml	221,00000	500,99773	1,000
	1μg/ml	78,00000	500,99773	1,000
	2μg/ml	33,00000	500,99773	1,000
500ng/ml	Control	-221,00000	500,99773	1,000
	1μg/ml	-143,00000	500,99773	1,000
	2μg/ml	-188,00000	500,99773	1,000
1μg/ml	Control	-78,00000	500,99773	1,000
	500ng/ml	143,00000	500,99773	1,000
	2μg/ml	-45,00000	500,99773	1,000
2μg/ml	Control	-33,00000	500,99773	1,000
	500ng/ml	188,00000	500,99773	1,000
	1μg/ml	45,00000	500,99773	1,000

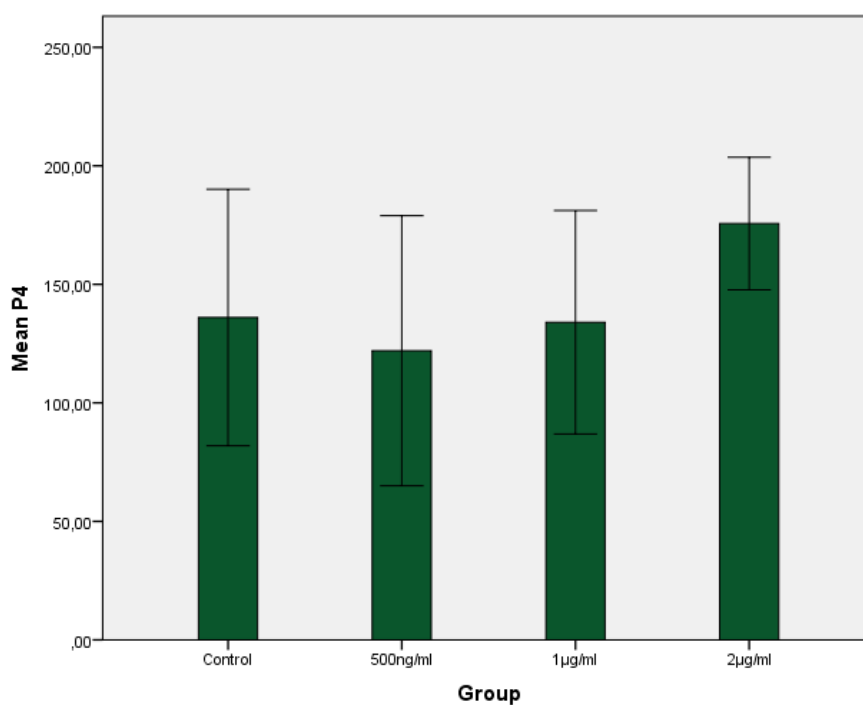


Εικόνα 7: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συγκεντρώσεων του Gremlin-1 στην παραγωγή της οιστραδιόλης (pg/ml).

❖ *One Way Anova για σύγκριση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του Gremlin-1 ως προς της έκκριση της:*

β) προγεστερόνης

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	500ng/ml	14,00000	39,10953	1,000
	1μg/ml	2,00000	39,10953	1,000
	2μg/ml	-39,66667	39,10953	1,000
500ng/ml	Control	-14,00000	39,10953	1,000
	1μg/ml	-12,00000	39,10953	1,000
	2μg/ml	-53,66667	39,10953	1,000
1μg/ml	Control	-2,00000	39,10953	1,000
	500ng/ml	12,00000	39,10953	1,000
	2μg/ml	-41,66667	39,10953	1,000
2μg/ml	Control	39,66667	39,10953	1,000
	500ng/ml	53,66667	39,10953	1,000
	1μg/ml	41,66667	39,10953	1,000



Εικόνα 8: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συγκεντρώσεων του Gremlin-1 στην παραγωγή της προγεστερόνης (pg/ml).

Από τα παραπάνω διαγράμματα (Εικόνα 7 και 8) δεν προκύπτει κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά στη βέλτιστη συγκέντρωση δράσης του Gremlin-1 σε στην παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήσαμε για τη συνέχεια του πειράματός μας Gremlin-1 1μg/ml , μια συγκέντρωση η οποία είναι σύμφωνη με τις βιβλιογραφικές αναφορές (Sethi et al.,2013; Ampuja et al., 2013).

Αφού προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια του πειράματος, έγιναν καλλιέργειες των κοκκωδων κυττάρων με τους συνδυασμούς ορμονων που φαίνονται στον πίνακα 3 και τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) είναι τα παρακάτω:

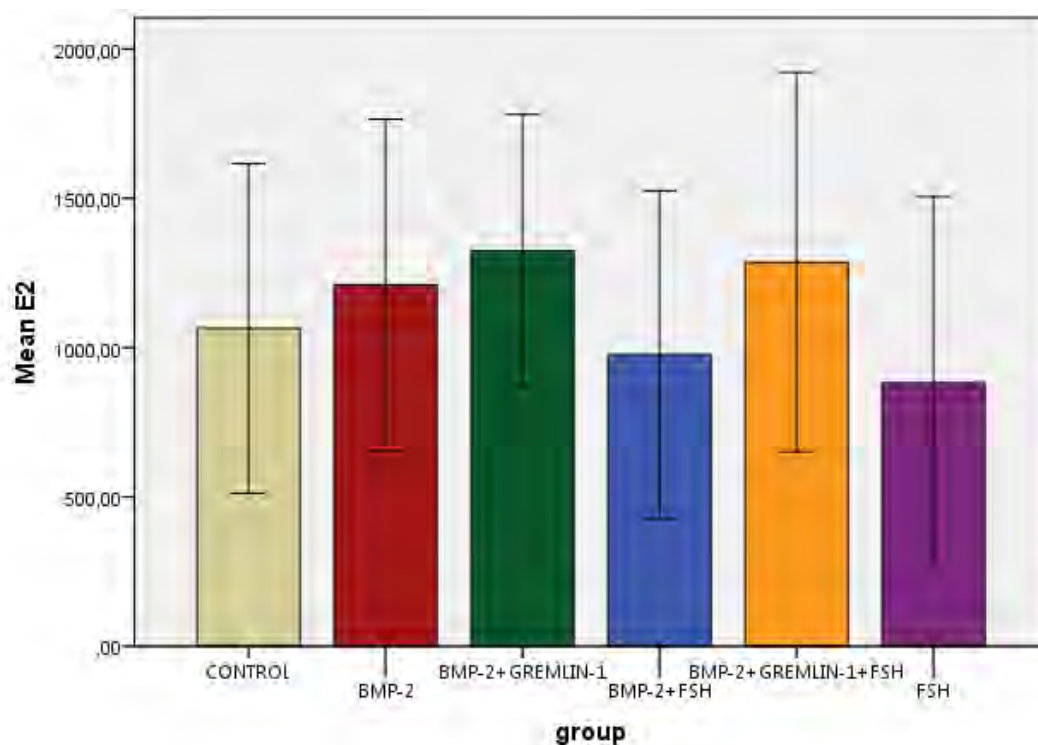
Group	Οιστραδιόλη (E2)	Προγεστερόνη (P4)
CONTROL	1593	214
	493	84
	1106	160
BMP-2	1721	272
	620	68
	1290	178
BMP-2+GREMLIN-1	1761	244
	850	280
	1361	230
BMP-2+FSH	1432	216
	368	54
	1131	180
BMP-2+GREMLIN-1+FSH	1822	244
	584	120
	1452	244
FSH	1602	236
	514	74
	530	74

Πίνακας 4 : Αποτελέσματα ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA)

❖ *One way anova για συσχέτιση των συνδυασμών ορμονών ως προς την έκκριση της:*

α) 17β- οιστραδιόλης

(I) Group	(J) Group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	-146.33333	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin	-260.00000	461.11499	1.000
	BMP2+FSH	87.00000	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-222.00000	461.11499	1.000
	FSH	182.00000	461.11499	1.000
BMP2	Control	146.33333	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin	-113.66667	461.11499	1.000
	BMP2+FSH	233.33333	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-75.66667	461.11499	1.000
	FSH	328.33333	461.11499	1.000
BMP2+Gremlin	Control	260.00000	461.11499	1.000
	BMP2	113.66667	461.11499	1.000
	BMP2+FSH	347.00000	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	38.00000	461.11499	1.000
	FSH	442.00000	461.11499	1.000
BMP2+FSH	Control	-87.00000	461.11499	1.000
	BMP2	-233.33333	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin	-347.00000	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-309.00000	461.11499	1.000
	FSH	95.00000	461.11499	1.000
BMP2+Gremlin+FSH	Control	222.00000	461.11499	1.000
	BMP2	75.66667	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin	-38.00000	461.11499	1.000
	BMP2+FSH	309.00000	461.11499	1.000
	FSH	404.00000	461.11499	1.000
FSH	Control	-182.00000	461.11499	1.000
	BMP2	-328.33333	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin	-442.00000	461.11499	1.000
	BMP2+FSH	-95.00000	461.11499	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-404.00000	461.11499	1.000



Εικόνα 9: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συνδυασμών ορμονών στην παραγωγή της οιστραδιόλης (pg/ml).

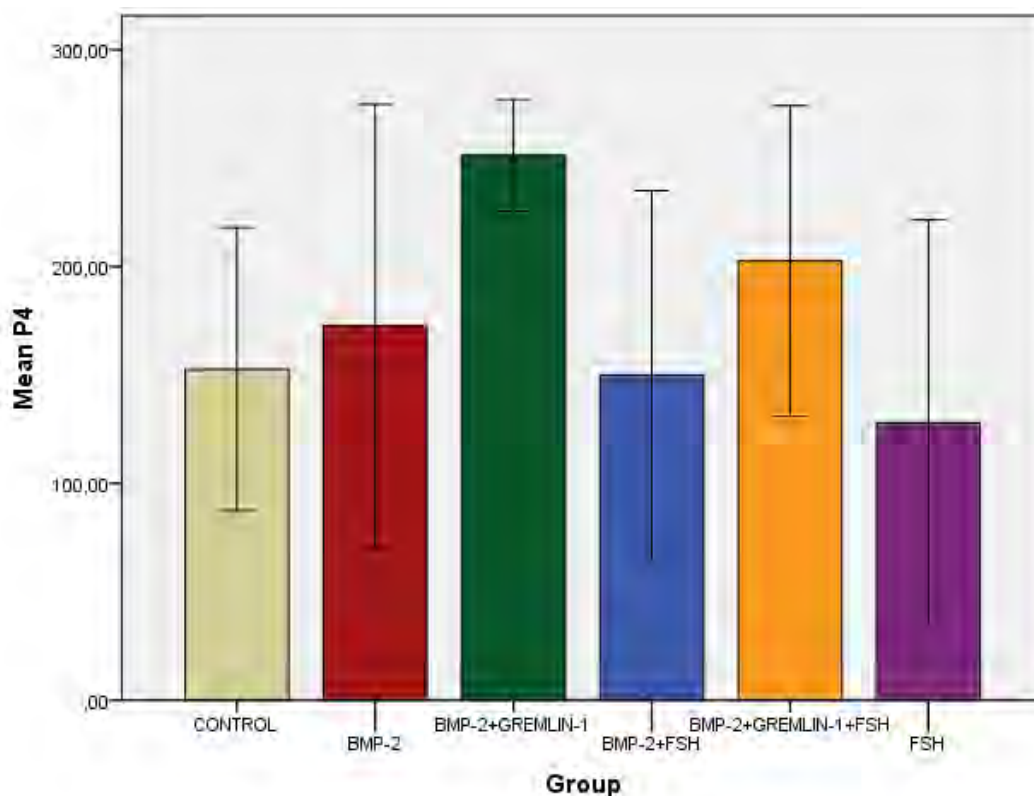
Τα συμπεράσματα που εξάγονται από το παραπάνω διάγραμμα είναι τα εξής:

1. Η ομάδα BMP-2 (1210pg/ml) προκαλεί μια αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης της τάξης του 13,7% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (1064pg/ml).
2. Η ομάδα BMP-2+FSH (977pg/ml) προκάλεσε μια αύξηση της τάξης του 10,8% στην παραγωγή της οιστραδιόλης σε σχέση με την ομάδα FSH (882pg/ml).
3. Η ομάδα BMP-2+FSH+Gremlin-1 (1286pg/ml) προκάλεσε αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης της τάξης του 31,6% σε σχέση με την ομάδα BMP-2+FSH (977pg/ml).
4. Η ομάδα BMP-2+Gremlin-1 (1324pg/ml) προκάλεσε αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης της τάξης του 24,4% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (1064pg/ml).

❖ *One way anova για συσχέτιση των συνδυασμών ορμονών ως προς την έκκριση της:*

β) προγεστερόνης

(I) Group	(J) Group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP2	-20.00000	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin	-98.66667	63.65299	1.000
	BMP2+FSH	2.66667	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-50.00000	63.65299	1.000
	FSH	24.66667	63.65299	1.000
BMP2	Control	20.00000	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin	-78.66667	63.65299	1.000
	BMP2+FSH	22.66667	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-30.00000	63.65299	1.000
	FSH	44.66667	63.65299	1.000
BMP2+Gremlin	Control	98.66667	63.65299	1.000
	BMP2	78.66667	63.65299	1.000
	BMP2+FSH	101.33333	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	48.66667	63.65299	1.000
	FSH	123.33333	63.65299	1.000
BMP2+FSH	Control	-2.66667	63.65299	1.000
	BMP2	-22.66667	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin	-101.33333	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-52.66667	63.65299	1.000
	FSH	22.00000	63.65299	1.000
BMP2+Gremlin+FSH	Control	50.00000	63.65299	1.000
	BMP2	30.00000	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin	-48.66667	63.65299	1.000
	BMP2+FSH	52.66667	63.65299	1.000
	FSH	74.66667	63.65299	1.000
FSH	Control	-24.66667	63.65299	1.000
	BMP2	-44.66667	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin	-123.33333	63.65299	1.000
	BMP2+FSH	-22.00000	63.65299	1.000
	BMP2+Gremlin+FSH	-74.66667	63.65299	1.000



Εικόνα 10: Συσχέτιση της επίδραση της των διάφορων συνδυασμών ορμονών στην παραγωγή της προγεστερόνης (pg/ml).

Τα συμπεράσματα που εξάγονται από το παραπάνω διάγραμμα είναι τα εξής:

1. Η ομάδα BMP-2 (172,7pg/ml) προκαλεί μια αύξηση στην παραγωγή της προγεστερόνης της τάξης του 13,1% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) (152,7pg/ml).
2. Η ομάδα BMP-2+Gremlin-1 (251,3pg/ml) προκάλεσε μια αύξηση της τάξης του 45,5% στην παραγωγή της προγεστερόνης σε σχέση με την ομάδα BMP-2 (172,7pg/ml).
3. Η ομάδα BMP-2+FSH+Gremlin-1 (202,7pg/ml) προκάλεσε αύξηση στην παραγωγή της προγεστερόνης της τάξης του 35,1 % σε σχέση με την ομάδα BMP-2+FSH (150pg/ml).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, προσδιορίζουν την δράση της BMP-2 και του ανταγωνιστή της gremlin-1 στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων. Καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επωάστηκαν με BMP-2 καθώς και με BMP-2 σε συνδυασμό με το gremlin-1 σε διαφορετικές συγκεντρώσεις για 48 ώρες έτσι ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση δράσης τους στην παραγωγή της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Από τα αποτελέσματα, στατιστικά σημαντικές διαφορές δεν προσδιορίστηκαν και γι' αυτό το λόγο οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν σύμφωνες με τις βιβλιογραφικές αναφορές για την BMP-2 50ng/ml (Morgan et al.,2010)και για το gremlin-1 1μg/ml (Sethi et al.,2013; Ampuja et al., 2013). Εφόσον προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση δράσης της BMP-2 και του gremlin-1 ακολούθησε καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων για 48 ώρες, με τους ακόλουθους συνδυασμούς ορμονών: ομάδα ελέγχου, BMP-2, BMP-2+ gremlin-1, BMP-2+FSH, BMP-2+gremlin-1+FSH, FSH με σκοπό να γίνει εμφανής η δράση της BMP-2 και του αναστολέα της (Gremlin-1) στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών.

Προγενέστερες μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα προβάτων έδειξαν πως η BMP-2 προκαλεί αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων (Souza et al., 2002). Σε μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα βρέθηκε πώς η BMP-2 αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων της FSH και του mRNA της αρωματάσης. Το γεγονός αυτό αυξάνει τη μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της οιστραδιόλης (Shi et al., 2011).

Αντίθετες ήταν οι επιδράσεις της BMP-2 στην παραγωγή της προγεστερόνης. Μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα χοίρων και βοοειδών έδειξαν πώς η BMP-2 προκαλούσε καταστολή (ή μείωση ή αναστολή) της παραγωγής της προγεστερόνης (Brankin et al., 2005; Glistler et al., 2004). Αναστολή στην παραγωγή της επαγόμενης από FSH προγεστερόνης προκλήθηκε και σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών (Inagaki et al.,2009) και όρνιθων (Morgan et al.,2010).

Όσον αφορά τη δράση του ανταγωνιστή της BMP-2 (Gremlin) στη λειτουργία των ωοθηκών οι απόψεις της επιστημονικής κοινότητας είναι διφορούμενες. Έχει βρεθεί σε μελέτες που έγιναν σε κύτταρα θήκης βοοειδών ότι ο ανταγωνιστής αυξάνει την παραγωγή των ανδρογόνων σε αντίθεση με την BMP-7 που αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα για την παραγωγή τους (Glister et al., 2005). Σε μία δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε βοοειδή από τον Glister και τους συν., 2011 ταυτοποιήθηκε η δράση των ανταγωνιστών καθώς και του Gremlin στην ρύθμιση της BMP σηματοδότησης σε όλα τα στάδια της ωοθυλακιογένεσης. Αλλά, υπό έρευνα είναι ο συσχετισμός του ρόλου των ανταγωνιστών (Gremlin) στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών της αναπαραγωγής.

Η παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε καλλιέργειες ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων, έδειξε χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ότι η BMP-2 τείνει να αυξήσει την παραγωγή της οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων που επώαστηκαν για 48 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πρόβατα (Souza et al., 2002).

Όσον αφορά στην προγεστερόνη παρατηρήθηκε πως η BMP-2 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής της γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα χοίρων, βοοειδών (Brankin et al., 2005; Glister et al., 2004) ποντικών (Inagaki et al., 2009) και όρνιθων (Morgan et al., 2010).

Ακόμη, συγκρίνοντας τις ομάδες FSH και BMP-2+FSH ως προς την παραγωγή της οιστραδιόλης παρατηρήθηκε στη δεύτερη ομάδα μια μικρή αύξηση της, γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη που έγινε στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα όπου έδειξε θετική δράση της BMP-2 στην έκφραση των υποδοχέων της FSH και κατά συνέπεια στην παραγωγή της οιστραδιόλης (Shi et al., 2011).

Εν συνεχεία, ελέγξαμε την επίδραση του ανταγωνιστή Gremlin-1 στην παραγωγή της οιστραδιόλης. Παρατηρήθηκε πως η προσθήκη BMP-2 στις καλλιέργειες προκάλεσε αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης ενώ η προσθήκη του gremlin-1 προκάλεσε επιπλέον αύξηση γεγονός που είναι αντίθετο της ανταγωνιστικής δράσης του. Συγκρίνοντας τις ομάδες BMP2+FSH και BMP-2+FSH+ Gremlin-1 έγινε εμφανές πως η πρώτη ομάδα παρουσιάζει μια μικρή αύξηση στην παραγωγή της οιστραδιόλης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control) ενώ η δεύτερη μείωση και έτσι επιβεβαιώνεται η ανταγωνιστική δράση του gremlin-1.

Τέλος, αξιολογώντας την επίδραση του ανταγωνιστή στην παραγωγή της προγεστερόνης βλέπουμε πως η προσθήκη του Gremlin-1 σε καλλιέργειες με BMP-2 δε

φανερώνει την ανταγωνιστική του δράση γεγονός που είναι εμφανές στις καλλιέργειες στις οποίες επιπλέον προστίθεται FSH.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για τη δράση της BMP-2 και του ανταγωνιστή της (gremlin-1) αλλά παρατηρήθηκε μια τάση αναστολής της δράση της BMP-2 σε συνδυασμό με την FSH. Γι' αυτό επιφυλασσόμαστε για περαιτέρω δοκιμές στο μέλλον σχετικά με τη δοσολογία των ορμονών καθώς και για τη χρησιμοποίηση περισσότερων δειγμάτων στις ομάδες μελέτης.

Συμπερασματικά, η BMP-2 είναι σημαντική για την στεροειδογένεση των ωοθηκών. Είναι υπεύθυνη για την αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης και παίζει ρόλο στην ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης, της ωοθυλακιορρηξίας καθώς και της ωχρινοποίησης των ωοθυλακίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Adriaenssens T, Segers I, Wathlet S and Smits J (2011). The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *J Assist Reprod Genet.* 28:31-40.
- Allegrini S, Yoshimoto M, Salles MB, König B (February 2004). "Bone regeneration in rabbit sinus lifting associated with bovine BMP". *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 68 (2): 127–31.
- Allendorph, G.P., W.W. Vale, and S. Choe, Structure of the ternary signaling
- Ampuja Minna, Jokimäki Riikka , Juuti-Uusitalo Kati, Rodriguez-Martinez Alejandra, Alarmo Emma-Leena and Kallioniemi Anne BMP4 inhibits the proliferation of breast cancer cells and induces an MMP-dependent migratory phenotype in MDA-MB-231 cells in 3D environment *BMC Cancer* 2013, 13:429
- Aspenderg P, Jeppson C and Economides AN (2001). The bone morphogenetic proteins antagonist noggin inhibits membranous classification. *J Bone Miner Res.* 16:497-500.
- Attisano L, Wrana JL 2000 Smads as transcriptional co-modulators. *Curr Opin Cell Biol* 12:235–243.
- Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massague J 1992 Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 68:97–108.
- Baarends WM, van Helmond MJ, Post M, van der Schoot PJ, Hoogerbrugge JW, de Winter JP, Uilenbroek JT, Karels B, Wilming LG, Meijers JH, Themmen APN, Grootegoed JA 1994 A novel member of the transmembrane serine/threonine kinase receptor

family is specifically expressed in the gonads and in mesenchymal cells adjacent to the Müllerian duct. *Development* 120:189–197.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 2011; 23:609–620.

Brankin V, Quinn RL, Webb R, Hunter MG. Evidence for a functional bone morphogenetic protein (BMP) system in the porcine ovary. *Domest Anim Endocrinol* 2005;28:367–79.

Canalis E, Economides AN and Gazzero Elisabetta (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocr Rev.* 24(2):218-235.

Carreira A.C., Lojudice F.H., Halcsik E., Navarro R.D., Sogayar M.C, Granjeiro J.M., Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J. Dent. Res.* 93 (2014) 335–345.

Chang H, Brown CW, Matzuk MM. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor-beta superfamily. *Endocr Rev* 2002; 23:787–823.

Channing C & Kammerman S 1974 Binding of gonadotropins to ovarian cells. *Biology of Reproduction* 10 179–198. (doi:10.1095/biolreprod10.2.179).

Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massagué J 1990 Distinct transforming growth factor- β (TGF- β) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three TGF- β isoforms. *J Biol Chem* 265:20533–20538.

Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang ML, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massagué J 1987 The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48:409–415.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22:233–241.

- Clark David A., Robina Coker Transforming growth factor-beta (TGF-b) The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 30 (1998) 293±298
- Craig Z, Leslie T, Hatfield K, Gupta R & Flaws J 2010 Mono-hydroxy methoxychlor alters levels of key sex steroids and steroidogenic enzymes in cultured mouse antral follicles. Toxicology and Applied Pharmacology 249 107–113.
- Craig ZR, Wang W and Flaws JA (2011). Endocrine- disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. Reprod. 142:633-646.
- D.L. Griffith, P.C. Keck, T.K. Sampath, D.C. Rueger, W.D. Carlson, Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A. 93 (1996) 878–883.
- De Robertis EM 1999 The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of nodal, BMP and Wnt signals. Nature 397:707–710.
- Derynck R (1994). TGF-beta-receptor mediated signaling. Trends in Biochemical Sciences. 19:548-553.
- di Clemente N, Wilson CA, Faure E, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, Vigier B, Josso N, Cate R 1994 Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti-Müllerian hormone. Mol Endocrinol 8:1006–1020.
- Dolan V, Murphy M, Sadlier D, Lappin D, Doran P, Godson C, Martin F, O' Meare Y, Schmid H, Henger A, Kretzler M, Droquett A, Mezzano S and Brady HR (2005). Expression of gremlin a bone morphogenetic protein antagonist in human diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis. 45:1034-1039.
- Falck B 1959 Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in microtransplants. Acta Physiologica Scandinavica 47 1–101.

- Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH and Miyazono K (1993). Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell*.75:681-692.
- Gazzerio E, Pereira RC, Jorgetti V, Olson S, Economides AN and Canalis E (2005). Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinol*.146:655-665.
- Geiger M, Li RH, Friess W (November 2003). "Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (12): 1613–29.
- Glister C, Kemp CF, Knight PG. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* 2004;127:239–54.
- Glister C, Richards SL and Knight PG (2005). Bone morphogenetic proteins (BMP)-4-6-7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca internal cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in theca BMP signaling? *Endocrinol*.146:1883-1892.
- Glister C, Sutchell L and Knight PG (2011). Granulosa and thecal expression of bone morphogenetic protein- and activin-binding protein mRNA transcripts during bovine follicle development and factors modulating their expression in vitro. *Reprod*.142:581-591.
- Gougeon A (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1(2):81-87.
- Hanukoglu I 1992 Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 43 779–804. (doi:10.1016/0960-0760(92)90307-5)

- Heldin CH, Miyazono K and ten Dijke P (1997). TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature*. 390:465-471.
- Hillier SG, Wickings EJ, Illingworth PI, Yong EL, Reichert LE Jr, Baird DT and McNeilly AS (1991). Control of immunoactive inhibin production by human granulosa cells. *Clin Endocrinol*. 35:71-78.
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM, Harland RM. The *Xenopus* dorsalizing factor Gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell* 1998; 1:673–683.
- Inagaki K, Otsuka F, Miyoshi T, Yamashita M, Takahashi M, Goto J, Suzuki J & Makino H 2009 p38-Mitogen-activated protein kinase stimulated steroidogenesis in granulosa cell-oocyte co-cultures: role of bone morphogenetic proteins 2 and 4. *Endocrinology* 150 1921–1930
- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M and Miyazono K (2000). Smad6 is a smad1/5-induced smad inhibitor characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse smad6 promoter. *J Biol Chem*. 275:1-14.
- Ishitani T, Ninomiya-Tsui J, Nagai S-I, Nishika M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibura H and Matsumoto K (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signaling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature*. 399:798-802.
- Itoh S, Itoh F, Goumanis MS and ten Dijke (2000). Signaling of transforming growth factor-beta family members through smad proteins. *Eur J Biochem*. 267:6954-6967.
- Jaatinen R, Bondestam J, Raivio T, Hilden K, Dunkel L, Groome N, Ritvos O 2002 Activation of the bone morphogenetic protein signaling pathway induces inhibin β -subunit mRNA and secreted inhibin B levels in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1254–1261.

- Jamnongjit M and Hammes SR (2006). Ovarian steroids: The good, the bad and the signals that raise them. *Cell cycle*. 5(11):1178-1183.
- Jindal S, Greenseid K, Berger D, Santoro N and Pal L (2012). Impaired Gremlin1(Grem1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet*. 29:159-162.
- K. Miyazono, U. Hellman, C. Wernstedt, C.H. Heldin, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 567 6407–6415.
- Kawabata M, Chytil A, Moses HL 1995 Cloning of a novel type II serine/threonine kinase receptor through interaction with the type I transforming growth factor- β receptor. *J Biol Chem* 270:5625–5630.
- Kawabata M, Imamura T and Miyazono K (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth factor Rev*.9:49-61.
- .Knight PG and Glister C (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction Reviews*. 132:191-206.
- Koenig BB, Cook JS, Wolsing DH, Ting J, Tiesman JP, Correa PE, Olson CA, Pecquet AL, Ventura F, Grant RA, et al Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells..*Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5961-74.
- Koli K, Myllarniemi M, Vuorikien K, Salmenkivi K, Ryyanen MS, Kinnula VL and Keski-Oja J (2006). Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 169:61-71.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N and Matzuk MM (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 15:201-204.
- Kusanagi K, Inoue H, Ishidoo Y, Mishima HK, Kawabata M and Miyazono K (2000). Characterization of a bone morphogenetic protein- responsive smad-binding element. *Mol Biol Cell*. 11:555-565.

- Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, Massague J 1996 Partnership between DPC4 and SMAD proteins in TGF- β signaling pathways. *Nature* 383:832–836.
- Lappin DW, Hensey C, McMahon R, Godson C, Brady HR (2000) Gremlins, glomeruli and diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 469–472.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK and Shimasaki S (2001). Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 65:994-999.
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF 1992 Expression cloning of the TGF- β type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* [Erratum (1992) 70: 1069] 68:775–785.
- Liu F, Poupponnot C, Massague J 1997 Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF β -inducible transcriptional complexes. *Genes Dev* 11:3157–3167.
- Liu F, Ventura F, Doody J, Massague J 1995 Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15:3479–3486.
- Lu MM, Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG and Morrissey EE (2001). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung. *Dev Dyn.* 222:667-680.
- Lyons KM, Jones CM and Hogan BLM (1991). The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet.* 7:408-412.
- Marie PJ, Debais F, Hay E (2002). "Regulation of human cranial osteoblast phenotype by FGF-2, FGFR-2 and BMP-2 signaling". *Histol. Histopathol.* **17** (3): 877–85.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-791.
- Massague J and Cen Y-C (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14:627-644.
- Massague, J., J. Seoane, and D. Wotton, *Smad transcription factors*. *Genes Dev.* 2005 Dec 1;19(23):2783-810.

- Mathews LS, Vale WW 1991 Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. *Cell* 65:973–982.
- Mazerbourg S, Sangkuhl K, Luo CW, Sudo S, Klein C, Hsueh AJ. Identification of receptors and signaling pathways for orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands based on genomic analyses. *J Biol Chem* 2005; 280:32122–32132.
- Mc KD, Hertig AT, Adam EC and Danziger S (1953). Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec.* 2:201-219.
- McDonald NQ, Hendrickson WA. 1993. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif *Cell*. 1993 May 7;73(3):421-4.
- McMahon R, Murphy M, Clarkson M, Taal M, Mackenzie HS, Godson C, Martin F and Brady HR (2000). IHG-2 a mesangial cell gene induced by high glucose, is human gremlin. Regulation by extracellular glucose concentration cyclic mechanical strain and transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem*. 275:9901-9904.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN and Hurlé JM (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development*. 126:5515-5522.
- Messinis IE (2006). Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Upd*.12:557-571.
- Miller W 1988 Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocrine Reviews* 9 295–318. (doi:10.1210/edrv-9-3-295)
- Minabe Saegusa C, Saegusa H, Tsukahara M and Noguchi S (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC(protein related) to DAN and Cerberus) identified by a gene trap approach. *Dev Growth Differ*.40:343-353.
- Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Leali D, et al. (2010) Gremlin is a novel agonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood* 116: 3677–3680.

- Miyazono K 2000 TGF- signaling by Smad proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:15–22.
- Miyazono K, Kusanagi K and Inoue H (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol.* 187:265-276.
- Morgan J Haugen and A L Johnson 2010 Society for Reproduction and fertility 1470–1626 (paper) 1741–7899.
- Murray-Rust J, McDonald NQ, Blundell TL, Hosang M, Oefner C, Winkler F, Bradshaw RA. 1993. Topological similarities in TGF- β 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* 1: 153–159.
- Myllarniemi M, Lindholm P, Ryyanen MS, Kliment VL, Oury TD and Koli K (2008). Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 177:321-329.
- Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, et al. (2006) The bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein. *BMC Cancer* 6: 74.
- Negarajan RP, Zhang J, Li W and Chen Y (1999). Regulation of smad7 promoter by direct association with smad3 and smad4. *J Biol Chem.*274:33412-33418.
- Newfeld SJ, Mehra A, Singer MA, Wrana JL, Attisano L, Gelbart WM. Mothers against dpp participates in a DDP/TGF-beta responsive serine-threoninekinase signal transduction cascade. *Development.* 1997 Aug;124(16):3167-76.
- Nishimura R, Kato Y, Chen D, Harris SE, Mundy GR, Yoneda T 1998 Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* 273:1872–1879.
- Nohno T, Ishikawa T, Saito T, Hosokawa K, Noji S, Wolsing DH, Rosenbaum JS 1995 Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms

differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. J Biol Chem 270:22522–22526.

Oktem O and Urman B (2010). Understanding follicle growth in vivo. Hum Reprod. 25(12):2944-2954.

Pangas SA, Jorgez CJ and Matzuk MM (2004). Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. Biol Chem. 279(31):32281-32286.

Passa O, Tsavalos S, Belyaev NN, Petryk A, Potocnik AJ and Graf D (2011). Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironment and functional implications. Immunol.134:349-359.

Pearce JJH, Penny G and Roscant J (1999). A mouse Cerberus/Dan-related gene family. Dev Biol. 209:98-110.

Penning T 1997 Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. Endocrine Reviews 18 281–305. (doi:10.1210/er.18.3.281)

Piccolo S, Agius E, Leyns L, Bhattacharyya S, Grunz H, Bouwmeester T and De Robertis EM (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of nodal, BMP and Wnt signals. Nature. 397:707-710.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B and De Robertis EM (1996). Dorsoventral patterning in Xenopus: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP7. Cell. 86:589-598.

Piek, E., Westermarck, U., Kastemar, M., Heldin, C.-H., van Zoelen, E.JJ., Nistér, M. and ten Dijke, P. (1999). Expression of transforming growth factor (TGF)- β receptors and Smad proteins in glioblastoma cell lines with distinct responses to TGF- β 1. Int. J. Cancer 80, 756-763.

Ray RP and Wharton KA (2001). Twisted perspective new insights into extracellular modulation of BMP signaling during development. Cell. 104:801-804.

- Reddi AH (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology*. 16(3):247-252.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM and Sporn MB (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78(9):5339-5343.
- Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, Cox GN, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K 1995 Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7632–7636.
- Ruppert R, Hoffmann E, Sebald W. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity.
- S.J. Butler, J. Dodd, *Neuron* 38 (2003) 389–401.
- Sakuta H, Suzuki R, Takahashi H, Kato A, Shintani T, Iemura S, Yamamoto T, Ueno N and Noda M (2001). Ventoptin: a BMP4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science*. 293:111-115.
- Schlegel KA, Thorwarth M, Plesinac A, Wiltfang J, Rupprecht S (December 2006). "Expression of bone matrix proteins during the osseous healing of topical conditioned implants: an experimental study". *Clin Oral Implants Res* 17 (6): 666–72.
- Schliephake H, Aref A, Scharnweber D, Bierbaum S, Roessler S, Sewing A (October 2005). "Effect of immobilized bone morphogenic protein 2 coating of titanium implants on peri-implant bone formation". *Clin Oral Implants Res* 16 (5): 563–9.
- Sethi Anirudh , Jain Ankur , Zode S. Gulab , Wordinger J. Robert , and Clark F. Abbot Role of TGF β /Smad Signaling in Gremlin Induction of Human Trabecular Meshwork Extracellular Matrix Proteins *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Jul 2011; 52(8): 5251–5259.
- Sethi Anirudh , Wordinger J. Robert , and Clark F. Abbot Gremlin utilizes canonical and non-canonical TGF β signaling to induce lysyl oxidase (LOX) genes in human trabecular meshwork cells Published online Jun 5, 2013

- Sha G, Zhang Y, Zhang C, Wan Y, Zhao Z, et al. (2009) Elevated levels of gremlin-1 in eutopic endometrium and peripheral serum in patients with endometriosis. *Fertil Steril* 91: 350–358.
- Shi Jia, Yoshino Osamu, Osuga Yutaka, Koga Kaori, Hirota Yasushi, Nose Emi, Nishii Osamu, Yano Tetsu, Taketani Yuji Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells *American Journal of Reproductive Immunology* 65 (2011) 421–427
- Shi W, Zhao J, Anderson KD, Warburton D (2001) Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L1030–1039.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F and Erickson GF (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 25:72-101.
- Smith WC, Harland RM 1992 Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70:829–840.
- Smitz JEJ and Cortvrindt RG (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod Reviews.* 123:185-202.
- Souza CJH, Campbell BK, McNeilly AS, Baird DT 2002 Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 123:363–369.
- Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang C-C, Hatzistavrou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M, Buckingham M, Hilton D, Nash A, Mohun T, Harvey RP 1998 DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* cerberus. *Mech Dev* 77:173–184.

- Strauss J III, Kallen C, Christenson L, Watari H, Devoto L, Arakane F & Kiriakidou M 1999 The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Recent Progress in Hormone Research* 54 394.
- Sun J, Zhuang FF, Mullersman JE, Chen H, Robertson EJ, et al. (2006) BMP4 activation and secretion are negatively regulated by an intracellular gremlin- BMP4 interaction. *J Biol Chem* 281: 29349–29356.
- Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG and Latham JA (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. 35:828-835.
- ten Dijke P, Goumans M-J, Itoh F, Itoh S 2002 Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* 191:1–16.
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K 1993 Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879–2887.
- Topol LZ, Marx M, Laugier D, Bogdanova NN, Boubnov NV, Clausen PA, Calothy C, Blair DG 1997 Identification of *drm*, a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Mol Cell Biol* 17:4801–4810.
- Topol LZ, Modi WS, Koochekpour S, Blair DG (2000) DRM/GREMLIN (CKTSF1B1) maps to human chromosome 15 and is highly expressed in adult and fetal brain. *Cytogenet Cell Genet* 89: 79–84.
- Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y and Sugino H (2000). Identification and characterization of a novel follistatin- like protein as a binding protein for the TGF- β family. *J Biol Chem*. 275:40788-40796.
- Urist MR 1965 Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893–899.

- Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, Mc-Dowell RM, Chien C 1973 Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3511–3515.
- Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nunez L, Jones P, Ip NY, Espinosa R, Brannan CI, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, LeBeau MM, Harland RM, Yancopoulos GD 1995 Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci* 15:6077–6084.
- Van Bezooijen RL, Karperien M, Visser A, Hamersma H, Winkler D, Hayes T, Skonier J, Staehling-Hampton K, Latham JA, Papapoulos SE, Lowik CWG (2002). BMP-antagonist sclerostin is expressed in mineralized bone and blocks BMP-induced bone formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 16(Suppl 1):S163.
- Vitt UA, Hsu SY, Hsueh AJW 2001 Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol* 15:681–694.
- von Bubnoff A and Cho KWY (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrate pathway or network? *Dev Biol.* 239:1-14.
- Walsh DW, Roxburgh SA, McGettigan P, Berthier CC, Higgins DG, Kretzler M, Cohen CD, Mezzano S, Brazil DP and Martin F (2008). Co-regulation of gremlin and Notch signaling in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Acta.* 1782:10-21.
- Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE, Shpektor D, Sutherland MK and Latham JA (2004). Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem.* 279:36293-36298.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF and Massague J (1992). TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71:1003-1014.
- Yamaguchi K, Nagai S-I, Ninomiya-Tsui J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H and Natsumoto K (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of

apoptosis protein family links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J.* 18:179-187.

Yokouchi Y, Vogan KJ, Pearse RV, Tabin CJ 1999 Antagonistic signaling by *caronte*, a novel *cerberus*-related gene, establishes leftright asymmetric gene expression. *Cell* 98:573–583.

Zimmerman LB, DeJesus-Escobar JM, HarlandRM1996 The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* 86:599–606.

Ελληνική βιβλιογραφία:

Μεσσήνης ΙΕ (2005). Επιτομή: Μαιευτική & Γυναικολογία. MD communications. Αθήνα. Κεφ 1-4. Σελ 15-50.