



**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 εμμηνόπαυσης στην έκφραση των mRNA της κοινής (BMPR2) και της ειδικής (TGFB β 1 or ALK5) υπομονάδας του υποδοχέα GDF9 καθώς και της ειδικής (BMPR1b) υπομονάδας του υποδοχέα BMP15, σε ωοθηκικό ιστό».

ΧΑΡΙΣ ΣΟΥΛΙΟΠΟΥΛΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2014

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Πρόλογος

Θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω θερμά τον υπεύθυνο καθηγητή της Διπλωματικής μου εργασίας, τον κύριο Βαμβακόπουλο Νικόλαο για την εγκάρδια υποστήριξη που μου παρείχε και για την άψογη συνεργασία μας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Κουρή Σπύρο για την υπομονή του και την ευχάριστη διάθεση με την οποία με δίδαξε, στο διάστημα εκπόνησης της εργασίας αυτής. Ακόμη, τον ευχαριστώ ιδιαίτερος για την πολύτιμη υποστήριξη και εμπιστοσύνη, αλλά και για την ανεκτίμητη βοήθεια και καθοδήγηση στην πραγμάτωση όχι μόνο του πειραματικού μέρους, αλλά και της συγγραφής της εργασίας μου. Τις θερμές ευχαριστίες μου θα επιθυμούσα να εκφράσω στους κυρίους Μεσσήνη Ιωάννη, Νταφόπουλο Κωνσταντίνο και Ανυφαντή Γεώργιο- Σπυρίδωνα πρωτίστως για τα όσα μου δίδαξαν, αλλά και για την αμέριστη συμπαράστασή τους, σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλους τους γιατρούς και το νοσηλευτικό προσωπικό, που με την ευγένειά τους και την προθυμία τους, μου παρείχαν ουσιαστική και πολύτιμη βοήθεια στη συλλογή των δειγμάτων μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Γραμματεία του Μεταπτυχιακού, για την ηθική και πρακτική υποστήριξη σε κάθε επίπεδο. Θα επιθυμούσα επίσης να ευχαριστήσω τα άτομα που απαρτίζουν το δυναμικό του εργαστηρίου καθένα ξεχωριστά και όλα μαζί, για την εξαιρετική συνεργασία που μου προσέφεραν, καθώς και για τη βοήθεια που μου έδωσαν απλόχερα. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένειά μου και τους φίλους μου, που στέκονται στο πλευρό μου σε κάθε μου προσπάθεια.

Με εκτίμηση,

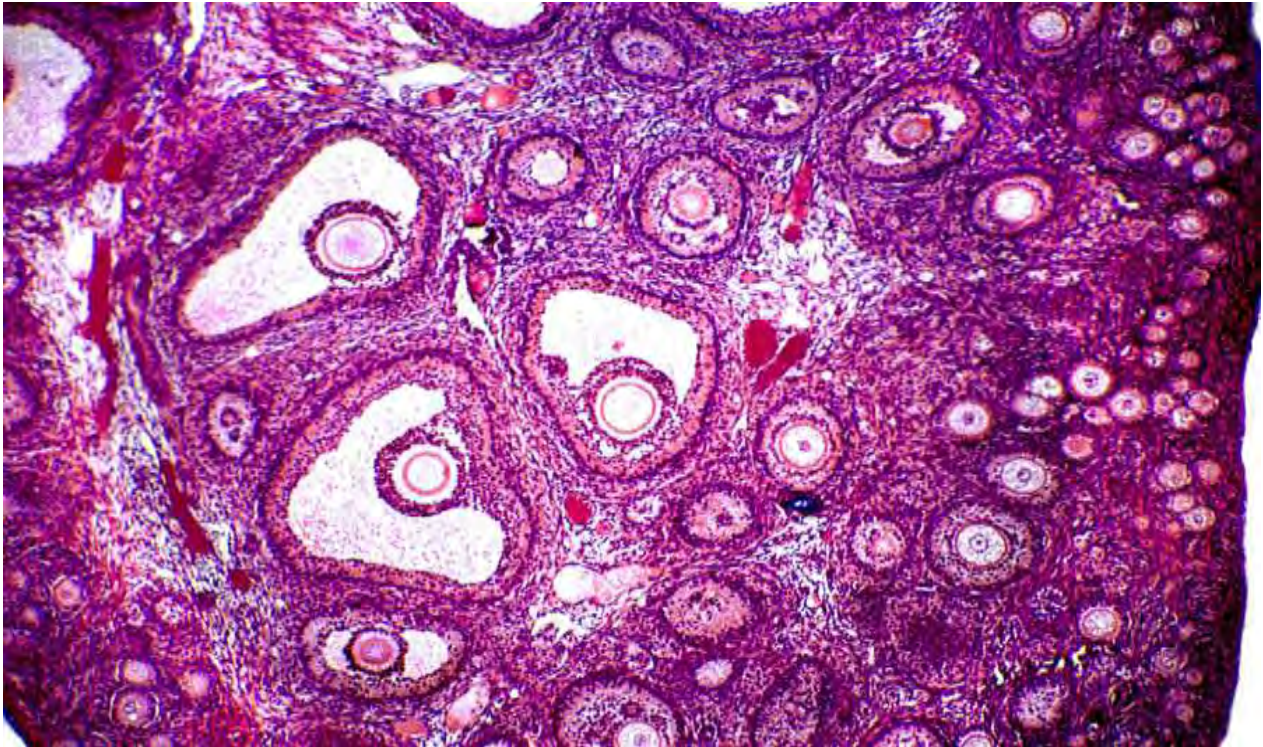
Χάρις Σουλιοπούλου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΕΛΙΔΕΣ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	2
A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A.1 Περίληψη	5
A.2 Εισαγωγή	
A.2.1 Οι ωοθήκες και η λειτουργία τους	6-10
A.2.2 Τα Ωοθυλάκια και η ανάπτυξή τους	11-14
A.2.3 Εμμηνόπαυση	15-16
A.2.4 Η υπερ- οικογένεια TGFβ	17-20
A.2.4.1 Οι παράγοντες GDF9 και BMP15	21-26
A.2.4.2 Ο παράγοντας TGFBR1	27-29
B) ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ	
B.1 Σκοπός	31
B.2. Πρωτόκολλο συλλογής δείγματος	31-35
B.3 Υλικά και μέθοδοι	
B.3.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης RNA	36-37
B.3.2. Σύνθεση cDNA με τυχαίους εκκινητές	37-38
B.3.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού Πραγματικού Χρόνου - Real Time PCR	39-44
B.4 Παρουσίαση αποτελεσμάτων	
B.4.1. T – TEST για ανεξάρτητα δείγματα	45-49
B.4.2. Διάγραμμα Κουτιού (BOX – PLOT)	50-53
B.4.3. Συσχέτιση ηλικίας των γυναικών με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης	54-74
B.4.4. Διαγράμματα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων, μεταξύ τους	75-77
B.4.5. Υπολογισμός του λόγου των ειδικών υπομονάδων (TGFBR1, BMPR1b) προς την κοινή υπομονάδα (BMPR2).	78-82
B.5 Αποτελέσματα- Συζήτηση	83
B.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84-95

A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



Follicles in a human ovary, micrograph by Dr. Keith Wheeler

(www.fineartamerica.com, 2014)

A.1 Περίληψη

Μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας και της κατάστασης εμμηνόπαυσης στα επίπεδα έκφρασης mRNA των γονιδίων των υπομονάδων BMPR2, TGFBR1, BMPR1b των διμερών υποδοχέων των παραγόντων GDF9 [BMPR2/TGFR1] και BMP15 [BMPR2/BMPR1b], σε 19 δείγματα ωοθηκικού ιστού γυναικών που υποβλήθηκαν σε χειρουργικές επεμβάσεις αφαίρεσης είτε μόνο των ωοθηκών, είτε συνολικά των γεννητικών τους εξαρτημάτων.

Για το σκοπό αυτό απομονώθηκε ολικό RNA μακροσκοπικά υγιούς ωοθηκικού ιστού, συντέθηκε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και πραγματοποιήθηκε Real-Time PCR με ειδικά ζεύγη ειδικών εκκινητών, για να προσδιοριστεί ο λόγος των BMPR2-, TGFBR1-, BMPR1b-mRNA ως προς τον γενικό δείκτη ιστικής ζωτικότητας GAPDH-mRNA.

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων, έδειξαν ότι εκτός από την αναμενόμενη περίσσεια της κοινής υπομονάδας BMPR2mRNA, δεν ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφοροποιήσεις των επιπέδων mRNA των υπομονάδων των υποδοχέων σε συνάρτηση με την εμμηνοπαυσιακή κατάσταση, φάνηκε όμως να υπάρχει σχέση των επιπέδων έκφρασης με την ηλικία των γυναικών.

A.2 Εισαγωγή

A.2.1 Οι Ωοθήκες

Η **ωοθήκη** αποτελεί τη βασική λειτουργική μονάδα του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος, γιατί είναι η πηγή παραγωγής των ωαρίων αλλά και των στεροειδών ορμονών του φύλου για τη γυναίκα. Εμβρυολογικά σχηματίζονται από πάχυνση του επιθηλίου που καλύπτει τη γεννητική ταινία. Η λειτουργία των ωοθηκών εξυπηρετείται από μικροσκοπικούς ανατομικολειτουργικούς σχηματισμούς, που λέγονται ωοθυλάκια και αποτελούν τα αναπαραγωγικά κύτταρα της γυναίκας. Τα ωοθυλάκια σχηματίζονται από τα γεννητικά κύτταρα, περίπου μετά την 20^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής και κατασκηνώνουν μέσα στη φλοιώδη μοίρα της ωοθήκης.

Μετά το σχηματισμό τους, ο αριθμός των ωαρίων μειώνεται συνεχώς. Έτσι, κατά τη γέννηση υπάρχουν στις ωοθήκες περίπου 1.000.000 ωοθυλάκια, κυρίως αρχέγονα, τα οποία κατά την έναρξη της ήβης έχουν μειωθεί στις 400.000 περίπου. Οι ωοθήκες έχουν την ιδιομορφία ότι λειτουργούν μόνο για ορισμένα έτη στη διάρκεια της ζωής της γυναίκας. Η έναρξη της λειτουργίας τους, σηματοδοτεί την έναρξη της ήβης, με κύριο χαρακτηριστικό, την 1^η έμμηνο ρύση. Μετά την έναρξη της περιόδου (εμμηναρχή), εμφανίζεται για πρώτη φορά η κυκλική ωοθυλακιορρηξία.

Η λειτουργία των ωοθηκών εξαρτάται από την υπόφυση. Έτσι, πριν από την ήβη, η απουσία λειτουργίας των ωοθηκών, οφείλεται στο ότι η υπόφυση δε στέλνει ερεθίσματα στις ωοθήκες. Η οριστική όμως παύση της λειτουργίας των ωοθηκών, οφείλεται καθαρά σε ενδοωοθηκικά αίτια, που οδηγούν στην ελάττωση, έως σχεδόν εξαφάνιση των ωοθυλακίων και επομένως σε εμμηνόπαυση. Σε αυτήν την περίπτωση, η υπόφυση στην προσπάθειά της να διεγείρει τις ωοθήκες υπερλειτουργεί, οπότε η στάθμη των γοναδοτροπινών στο αίμα αυξάνεται 10 – 20 φορές.



Εικόνα 1. Μορφολογία ωοθήκης (www.iasis-farsala.gr, 2014)

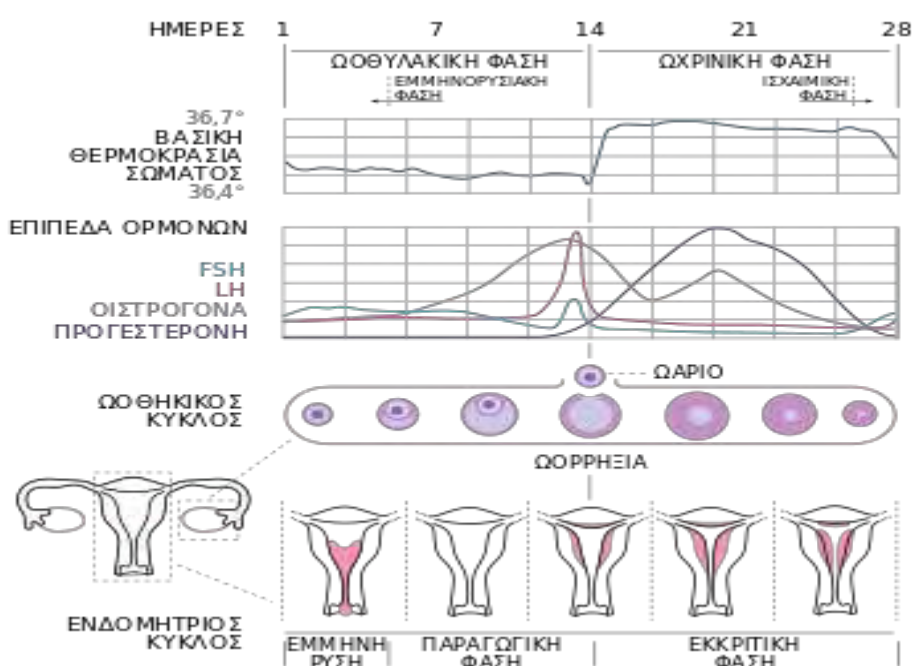
Προκειμένου να επιτευχθεί η έμμηνος ρύση, συνεργάζονται άρρηκτα ο άξονας υποθαλάμου–υπόφυσης-ωοθηκών με τις στεροειδείς ορμόνες, τις γοναδοτροπίνες της υπόφυσης και τους αυτοκρινείς και παρακρινείς ωοθηκικούς παράγοντες.

Χαρακτηριστικό γνώρισμα της ωοθήκης κατά την αναπαραγωγική περίοδο, είναι η πλήρης ωρίμανση μερικών ωοθυλακίων, με αποτέλεσμα την ωοθυλακιορρηξία και την δημιουργία του ωχρού σωματίου, ακολουθούμενη από μεταβολές στην έκκριση των στεροειδών ορμονών.

Η ανθρώπινη ωοθήκη έχει τη δυνατότητα να συνθέσει οιστρογόνα από την 8η εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής, παρόλο που ένα ελάχιστο ποσό στεροειδών ορμονών παράγεται σε όλα τα στάδια της εμβρυϊκής εξέλιξης. Κατά τη ενήλικη ζωή, οι ωοθήκες, με σκοπό να εξυπηρετήσουν την αναπαραγωγή, παράγουν τις στεροειδείς ορμόνες του φύλου, που περιλαμβάνουν τα οιστρογόνα, την προγεστερόνη και τα ανδρογόνα, με ένα ακριβές και ελεγχόμενο μοντέλο έκκρισης, το οποίο ρυθμίζεται μερικά από ορμόνες της υπόφυσης του εγκεφάλου, τις γοναδοτροπίνες (FSH και LH). Τα πιο σημαντικά ωοθηκικά παράγωγα είναι η προγεστερόνη και η οιστραδιόλη. Η ωοθήκη, όμως, εκκρίνει επιπλέον οιστρόνη, ανδροστενδιόνη, τεστοστερόνη και 17-υδροξυπρογεστερόνη.

Το επικρατές οιστρογόνο που κυκλοφορεί στη συστηματική κυκλοφορία της γυναίκας στην αναπαραγωγική ηλικία είναι η οιστραδιόλη, τα επίπεδα της οποίας ρυθμίζονται από το εξελισσόμενο ωοθυλάκιο και το ωχρο σωματίο. Κατά την εμμηνόπαυση, όμως, το επικρατές οιστρογόνο που κυκλοφορεί είναι η οιστρόνη, με βιολογική ισχύ περίπου στο ένα τρίτο της οιστραδιόλης.

Οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου διαδραματίζουν ένα σημαντικό ρόλο στο γυναικείο αναπαραγωγικό κύκλο, προετοιμάζοντας τη μήτρα για την εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Εάν δεν συμβεί η εμφύτευση, η ωθητική στεροειδογένεση εξασθενεί, το ενδομήτριο εκφυλίζεται και ακολουθεί η έμμηνος ρύση..

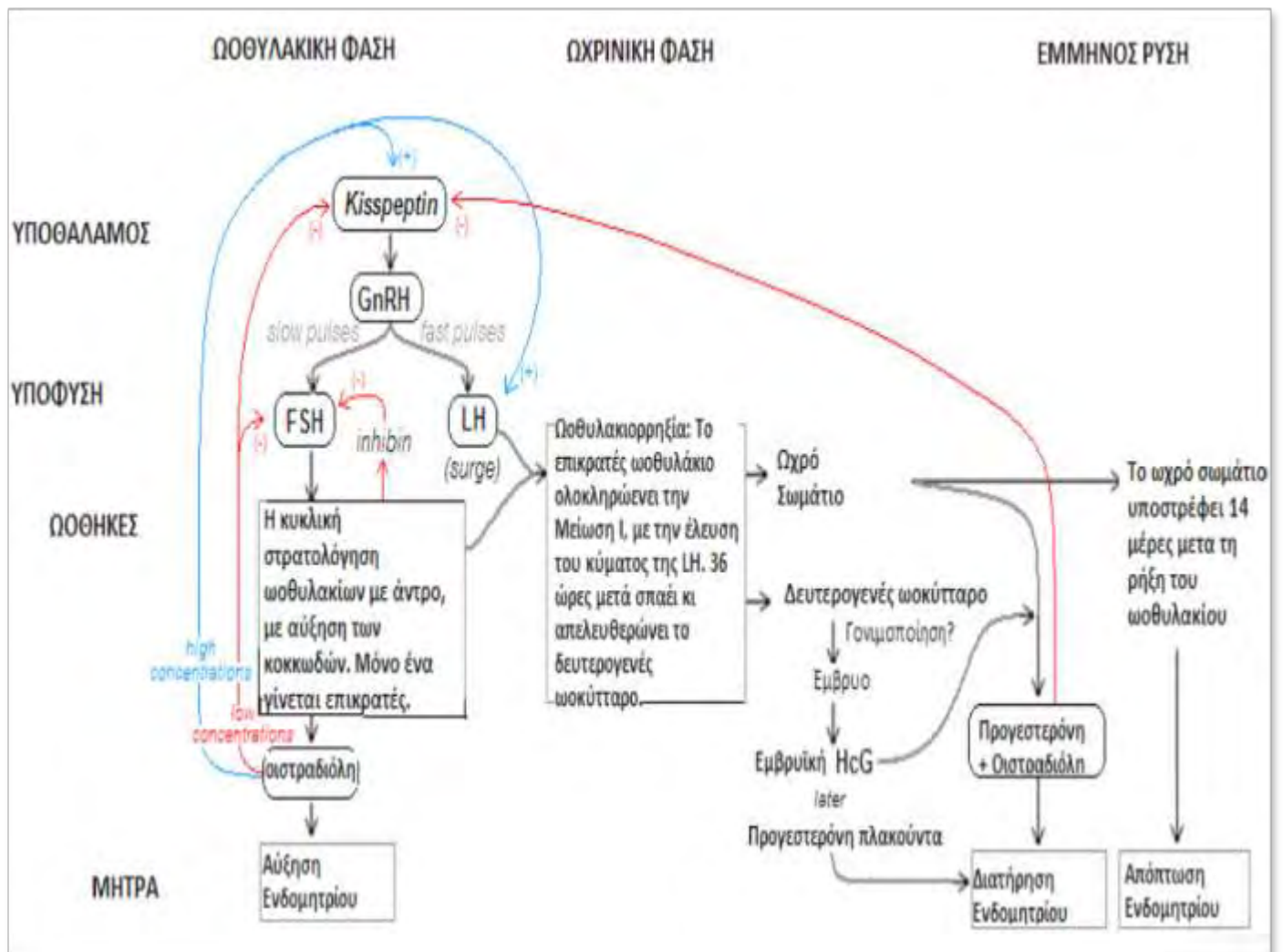


Εικόνα 2. Menstrual cycle (el.wikipedia.org, 2014)

Η ωοθυλακιόρρηξία τοποθετείται χρονικά στο μέσο του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου, η διάρκεια του οποίου υπολογίζεται σε 28 ημέρες περίπου. Η ωοθυλακιόρρηξία, είναι το φαινόμενο της ρήξης του ώριμου ωοθυλακίου, που συμβαίνει περίπου την 14η ημέρα του κύκλου και οδηγεί στην απελευθέρωση του ωαρίου.

Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος, διαιρείται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση, διάρκειας 14 ημερών, που ονομάζεται ωοθυλακική ή παραγωγική, αρχίζει από την πρώτη ημέρα της εμμήνου ρύσεως και τελειώνει με την ωοθυλακιορρηξία του ώριμου ωοθυλακίου. Στη δεύτερη φάση του γεννητικού κύκλου, που ονομάζεται ωχρινική ή εκκριτική, το ωοθυλάκιο που έχει υποστεί ρήξη, μετατρέπεται σε ωχρό σωματίο, το οποίο συνθέτει προγεστερόνη, μετατρέποντας το παραγωγικό ενδομήτριο σε εκκριτικό και το προετοιμάζει έτσι, για την εμφύτευση του τυχόν γονιμοποιημένου ωαρίου.

Τα επίπεδα της προγεστερόνης και της οιστραδιόλης βρίσκονται στο υψηλότερο σημείο οκτώ περίπου ημέρες μετά την αιχμή της LH, τη χρονική στιγμή δηλαδή, που αναμένεται η εμφύτευση του γονιμοποιημένου ωαρίου. Σε περίπτωση εγκυμοσύνης το ωχρό σωματίο διατηρείται ενεργό για 6-8 εβδομάδες, υπό την επίδραση της χοριακής γοναδοτροφίνης (β - hCG) και συνεχίζει να παράγει προγεστερόνη. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα τη συντήρηση της εγκυμοσύνης αναλαμβάνει ο πλακούντας. Το ωχρό σωματίο, εφόσον δεν επέλθει γονιμοποίηση, διατηρείται για 14, περίπου, ημέρες, υπό την επίδραση της LH. Η απουσία εγκυμοσύνης οδηγεί σε εκφύλιση του ωχρού σωματίου και αντικατάστασή του με συνδετικό ιστό, οπότε δημιουργείται το λεγόμενο λευκό σωματίο. Η εκφύλιση του ωχρού σωματίου συνοδεύεται από ελάττωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, με αποτέλεσμα την μη υποστήριξη του ενδομητρίου και την απόπτωση της λειτουργικής του στιβάδας, που έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση της εμμήνου ρύσεως.



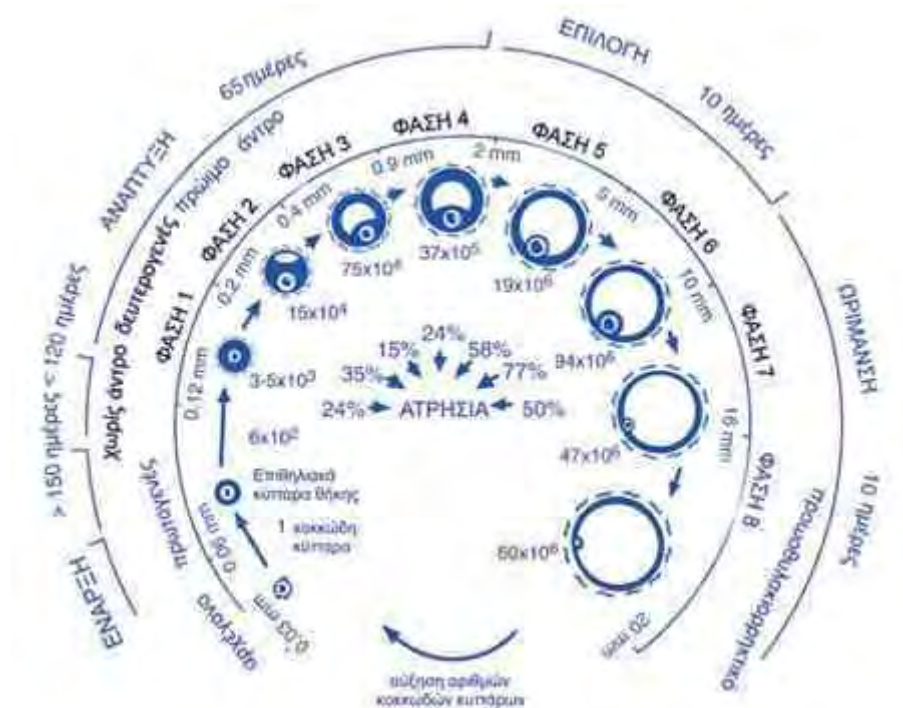
Εικόνα 3. Menstrual Cycle (el.wikipedia.org, 2014)

A.2.2 Τα ωοθυλάκια και η ανάπτυξή τους

Το **ωοθυλάκιο** είναι η βασική μονάδα του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Τα ωοθυλάκια περιέχουν ένα ωοκύτταρο. Η διάμετρος του ώριμου ανθρώπινου ωοκυττάρου είναι περίπου 110 – 115 μm και περιβάλλεται από την πλασματική μεμβράνη. Γύρω από το ωοκύτταρο και την πλασματική του μεμβράνη, βρίσκεται ένας γλυκοπρωτεϊνικός φάκελος, η διαφανής ζώνη, μία δομή πλάτους περίπου 15 – 20 μm , η οποία λεπταίνει μετά τη γονιμοποίηση και προστατεύει το ωοκύτταρο, κατά τη μεταφορά και τη γονιμοποίησή του. Η διαφανής ζώνη περιβάλλεται από μία ζώνη κοκκωδών κυττάρων. Μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και της διαφανούς ζώνης του ωοκυττάρου, υπάρχει ένας χώρος γεμάτος υγρό, ο περιβιτελλινικός χώρος. Όταν το δευτερογενές ωοκύτταρο είναι έτοιμο να περάσει στη διαδικασία της γονιμοποίησης, τότε παραμένει για ένα σύντομο διάστημα στο στάδιο της Μετάφασης II της μείωσης.

Τα κύτταρα που απαρτίζουν το ωοθυλάκιο είναι το ωοκύτταρο, τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα των εσωτερικών και εξωτερικών στοιβάδων της ωοθήκης.

Υπάρχουν πολλές εξελικτικές μορφές των ωοθυλακίων. Η αρχική μορφή, από την οποία προκύπτουν οι υπόλοιπες, ονομάζεται αρχέγονο ωοθυλάκιο, το οποίο έχει διάμετρο 30 – 60 μm και αποτελείται στο κέντρο του από το πρωτογενές ωοκύτταρο στο στάδιο της δικτυοταινίας (Πρόφαση 1^{ης} μειωτικής διαίρεσης), το οποίο περιβάλλεται από μία στιβάδα προκοκκωδών κυττάρων. Ο πυρήνας του πρωτογενούς ωοκυττάρου, καλείται GV (germinal vesicle). Ο σχηματισμός των αρχέγονων ωοθυλακίων ξεκινά περίπου στο μέσο της ενδομήτριας ζωής (6^ο-9^ο μήνα της κύησης). Σαν αποτέλεσμα, όλα τα αρχέγονα ωοθυλάκια που θα μπορούσαν να συμμετέχουν στην αναπαραγωγή κατά τη διάρκεια της ζωής της γυναίκας, είναι παρόντα στις ωοθήκες κατά τη γέννηση. Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων στις ωοθήκες της γυναίκας, αποτελεί τις ωοθηκικές της εφεδρείες.



Εικόνα 4. Ανάπτυξη ωοθυλακίων (Gougeon et. al., 1986)

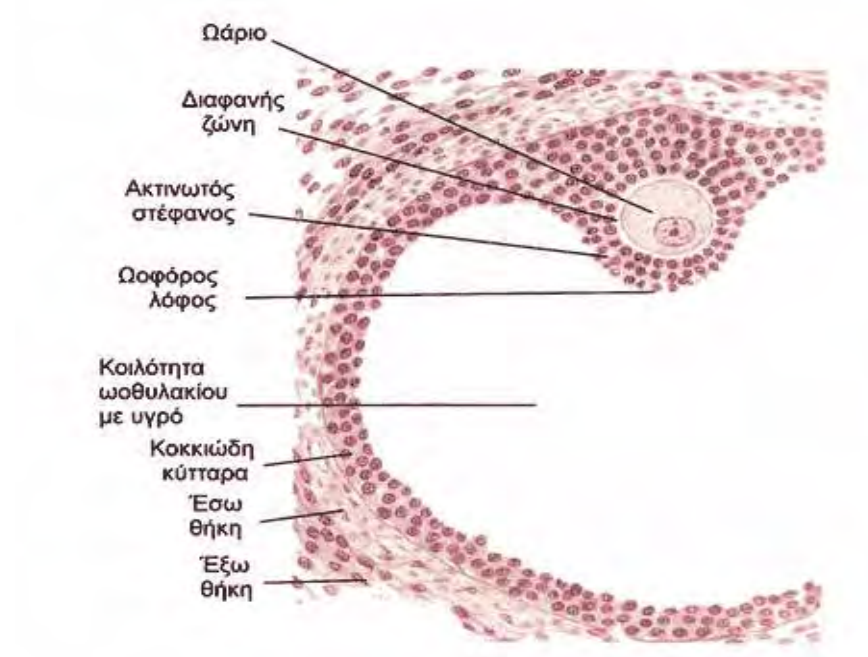
Το επόμενο στάδιο είναι το πρωτογενές ωοθυλάκιο, το οποίο έχει διάμετρο μεγαλύτερη των 60 μm και αποτελείται από το ωάριο, που περιβάλλεται από μία στιβάδα κοκκωδών κυττάρων. Τα σημαντικότερα γεγονότα που συμβαίνουν στο πρωτογενές ωοθυλάκιο, είναι η έκφραση του υποδοχέα της FSH και η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση του ωαρίου. Το δευτερογενές ωοθυλάκιο που αποτελεί εξέλιξη του πρωτογενούς, έχει διάμετρο περίπου 120 μm και αποτελείται από ένα πλήρως ανεπτυγμένο ωάριο, που περιβάλλεται από πολλές στιβάδες κοκκωδών κυττάρων.

Οι σημαντικότερες αλλαγές που συμβαίνουν κατά το στάδιο του δευτερογενούς ωοθυλακίου, είναι ο πολλαπλασιασμός των κοκκωδών κυττάρων, που σχηματίζουν πολλές στιβάδες γύρω από το ωάριο και η απόκτηση θήκης.

Η εξέλιξη του ωοθυλακίου από πρωτογενές σε πλήρως ανεπτυγμένο δευτερογενές, είναι αποτέλεσμα της δράσης αυξητικών παραγόντων, που εκκρίνονται από το ωάριο και έχουν είτε παρακρινή, είτε αυτοκρινή δράση. Οι παράγοντες GDF9 και BMP15, είναι αναντικατάστατοι, κατά τη μετάβαση του ωοθυλακίου από το πρωτογενές στο δευτερογενές στάδιο, πιθανόν λόγω της ικανότητάς τους να διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό και τον τρόπο διάταξης των κοκκωδών κυττάρων (Silva et al., 2004).

Ανάλογα με τον εάν στο δευτερογενές ωοθυλάκιο έχει σχηματιστεί άντρο ή όχι, διακρίνεται σε προκοιλοτικό και κοιλοτικό. Το ώριμο γραφιανό ή προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο, διαφοροποιείται λόγω της παρουσίας της έσω θήκης, η οποία έχει πολύ σημαντική λειτουργική σημασία. Στη διάρκεια της ανάπτυξης του δευτερογενούς ωοθυλακίου, σχηματίζονται δύο στιβάδες κυττάρων θήκης, μία εσωτερική και μία εξωτερική. Κυτταροπλασματικές προεκβολές των κοκκωδών κυττάρων διαπερνούν την διάφανη ζώνη του ωαρίου και δημιουργούν μία δίοδο επικοινωνίας με το ωκύτταρο, μέσω της οποίας μεταφέρονται πληροφορίες ή τροφικά στοιχεία στο ωάριο. Στις δομές αυτές, περιέχονται κυτταροπλασματικά οργανίδια.

Η δομή αυτών των προεκβολών αλλάζει κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης και της ωρίμανσης του ωαρίου (Albertini *et. al.* 2001, Kidder *et al.*, 2002).



Εικόνα 5. Το προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο και οι στιβάδες του.
(www.eugonia.com, 2014)

Η ανάπτυξη του δευτερογενούς ωοθυλακίου, περνά από διάφορα στάδια εξέλιξης, μέχρι το ώριμο γραφιανό ή προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.

Τα ωοθυλάκια, πέρα από την ταξινόμηση που προαναφέρθηκε, διακρίνονται επίσης σε 8 κατηγορίες, σύμφωνα με ανατομικό – ιστολογικές μελέτες.

Η κατηγορία 1 περιλαμβάνει το ώριμο προκοιλοτικό δευτερογενές ωοθυλάκιο, η κατηγορία 2 το πρώιμο κοιλοτικό, η κατηγορία 5 το κοιλοτικό μεγέθους περίπου 5 mm και η κατηγορία 8 το προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο μεγέθους 18 – 20 mm.

Οι υπόλοιπες κατηγορίες περιλαμβάνουν ωοθυλάκια σε ενδιάμεσο βαθμό εξέλιξης.

Κάθε μήνα, κατά τη διάρκεια του γεννητικού κύκλου της γυναίκας, γίνεται επιλογή ενός κυρίαρχου ωοθυλακίου, το οποίο θα ωριμάσει και θα οδηγηθεί σε ωοθυλακιορρηξία.

Υπεύθυνη για την επιλογή αυτού του ωοθυλακίου, είναι η διακυκλική αύξηση της FSH, η οποία αρχίζει κατά την ωχρινική φάση και συγκεκριμένα, περίπου 2 – 3 μέρες πριν την αναμενόμενη έμμηνο ρύση και συνεχίζεται κατά τις πρώτες 5 – 6 μέρες της ωοθυλακικής φάσης του επόμενου κύκλου.

Η διακυκλική αύξηση της FSH, καλείται και «παράθυρο» της FSH. Κατά την περίοδο αυτή, στρατολογούνται στις ωοθήκες αρκετά ωοθυλάκια μεγέθους 2- 5 mm, ένα από τα οποία θα επιλεγεί. Το ωοθυλάκιο που έχει το μεγαλύτερο αριθμό υποδοχέων FSH στα κοκκώδη κύτταρα, δηλαδή το πιο ευαίσθητο στην FSH, θα αρωματοποιήσει πρώτο τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα και κατ' επέκταση, είναι αυτό που θα επιλεγεί.

Τέλος, η ωοθυλακιογένεση, μπορεί να διαιρεθεί σε 3 φάσεις, ανάλογα με την εξάρτηση από τις γοναδοτροπίνες και το εξελικτικό στάδιο:

1. Ανεξάρτητη από γοναδοτροπίνες φάση: Κατά την εξέλιξη ενός ωοθυλακίου από αρχέγονο σε πρωτογενές κι έπειτα σε δευτερογενές.
2. Ευαίσθητη στις γοναδοτροπίνες φάση: Κατά την εξέλιξη ενός ωοθυλακίου από δευτερογενές προ – αντρικό σε πρώιμο αντρικό.
3. Εξαρτώμενη από γοναδοτροπίνες φάση: Κατά την εξέλιξη ενός ωοθυλακίου πέρα από το πρώιμο αντρικό στάδιο, που περιλαμβάνει τη στρατολόγηση, την επιλογή και την ωοθυλακιορρηξία.

A.2.3. Η εμμηνόπαυση

Η εμμηνόπαυση, αποτελεί ένα φυσιολογικό γεγονός στη ζωή της γυναίκας. Η διάγνωση της εμμηνόπαυσης, γίνεται αναδρομικά, μετά τη συμπλήρωση ενός έτους αμηνόρροιας. Η χρονική περίοδος πριν την εμμηνόπαυση, καλείται κλιμακτήριος. Η μέση ηλικία εμμηνόπαυσης είναι τα 51 περίπου έτη. Προς το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου, δηλαδή κατά την κλιμακτήριο, παρατηρούνται διαταραχές στο γεννητικό κύκλο, συνηθέστερα με τη μορφή κύκλων με μεγαλύτερη διάρκεια, που καταλήγουν σταδιακά σε αμηνόρροια και σε αμηνόρροια. Η κλιμακτήριος περιλαμβάνει την περίοδο αμέσως πριν την εμμηνόπαυση και τον πρώτο χρόνο μετά την εμμηνόπαυση και είναι η περίοδος κατά την οποία εμφανίζονται τα πρώτα ενδοκρινολογικά, κλινικά και βιολογικά χαρακτηριστικά της εμμηνόπαυσης.

Η προοδευτική γήρανση των ωοθηκών γίνεται αντιληπτή με τη μεταβολή ορισμένων δεικτών, οι οποίοι είναι ορμόνες, η στάθμη των οποίων μπορεί να μετρηθεί στο αίμα. Παρατηρείται σταδιακή μείωση των inhibins και αύξηση των γοναδοτροπινών. Οι τιμές της FSH αυξάνουν σταδιακά στο αίμα και όταν ανέλθουν αρκετά ($> 25 - 30$ mIU/ml), σηματοδοτούν το τέλος της περιόδου και την εμφάνιση της τελευταίας εμμήνου ρύσης στη ζωή της γυναίκας. Οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν αμηνόρροια και τα επίπεδα της FSH είναι πολύ αυξημένα. Με την πρόοδο της αναπαραγωγικής ηλικίας, ελαττώνονται η inhibin A και η inhibin B. Η ελάττωση της inhibin B, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της FSH, λόγω εξασθένησης του αρνητικού μηχανισμού παλίνδρομης ρύθμισης, που αφορά μόνο στην έκκριση της FSH. Η αύξηση αυτή, αρχικά γίνεται αισθητή στην αρχή της ωοθυλακικής φάσης, αλλά σταδιακά γίνεται εμφανής σε όλα τα στάδια του γεννητικού κύκλου, ενώ όλες οι άλλες ορμόνες παραμένουν σε φυσιολογικά επίπεδα.

Ακόμη, παρατηρούνται μεταβολές στα ωοθυλάκια καθώς οδεύουμε προς την εμμηνόπαυση. Στις γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας, παρατηρείται μικρότερος αριθμός κοιλοτικών ωοθυλακίων την 3^η μέρα του γεννητικού κύκλου, ενώ υπάρχει η τάση να συμβαίνει η ωοθυλακιόρρηξία τους σε ωοθυλάκια μικρότερου μεγέθους. Στην κλινική πράξη έχουν χρησιμοποιηθεί πολλοί, διαφορετικοί δείκτες ελέγχου των ωοθηκικών εφεδρειών.

Στόχος του ελέγχου αυτού, είναι η εύρεση γυναικών με μικρές, για την ηλικία τους, ωοθηκικές εφεδρείες. Οι δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς είναι: η AMH, η FSH, η inhibin B, η οιστραδιόλη, ο αριθμός των ωοθυλακίων, ο όγκος των ωοθηκών, η δοκιμασία της κλομιφαίνης, η δοκιμασία διέγερσης των ωοθηκών με χορήγηση FSH και η διέγερση των ωοθηκών με χορήγηση GnRH. Πιο έγκυρη θεωρείται η μέτρηση της AMH.

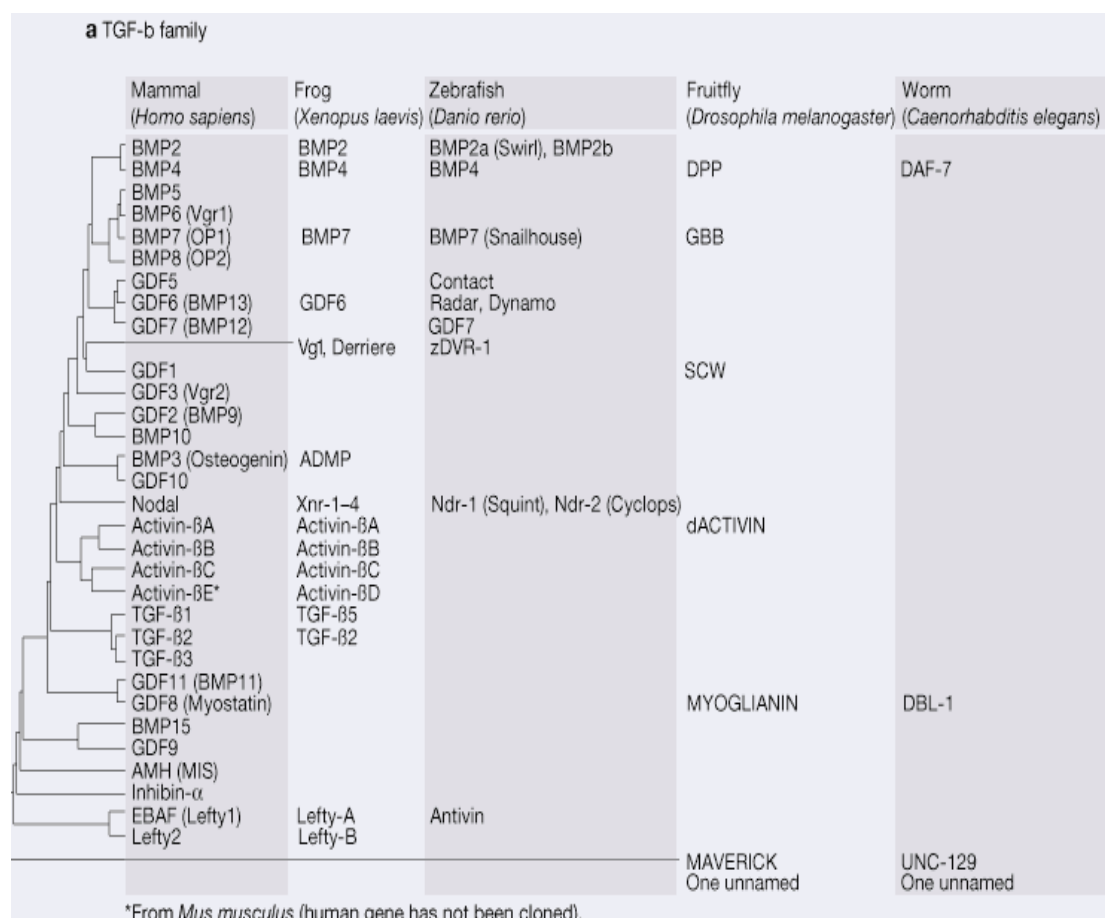
A.2.4. Η TGF – β Υπεροικογένεια

Καθώς εκτυλίσσονταν τα γεγονότα της εξέλιξης και αναδείχθηκαν οι πολυκύτταρες μορφές ζωής, εμφανίστηκε η ανάγκη για αυστηρό έλεγχο της ικανότητας των μεμονωμένων κυττάρων για μετακίνηση, διαίρεση, διαφοροποίηση. Γι' αυτό εξελίχθηκαν πολύπλοκα ενδοκυτταρικά συστήματα επικοινωνίας, ώστε να εξασφαλιστεί η σωστή συμπεριφορά των μεμονωμένων κυττάρων στα πλαίσια του οργανισμού, ως σύνολο. Ανάμεσα σε αυτές τις μορφές επικοινωνίας, μία από τις πιο διαδεδομένες, περιλαμβάνει την έκκριση πολυπεπτιδίων που αναγνωρίζονται από μεμβρανικούς υποδοχείς, συζευγμένους με μεταγραφικούς ρυθμιστικούς παράγοντες. Με 42 μέλη στο ανθρώπινο γονιδίωμα, επτά στη *Drosophila*, και τέσσερις στον *Caenorhabditis elegans*, η οικογένεια TGF - β είναι ένας από τους σημαντικότερους εκπροσώπους αυτής της κατηγορίας μορίων. Ο TGF - β και τα μέλη της υπερ-οικογένειας, όπως οι nodals, οι ακτιβίνες, οι πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών (BMP), οι μυοστατίνες και η αντι-Μυλλεριανή ορμόνη (AMH), ασκούν σημαντικές επιδράσεις στην κυτταρική διαίρεση, διαφοροποίηση, μετανάστευση, την οργάνωση και το θάνατο. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να παραχθούν από πολλούς τύπους κυττάρων, όπως στην περίπτωση του TGF - β, ή από πολύ λίγους, όπως στην περίπτωση της μυοστατίνης, και μπορεί να είναι ενεργοί από τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου μέχρι την ενηλικίωση, όπως στην περίπτωση των BMP , ή για πολύ περιορισμένες χρονικές περιόδους κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όπως στην περίπτωση της AMH.

Σε γενικές γραμμές, η οικογένεια TGF - β παρέχει ένα παράδειγμα της λειτουργικής ευελιξίας μεταξύ ορμονικά δραστικών πολυπεπτιδίων.

Ο TGF - β (transforming growth factor β) είναι ένας σημαντικός αναστολέας της ανάπτυξης των επιθηλιακών κυττάρων. Ανήκει στην υπερ - οικογένεια των κυτοκινών με ποικίλλες, διαφορετικές δράσεις, μέσω των οποίων ρυθμίζουν πολλές βιολογικές διαδικασίες, επηρεάζοντας έτσι την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των ιστών. Η σηματοδότηση του TGF-β χρησιμοποιεί μεμβρανικούς υποδοχείς με δραστικότητα κινάσης σερίνης – θρεονίνης (Ser/Thr), οι οποίοι μεταδίδουν το σήμα μέσω ενδοκυτταρικών μορίων, των smad και συγκεκριμένα των smad2, smad3 και smad4.

Οι πρωτεΐνες smad, βρίσκονται εντός του κυττάρου και μεταδίδουν τα εξωκυτταρικά σήματα, που προέρχονται από συνδέτες του TGF-β, στον πυρήνα, όπου και ενεργοποιείται ο καταρράκτης των γεγονότων της γονιδιακής μεταγραφής.



Εικόνα 6. TGF-β Super Family (www.nature.com, 2014)

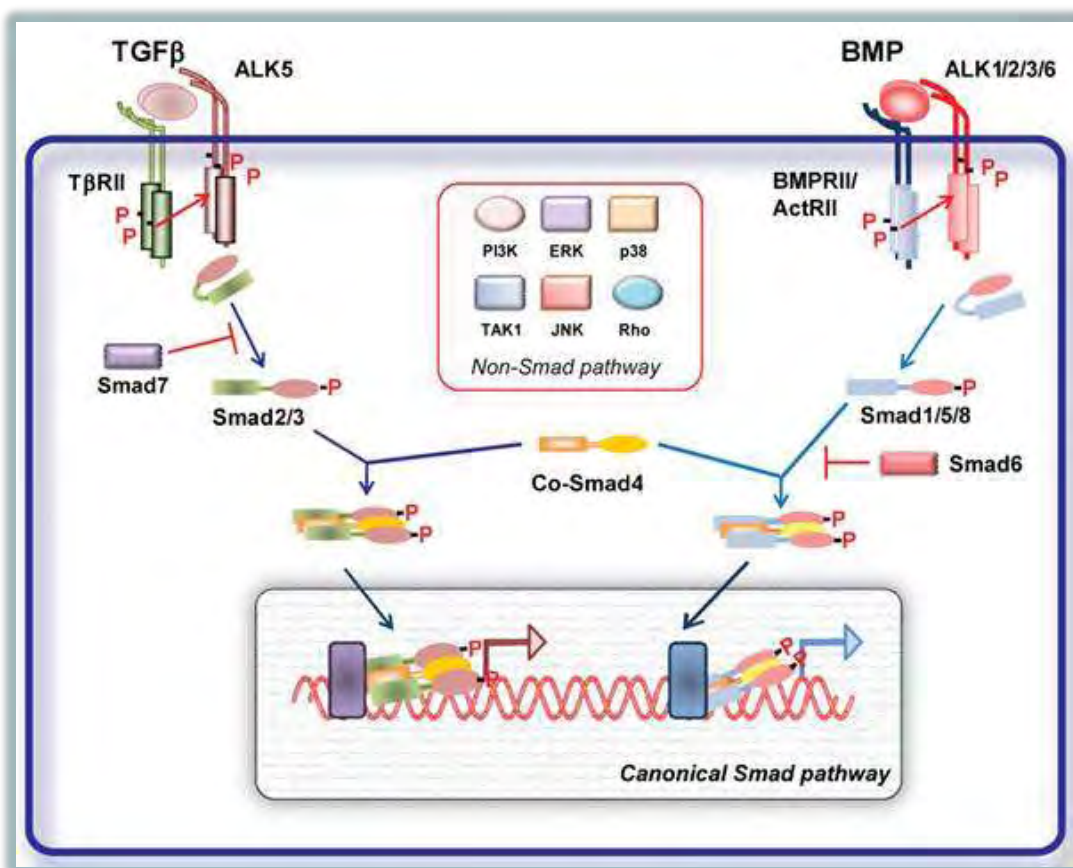
Οχτώ smad πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του ανθρώπου και του ποντικού, 4 από της *Drosophila* και 3 από του *C. elegans*. Μόνο 5 από τις smads των θηλαστικών, οι smad1, smad2, smad3, smad5 και smad8, δρουν ως υπόστρωμα για την οικογένεια των TGF - β υποδοχέων, και αυτές ονομάζονται R Smads, δηλαδή Smads που ρυθμίζονται από τους υποδοχείς. Οι Smads 1, 5, και 8 χρησιμεύουν κυρίως ως υποστρώματα για τους υποδοχείς των BMP (bone morphogenetic factor) και AMH και οι Smads 2 και 3 για τους υποδοχείς των TGFβ, ακτιβίνης, και nodal.

Η Smad4, που αναφέρεται επίσης ως Co-Smad, χρησιμεύει ως κοινό μόριο - συνοδός για όλες τις R Smads. Οι Smad6 και Smad7 είναι ανασταλτικές Smads που χρησιμεύουν ως αντιπερισπασμός, παρεμβαίνοντας σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ Smad-υποδοχέα ή σε Smad-Smad αλληλεπιδράσεις.

Η Mad πρωτεΐνη στη *Drosophila*, η οποία ήταν το πρώτο μέλος αυτής της οικογένειας που προσδιορίστηκε (Raftery και Sutherland, 1999), είναι ορθόλογη με τη Smad1/ 5 των θηλαστικών, ενώ η dSmad2, η Medea και η Dad είναι ορθόλογες, αντίστοιχα, με τις Smad2/3, Smad4, και Smad6/7. Η οικογένεια Smad στο *C. elegans* περιλαμβάνει τις Sma1, Sma2, και Sma3 (Das *et al.* 1999). Το όνομα "Smad" επινοήθηκε με την ταυτοποίηση της ανθρώπινης Smad1 και αναφέρεται στην ομοιότητα της αλληλουχίας μεταξύ των Sma και Mad πρωτεϊνών (Liu *et al.* 1996).

Οι smads, περιέχουν συντηρημένες MH1 και MH2 περιοχές (domains), οι οποίες χωρίζονται μεταξύ τους από μία ευέλικτη linker επιφάνεια. Η N – τελική MH1 περιοχή είναι υψηλά συντηρημένη σε όλες τις R Smads και στη Smad4, αλλά όχι στις Smad6 και Smad7. Η λειτουργία της Linker επιφάνειας ποικίλλει μεταξύ των διάφορων υπο – ομάδων. Η MH2, C – τελική περιοχή, είναι υψηλά συντηρημένη σε όλες τις Smad πρωτεΐνες.

Η φωσφορυλίωση των Smad από το ενεργοποιημένο σύμπλοκο του TGF - β υποδοχέα, είναι ένα σημαντικό βήμα στη μεταγωγή σήματος από τον TGF - β. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης του TGF - β υποδοχέα, ανακαλύφθηκε με συνδυασμό βιοχημικών και γενετικών ευρημάτων (Wrana *et al.* 1994). Η διαδικασία αυτή και η δομική της θεώρηση, έχουν αναλυθεί λεπτομερώς αλλού (Shi and Massagué, 2003). Εν συντομία ο TGF - β προσδένεται σε ζεύγη υποδοχέων, με λειτουργία κινάσης σερίνης/θρεονίνης, που είναι γνωστοί ως τύπου I (TβR-I) και τύπου II (TβR-II) υποδοχείς, σχηματίζοντας ένα ετερο – τετραμερές σύμπλοκο υποδοχέων. Σε αυτό το σύμπλοκο ο TβR-II φωσφορυλιώνει μία περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης, η οποία καλείται GS περιοχή και βρίσκεται αμινοτελικά προς την περιοχή κινάσης του TβR-I. Απουσία συνδέτη, οι μικρές πρωτεΐνες FKBP12 και FKBP12.6 προσδένονται στη GS περιοχή και προκαλούν «απόφραξη» των θέσεων φωσφορυλίωσης στην περιοχή αυτή (Y.G. Chen *et al.* 1997, Datta *et al.* 1998).



Εικόνα 7. Μεταγωγή σήματος απο τα μέλη της TGF - b Οικογένειας (Pardali E. et. al., 2012 www.jibs.com, 2014)

A.2.4.1 Οι παράγοντες GDF9 και BMP15

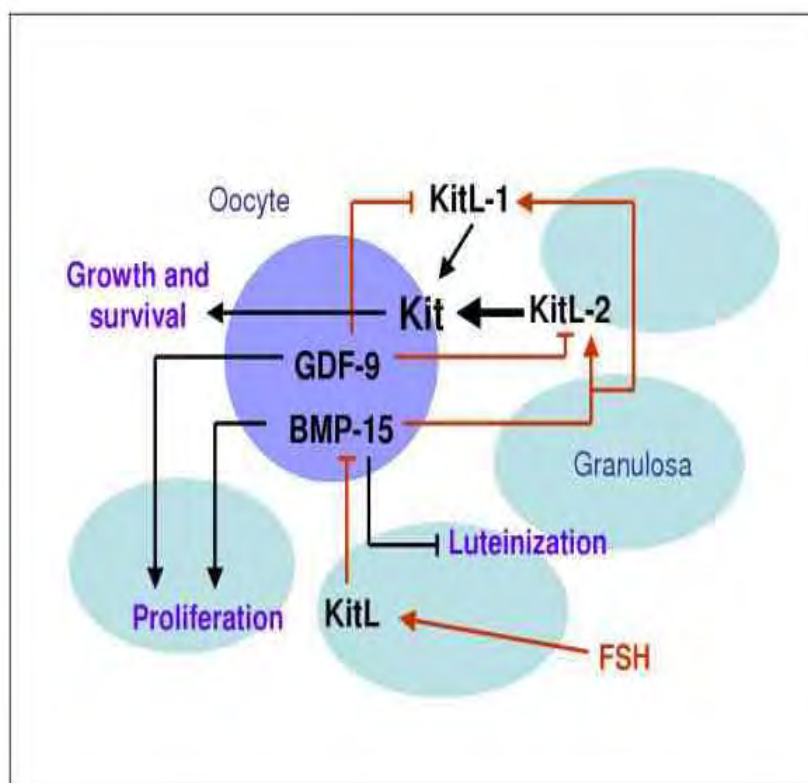
Ο GDF9 και ο BMP15, είναι παράγοντες που εκκρίνονται από τα ωοκύτταρα και εμπλέκονται στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων, κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των ωοθυλακίων (Aaltonen *et al.* 1999, Mc Grath *et al.* 1995, Kedem *et al.* 2011). Έχειδειχθεί ότι παίζουν ρόλο στην ωοθυλακιογένεση, την ωοθυλακιόρρηξία και τη λειτουργία του ωχρού σωματίου (Knight PG & Glistner C, 2003, Su *et. al.*, 2004). Μάλιστα, φαίνεται να υπάρχει συνεργασία μεταξύ των δύο παραγόντων (Mottershead *et al.* 2013).

Και οι δύο παράγοντες αποτελούν μέλη της υπερ – οικογένειας των TGF - β παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί μπορούν επιπλέον να επηρεάσουν την ωοθυλακική λειτουργία με ειδο – ειδικό τρόπο (Hashimoto *et al.* 2005). Ακόμη, είναι απαραίτητοι για τη γονιμότητα του θηλυκού σε διάφορα είδη, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, των προβάτων και των ποντικών (Juengel *et al.* 2004). Επίσης, ασκούν μιτογόνο δράση στα κοκκώδη κύτταρα του ανθρώπου (Di Pasquale *et. al.*, 2004) και του ποντικού (Mc Natty *et. al.*, 2005).

Ο BMP15 και ο GDF9 εκφράζονται από το ωοκύτταρο σε πρώιμα στάδια της ωοθυλακιογένεσης στον άνθρωπο και συγκεκριμένα ο BMP15, είναι παρών σε πρωτογενή ωοθυλάκια, όταν αυτά περικλείονται πλήρως από μία τουλάχιστον σειρά κοκκωδών κυττάρων. Ο GDF9 έχει συσχετιστεί με διαφορές στο ρυθμό ωοθυλακιόρρηξίας και με πρόωρη παύση της ωοθηκικής λειτουργίας (Mc Natty *et al.* 2007, Juengel *et al.* 2004, Kovanci *et al.*, 2007, Wang *et al.* 2010).

Η σημασία των παραγόντων αυτών στη φυσιολογική λειτουργία των ωοθηκών των ποντικών, έχειδειχθεί με knockout πειράματα. Θηλυκά ποντίκια από τα οποία έλειπε ο GDF9 παράγοντας, είναι υπογόνιμα και η ανάπτυξη των ωοθυλακίων δεν προχωρά πέρα από το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου (Dong *et al.*, 1996).

Αντιθέτως, θηλυκά ποντίκια από τα οποία έλειπε ο BMP15 παράγοντας, είναι γόνιμα, με ελάχιστες μόνο αλλαγές στην ωοθυλακιογένεση (Yan *et al.* 2001).



Εικόνα 8. Η δράση των GDF9 και BMP15 στα κοκκώδη κύτταρα του ωοκυττάρου. (www.rbej.com, 2014)

Επιπρόσθετα, μερική έλλειψη της λειτουργίας του BMP15 σε θηλυκά πρόβατα, οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού ωοθυλακιορρηξίας, ενώ μετάλλαξη που οδηγεί σε πλήρη απώλεια λειτουργίας του, επηρεάζει δραματικά των ωοθυλακιογένεση και τη γονιμότητα σε πρόβατα και ανθρώπους. Κυρίως, η μετα- μεταφραστική τροποποίηση της BMP15 προ- πρωτεΐνης, παίζει σημαντικό ρόλο στη γυναικεία γονιμότητα και διαφοροποιήσεις στο στάδιο αυτό, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα ειδο- ειδικές διαφορές στο ρυθμό ωοθυλακιορρηξίας και στα ωοθηκικά αποθέματα (Galloway *et al.* 2000, Juengel *et al.* 2002, Hanrahan *et al.* 2004, Di Pasquale *et al.*, 2004).

Ο BMP15 βρίσκεται στην Xp11.2 και εκφράζεται αποκλειστικά στο ωοκύτταρο κατά την ωοθυλακιογένεση. Ο BMP15 ή GDF9b παράγοντας, λειτουργεί είτε σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές, είτε ετεροδιμερή με τον GDF9 (De Resende *et al.* 2012). Όπως οι περισσότεροι TGFβ/BMP παράγοντες, εκφράζεται αρχικά ως προ- πρωτεΐνη, που αποτελείται από ένα μόριο – σηματοδότη, από μία προ- περιοχή και από ένα ώριμο πεπτίδιο.

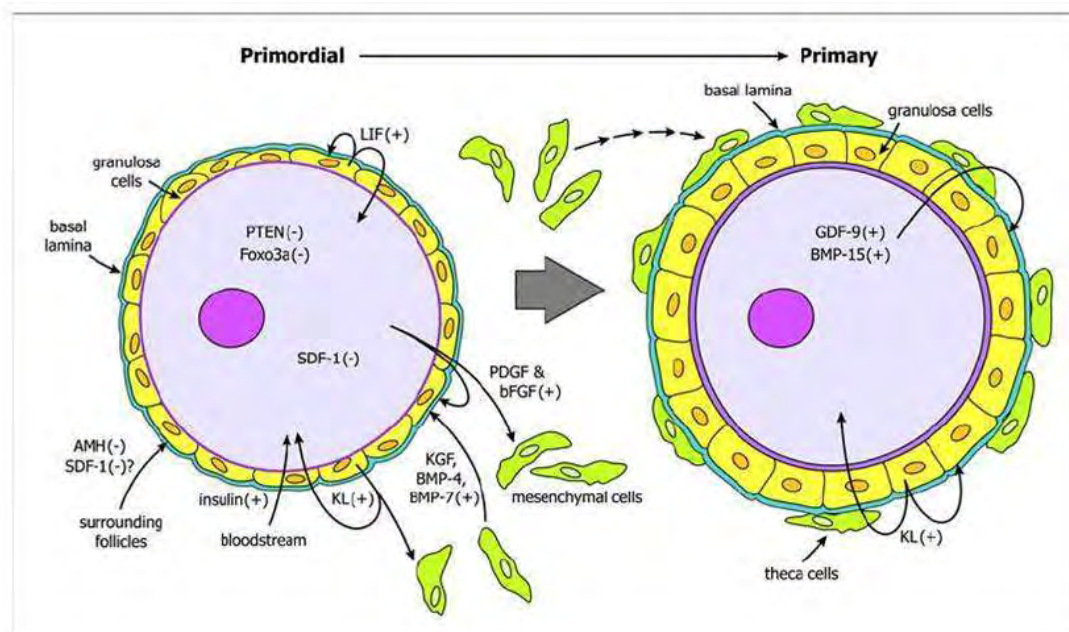
Η περιοχή που αντιστοιχεί τη βιολογικά ενεργή μορφή του παράγοντα, εδράζεται στην καρβοξυτελική περιοχή του μορίου (Juengel *et al.*, 2004). Η δράση της προ – πρωτεΐνης των BMP15 και GDF9 είναι άγνωστη.

Τα ώριμα πεπτίδια, μπορούν να σχηματίσουν ομοδιμερή ή ετεροδιμερή με άλλα μέλη της TGF – β υπερικογένειας. Η περιοχή του ώριμου πεπτιδίου των περισσότερων μελών της TGF – β υπερικογένειας, περιέχει συνήθως επτά κυστεΐνες, η μια εκ των οποίων είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του δισουλφιδικού δεσμού, μεταξύ των δύο ώριμων πεπτιδίων. Από το μόριο των BMP15 και GDF9, λείπει η κυστεΐνη αυτή. Για το λόγο αυτό, είναι εφικτός ο σχηματισμός βιολογικά ενεργών ομοδιμερών, αλλά και ετεροδιμερών, μεταξύ των δύο παραγόντων. Μετά την αφαίρεση του πεπτιδίου – σηματοδότη, η προ- πρωτεΐνη πρώτα υφίσταται διμερισμό και στη συνέχεια πρωτεολυτική διάσπαση (Rosetti *et al.* 2009).

Και ο GDF9 παράγοντας εκφράζεται αρχικά ως προ - πρωτεΐνη και το εναλλακτικό μάτισμα του μορίου, οδηγεί σε διαφορετικά μετάγραφα του παράγοντα. Ασθένειες που σχετίζονται με τον GDF9 είναι το Σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, η πρόωρη ωοθηκική ανεπάρκεια (Zhao *et al.* 2007, Dixit *et al.* 2005), και ο καρκίνος των νεφρών. Ο GDF9 παράγοντας, όπως και ο BMP15, συμμετέχει στην ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων και στην ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων. Ακόμη, προωθεί τη μετάβαση των κυττάρων από την G0 / G1 στις S και G2 / M φάσεις, μέσω αύξησης της έκφρασης των CCND1 και CCNE1 και φωσφορυλίωσης της RB1. Η φωσφορυλίωση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή λειτουργία του παράγοντα. Ρυθμίζει την έκφραση της STAR πρωτεΐνης και την από το cAMP εξαρτώμενη απελευθέρωση προγεστερόνης, στα κοκκώδη κύτταρα και στα κύτταρα θήκης. Μετριάζει τις κατασταλτικές επιδράσεις της ακτιβίνης A (Mc Tavish *et al.* 2013) στην έκφραση της STAR πρωτεΐνης και στην παραγωγή προγεστερόνης, αυξάνοντας την έκφραση ινχιπίνης B. Καταστέλλει ακόμη την παραγωγή των FST και FSTL3 στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα (Shi *et al.* 2011).

Οι BMPs δρουν στα κύτταρα στόχους, μέσω 2 τύπων υποδοχέων: 1) ο τύπος I περιλαμβάνει τους BMPR1a και BMPR1b και 2) ο τύπος II περιλαμβάνει τον BMPR2.

Ο BMP15 ή GDF9 παράγοντας λειτουργεί είτε σχηματίζοντας ένα ομοδιμερές BMP15/BMP15, είτε ετεροδιμερή με τον GDF9 και χρειάζεται 2 υποδοχείς από κάθε τύπο σχηματίζοντας έτσι ένα ετεροτετραμερές σύμπλοκο υποδοχέων (De Resende *et al.* 2012). Ο εκκρινόμενος, βιολογικά ενεργός BMP15 ως διμερές συμμετέχει σε μεταγωγή σήματος, μέσω υποδοχέων με λειτουργία κινάσης σερίνης / θρεονίνης.



Εικόνα 9. Η δράση των GDF9 BMP15 στα αρχέγονα (primordial) και πρωτογενή (primary) ωοθυλάκια. Φαίνεται ότι και οι δύο παράγοντες δρουν από το στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου κι έπειτα. (Ωρίμανση ωαρίου, Νικολέττος, 2014)

Για την ενεργοποίηση του BMP15 παράγοντα, απαιτείται αλληλεπίδραση μεταξύ των BMPR2 και BMPR1b υποδοχέων. Για την ενεργοποίηση του GDF9 παράγοντα, απαιτείται αλληλεπίδραση μεταξύ της κοινής, BMPR2, υπομονάδας και του TGFBR1 υποδοχέα (Mazerbourg *et al.* 2007, Vitt *et al.* 2002). Μεταλλαγές του GDF9 γονιδίου οδηγούν σε ωθητική δυσγενεσία ή και πρόωρη ωθητική ανεπάρκεια. Οι υποδοχείς αυτοί με τη σειρά τους διεγείρουν τις ρυθμιστικές Smad πρωτεΐνες, οι οποίες μετατοπίζονται στον πυρήνα και ρυθμίζουν τη μεταγραφή γονιδίων – στόχων.

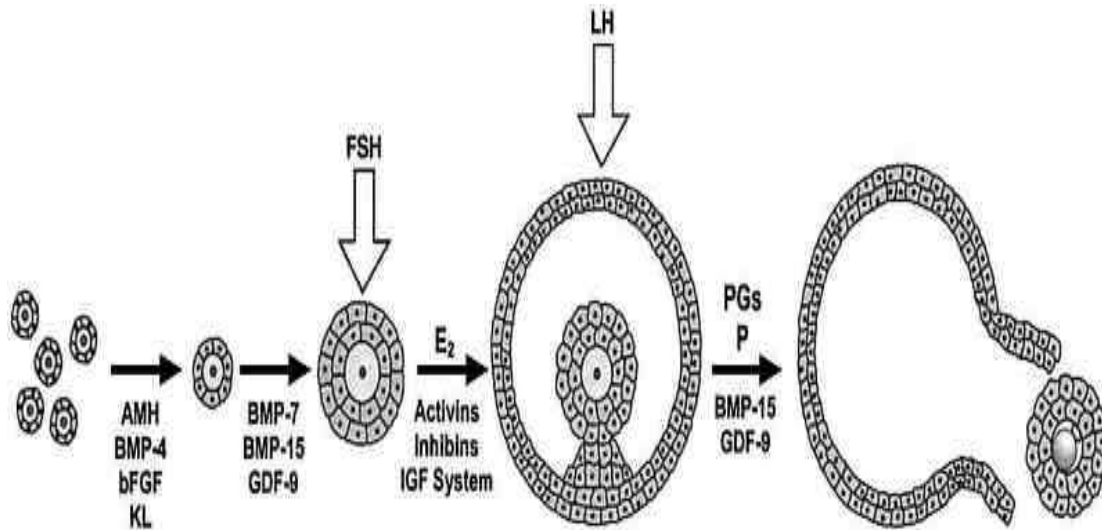
Το BMPR2 γονίδιο κωδικοποιεί ένα μέλος της BMP οικογένειας διαμεμβρανικών υποδοχέων, με ενεργότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης. Τα μόρια – συνδέτες αυτού του υποδοχέα είναι BMPs, που αποτελούν μέλη της υπερικογένειας των TGF - β παραγόντων.

Όταν το μόριο – συνδέτης ενωθεί με τον υποδοχέα, τότε δημιουργείται ένα σύμπλοκο, που αποτελείται από δύο τύπου II και δύο τύπου I κινάσες σερίνης/θρεονίνης. Οι τύπου II υποδοχείς φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τους τύπου I υποδοχείς, οι οποίοι αυτοφωσφορυλιώνονται και στη συνέχεια δεσμεύουν και ενεργοποιούν Smad πρωτεΐνες, οι οποίες ρυθμίζουν τη μεταγραφή (Wong *et al.* 2006).

Το πρότυπο έκφρασης των δύο παραγόντων διαφέρει μεταξύ των ειδών, με τον GDF9 παράγοντα να εκφράζεται σε αρχέγονα ωοθυλάκια στα πρόβατα και στα βοοειδή, αλλά όχι στα ποντίκια (Bodensteiner *et al.* 1999, Eckery *et al.* 2002). Συνήθως, το γονίδιο BMP15 δεν εκφράζεται σε αρχέγονα ωοθυλάκια σε ποντίκια, πρόβατα και βοοειδή, αλλά έχει εντοπιστεί σε κάποια είδη πόσσουμ (Eckery *et al.* 2002). Στα τρωκτικά και οι 2 παράγοντες, παρεμποδίζουν την, από την FSH προκαλούμενη, παραγωγή στεροειδών ορμονών από τα κοκκώδη κύτταρα, μερικώς μέσω παρεμπόδισης της έκφρασης των υποδοχέων των γοναδοτροπινών. Συγκεκριμένα, στα κοκκώδη κύτταρα του ποντικού, ο GDF9 εμποδίζει την πρόσδεση της ανθρώπινης hCG και ο BMP15 μειώνει την έκφραση του mRNA του υποδοχέα της FSH. Αυτή η αρνητική επίδραση του BMP15 στην, από την FSH προκαλούμενη, έκκριση προγεστερόνης, σχετίζεται με μία μείωση στα επίπεδα της STAR πρωτεΐνης, μεταφορέα της χοληστερόλης και σχετίζεται επίσης με τη μείωση των επιπέδων δύο πολύ σημαντικών ενζύμων της στεροειδογένεσης, των 3β – HSD και P450_{scc}.

Τα σηματοδοτικά μονοπάτια, μέσω των οποίων δρουν οι δύο παράγοντες, είναι επίσης διαφορετικά. Μελέτες *in vitro* (Otsuka *et al.* 2000) έδειξαν ότι τα κοκκώδη κύτταρα είναι ο στόχος των παρακρινών δράσεων του BMP15 στο ωοθυλάκιο και μάλιστα ο BMP15 φαίνεται να αλληλεπιδρά με τον BMPRIb υποδοχέα και να διεγείρει το μονοπάτι των Smad 1/5/8 σε πρωτογενή κοκκώδη κύτταρα ποντικού και στην COV434 κυτταρική σειρά ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων (Moore *et al.*, 2003). Η επίδραση του BMP15 στα κοκκώδη κύτταρα πραγματοποιείται δηλαδή, με τη διαμεσολάβηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των Smad1/5/8 και/ή της MAPK κινάσης (Moore *et al.* 2003, Su *et al.* 2004). Έχει δειχθεί ότι ο BMP15 έχει ανασταλτική δράση στην FSH των κοκκωδών κυττάρων των θηλαστικών (Otsuka *et al.* 2000, Su *et al.* 2004, McNatty *et al.* 2005).

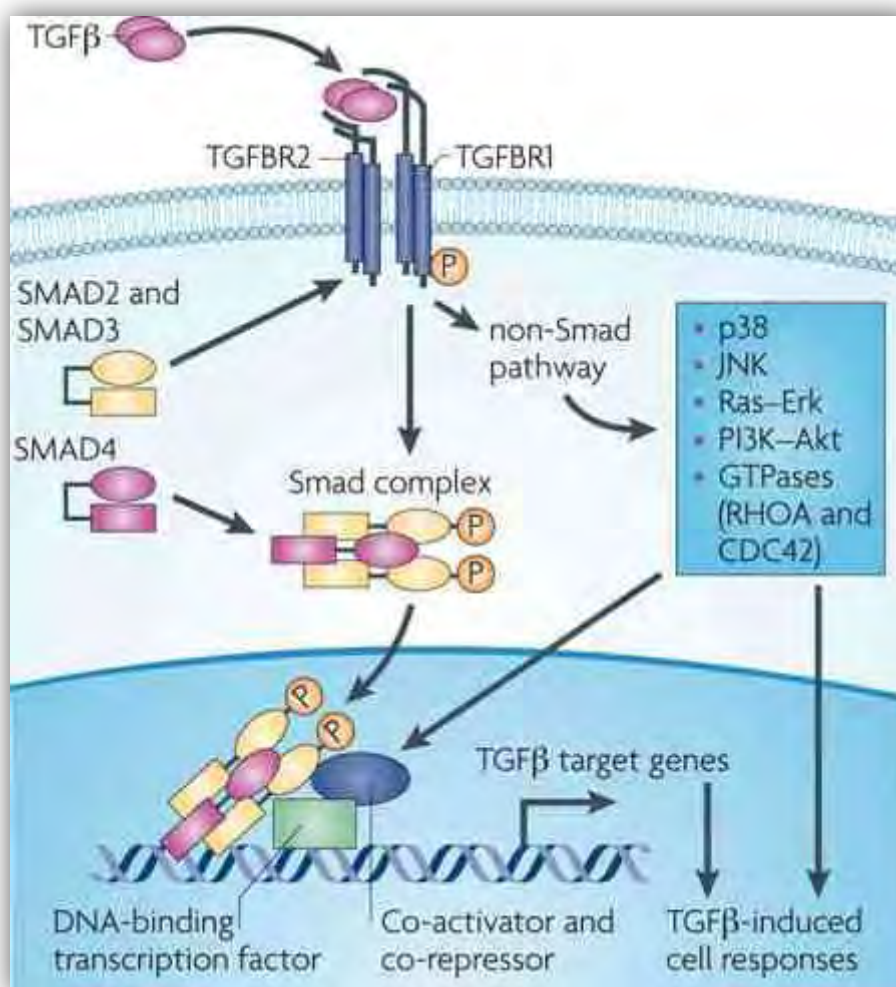
Οι παράγοντες αυτοί μπορούν επιπλέον να επηρεάσουν την ωοθυλακική λειτουργία με ειδο – ειδικό τρόπο (Hashimoto *et al.* 2005).



Εικόνα 10. Η δράση των BMP15 και GDF9 στην ωρίμανση και τη ρήξη του ωοθυλακίου. (characterization of the ovarian transcription, humupd.oxfordjournals.org, 2014)

A.2.4.2. Ο παράγοντας TGFBR1

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το TGFBR1 γονίδιο σχηματίζει ένα ετερομερές σύμπλοκο με τους τύπου II TGFβ (TGFBR2) υποδοχείς, μετά από τη δέσμευση του TGF - β παράγοντα, με αποτέλεσμα τη μεταγωγή του TGF - β σήματος από την κυτταρική επιφάνεια στο κυτταρόπλασμα. Ο TGFBR2 φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τον TGFBR1, ο οποίος με τη σειρά του φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί ένα υποσύνολο των Smad πρωτεϊνών, τις Smad2 και Smad3, που μετατοπίζονται στον πυρήνα και σχηματίζουν μεταγραφικά σύμπλοκα με παράγοντες που δεσμεύονται στο DNA και συνενεργοποιητές/συν-καταστολείς. Η κωδικοποιούσα πρωτεΐνη είναι μία κινάση σερίνης/θρεονίνης.



Εικόνα 11. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης του TGF- β παράγοντα (TGFβ signalling a complex web in cancer progression, Ikushima et al. 2010, www.nature.com)

Για να επιτελέσει τη μετάδοση σήματος ο TGFBR1 εκτείνεται στην κυτταρική μεμβράνη, ώστε το ένα άκρο της πρωτεΐνης να προεξέχει από την εξωτερική επιφάνεια του κυττάρου (εξωκυτταρικά), ενώ το άλλο άκρο παραμένει εντός του κυττάρου (ενδοκυτταρικά). Όταν ο TGF - β συνδεθεί με τον TGFBR1, τότε αυτός ενεργοποιείται και συνδέεται με τον TGFBR2, που βρίσκεται στην κυτταρική επιφάνεια. Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες σχηματίζουν ένα σύμπλοκο, που πυροδοτεί τη μεταγωγή σήματος, με τη συμμετοχή και άλλων πρωτεϊνών του μονοπατιού αυτού.

Επειδή ο TGFBR1 παρεμποδίζει τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, είναι απαραίτητος για την καταστολή της δημιουργίας όγκων. Το γονίδιο του TGFBR1 βρίσκεται στον μακρύ βραχίονα του 9 χρωμοσώματος, στη θέση 22. Μεταλλάξεις αυτού του γονιδίου σχετίζονται με το σύνδρομο αορτικού ανευρύσματος Loey-Dietz (LDAS) (Singh *et al.* 2006). Πολλά διαφορετικά μετάγραφα αυτού του γονιδίου έχουν βρεθεί, τα οποία κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές της πρωτεΐνης. Ο TGF - β λειτουργεί ως καταστολέας όγκων, σταματώντας τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση.

Η χορήγηση TGF - β φαίνεται να προστατεύει από την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού, σε πειράματα που έγιναν με διαγονιδιακά ποντίκια. Τυχόν παρεμπόδιση του μονοπατιού TGFβ/Smad έχει συσχετιστεί με πολλούς καρκίνους, κυρίως του γαστρεντερικού και ίσως του απεκκριτικού συστήματος, λόγω μιας μετάλλαξης που προκαλεί αδρανοποίηση του TGFBR2 υποδοχέα. Έχουν βρεθεί επίσης ομόζυγες διαγραφές του TGFBR1 και μεταλλάξεις αδρανοποίησης των Smad γονιδίων.

Ακόμη, είναι πιθανό, ο TGF - β να έχει ογκογονικό ρόλο. Μόλις τα κύτταρα χάσουν την ευαισθησία τους στην αυτόματη αναστολή ανάπτυξης, στην οποία παίζει ρόλο ο TGFBR1, αυτοκρινή TGF σήματα μπορούν να προωθήσουν την ογκογένεση. Συχνά παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα του TGFBR1 σε προχωρημένα καρκινώματα και έχουν συσχετιστεί με αυξημένη διεισδυτικότητα του όγκου και με την εξέλιξη της νόσου (Chen *et al.* 2004, Mc Knight *et al.* 2007, Castillejo *et al.* 2009, Liao *et al.* 2010, Dutt *et al.* 2008).

Στην παραπάνω εικόνα περιγράφεται ο μηχανισμός λειτουργίας του TGFBR1: Η μεταγωγή σήματος από τον TGFβ γίνεται μέσω μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν οι Smad πρωτεΐνες και μέσω μονοπατιών στα οποία δεν συμμετέχουν. Ο TGF - β συνδέτης, συνδέεται με τον TGFBR2 και τον TGFBR1.

Ο TGFBR2 φωσφορυλιώνει (P) τον TGFBR1, ο οποίος στη συνέχεια φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις Smad2 και Smad3. Οι ενεργοποιημένες Smad2 και Smad3 σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με τη Smad4 και μετατοπίζονται στον πυρήνα. Στον πυρήνα, το Smad σύμπλοκο αλληλεπιδρά με παράγοντες μεταγραφής που προσδένονται στο DNA και συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς, οι οποίοι προσδένονται στις περιοχές του υποκινητή των γονιδίων στόχων του TGFβ και ρυθμίζουν έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων - στόχων. Η ενεργοποίηση του TGFβ ενεργοποιεί επίσης και άλλους καταρράκτες σηματοδότησης, εκτός από το μονοπάτι των Smad. Οι TGFβ υποδοχείς ενεργοποιούν επίσης τα: p38, JNK, Ras-Erk, PI3K-Akt, και μικρές GTPases όπως η RhoA και η CDC42.

Β. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟ ΜΕΡΟΣ



Don Shank, Laboratory Still Life 01 (2.bp.blogspot.com, 2014)

B.1 Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ερευνήσουμε την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ηλικίας και της εμμηνόπαυσης, με τα επίπεδα έκφρασης (mRNA) των γονιδίων BMPR2, TGFBR1, BMPR1b, στις ωοθήκες. Προηγούμενες μελέτες σχετικά με την έκφραση των παραγόντων GDF9 και BMP15, έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική σχέση μεταξύ ηλικίας και εμμηνόπαυσης και των επιπέδων των παραγόντων.

B.2 Πρωτόκολλο συλλογής δειγμάτων

Η συλλογή δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας (ΠΓΝΛ). Για τη λήψη των δειγμάτων, ήταν απαραίτητη η συνεννόηση μας εκ των προτέρων, με τον υπεύθυνο χειρουργό – γυναικολόγο. Για την παρουσία μας στα χειρουργεία της Γυναικολογικής μονάδας του ΠΓΝΛ, ήταν απαραίτητη η ειδική, αποστειρωμένη ενδυμασία, η μάσκα και τα γάντια. Τα δείγματα προέρχονται από γυναίκες – ασθενείς διαφόρων ηλικιών, σε διάφορα στάδια εμμηνόπαυσης, που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση για γυναικολογικούς λόγους. Τα δείγματα που συλλέξαμε, ήταν δείγματα ωοθηκικού ιστού, μεγέθους ίσου περίπου με αυτό ενός μικρού στραγαλιού. Συλλέχτηκαν δείγματα ωοθηκικού ιστού, μεγέθους ίσου περίπου με αυτό ενός μικρού στραγαλιού, 19 συνολικά γυναικών. Ακολουθούν οι Πίνακες με την αναλυτική παρουσίαση των δειγμάτων.

ΠΙΝΑΚΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑΣ

Αρ.δείγματος	Ημ/νία λήψης	Εμμηνό παυση	Ηλικία ασθενούς	Λόγος χειρουργείου	Τύπος χειρουργείου	Λοιπά κλινικά χαρακτηριστικά
X1	24/3/14	Μετά	87 ετών	Αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, ενδομητριοειδούς τύπου, grade 3	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Κολπική αιμόρροια, σκωληκοειδίτιδα, χολοκυστεκτομή
X2	21/3/14	Μετά	52 ετών	Ινομύωμα μήτρας	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Αιμορραγίες μήτρας – κόλπου, θυροειδής εκτομή
X3	24/3/14	Πρίν	38 ετών	Παθολογικές αιμόρροιες μήτρας - κόλπου	Υστεροσκόπησ η + Αφαίρεση κύστης ΔΕ ωοθήκης	χολοκυστεκτομή
X4	24/3/14	Πρίν	38 ετών	Δερμοειδής κύστη ΔΕ ωοθήκης	Λαπαροσκοπική αφαίρεση κύστης ΔΕ ωοθήκης	Αφαίρεση κύστης ΑΡ ωοθήκης, σκωληκοειδεκτομή
X5	31/3/14	Πρίν	48 ετών	Ινομυωματώδης μήτρα	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Ινοκυστική μαστοπάθεια, υπερλιπιδαιμία υπο αγωγή, κύστεις ήπατος
X6	1/4/14	Πρίν	40 ετών	Καρκίνος τραχήλου μήτρας, αδενοκαρκίνωμα in situ του του ενδοτραχήλου ASCUS + AGUS	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Υποθυροειδισμός
X7	1/4/14	Πρίν	50 ετών	Μητρορραγίες προς ΟΥΜΕ, διαταρχές εμμήνου ρύσης	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Πολύποδας ενδομητρίου
X8	4/4/14	Μετά	64 ετών	Μόρφωμα ΔΕ ωοθήκης	Ερευνητική Λαπαροτομία	Ινοκυστική μαστοπάθεια, αμυγδαλεκτομή, ωχρά κηλίδα, ελκώδης κολίτιδα, υπερχοληστεριναιμία
X9	4/4/14	Μετά	54 ετών	Κύστη ΔΕ ωοθήκης	Ερευνητική Λαπαροτομία	Έλκος στομάχου, ΧΑΠ ηπίου β.

Αρ.δείγματος	Ημ/νία λήψης	Εμμηνό παυση	Ηλικιά ασθενούς	Λόγος χειρουργείου	Τύπος χειρουργείου	Λοιπά κλινικά χαρακτηριστικά
X10	5/5/14	Μετά	55 ετών	Κυστικά μορφώματα ωοθηκών άμφω	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	ΣΔ ινσουλινοεξαρτώμενος, ΧΑΠ, θυροειδοπάθεια, Αναιμία, Δυσλιπιδαιμία, Βρογχικό άσθμα, σκωληκοειδεκτομή, bypass ενός αγγείου lap
X11	30/5/14	Πρίν	53 ετών	Ινομύωμα μήτρας	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	IVF (ανδρικός παράγοντας), εμμηναρχή 12 ετών, διαταραχές Ε.Ρ. από Ζετίας, κατάθλιψη, αιματόμητρα
X12	30/5/14	Μετά	79 ετών	Καρκίνος ενδομητρίου	Ερευνητική λαπαροτομία	Αφαίρεση πολύποδα, παθολογικές αιμορραγίες μήτρας – κόλπου, ΣΔ, θυροειδοπάθεια Hashimoto
X13	26/5/14	Πρίν	48 ετών	Ινομύωμα μήτρας	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Παθολογικές αιμορραγίες μήτρας - κόλπου
X14	2/6/14	Πρίν	43 ετών	Ινομύωμα μήτρας	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Σφηνοειδείς εκτομές κύστεων AP + ΔΕ ωοθήκης
X15	24/6/14	Μετά	69 ετών	Αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου	Ερευνητική λαπαροτομία	Κολπική αιμόρροια, αυξημένη ουρία, δυσλιπιδαιμία
X16	24/6/14	Μετά	74 ετών	Καρκίνος ενδομητρίου	Ερευνητική λαπαροτομία	Κολπική αιμόρροια, καρδιοπάθεια υπο αγωγή, αρθρίτιδα

Αρ.δείγματος	Ημ/νία λήψης	Εμμηνό παυση	Ηλικία ασθενούς	Λόγος χειρουργείου	Τύπος χειρουργείου	Λοιπά κλινικά χαρακτηριστικά
X17	25/6/14	Μετά	75 ετών	Καρκίνος ενδομητρίου	Ερευνητική λαπαροτομία	ΣΔ τύπου 2 ινσουλινοθεραπευόμενο, πολυοζώδης βρογχοκήλη, παθολογικές αιμόρροιες, αυξημένο σάκχαρο
X18	25/6/14	Πρίν	47 ετών	Ινομύωμα μήτρας – Κύστη ωοθήκης	Ερευνητική λαπαροτομία	Θυροειδής εκτομή, στίγμα β' Μεσογειακής αναιμίας υπο αγωγή με Fe + φυλλικό οξύ
X19	25/6/14	Μετά	56 ετών	Λειομύωμα μήτρας	Ολική υστερεκτομή μετ' εξαρτημάτων	Ηπατίτιδα, αυξημένη TSH, Καρδιά: διαστολική δυσλειτουργία LV, μικρή ανεπάρκεια μητροειδούς και μικρή διαφυγή απ' την αορτή

B.3. Υλικά και Μέθοδοι

Ο ιστός αμέσως μετά τη λήψη του, τοποθετήθηκε σε eppendorf των 2ml, με διάλυμα Trizol 500 μ l και αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη, σε θερμοκρασία -20°C . Το Trizol καταστρέφει τις πρωτεΐνες και προστατεύει το RNA, από λύση.

Το πρώτο βήμα επεξεργασίας του δείγματος, είναι η ομογενοποίησή του. Αρχικά, αφαιρείται τον ιστό από το eppendorf με το Trizol και τοποθετείται σε ένα τρυβλίο, όπου ακολουθεί ο τεμαχισμός του σε μικρά κομμάτια. Στη συνέχεια, τα κομμάτια του ιστού μαζί με το Trizol μεταφέρονται σε ένα μεγάλο Falcon, όπου με τη χρήση ομογενοποιητή δημιουργείται ένα ομοιόμορφο μείγμα. Για τον καθαρισμό του ομογενοποιητή, μετά πο την επεξεργασία κάθε δείγματος, απαιτούνται 3 Falcon που θα περιέχουν: α) 7 - 8 ml ddH₂O με 4 κοκκία NaOH, β) 7 - 8 ml ddH₂O, γ) 7 - 8 ml 70% Αιθανόλης και με αυτή τη σειρά καθαρίζεται ο ομογενοποιητής.

➤ B.3.1. Πρωτόκολλο Απομόνωσης RNA

Αρχικά, στο eppendorf και στη συνέχεια στο Falcon, περιέχονται 500 μ l Trizol. Η ποσότητα του Trizol και του ομογενοποιημένου ιστού, υπολογίζεται στα 500 μ l και μεταφέρεται σε νέο eppendorf. Σε αυτή προστίθενται 800 μ l Trizol, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι:

$$\Sigma V = 500 + 800 = 1300 \mu\text{l}.$$

Στη συνέχεια, προστίθεται χλωροφόρμιο ίσο με το 1/10 του όγκου (ΣV), δηλαδή 130 μ l. Ακολουθεί Vortex για 10 min στις 2400 rpm, με στόχο τη λύση των κυττάρων.

Μετά την ομογενοποίηση, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση για 15 min, στις 12000 rpm, στους 4°C . Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο υπάρχουν 3 φάσεις: 1) η υποκείμενη φάση που περιέχει χλωροφόρμιο, 2) η μεσόφαση που περιέχει κυτταρικά και πρωτεϊνικά θραύσματα λευκού χρώματος και 3) η ανώτερη υδατική φάση, η οποία είναι διάφανη και περιέχει το RNA που μας ενδιαφέρει.

Η ανώτερη υδατική φάση, μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο των 2 ml. Γίνεται κατακρήμνιση του RNA, με προσθήκη ίσου όγκου ισοπροπυλικής αλκοόλης, καλή ανάδευση και τελική τοποθέτηση του δείγματος στους -20°C για 24 ώρες.

Την επόμενη μέρα, αφού ξεπαγώσουν τα δείγματα, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 30 min στις 12000 rpm, στους 4°C . Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα, που περιέχει το RNA, παραμένει.

Το ίζημα, αφού στεγνώσει πολύ καλά, διαλυτοποιείται, με προσθήκη 50 μl ddH₂O. Κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -20 °C.

B.3.2 Σύνθεση cDNA με τυχαίους εκκινητές

Ακολουθεί η σύνθεση cDNA, για το RNA κάθε δείγματος.

Για κάθε δείγμα, σε νέο σωληνάριο, προστίθενται:

15 μl 2 x RT Reaction Mix

3 μl RT Reaction Mix

15 μl RNA, από το διαλυτοποιημένο ίζημα

Δηλαδή, $\Sigma V = 15 + 3 + 15 = 33 \mu\text{l}$

Ακολουθεί PCR.

Αρχικά, τα σωληνάρια τοποθετούνται στο πρόγραμμα RT SUPER1 του θερμικού κυκλοποιητή της PCR:

- 25 °C για 10 min
- 50 °C για 30 min
- 85 °C για 5 min
- 4 °C for ever

Μετά το τέλος αυτού του βήματος, προστίθεται σε κάθε σωληνάριο 1,5 μl E.coli RNase H.

Στη συνέχεια, τα σωληνάρια τοποθετούνται στο πρόγραμμα RT2 του θερμικού κυκλοποιητή:

- 37 °C για 20 min

Μετά το τέλος αυτού του βήματος, το ένζυμο E.coli RNase H, έχει διασπάσει όποιο RNA είχε απομείνει και συνεπώς, σε κάθε σωληνάριο υπάρχει μόνο το cDNA κάθε δείγματος.

Επιλογή ειδικού ζεύγους εκκινητών για RT – PCR

Από την τράπεζα γονιδίων Gene Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) βρέθηκε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν τα BMPR2, TGFBR1, BMPR1b mRNA του ανθρώπου, έχουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά.

Στόχος ήταν η κατασκευή εκκινητών που επεκτείνουν ένα κομμάτι mRNA μήκους περίπου 200 bp. Η σύνθεση του ζεύγους των εκκινητών, forward και reverse, μήκους 20 bp, έγινε από την Invitrogen.

Κριτήρια για επιλογή των εκκινητών:

- Περιεκτικότητα σε GC περίπου 50%.
- Μήκος περίπου ίσο με 20 bp.
- Σταθερότητα του 3' άκρου των εκκινητών.
- Όχι πάνω από 3 Gs ή Cs στις 5 τελευταίες βάσεις, του 3' άκρου.
- Όχι πάνω από 4 επαναλήψεις δινουκλεοτιδίων στο μόριό τους.
- Όχι επανάληψη ενός νουκλεοτιδίου πάνω από τέσσερις φορές.
- Όχι δημιουργία δομής – φουρκέτας από τους εκκινητές. Όχι συμπληρωματικά άκρα.
- Όχι ομολογία μεταξύ των εκκινητών.
- Η θερμοκρασίες τήξης (T_m) των εκκινητών, να μην έχουν διαφορά μεγαλύτερη των 5°C.

Στοιχεία Εκκινητών:

	FORWARD	REVERSE
TGFBR1	5'aaacagatggcagagctgtg3' 50% GC	5'aaccaggagcagatctgaa3' 50% GC
BMPR2	5'gcagatcctgggccatcaaa3' 55% GC	5'ttcagtggagatgaccagg3' 55% GC
BMPR1b	5'ccaaaccggtggagcagtga 60% GC	5'ctgttggtttctgcagaga3' 50% GC

B.3.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμερισμού Πραγματικού Χρόνου - Real Time PCR

Αρχή της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time polymerase chain reaction), είναι μία τεχνική που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό και ταυτόχρονα την ποσοτικοποίηση ενός μορίου DNA – στόχου.

Το χαρακτηριστικό της είναι ότι το πολλαπλασιαζόμενο DNA ποσοτικοποιείται καθώς συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μετά το τέλος κάθε κύκλου πολλαπλασιασμού, σε πραγματικό χρόνο. Η μέθοδος βασίζεται στην ανίχνευση ειδικής φθορίζουσας χρωστικής (SYBR Green) που προσδένεται στο δίκλωνο μόριο DNA. Η ελεύθερη χρωστική στο διάλυμα φθορίζει ελάχιστα, ενώ κατά το στάδιο επιμήκυνσης αυξανόμενα ποσά χρωστικής προσδένονται στο σχηματιζόμενο δίκλωνο μόριο DNA, με αποτέλεσμα την αύξηση στην ανίχνευση του φθορίζοντος σήματος. Το σήμα αυτό μειώνεται κατά το στάδιο της αποδιάταξης. Συνεπώς η ανίχνευση του σήματος στο τέλος του σταδίου επιμήκυνσης κάθε κύκλου είναι εκείνη που καταγράφει το αυξανόμενο ποσό του DNA.

Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι η ειδικότητα καθορίζεται αποκλειστικά από τους εκκινητές. Αφού η παρουσία οποιουδήποτε δίκλωνου μορίου DNA εκπέμπει φθορισμό, η μέθοδος δεν είναι πιο ειδική από τη συμβατική PCR. Ωστόσο, η ειδικότητα των προϊόντων μπορεί να επιβεβαιωθεί δημιουργώντας την καμπύλη τήξεως ή αποδιάταξης του προϊόντος. Η καμπύλη αυτή προκύπτει μετρώντας το φθορισμό που λαμβάνεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως του πολλαπλασιαζόμενου μορίου. Δεδομένου ότι η θερμοκρασία αυτή εξαρτάται από τη νουκλεοτιδική σύσταση, είναι δυνατόν να ταυτοποιηθεί το σήμα που λαμβάνεται από το σωστό προϊόν.

Ποσοτικοποίηση: Κατά τους αρχικούς κύκλους της PCR παρατηρείται μια μικρή αλλαγή στο σήμα φθορισμού. Αυτή η φάση αντιστοιχεί στο αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού του γραφήματος. Οι τιμές του φθορισμού καταγράφονται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου και αντιπροσωπεύουν το ποσό του προϊόντος μέχρι εκείνο το σημείο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο είναι το αρχικό ποσό του μορίου – στόχου κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται προκειμένου να φτάσει η αντίδραση στο σημείο εκείνο που το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού. Αυτό το σημείο ορίζεται ως Ct και εντοπίζεται πάντα στην εκθετική φάση πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι η ποσοτικοποίηση δεν επηρεάζεται από την εξάντληση κάποιου από τα συστατικά, συνήθως των εκκινητών, η οποία συμβαίνει κατά τη φάση κορεσμού. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων στη Real Time PCR μπορεί να είναι είτε απόλυτη, είτε σχετική.

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση γίνεται όταν είναι αναγκαία η γνώση του ακριβούς αριθμού των αντιγράφων του RNA στόχου και πραγματοποιείται μέσω της δημιουργίας απόλυτης πρότυπης καμπύλης. Αυτό προϋποθέτει τη συμβολή δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης. Η σχετική ποσοτικοποίηση χρησιμοποιείται για την ανάλυση της έκφρασης ενός γονιδίου σε ένα δείγμα, σε σχέση με ένα άλλο γονίδιο αναφοράς. Η σχετική ποσοτικοποίηση μπορεί να γίνει με πρότυπη καμπύλη ή με την συγκριτική Ct μέθοδο. Εμείς ακολουθήσαμε τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης. Το ποσό του μορίου – στόχου κανονικοποιημένο ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο ρυθμιστή δίνεται από τη σχέση $2^{-\Delta\Delta CT}$. Το πλεονέκτημα της συγκριτικής μεθόδου, είναι ότι δεν απαιτείται η δημιουργία πρότυπης καμπύλης κι έτσι αποφεύγονται τα λάθη που συμβαίνουν κατά την αραίωση των δειγμάτων, για τη δημιουργία της. Επίσης, εξοικονομείται χώρος για μελέτη περισσότερων δειγμάτων, μιας και αρκετά πηγαδάκια μένουν αχρησιμοποίητα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, για πειράματα στα οποία υπάρχει μεγάλος αριθμός δειγμάτων.

Κανονικοποίηση – Επιλογή εσωτερικού μάρτυρα: Κατά την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων είναι δυνατόν να προκύψουν σφάλματα που οφείλονται στη διακύμανση του αρχικού ποσού του υλικού DNA ή RNA μεταξύ των δειγμάτων. Η διόρθωση αυτής της διακύμανσης μεταξύ των δειγμάτων μπορεί να επιτευχθεί με τον ταυτόχρονο πολλαπλασιασμό ενός εσωτερικού μάρτυρα, ως προς τον οποίο θα κανονικοποιηθεί το δείγμα. Ο ιδανικός εσωτερικός μάρτυρας θα πρέπει να εκφράζεται σταθερά μεταξύ των διαφόρων ιστών ενός οργανισμού, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και θα πρέπει να παραμένει ανεπηρέαστος από τους χειρισμούς του πειράματος. Επίσης, θα πρέπει να εκφράζεται αδρά στο ίδιο επίπεδο με το υπό εξέταση γονίδιο. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι, η β – ακτιβίνη, δεϋδρογονάση της 3 – φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (GAPDH), το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και άλλα RNAs.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν, είναι:

- To Quantifast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)

Φτιάχνουμε ένα Master Mix για κάθε γονίδιο. Τα γονίδια που μελετούμε είναι τα: BMPR2, TGFBR1, BMPR1b, GAPDH. Δηλαδή, φτιάχνουμε συνολικά 4 Master Mix. Το GAPDH, χρησιμοποιείται ως εσωτερικός μάρτυρας στο πείραμά μας.

Και σε κάθε σωληνάριο προστέθηκαν:

- 5μl cDNA του υπό εξέταση δείγματος
- 10 μl SYBR Green Mix
- 1,5 μl forward primer του εκάστοτε γονιδίου
- 1,5 μl reverse primer του εκάστοτε γονιδίου
- 3 μl ddH₂O

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση του πειράματος, ήταν το ακόλουθο (rotor gene Corbett software):

Hold I: Στους 95 °C για 3 λεπτά, για αποδιάταξη DNA

Cycling: Στους 95 °C για 10 δευτερόλεπτα, στους 55 °C για 10 δευτερόλεπτα και στους 72 °C για 20 δευτερόλεπτα, ώστε να γίνει η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA.

Hold II: Στους 72 °C για 5 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA.

Melt: Όπου η θερμοκρασία αυξάνει από τους 65 °C στους 95 °C. Το 1^ο στάδιο διαρκεί 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια, κάθε δευτερόλεπτο, αυξάνει η θερμοκρασία κατά 1 °C.

Ο συνολικός χρόνος για 45 κύκλους ποσοτικής RT – PCR είναι 130 λεπτά. Σε ορισμένα πειράματα, προστέθηκαν 5 επιπλέον κύκλοι, για βελτίωση του αποτελέσματος. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής RT – PCR αναπαρίστανται σε χαρακτηριστικό γράφημα, όπου φαίνεται ο φθορισμός που αντιστοιχεί σε κάθε γονίδιο και ο αριθμός των κύκλων, με τον οποίο έγινε η ποσοτικοποίηση του mRNA, για threshold= 0,02.

Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Για να επιβεβαιώσουμε το προϊόν της ποσοτικής RT – PCR και η εξακρίβωση ότι επεκτάθηκε το επιθυμητό τμήμα DNA γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με τη χρήση τριών προγραμμάτων: 1) ενός προγράμματος του Microsoft Excel για υπολογισμό του $2^{-\Delta\Delta CT}$ κάθε δείγματος, 2) του προγράμματος gene Corbett Software για την RT – PCR και τη συσχέτιση της συγκέντρωσης κάθε γονιδίου με τη συγκέντρωση του γονιδίου - μάρτυρα, 3) του προγράμματος IBM SPSS Statistics 20, για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, με τη διεξαγωγή t – test για ανεξάρτητα δείγματα. Τα Pvalue < 0,05, θεωρούνται στατιστικά σημαντικά.

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ –

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρ. δείγματος	Gene of interest	Έκφραση γονιδίου 2 ⁻ ΔΔCT	Στάδιο εμμηνόπαυσης	Ηλικία
X1	BMPR2	1,453973	Μετά	87
	TGFBR1	1,591073		
	BMPR1b	1,815038		
X2	BMPR2	0,001926	Μετά	52
	TGFBR1	0,000265		
	BMPR1b	0,001381		
X4	BMPR2	0,456916	Πρίν	38
	TGFBR1	0,035897		
	BMPR1b	0,033726		
X5	BMPR2	0,094732	Πρίν	48
	TGFBR1	0,004776		
	BMPR1b	0,021197		
X6	BMPR2	0,007239	Πρίν	40
	TGFBR1	0,010598		
	BMPR1b	0,000793		
X7	BMPR2	0,111878	Πρίν	50
	TGFBR1	0,014782		
	BMPR1b	0,015517		
X8	BMPR2	0,095391	Μετά	64
	TGFBR1	0,010237		
	BMPR1b	0,019641		
X9	BMPR2	0,001343	Μετά	54
	TGFBR1	0,001325		
	BMPR1b	0,008549		
X10	BMPR2	0,133046	Μετά	55
	TGFBR1	0,015093		
	BMPR1b	0,026461		
X11	BMPR2	0,167241	Πρίν	53
	TGFBR1	0,020475		
	BMPR1b	0,004876		

ΠΙΝΑΚΕΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ –

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρ. δείγματος	Gene of interest	Έκφραση γονιδίου 2 ⁻ ΔΔCT	Στάδιο εμμηνόπαυσης	Ηλικία
X12	BMPR2	0,102238	Μετά	79
	TGFBR1	0,010237		
	BMPR1b	0,01176		
X13	BMPR2	0,888843	Πρίν	48
	TGFBR1	0,29937		
	BMPR1b	0,312083		
X14	BMPR2	0,024181	Πρίν	43
	TGFBR1	0,006848		
	BMPR1b	0,00942		
X15	BMPR2	0,073302	Μετά	69
	TGFBR1	0,001575		
	BMPR1b	0,017701		
X16	BMPR2	0,106579	Μετά	74
	TGFBR1	3,89E-05		
	BMPR1b	0,002577		
X17	BMPR2	0,363493	Μετά	75
	TGFBR1	0,00143		
	BMPR1b	0,027584		
X18	BMPR2	0,737135	Πρίν	47
	TGFBR1	0,032129		
	BMPR1b	0,037944		
X19	BMPR2	0,11908	Μετά	56
	TGFBR1	0,01243		
	BMPR1b	0,008912		

Σε αυτά τα αποτελέσματα και με τις τιμές αυτές, πραγματοποιήθηκε η στατιστική επεξεργασία, τα αποτελέσματα της οποίας αναλύονται παρακάτω.

B.4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

B.4.1. T – TEST ΓΙΑ ΑΝΕΞΑΡΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Όταν οι παρατηρήσεις από δύο δείγματα είναι ανεξάρτητες, δηλαδή από διαφορετικά άτομα, τότε μπορούμε να συγκρίνουμε τις μέσες τιμές των δύο δειγμάτων, χρησιμοποιώντας το t – test για ανεξάρτητα δείγματα. Π.χ. Τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου σε προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες – δείγμα 1 και μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες – δείγμα 2.

Με τη χρήση της εφαρμογής t – test για ανεξάρτητα δείγματα του στατιστικού προγράμματος IBM SPSS Statistics Viewer, ελέγξαμε αν οι μέσες τιμές των προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών δειγμάτων έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά, όσον αφορά στα επίπεδα έκφρασης (mRNA) των γονιδίων BMPR2, BMPR1b, TGFBR1. Τα αποτελέσματα δίνονται στο παρακάτω πίνακες.

Στους πίνακες 1,2 και 3 καταγράφεται ο αριθμός των ατόμων (N), η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση (Standard deviation) και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard Error Mean) των δύο ομάδων μελέτης (Μετεμμηνοπαυσιακές – Post Menopause και Προεμμηνοπαυσιακές – Pre Menopause), ως προς το mRNA των γονιδίων BMPR2, TGFBR1, BMPR1b, αντίστοιχα.

Πίνακας 1: ο αριθμός των ατόμων (N), η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση (Standard deviation) και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard Error Mean) για το **BMPR2** γονίδιο.

Group Statistics					
	menopause	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
bmpr2	Post Menopause	10	,245037100000 000	,436387182521 936	,137997743847 294
	Pre Menopause	8	,311020625000 000	,341929190497 071	,120890224643 053

Πίνακας 2: ο αριθμός των ατόμων (N), η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση (Standard deviation) και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard Error Mean) για το **TGFBRI** γονίδιο

Group Statistics					
	menopause	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TGFBRI	Post Menopause	10	,164370389650 000	,501324389344 753	,158532691692 247
	Pre Menopause	8	,053109375000 000	,100141453154 936	,035405350301 865

Πίνακας 3: ο αριθμός των ατόμων (N), η μέση τιμή (Mean), η τυπική απόκλιση (Standard deviation) και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής (Standard Error Mean) για το **BMPR1b** γονίδιο

Group Statistics					
	menopause	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
BMPR1b	Post Menopause	10	,193960400000 000	,569660335878 261	,180142415403 184
	Pre Menopause	8	,054444500000 000	,104923503551 057	,037096060433 401

Στους Πίνακες 4,5,6 καταγράφονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης με t-test για ανεξάρτητες μεταβλητές, των δύο ομάδων γυναικών (προεμμηνοπαυσιακές, μετεμμηνοπαυσιακές), ως προς το mRNA των γονιδίων BMPR2, TGFBR1, BMPR1b, αντίστοιχα.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα independent t test για το BMPR2 γονίδιο

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
Equal variances assumed	,029	,866	-,350	16	,731	-,065983525000000	,188707845505480	-,466026286691687	,334059236691687
bmpr2 Equal variances not assumed			-,360	15,999	,724	-,065983525000000	,183460687127218	-,454904201047283	,322937151047283

Η τιμή Pvalue = 0,731, που είναι τονισμένη με κόκκινο χρώμα, αντιστοιχεί στο % σημείο της t κατανομής. Ακόμη, το 95% διάστημα εμπιστοσύνης, 95% Δ.Ε. είναι ίσο με (- 0,466026286691687 , 0,334059236691687). Παρατηρούμε λοιπόν ότι:

- Pvalue = 0,731 > 0,05, οπότε αυτό αποτελεί ένδειξη για να μην απορρίψουμε την υπόθεση ότι οι μέσες τιμές των δύο ομάδων, δεν διαφέρουν.
Δηλαδή, δεν παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του BMPR2 γονιδίου, μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.
- 95% Δ.Ε. = (- 0,466026286691687 , 0,334059236691687). Παρατηρούμε ότι το μηδέν (0) συμπεριλαμβάνεται στο Δ.Ε., οπότε δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων, αναφορικά με την έκφραση του BMPR2 γονιδίου.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα independent t test για το TGFBR1 γονίδιο

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
<u>TGFBR1</u> Equal variances assumed	2,394	,141	,614	16	<u>,548</u>	,111261014650000	,181095629010191	- ,272644568954505	,495166598254505
Equal variances not assumed			,685	9,889	,509	,111261014650000	,162438151815350	- ,251227455166199	,473749484466199

Η τιμή Pvalue = 0,548, που είναι τονισμένη με κόκκινο χρώμα, αντιστοιχεί στο % σημείο της t κατανομής. Ακόμη, το 95% διάστημα εμπιστοσύνης, 95% Δ.Ε. είναι ίσο με (-0,272644568954505 , 0,495166598254505). Παρατηρούμε λοιπόν ότι:

- Pvalue = 0,548 > 0,05, οπότε αυτό αποτελεί ένδειξη για να μην απορρίψουμε την υπόθεση ότι οι μέσες τιμές των δύο ομάδων, δεν διαφέρουν.
Δηλαδή, δεν παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.
- 95% Δ.Ε. = (-0,272644568954505 , 0,495166598254505). Παρατηρούμε ότι το μηδέν (0) συμπεριλαμβάνεται στο Δ.Ε., οπότε δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων, αναφορικά με την έκφραση του TGBR1 γονιδίου.

Πίνακας 6 : Αποτελέσματα independent t test για το BMPR1b γονίδιο

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
BMPR1b Equal variances assumed	2,509	,133	,680	16	,507	,139515900000000	,205316478579205	- ,295735590957496	,574767390957496
Equal variances not assumed			,759	9,757	,466	,139515900000000	,183922286651107	- ,271676583765511	,550708383765511

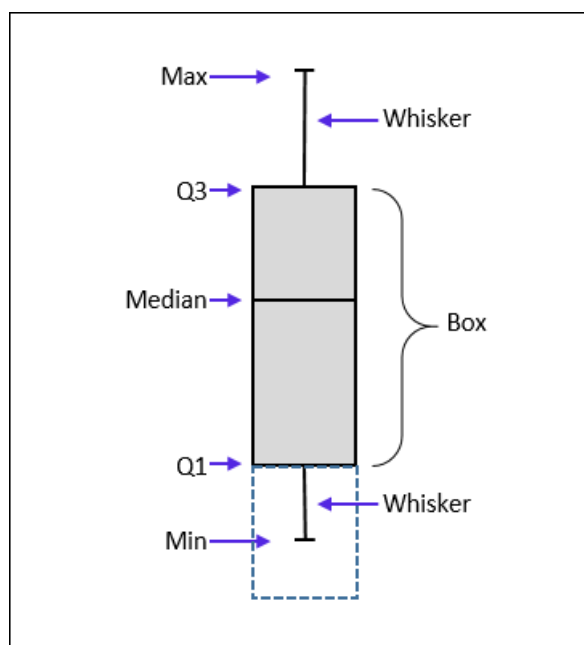
Η τιμή Pvalue = 0,507, που είναι τονισμένη με κόκκινο χρώμα, αντιστοιχεί στο % σημείο της t κατανομής. Ακόμη, το 95% διάστημα εμπιστοσύνης, 95% Δ.Ε. είναι ίσο με (-0,295735590957496 , 0,574767390957496). Παρατηρούμε λοιπόν ότι:

- Pvalue = 0,507 > 0,05, οπότε αυτό αποτελεί ένδειξη για να μην απορρίψουμε την υπόθεση ότι οι μέσες τιμές των δύο ομάδων, δεν διαφέρουν.
Δηλαδή, δεν παρατηρείται διαφορά στα επίπεδα έκφρασης του BMPR1b γονιδίου, μεταξύ προεμμηνοπαυσιακών και μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών.
- 95% Δ.Ε. = (-0,295735590957496 , 0,574767390957496). Παρατηρούμε ότι το μηδέν (0) συμπεριλαμβάνεται στο Δ.Ε., οπότε δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των μέσων τιμών των δύο ομάδων, αναφορικά με την έκφραση του BMPR1b γονιδίου.

B.4.2 ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΟΥΤΙΟΥ (BOX - PLOT)

Το διάγραμμα κουτιού παρουσιάζει τα δεδομένα σαν ένα κουτί με «μουστάκι». Το πάνω μέρος του κουτιού δείχνει το 75^ο εκατοστημόριο και το κάτω μέρος του κουτιού το 25^ο εκατοστημόριο. Η διάμεσος αναπαρίσταται με μία οριζόντια γραμμή στο κουτί. Οι άκρες δείχνουν τη μέγιστη και την ελάχιστη τιμή. Τα διαγράμματα κουτιού χρησιμοποιούνται κυρίως για τη σύγκριση κατανομών και δίνουν τις πρώτες ενδείξεις για τη συμμετρία μίας κατανομής. Οι ακραίες τιμές, συνήθως αγνοούνται.

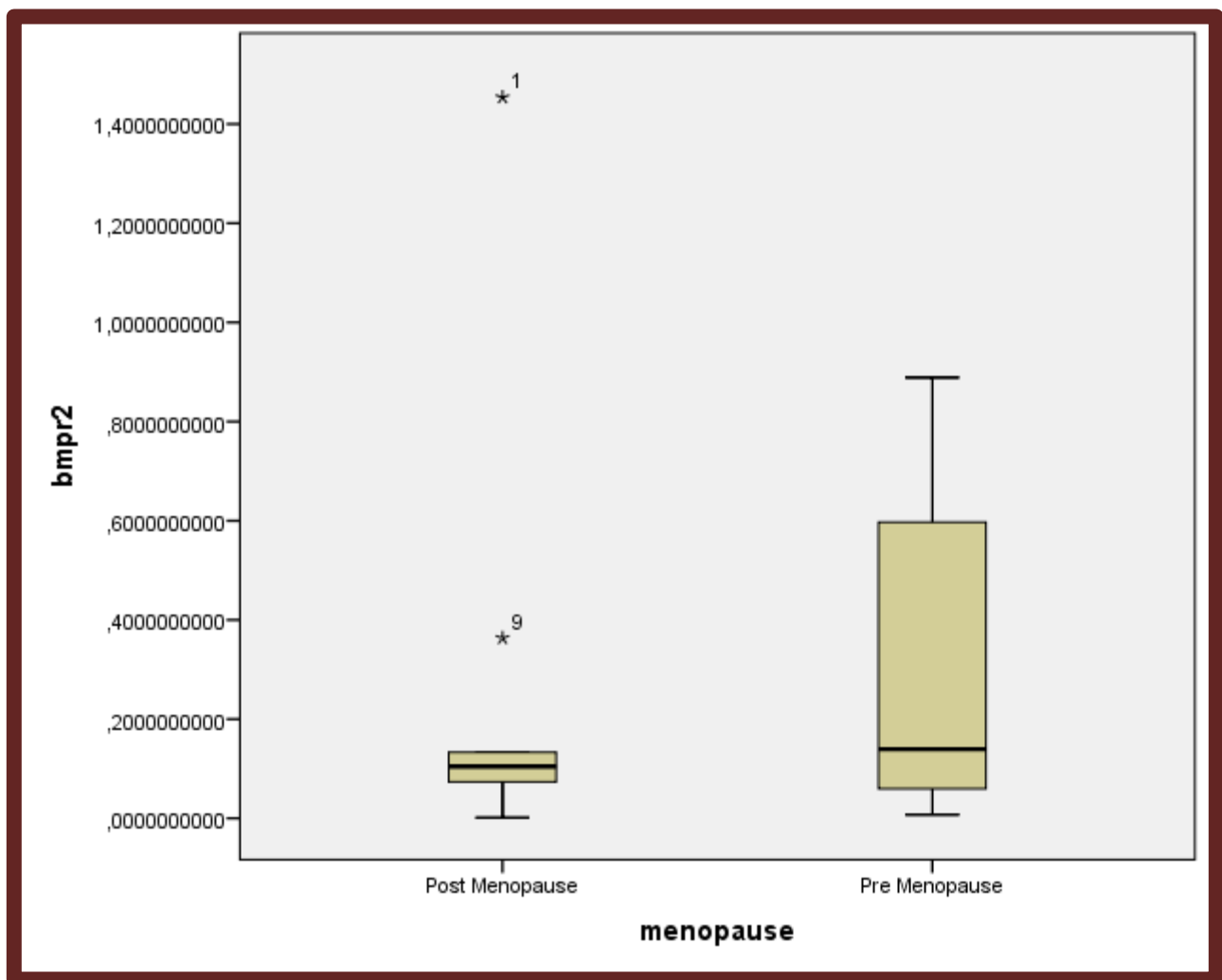
Στο πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 20, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, οι ακραίες τιμές που δεν συμπεριλαμβάνονται στο διάγραμμα, είναι εμφανείς ως αστερίσκοι.



Εικόνα 12. Παράδειγμα διαγράμματος - κουτιού και η σημασία του (blog.contextures.com, 2014)

▪ Διάγραμμα Κουτιού για το BMPR2 γονίδιο

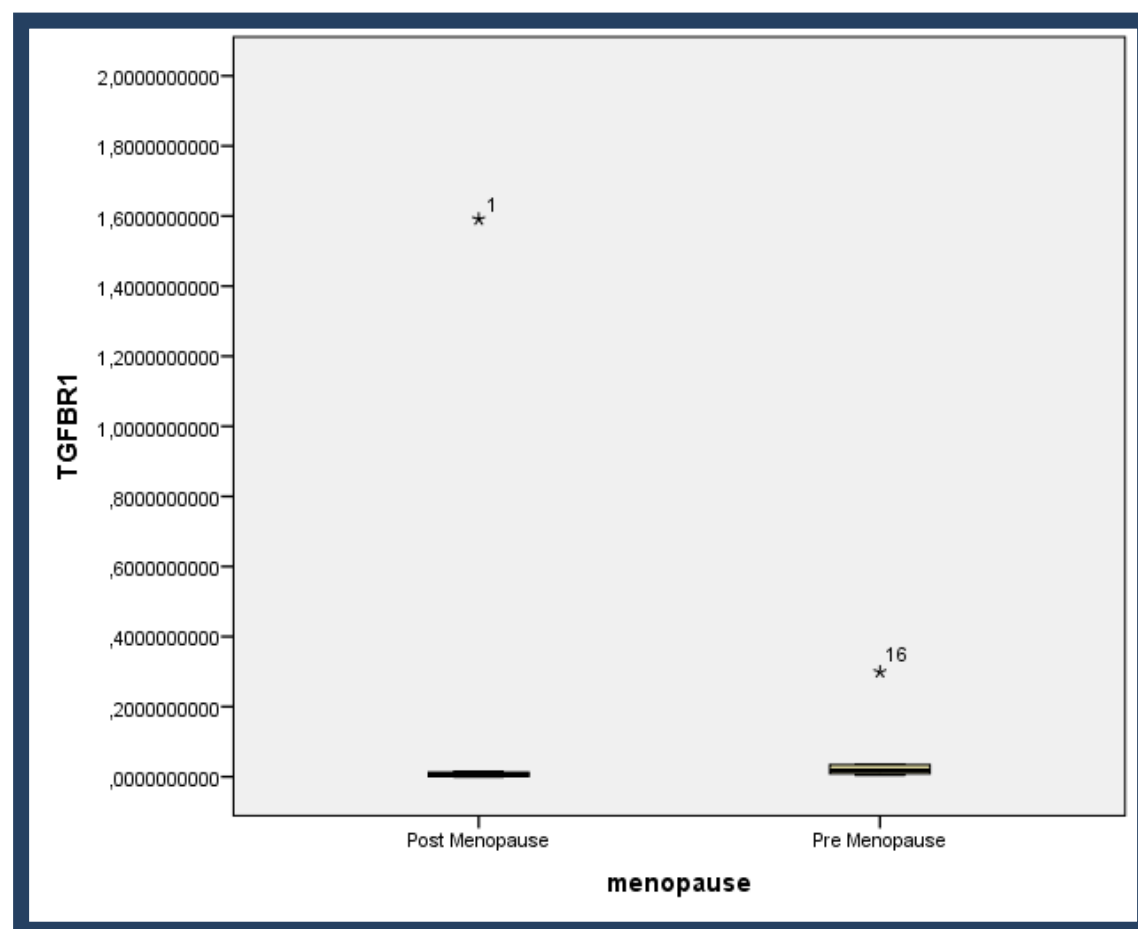
Case Processing Summary							
	menopause	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
bmpr2	Post Menopause	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Pre Menopause	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%



Παρατηρούμε ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες παρουσιάζουν μικρή διακύμανση των τιμών της έκφρασης του BMPR2 γονιδίου, σε αντίθεση με τις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες που φαίνεται να παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση. Η μεγάλη διακύμανση των τιμών των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, είναι φυσιολογική, λόγω των κυκλικών μεταβολών κατά τη διάρκεια του φυσιολογικού γεννητικού κύκλου των γυναικών.

▪ Διάγραμμα Κουτιού για το TGFBR1 γονίδιο

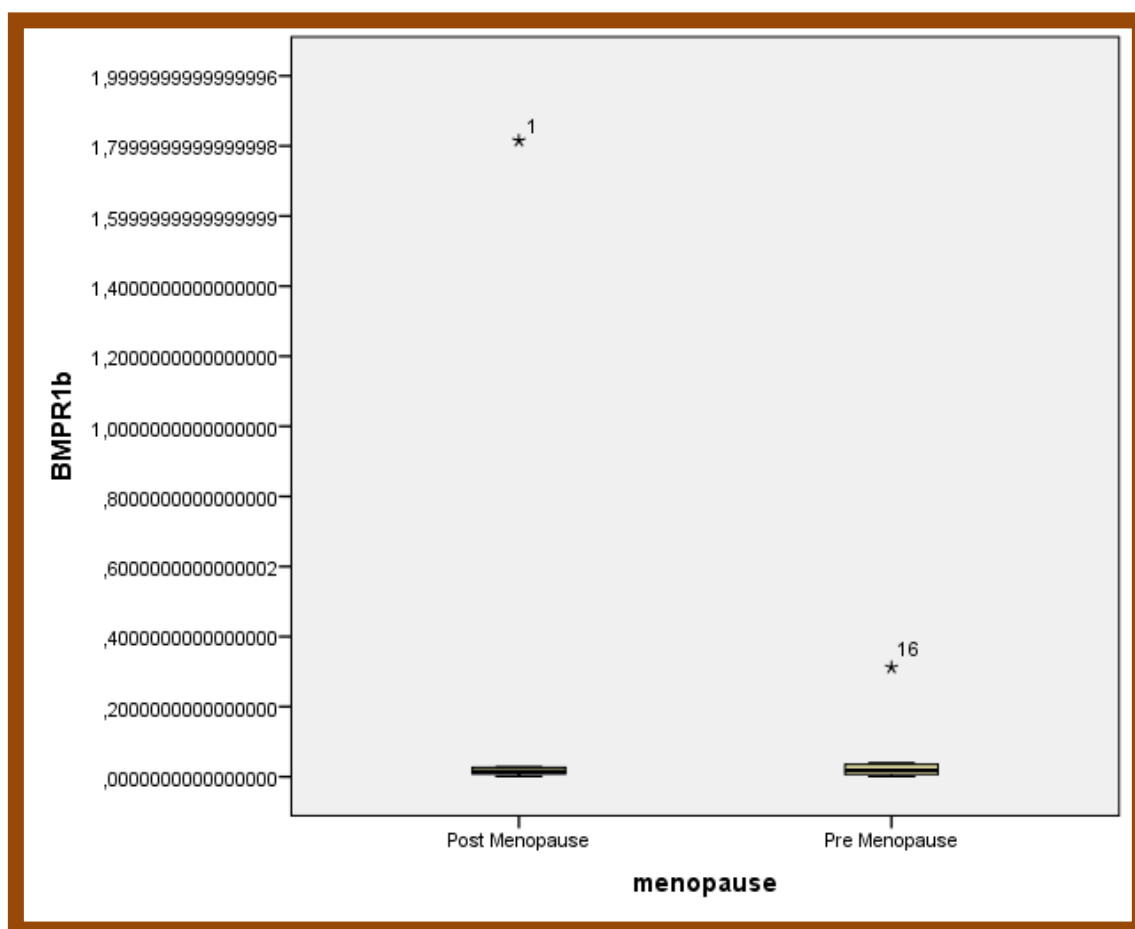
Case Processing Summary							
	menopause	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
TGFBR1	Post Menopause	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Pre Menopause	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%



Παρατηρούμε πως η διακύμανση των τιμών της έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, είναι πολύ μικρή και στις δύο ομάδες γυναικών που εξετάσαμε. Αυτό, συμπερασματικά, σημαίνει ότι δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου, μεταξύ των δύο ομάδων. Συνεπώς, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η έκφραση του TGFBR1 γονιδίου από την ύπαρξη ή μη, εμμηνόπαυσης.

▪ Διάγραμμα Κουτιού για το BMPR1b γονίδιο

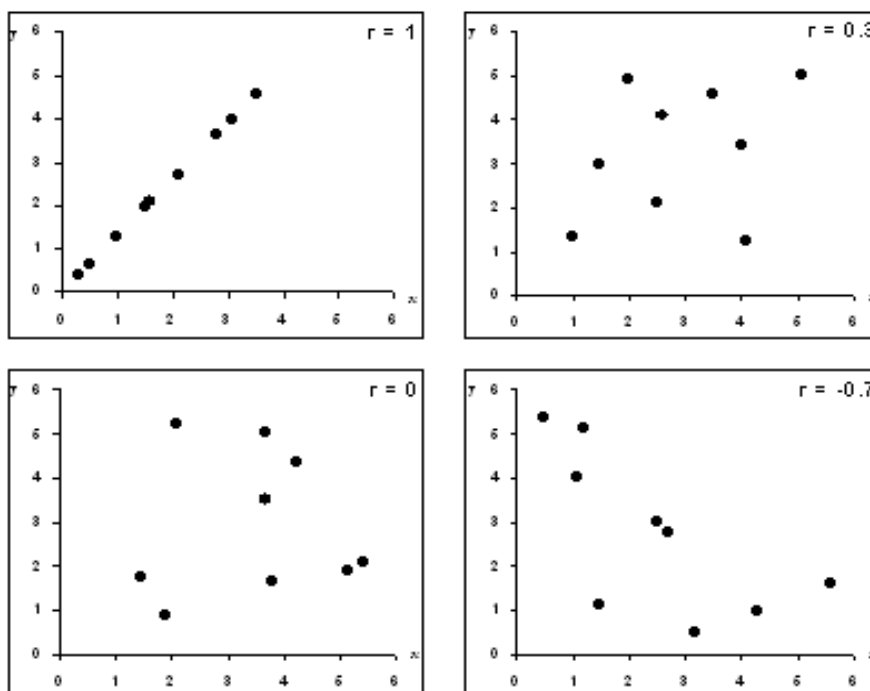
Case Processing Summary							
	menopause	Cases					
		Valid		Missing		Total	
		N	Percent	N	Percent	N	Percent
BMPR1b	Post Menopause	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Pre Menopause	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%



Παρατηρούμε πως η διακύμανση των τιμών της έκφρασης του BMPR1b γονιδίου, είναι πολύ μικρή και στις δύο ομάδες γυναικών που εξετάσαμε. Αυτό, συμπερασματικά, σημαίνει ότι δεν υπάρχει διαφορά στην έκφραση του γονιδίου, μεταξύ των δύο ομάδων. Συνεπώς, δεν φαίνεται να επηρεάζεται η έκφραση του BMPR1b γονιδίου από την ύπαρξη ή μη, εμμηνόπαυσης.

B.4.3 Συσχέτιση ηλικίας των γυναικών με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης

Η συσχέτιση δείχνει πόσο καλά σχετίζονται μεταξύ τους δύο ποσοτικές μεταβλητές x και y . Ο συντελεστής συσχέτισης (r) είναι πάντα μεταξύ -1 και $+1$. Αν ο συντελεστής συσχέτισης είναι ίσος με το μηδέν ($r = 0$), τότε οι δύο μεταβλητές δεν σχετίζονται μεταξύ τους. Είναι θετικός εάν το x και το y τείνουν σε μεγάλες ή χαμηλές τιμές μαζί και όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή του r , τόσο πιο μεγάλη είναι και η συσχέτισή τους. Η μέγιστη τιμή 1 αποκτάται αν όλα τα σημεία βρίσκονται σε μία γραμμή. Η ανάλυση των δεδομένων έγινε και εδώ με τη χρήση του ίδιου στατιστικού προγράμματος.

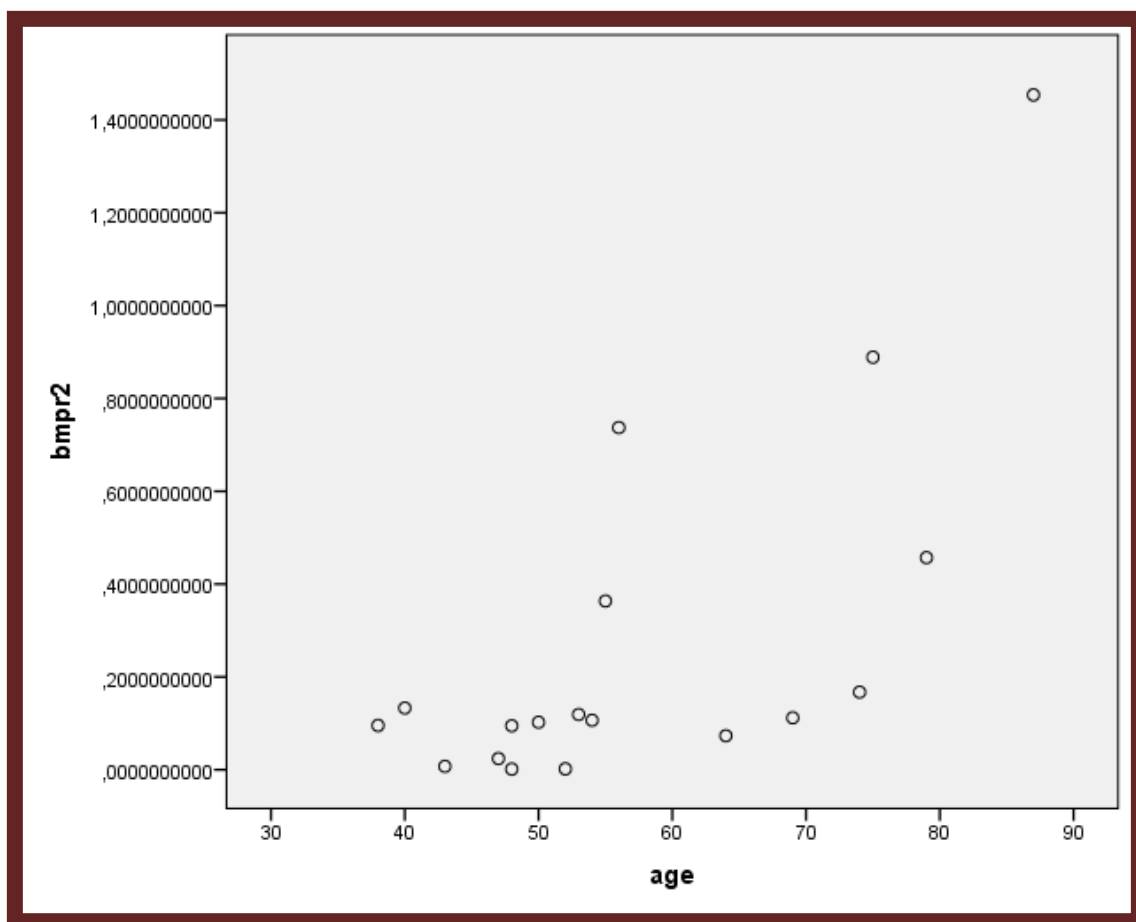


Εικόνα 13. Παραδείγματα διαγραμμάτων, ανάλογα με την τιμή του συντελεστή συσχέτισης r (www.brettscaife.net, 2014).

Διάγραμμα συσχέτισης ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του BMPR2 γονιδίου

Correlations			
		bmpr2	age
bmpr2	Pearson Correlation	1	,692**
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	18	18
age	Pearson Correlation	,692**	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	18	18

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

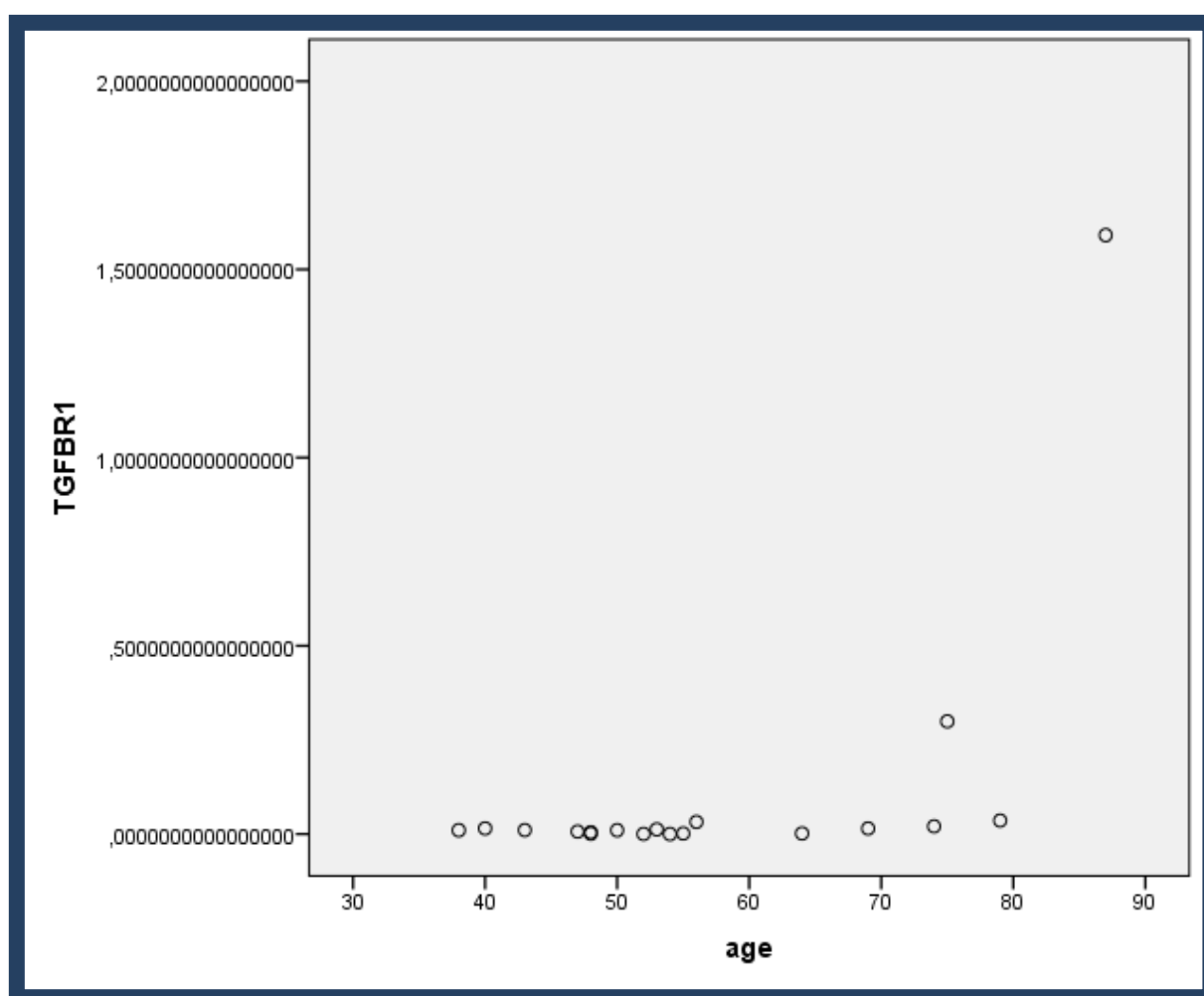


Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι $r = 0,692$, οπότε φαίνεται να υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και έκφρασης του BMPR2 γονιδίου, αλλά όχι πολύ ισχυρή. Ακόμη βλέπουμε ότι $P\text{value} = 0.01 = 1\%$, διότι τα αποτελέσματά μας είναι σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 1%. Άρα, όντως υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών και μάλιστα θετική.

Διάγραμμα συσχέτισης ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου

Correlations			
		TGFBR1	age
TGFBR1	Pearson Correlation	1	,587*
	Sig. (2-tailed)		,010
	N	18	18
age	Pearson Correlation	,587*	1
	Sig. (2-tailed)	,010	
	N	18	18

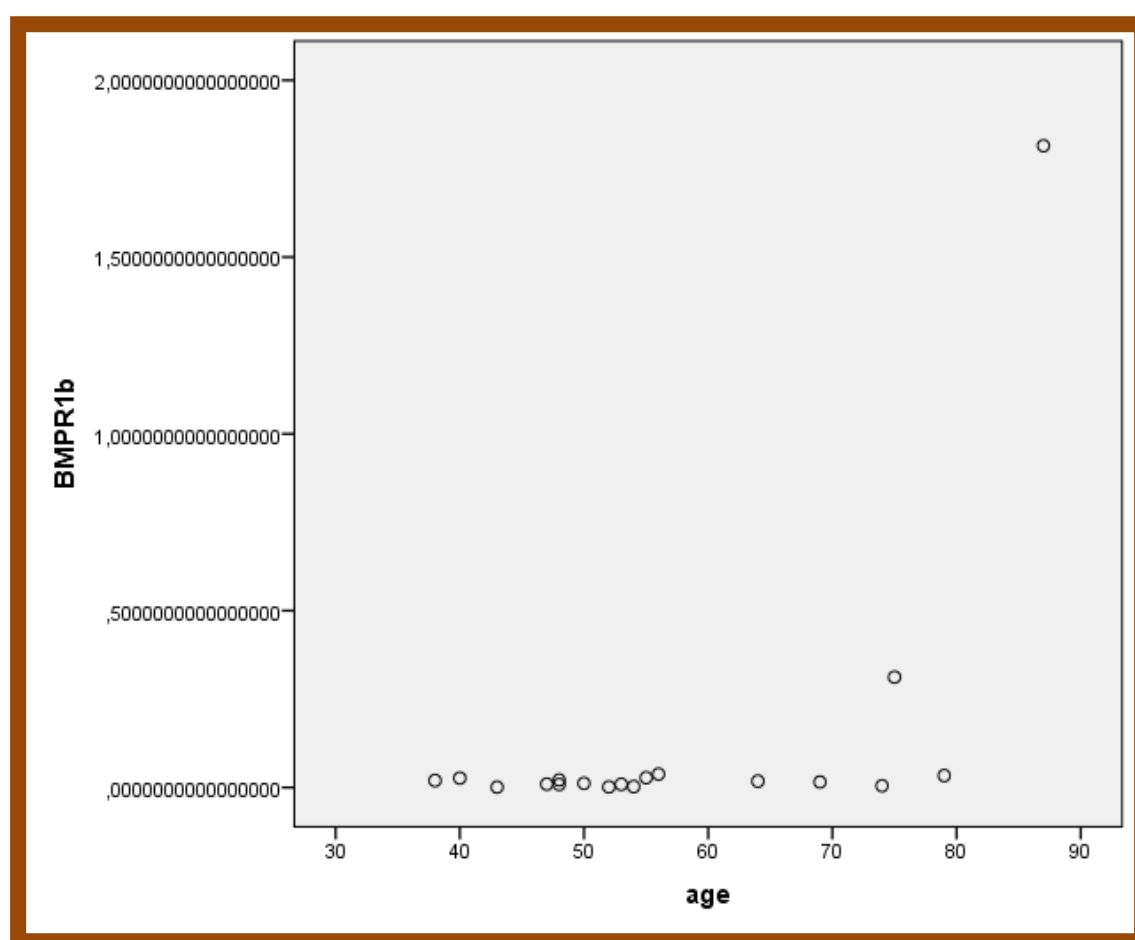
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι $r = 0,587$, οπότε φαίνεται να υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, αλλά όχι πολύ ισχυρή. Ακόμη βλέπουμε ότι $P\text{value} = 0.01 < 0,05$, διότι τα αποτελέσματά μας είναι σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Άρα, όντως υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών και μάλιστα θετική.

Διάγραμμα συσχέτισης της ηλικίας με τα επίπεδα του BMPR1b γονιδίου

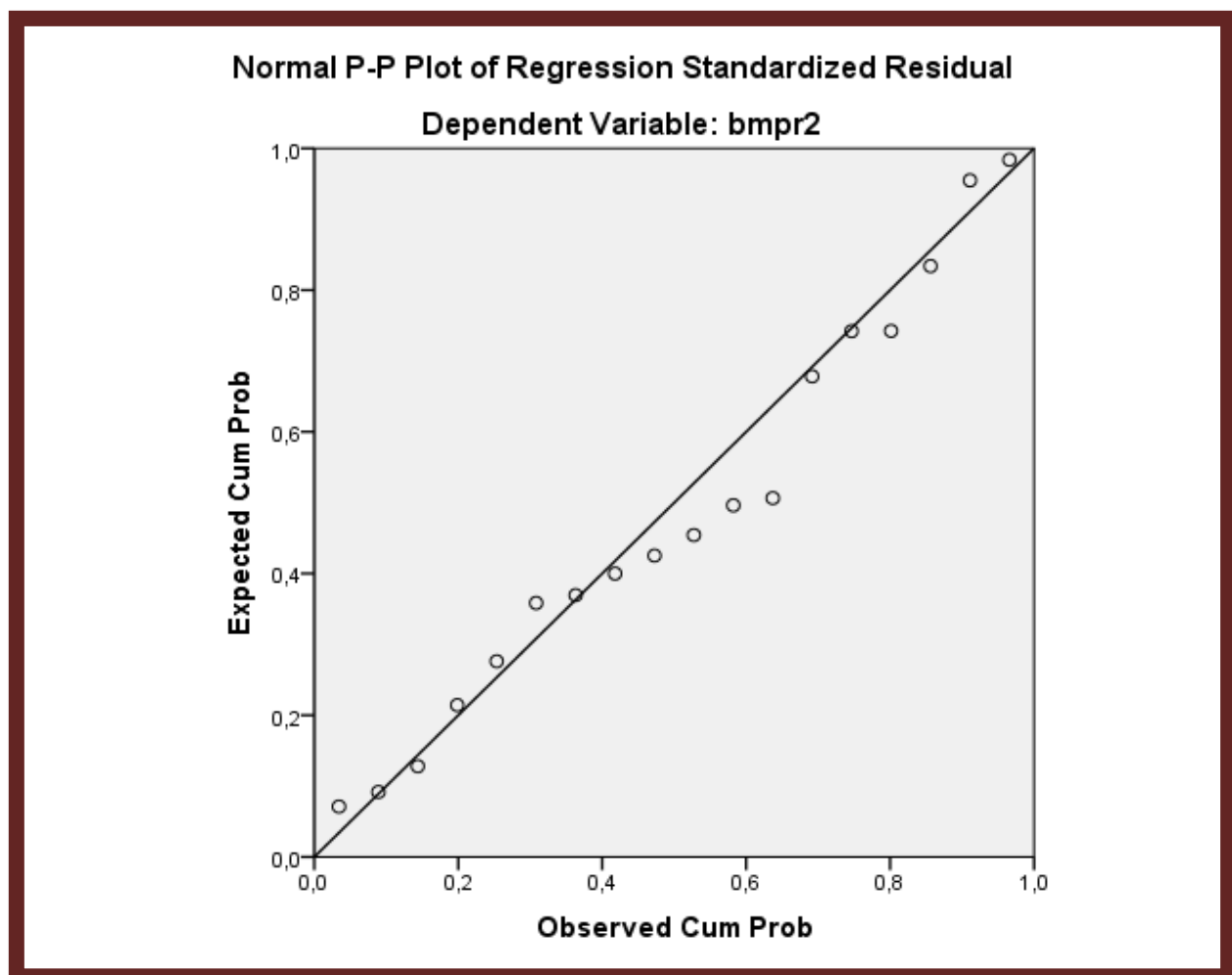
Correlations			
		BMPR1b	age
BMPR1b	Pearson Correlation	1	,576 [*]
	Sig. (2-tailed)		,012
	N	18	18
age	Pearson Correlation	,576 [*]	1
	Sig. (2-tailed)	,012	
	N	18	18
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).			

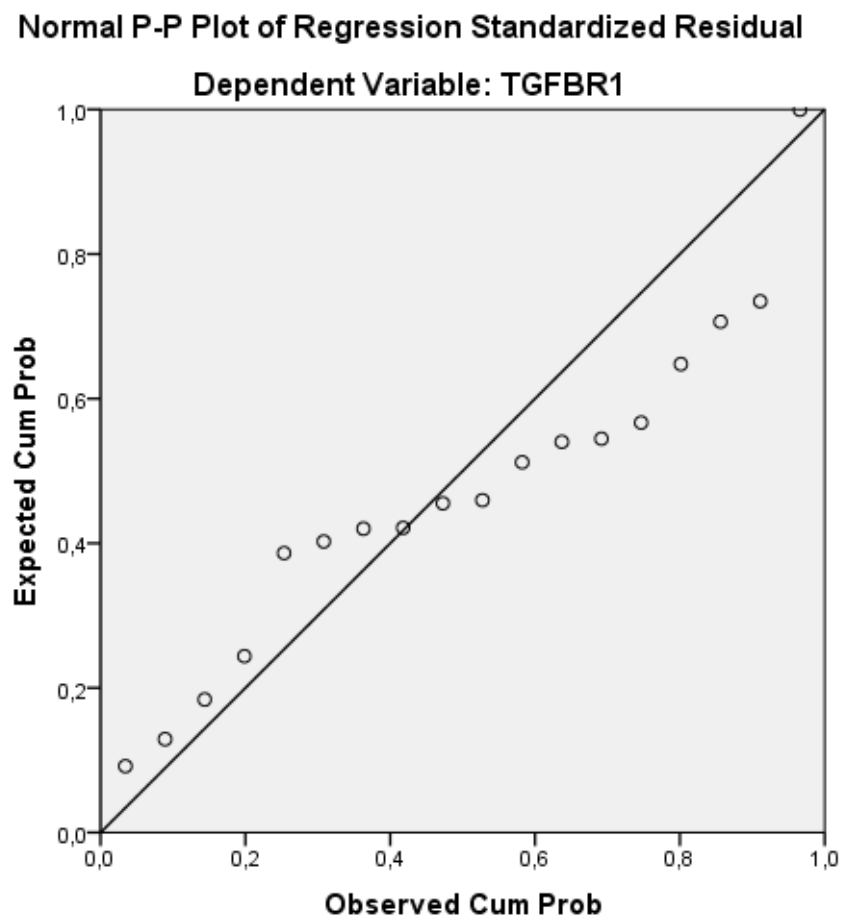


Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι $r = 0,576$, οπότε φαίνεται να υπάρχει μια θετική συσχέτιση μεταξύ ηλικίας και έκφρασης του BMPR1b γονιδίου, αλλά όχι πολύ ισχυρή. Ακόμη βλέπουμε ότι $P\text{value} = 0.012 < 0,05$, διότι τα αποτελέσματά μας είναι σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Άρα, όντως υπάρχει σχέση μεταξύ των δύο μεταβλητών και μάλιστα θετική.

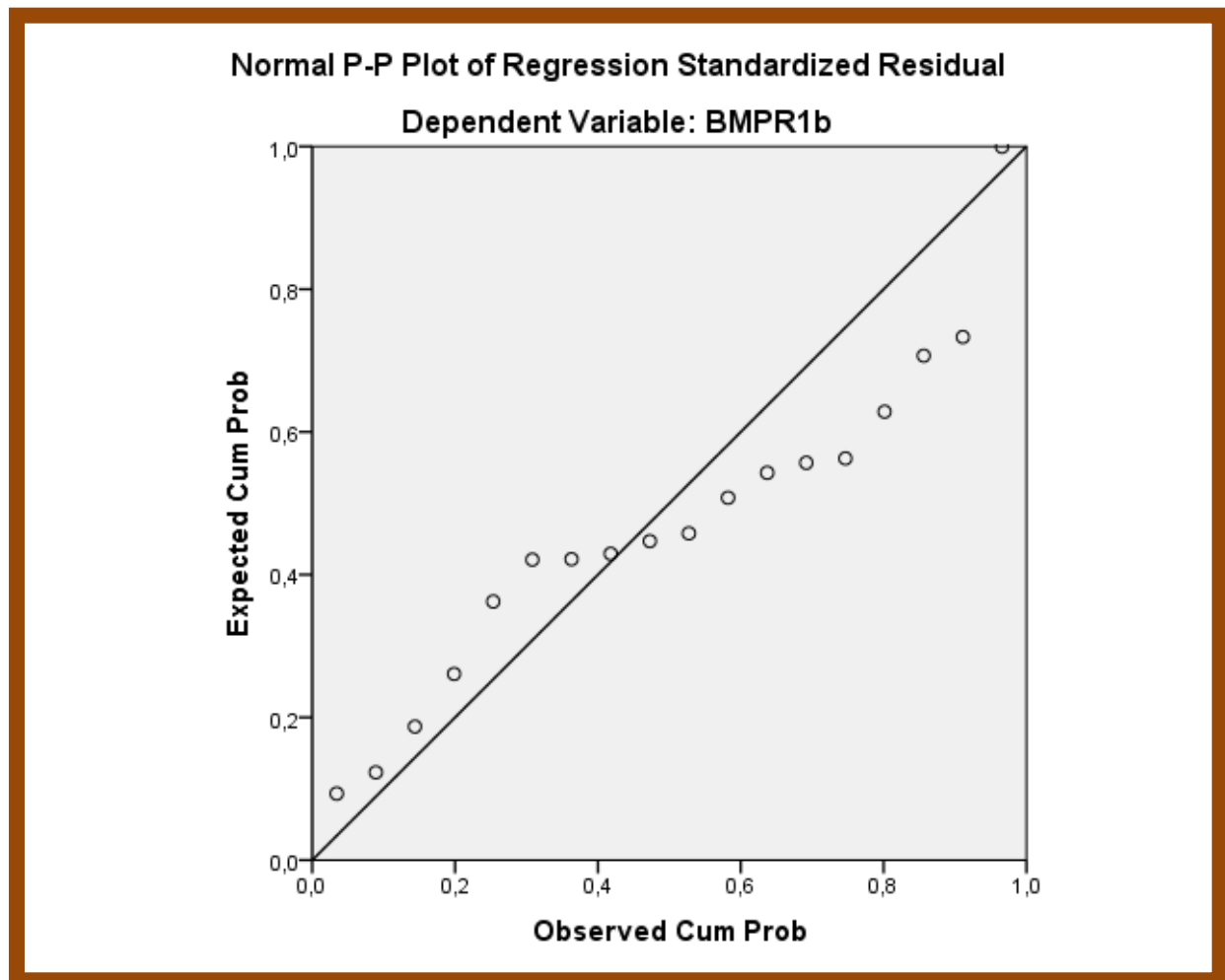
Ακολουθούν διαγράμματα συσχέτισης της ηλικίας των γυναικών με την έκφραση των mRNA των τριών υπομονάδων, των δύο υποδοχέων, με τη μορφή γραμμής γραμμικής παλινδρόμησης. Η γραμμή παλινδρόμησης, μας δείχνει πώς η μία μεταβλητή επηρεάζει την άλλη, δηλαδή πώς η μία μεταβλητή εξαρτάται από την άλλη. Η σύγκριση αυτή γίνεται μεταξύ μιας ανεξάρτητης (π.χ. ηλικία, εμμηνόπαυση) μεταβλητής και μίας εξαρτημένης (π.χ. επίπεδα mRNA ενός γονιδίου) μεταβλητής. Οι τιμές του συντελεστή συσχέτισης, είναι ίδιες με αυτές των παραπάνω γραφημάτων.

Διάγραμμα συσχέτισης ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του BMPR2 γονιδίου





Διάγραμμα συσχέτισης της ηλικίας με τα επίπεδα του BMPR1b γονιδίου



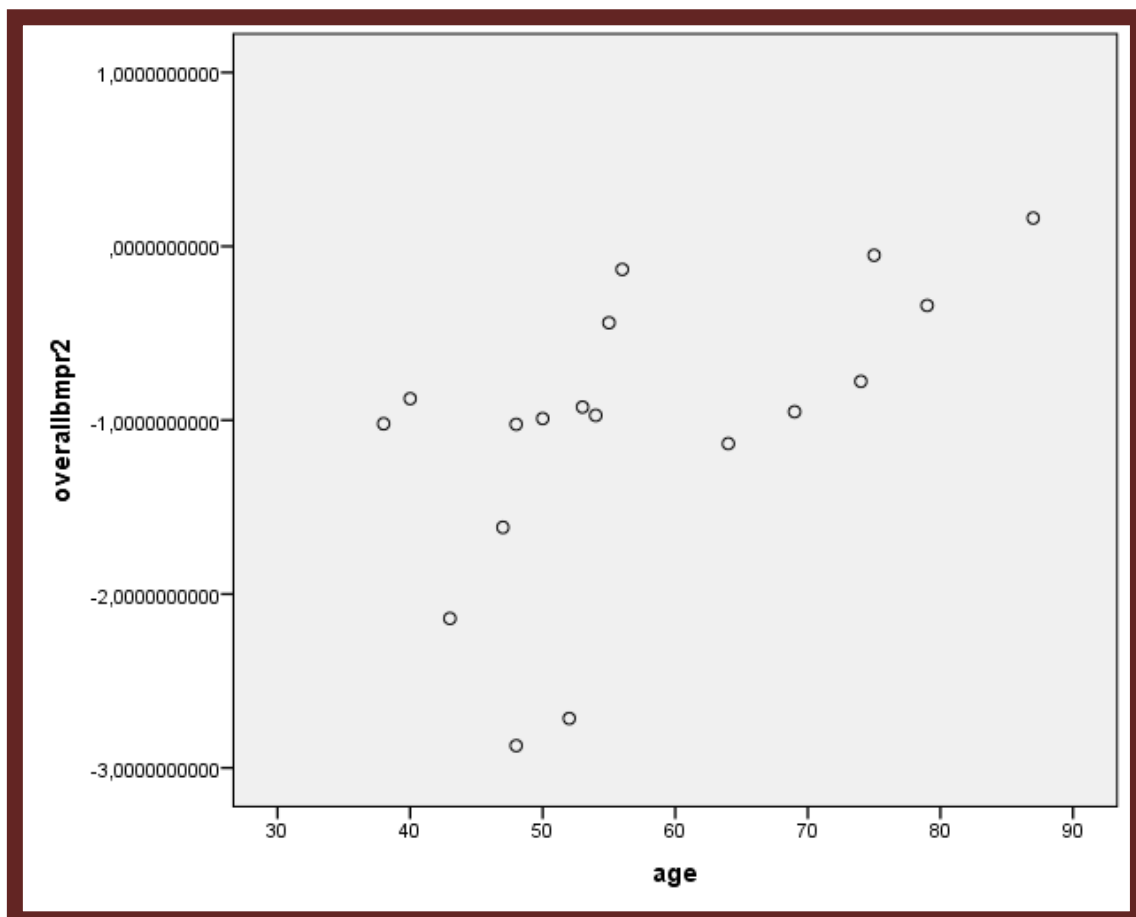
Στη συνέχεια, για κανονικοποίηση των δεδομένων, λογαριθμήθηκαν (log) οι τιμές έκφρασης mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$) και έγινε επανάληψη των υπολογισμών για τη συσχέτιση των επιπέδων έκφρασης με την ηλικία, συνολικά για όλα τα δείγματα, αλλά και ξεχωριστά, για τις δύο ομάδες γυναικών (προεμμηνοπαυσιακές – μετεμμηνοπαυσιακές).

Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του BMPR2 γονιδίου

Συνολικά αποτελέσματα

Correlations			
		age	overallbmpr2
age	Pearson Correlation	1	,565 [*]
	Sig. (2-tailed)		,015
	N	18	18
overallbmpr2	Pearson Correlation	,565 [*]	1
	Sig. (2-tailed)	,015	
	N	18	18

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

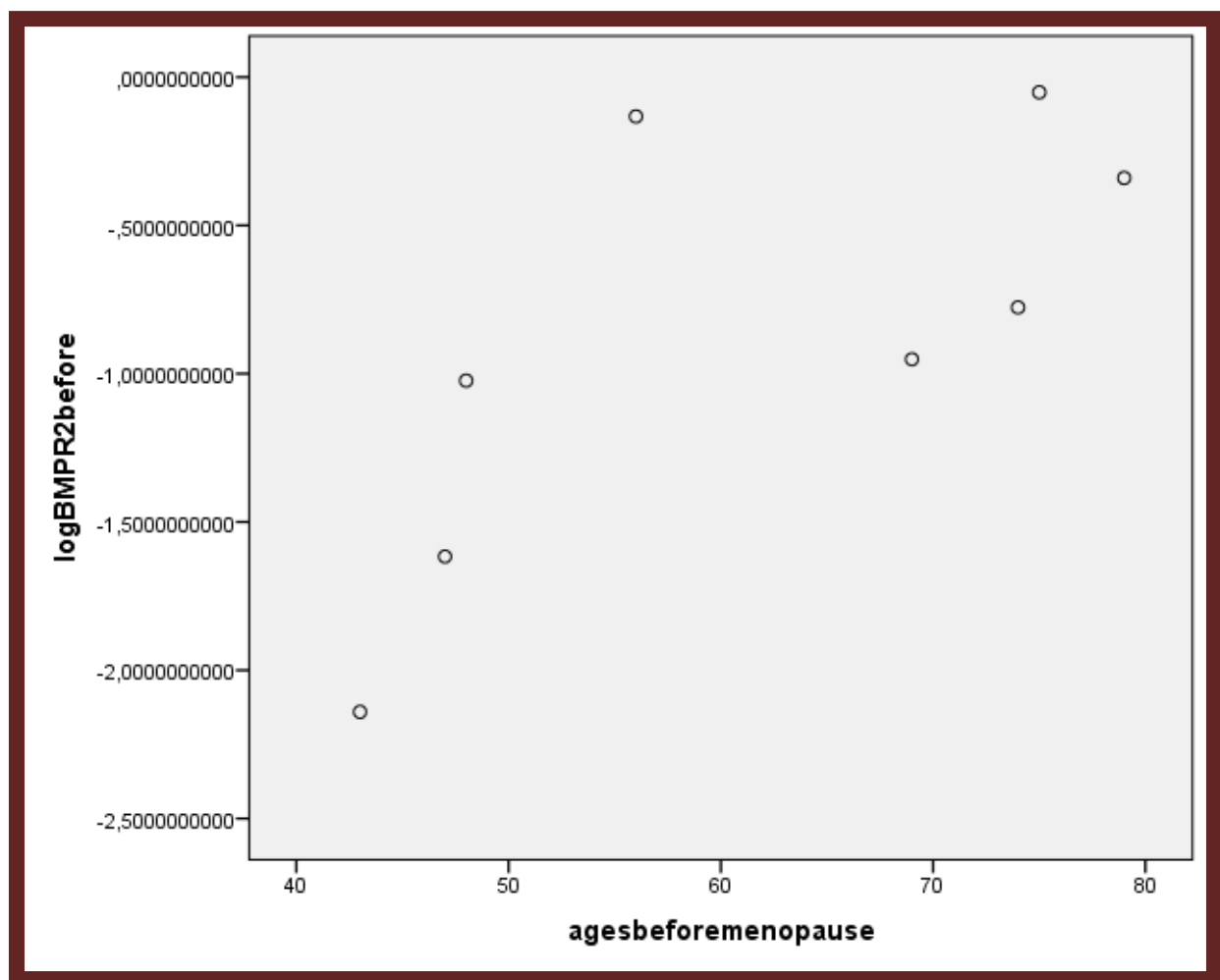


**Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του
BMPR2 γονιδίου**

Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

Correlations			
		logBMPR2before	agesbeforemenopause
logBMPR2before	Pearson Correlation	1	,722 [*]
	Sig. (2-tailed)		,043
	N	8	8
agesbeforemenopause	Pearson Correlation	,722 [*]	1
	Sig. (2-tailed)	,043	
	N	8	8

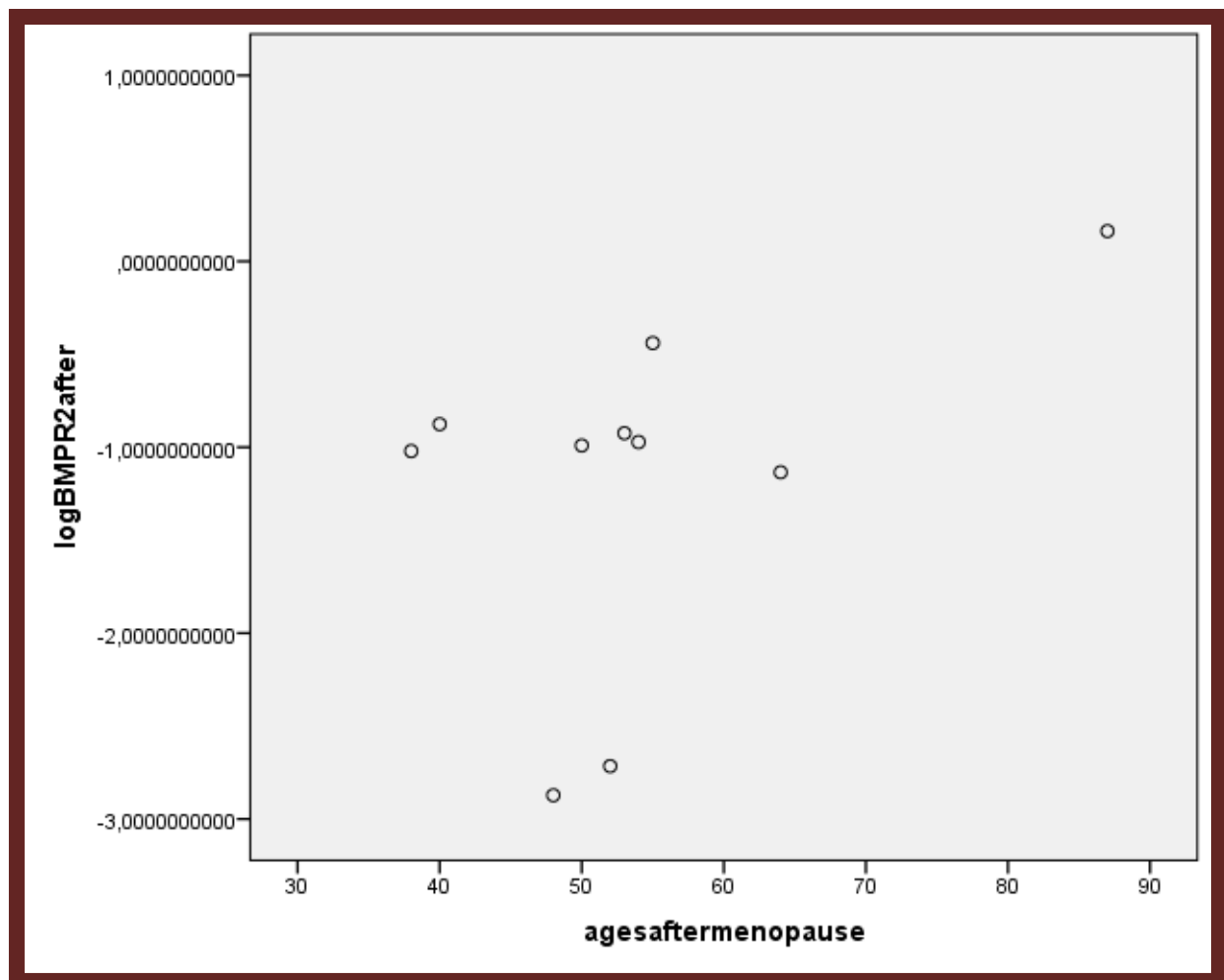
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του BMPR2 γονιδίου

Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

Correlations			
		agesaftermenopause	logBMPR2after
agesaftermenopause	Pearson Correlation	1	,441
	Sig. (2-tailed)		,202
	N	10	10
logBMPR2after	Pearson Correlation	,441	1
	Sig. (2-tailed)	,202	
	N	10	10



Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για το σύνολο των δειγμάτων μας, έδειξε ότι $P = 0,015 < 0,05$, οπότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του Bmpr2 γονιδίου.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξε ότι $P = 0,043 < 0,05$, οπότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του Bmpr2 γονιδίου.

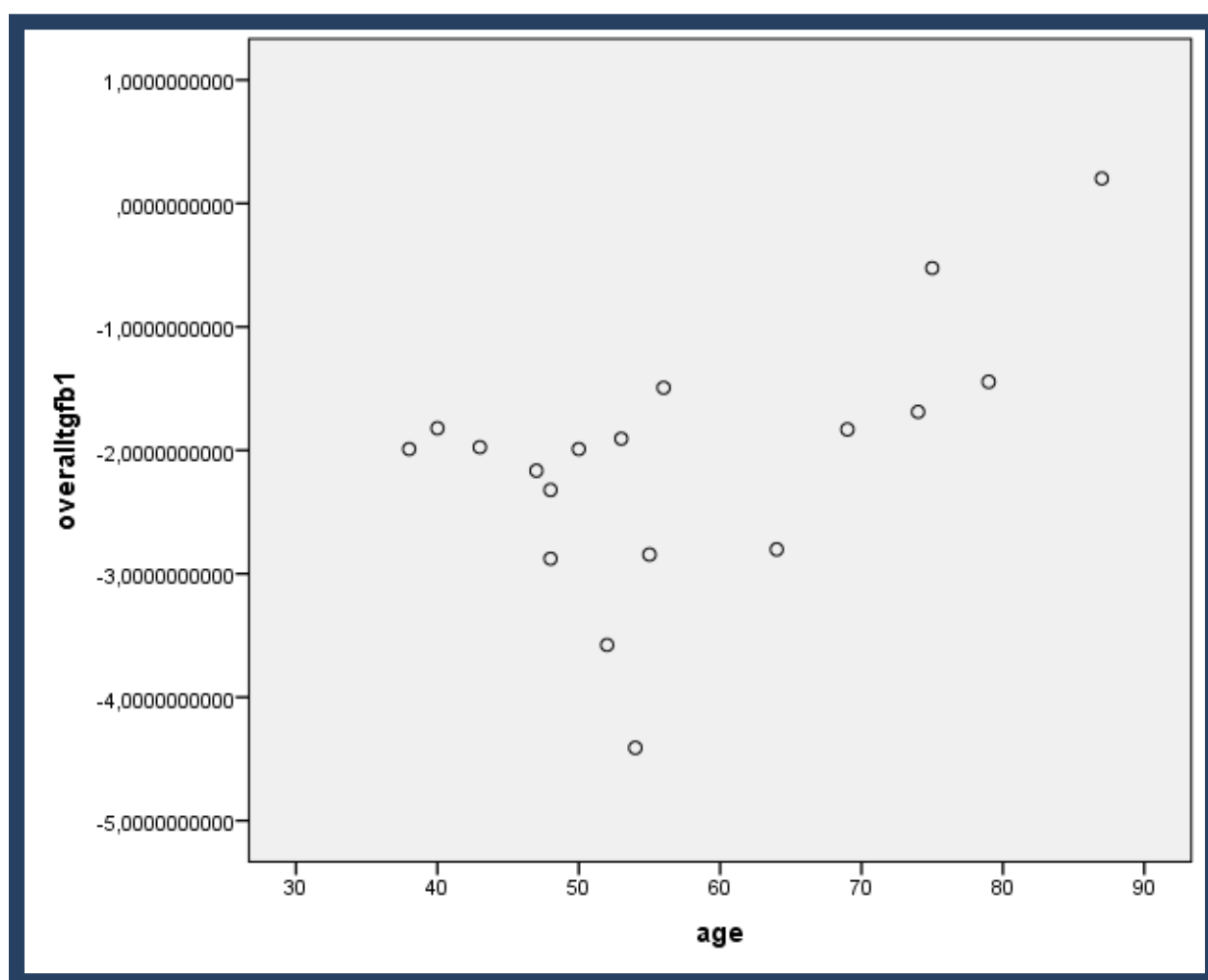
Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για τα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξε ότι $P = 0,202 > 0,05$, οπότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή δεν υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του Bmpr2 γονιδίου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ηλικία επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του Bmpr2 γονιδίου, αλλά αυτό συμβαίνει κυρίως σε γυναίκες που βρίσκονται πριν την εμμηνόπαυση. Ίσως υπάρχει ενδεχόμενος ρόλος της εμμηνόπαυσης στην έκφραση του γονιδίου αυτού.

**Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του
TGFB β 1 γονιδίου**

Συνολικά αποτελέσματα

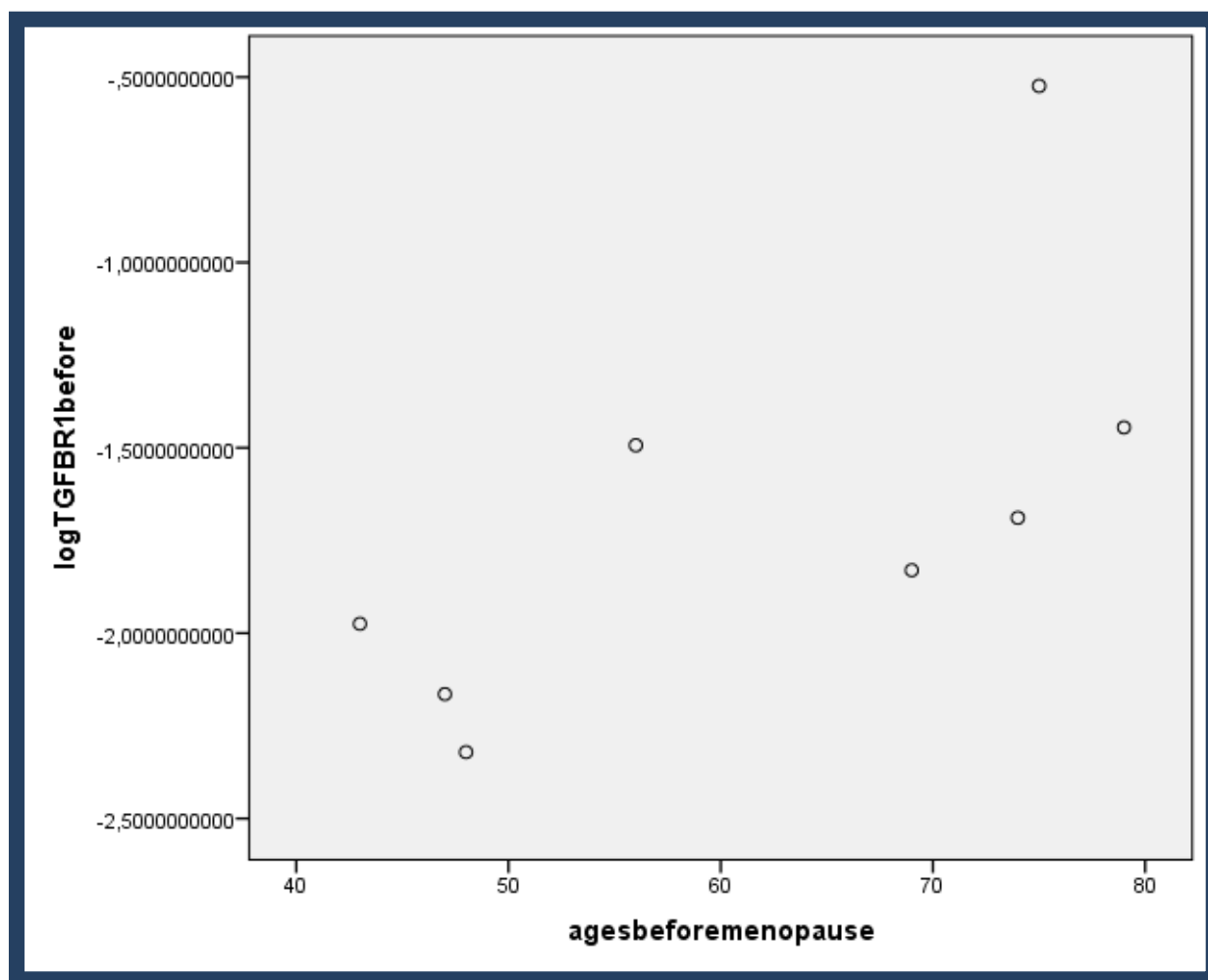
Correlations			
		overalltgfb1	age
overalltgfb1	Pearson Correlation	1	,530 [*]
	Sig. (2-tailed)		,024
	N	18	18
age	Pearson Correlation	,530 [*]	1
	Sig. (2-tailed)	,024	
	N	18	18
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).			



**Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του
TGFB β 1 γονιδίου**

Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

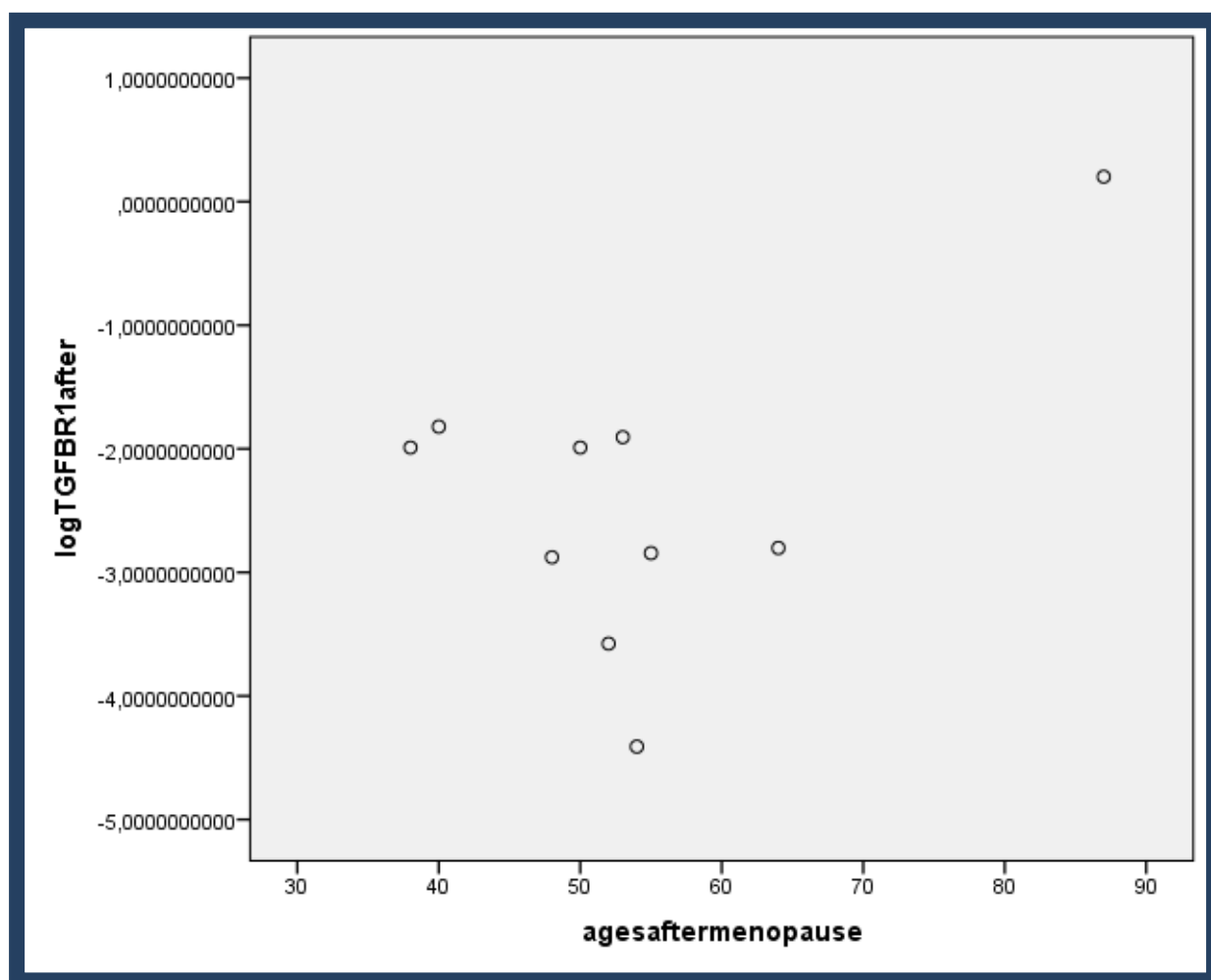
Correlations			
		logTGFB β 1before	agesbeforemenopause
logTGFB β 1before	Pearson Correlation	1	,682
	Sig. (2-tailed)		,062
	N	8	8
agesbeforemenopause	Pearson Correlation	,682	1
	Sig. (2-tailed)	,062	
	N	8	8



**Διαγράμματα συσχέτισης ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα έκφρασης του
TGFB β 1 γονιδίου**

Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

Correlations			
		logTGFB β 1after	agesaftermenopause
logTGFB β 1after	Pearson Correlation	1	,458
	Sig. (2-tailed)		,184
	N	10	10
agesaftermenopause	Pearson Correlation	,458	1
	Sig. (2-tailed)	,184	
	N	10	10



Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για το σύνολο των δειγμάτων, έδειξε ότι $P = 0,024 < 0,05$, οπότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξε ότι $P = 0,062 > 0,05$, οπότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή δεν υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου.

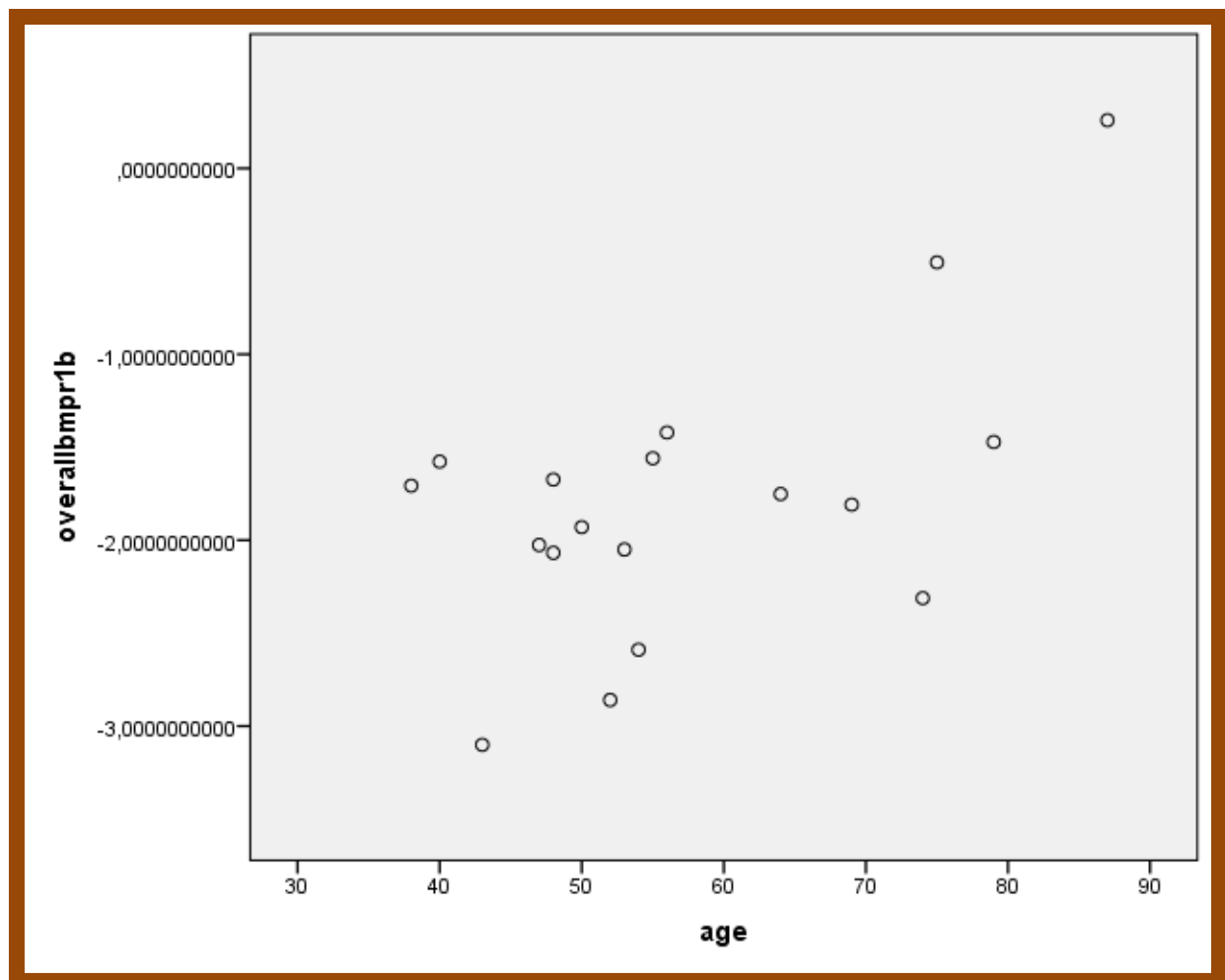
Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για τα δείγματα των μετεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξε ότι $P = 0,184 > 0,05$, οπότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή δεν υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ηλικία επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, αλλά αυτό συμβαίνει μόνο σε επίπεδο γενικών αποτελεσμάτων.

Διαγράμματα συσχέτισης της ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα του BMPR1b γονιδίου

Συνολικά αποτελέσματα

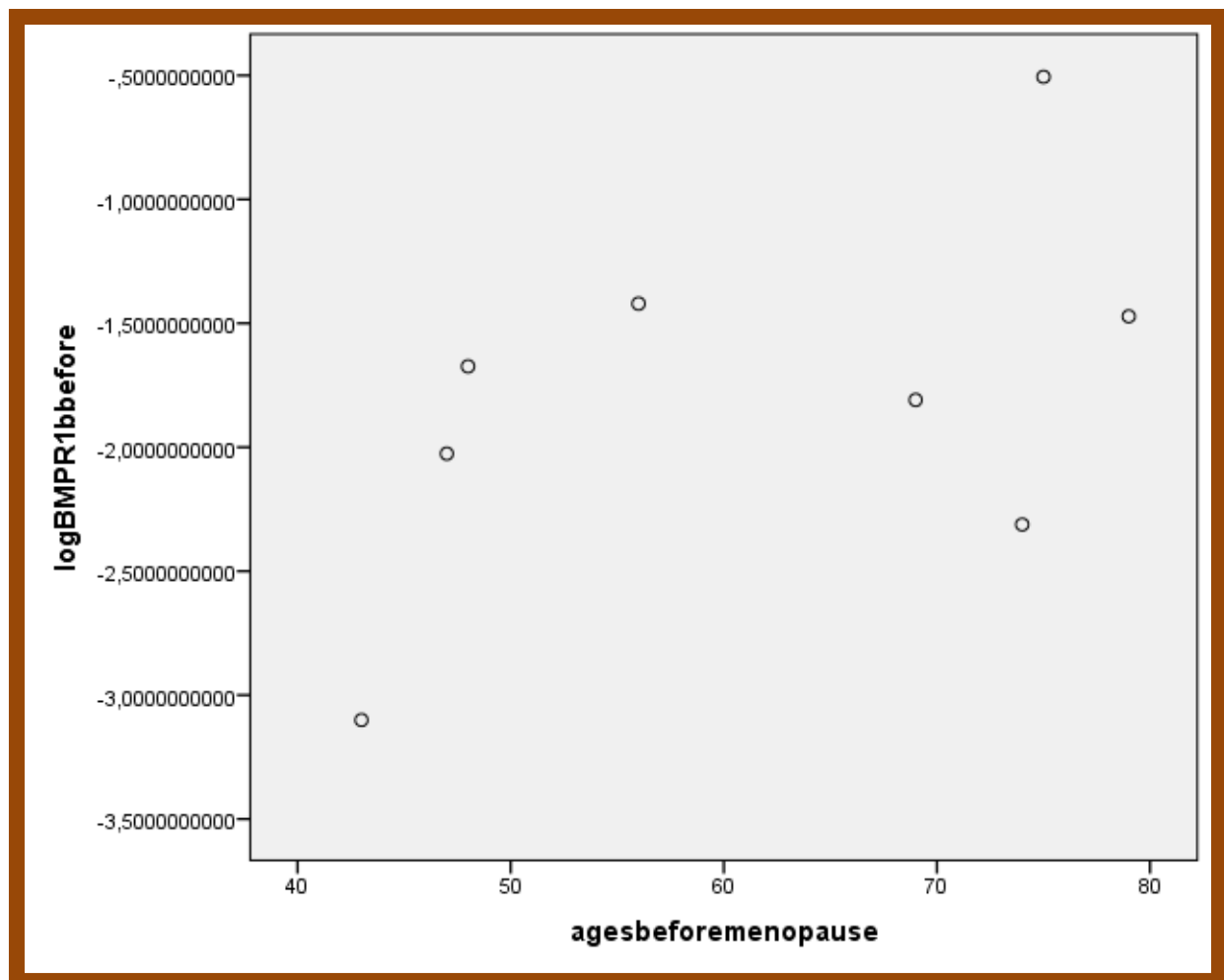
Correlations			
		age	overallbmpr1b
age	Pearson Correlation	1	,583 ⁺
	Sig. (2-tailed)		,011
	N	18	18
overallbmpr1b	Pearson Correlation	,583 ⁺	1
	Sig. (2-tailed)	,011	
	N	18	18
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).			



Διαγράμματα συσχέτισης της ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα του BMPR1b γονιδίου

Προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες

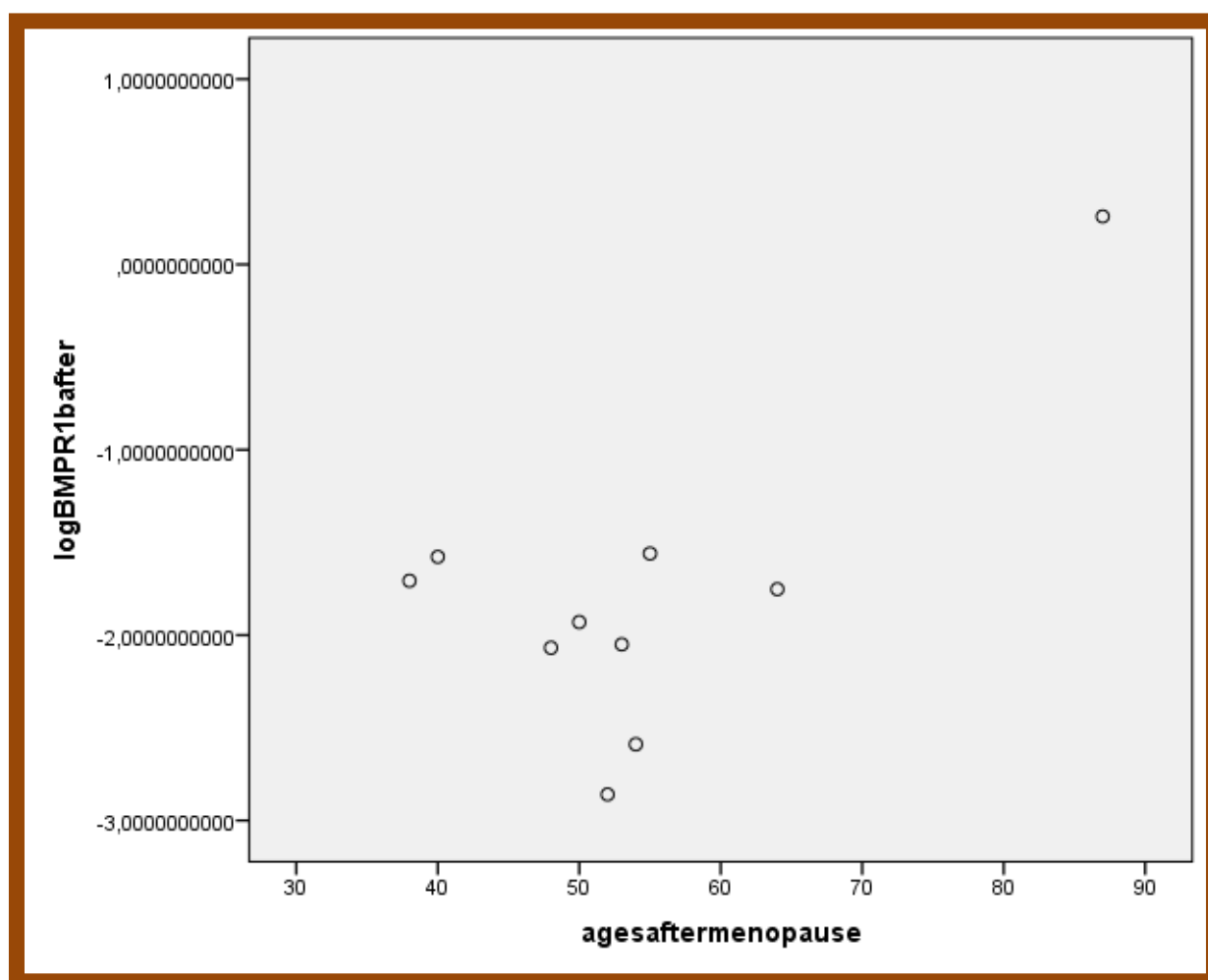
Correlations			
		logBMPR1bbefore	agesbeforemenopause
logBMPR1bbefore	Pearson Correlation	1	,530
	Sig. (2-tailed)		,177
	N	8	8
agesbeforemenopause	Pearson Correlation	,530	1
	Sig. (2-tailed)	,177	
	N	8	8



Διαγράμματα συσχέτισης της ηλικίας με τα λογαριθμημένα επίπεδα του BMPR1b γονιδίου

Μετεμηνοπαυσιακές γυναίκες

Correlations			
		logBMPR1bafter	agesaftermenopause
logBMPR1bafter	Pearson Correlation	1	,665*
	Sig. (2-tailed)		,036
	N	10	10
agesaftermenopause	Pearson Correlation	,665*	1
	Sig. (2-tailed)	,036	
	N	10	10
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).			



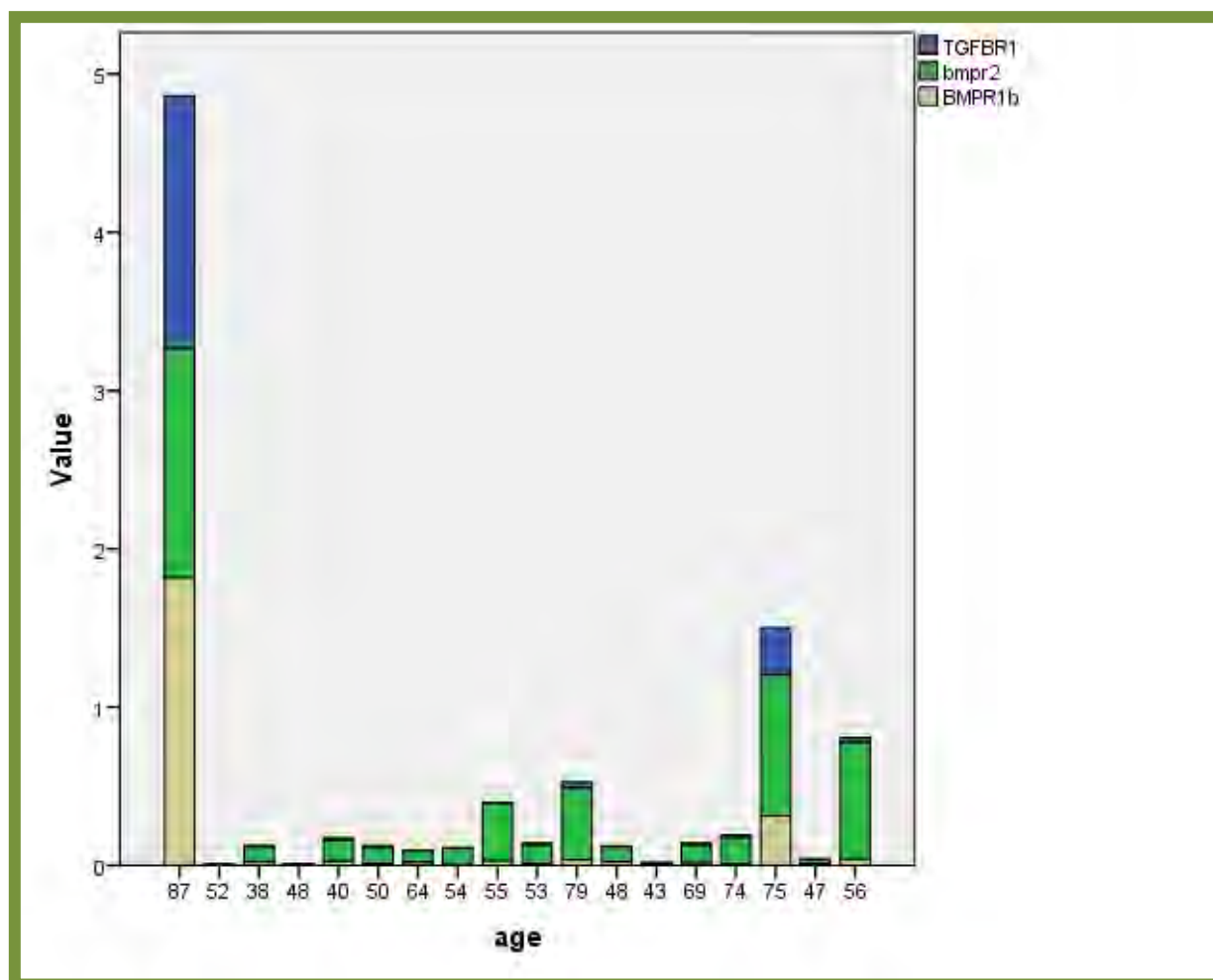
Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για το σύνολο των δειγμάτων, έδειξε ότι $P = 0,011 < 0,05$, οπότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του BMPR1b γονιδίου.

Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για τα δείγματα των προεμμηνοπαυσιακών γυναικών, έδειξε ότι $P = 0,177 > 0,05$, οπότε δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή δεν υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του BMPR1b γονιδίου.

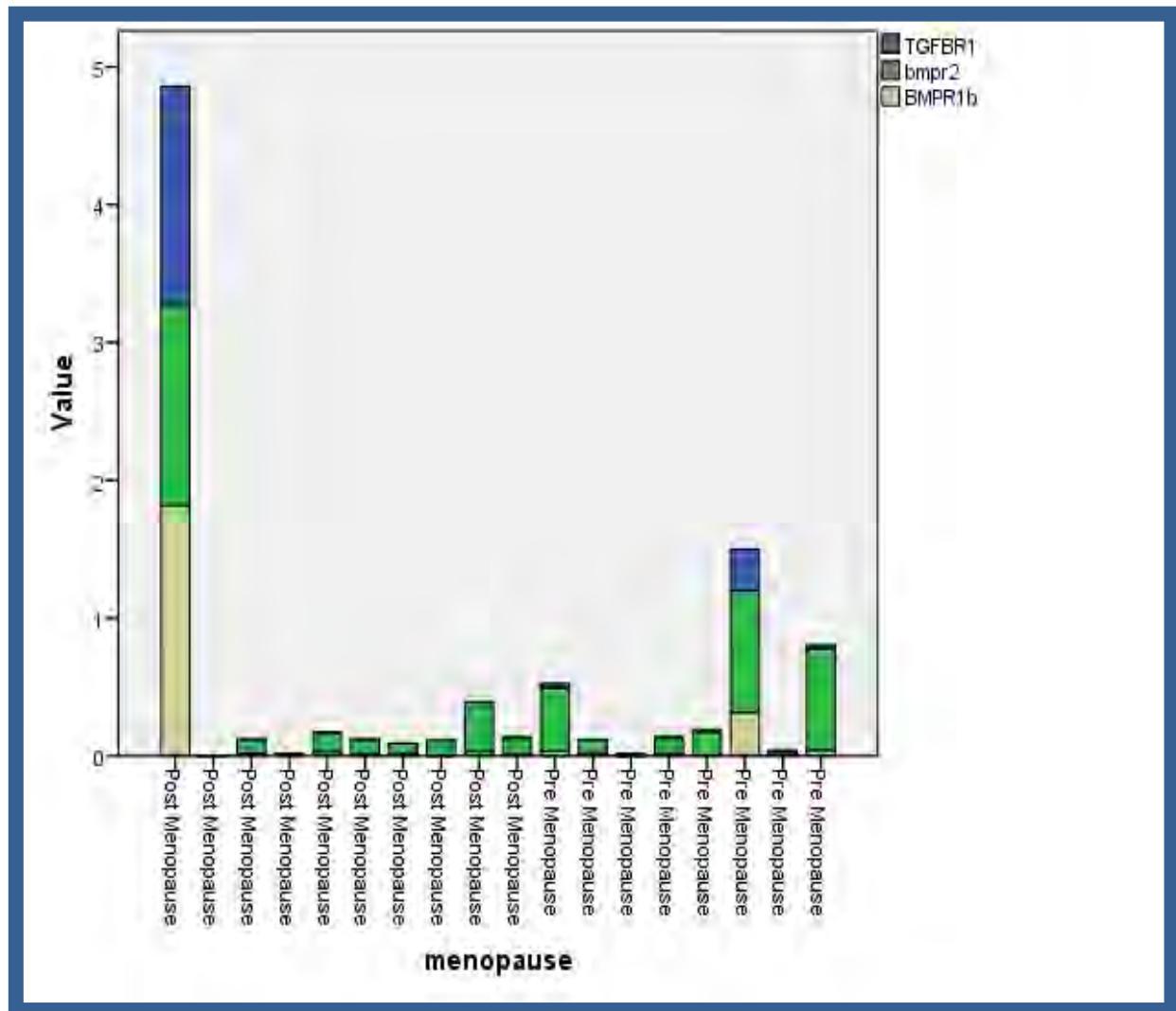
Τα αποτελέσματα της συσχέτισης $\log(2^{-\Delta\Delta CT})$ – ηλικίας, για το σύνολο των δειγμάτων, έδειξε ότι $P = 0,036 < 0,05$, οπότε υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των μέσων τιμών, δηλαδή υπάρχει σχέση της ηλικίας με τα επίπεδα έκφρασης του BMPR1b γονιδίου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ηλικία επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του BMPR1b γονιδίου, αλλά αυτό συμβαίνει κυρίως σε γυναίκες που βρίσκονται μετά την εμμηνόπαυση. Ίσως υπάρχει ενδεχόμενος ρόλος της εμμηνόπαυσης στην έκφραση του γονιδίου αυτού.

Ραβδόγραμμα απεικόνισης της συσχέτισης και των τριών γονιδίων με την ηλικία



**Ραβδόγραμμα απεικόνισης της συσχέτισης και των τριών γονιδίων με την
εμμηνόπαυση**

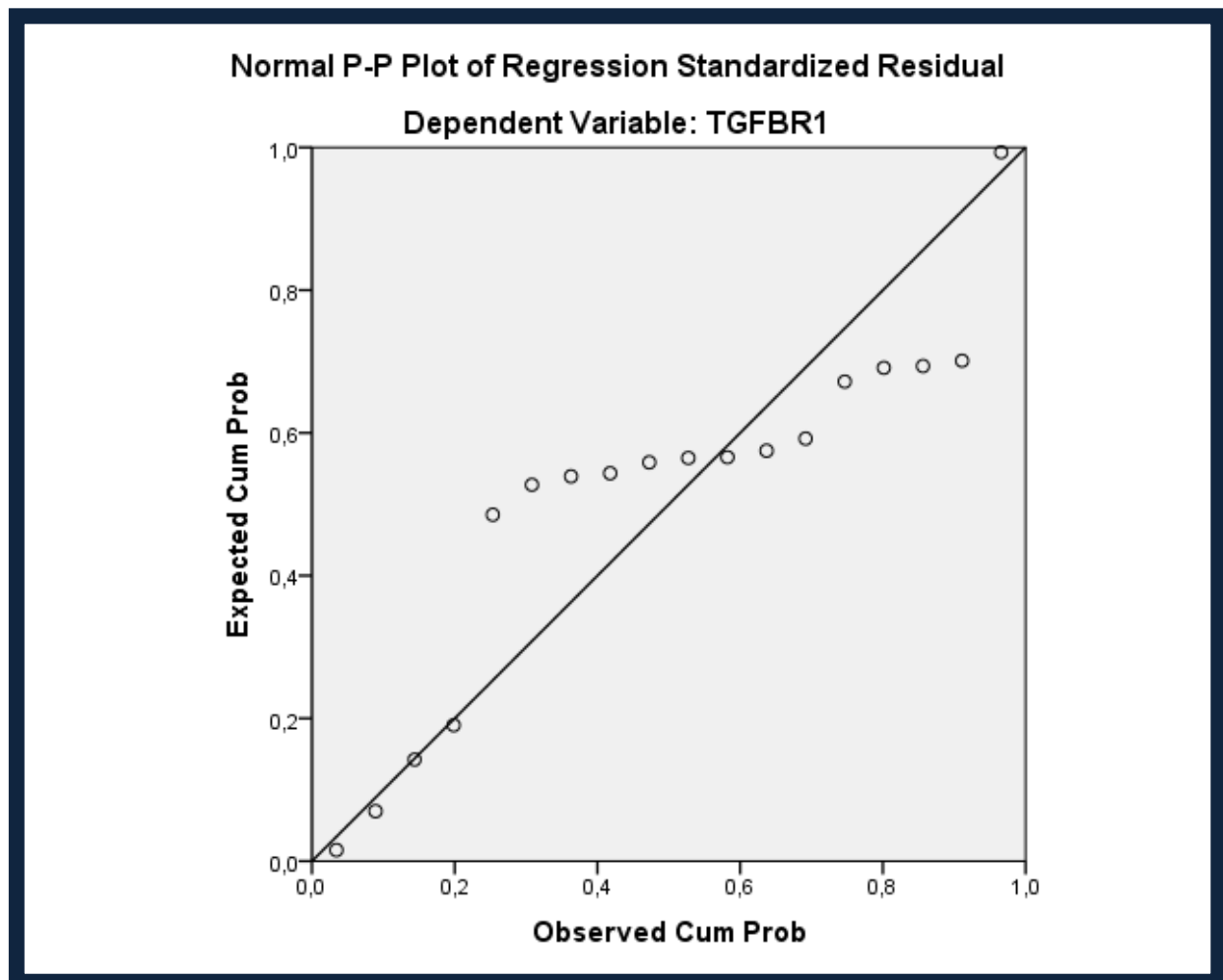


Τα δύο ραβδογράμματα, δείχνουν ότι η περίσσεια της κοινής BMPR2 υπομονάδας, είναι σαφώς μεγαλύτερη σε σχέση με τις δύο ειδικές υπομονάδες TGFBR1 και BMPRIb .

B.4.4. Διαγράμματα συσχέτισης των επιπέδων έκφρασης των τριών γονιδίων, μεταξύ τους

Διάγραμμα συσχέτισης της έκφρασης του TGFBR1(εξαρτημένη) γονιδίου με το BMPR2 (ανεξάρτητη) γονίδιο

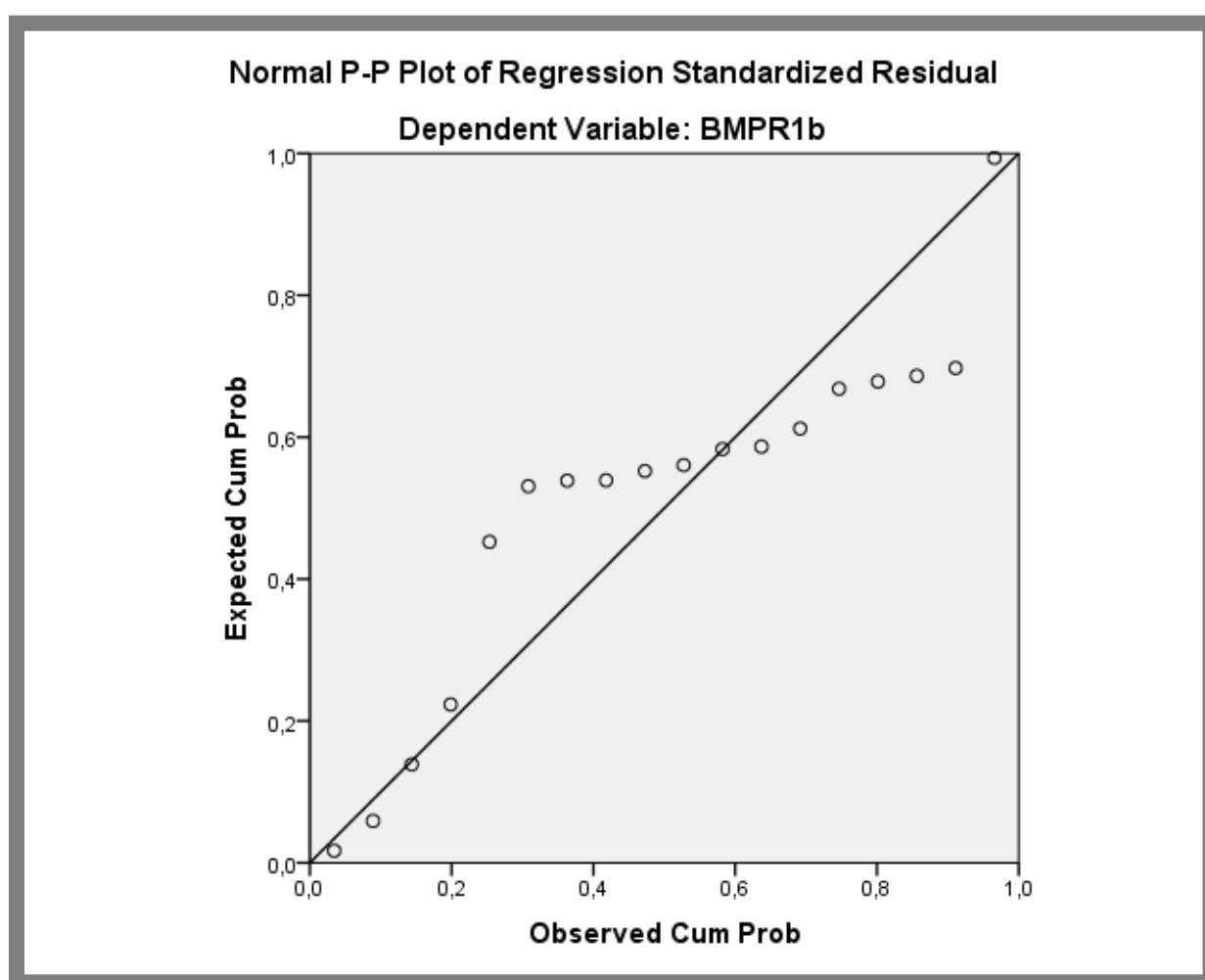
Model Summary ^b				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,836 ^a	,699	,681	,211794748748161
a. Predictors: (Constant), bmp2				
b. Dependent Variable: TGFBR1				



Παρατηρούμε ότι $r = 0,836$, οπότε υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση της έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, με αυτή του BMPR2. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα.

**Διάγραμμα συσχέτισης της έκφρασης του BMPR1b (εξαρτημένη)γονιδίου με το
BMPR2 (ανεξάρτητη) γονίδιο**

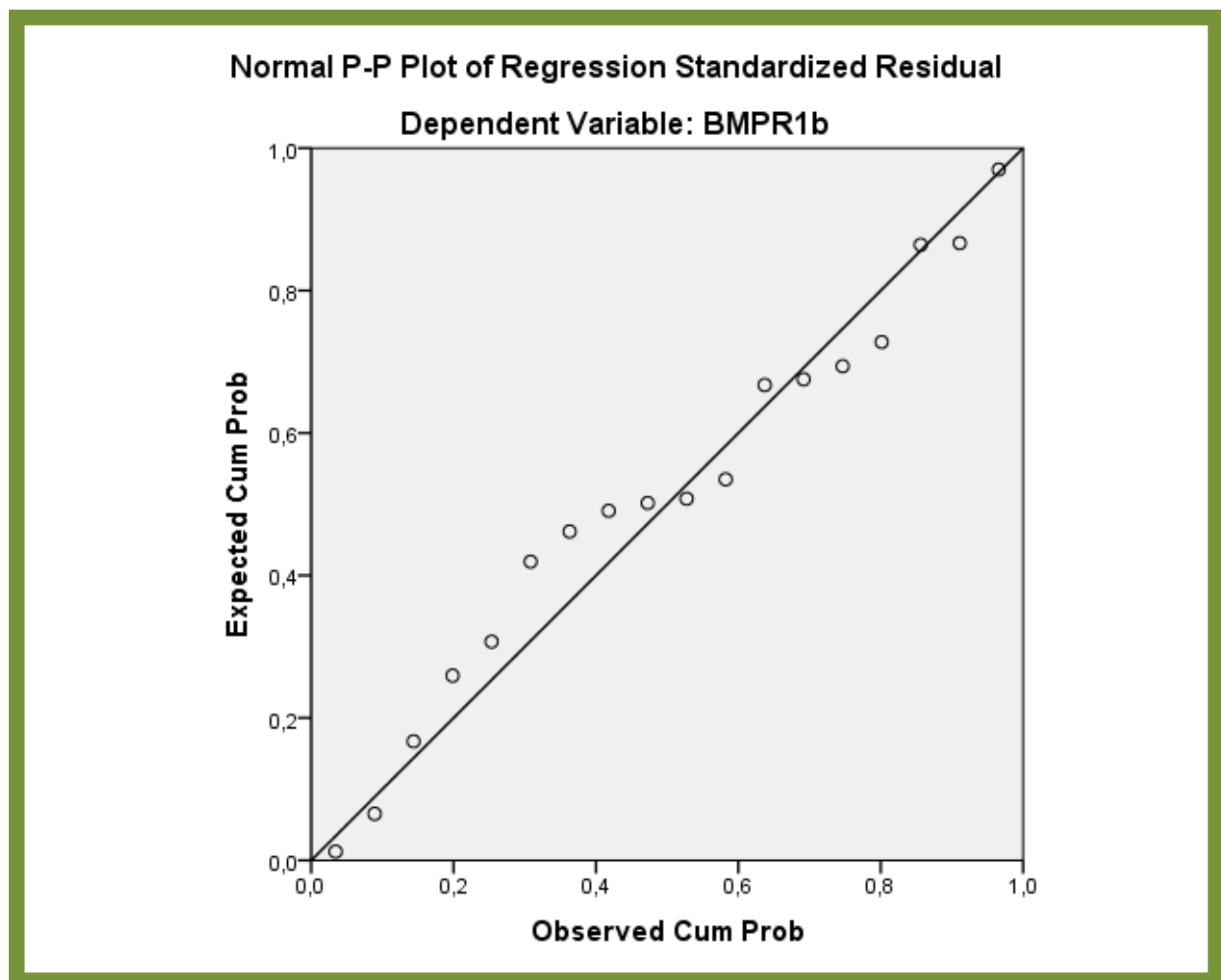
Model Summary ^b				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	,831 ^a	,691	,672	,244000912907333
a. Predictors: (Constant), bmpr2				
b. Dependent Variable: BMPR1b				



Παρατηρούμε ότι $r = 0,831$, οπότε υπάρχει ισχυρή θετική συσχέτιση της έκφρασης του BMPR1b γονιδίου, με αυτή του BMPR2. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα.

Διάγραμμα συσχέτισης της έκφρασης του TGFBR1 (εξαρτημένη) γονιδίου με το BMPR1b (ανεξάρτητη) γονίδιο

Model Summary ^b				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	1,000 ^a	,999	,999	,013080860749 297
a. Predictors: (Constant), TGFBR1				
b. Dependent Variable: BMPR1b				



Παρατηρούμε ότι $r = 1$, οπότε υπάρχει απόλυτα θετική συσχέτιση της έκφρασης του TGFBR1 γονιδίου, με αυτή του BMPR1b. Η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώνεται και από το διάγραμμα. Τα ίδια αποτελέσματα και γραφήματα προέκυψαν και με αντιστροφή της εκάστοτε εξαρτημένης μεταβλητής, με την αντίστοιχη ανεξάρτητη.

B.4.5. Υπολογισμός του λόγου των ειδικών υπομονάδων
(TGFBR1, BMPR1b) προς την κοινή υπομονάδα (BMPR2).

Αρ. δείγματος	Gene of interest	Τιμή Λόγου	Στάδιο εμμηνόπαυσης	Ηλικία
X1	TGFBR1/BMPR2	1,09429336	Μετά	87
	BMPR1b/BMPR2	1,248329921		
X2	TGFBR1/BMPR2	0,137590861	Μετά	52
	BMPR1b/BMPR2	0,717030114		
X4	TGFBR1/BMPR2	0,078563674	Πρίν	38
	BMPR1b/BMPR2	0,073812254		
X5	TGFBR1/BMPR2	0,05041591	Πρίν	48
	BMPR1b/BMPR2	0,223757547		
X6	TGFBR1/BMPR2	1,464014367	Πρίν	40
	BMPR1b/BMPR2	0,109545517		
X7	TGFBR1/BMPR2	0,132126065	Πρίν	50
	BMPR1b/BMPR2	0,138695722		
X8	TGFBR1/BMPR2	0,107316203	Μετά	64
	BMPR1b/BMPR2	0,205899927		
X9	TGFBR1/BMPR2	0,98659717	Μετά	54
	BMPR1b/BMPR2	6,365599404		
X10	TGFBR1/BMPR2	0,198886099	Μετά	55
	BMPR1b/BMPR2	0,113441967		
X11	TGFBR1/BMPR2	0,122428112	Πρίν	53
	BMPR1b/BMPR2	0,02915553		

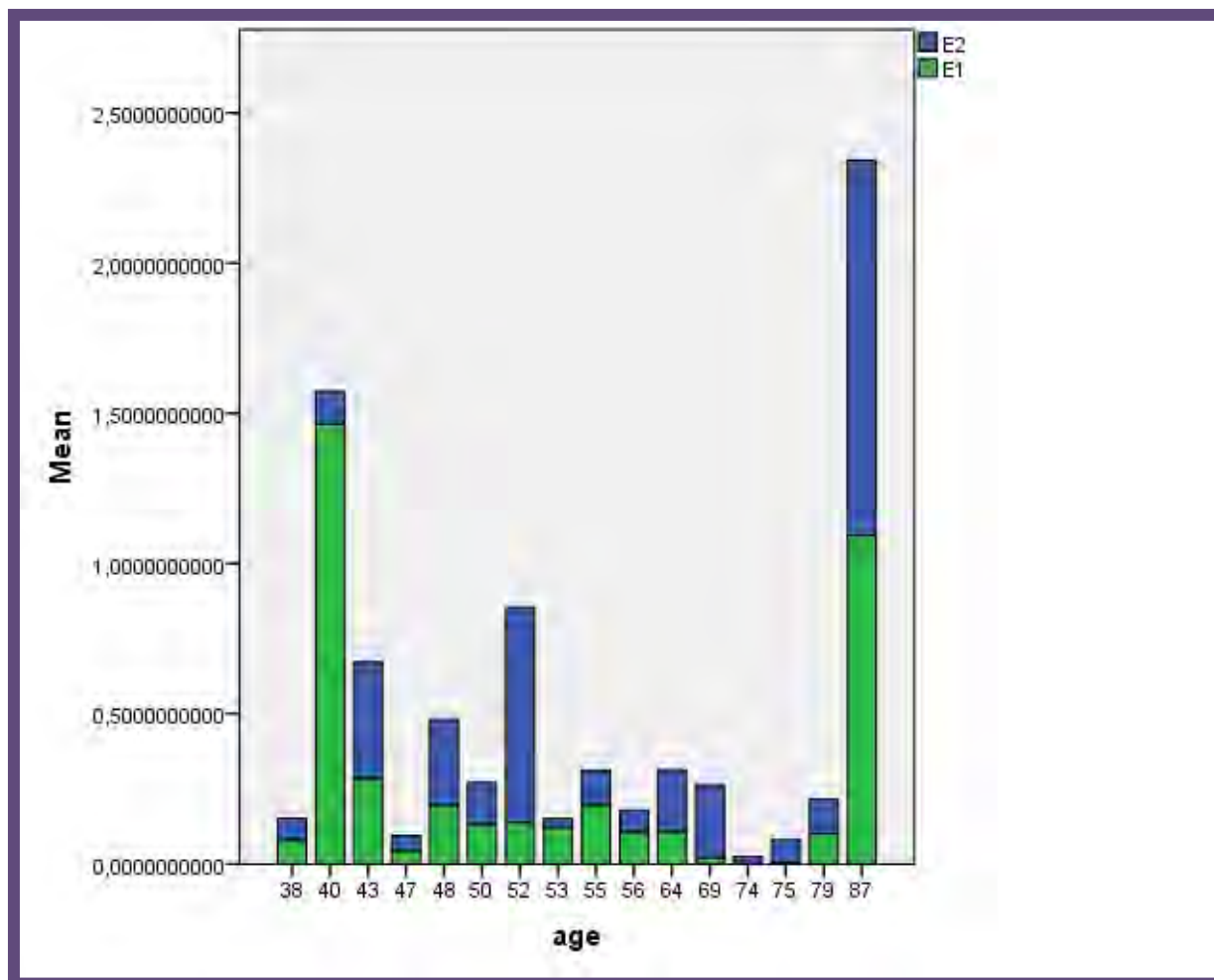
Αρ. δείγματος	Gene of interest	Τιμή Λόγου	Στάδιο εμμηνόπαυσης	Ηλικία
X12	TGFBR1/BMPR2	0,10012911	Μετά	79
	BMPR1b/BMPR2	0,115025724		
X13	TGFBR1/BMPR2	0,336808637	Πρίν	48
	BMPR1b/BMPR2	0,351111501		
X14	TGFBR1/BMPR2	0,283197551	Πρίν	43
	BMPR1b/BMPR2	0,389562052		
X15	TGFBR1/BMPR2	0,021486453	Μετά	69
	BMPR1b/BMPR2	0,24148045		
X16	TGFBR1/BMPR2	0,000364987	Μετά	74
	BMPR1b/BMPR2	0,024179247		
X17	TGFBR1/BMPR2	0,003934051	Μετά	75
	BMPR1b/BMPR2	0,075885918		
X18	TGFBR1/BMPR2	0,043586317	Πρίν	47
	BMPR1b/BMPR2	0,051474967		
X19	TGFBR1/BMPR2	0,104383607	Μετά	56
	BMPR1b/BMPR2	0,074840443		

Άθροισμα του λόγου TGFBR1/BMPR2 = 5,266122534. Ακόμη, $5,266122534/18(\text{αρ.δειγμάτων}) = 0,292562363$. Άρα κατά μέσο όρο η έκφραση της BMPR2 υπομονάδας υπερέχει.

Άθροισμα του λόγου BMPR1b/BMPR2 = 4,183228806 (αποκλείοντας την ακραία τιμή 6,365599404). Ακόμη, $4,183228806 / 18(\text{αρ.δειγμάτων}) = 0,2324016003$. Άρα κατά μέσο όρο η έκφραση της BMPR2 υπομονάδας υπερέχει.

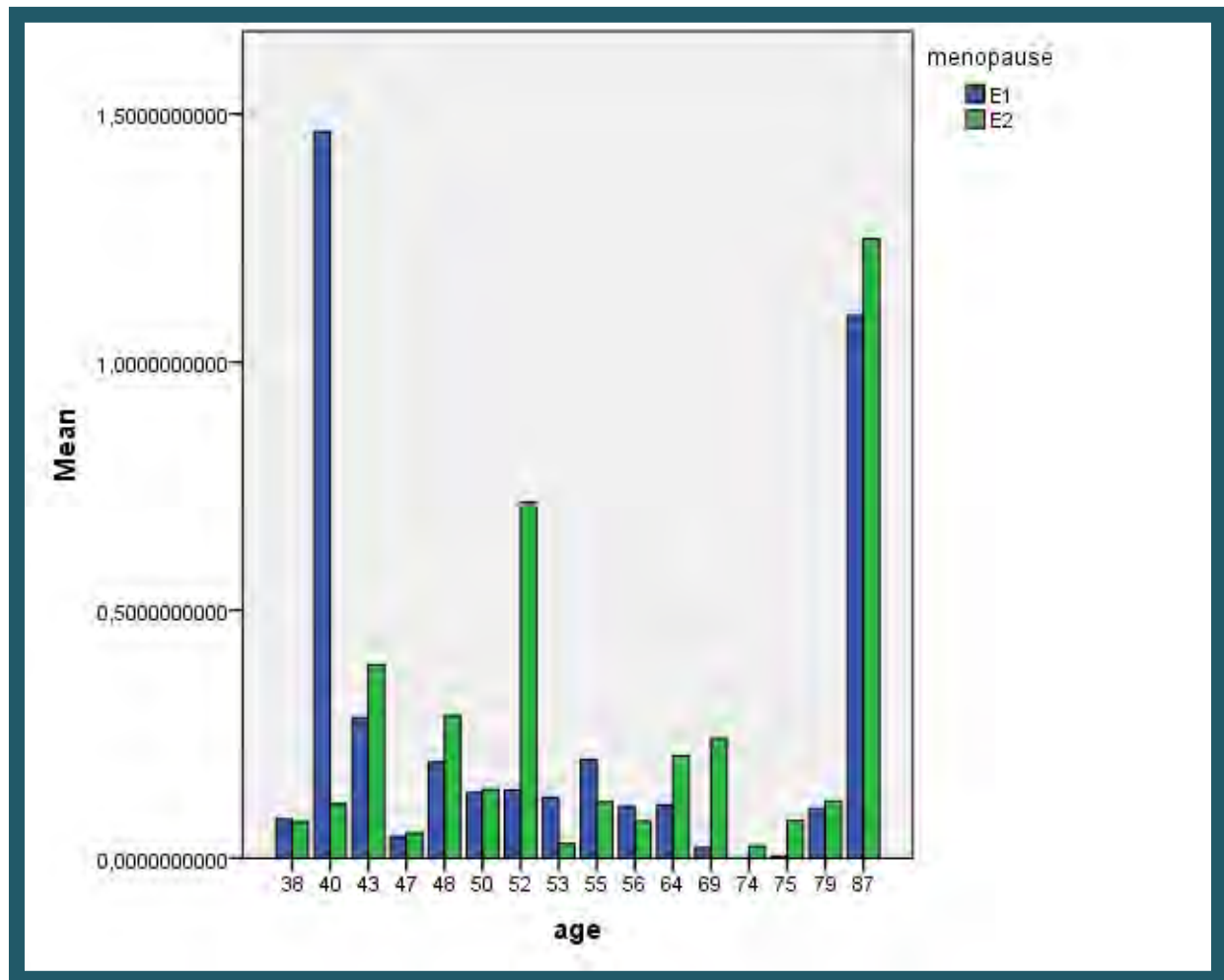
Επομένως: TGFBR1/BMPR2 > BMPR1b/BMPR2. Δηλαδή, τα επίπεδα του TGFBR1 γονιδίου φαίνεται να είναι ελαφρώς πιο αυξημένα από εκείνα του BMPR1b. Για την ακρίβεια ο λόγος TGFBR1/BMPR2 / BMPR1b/BMPR2 ισούται με 1,258865527. Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί θέσαμε E1 όπου TGFBR1/BMPR2 και E2 όπου BMPR1b/BMPR2.

**Ραβδόγραμμα σύγκρισης των λόγων των δύο ειδικών
υπομονάδων, ως προς την κοινή**



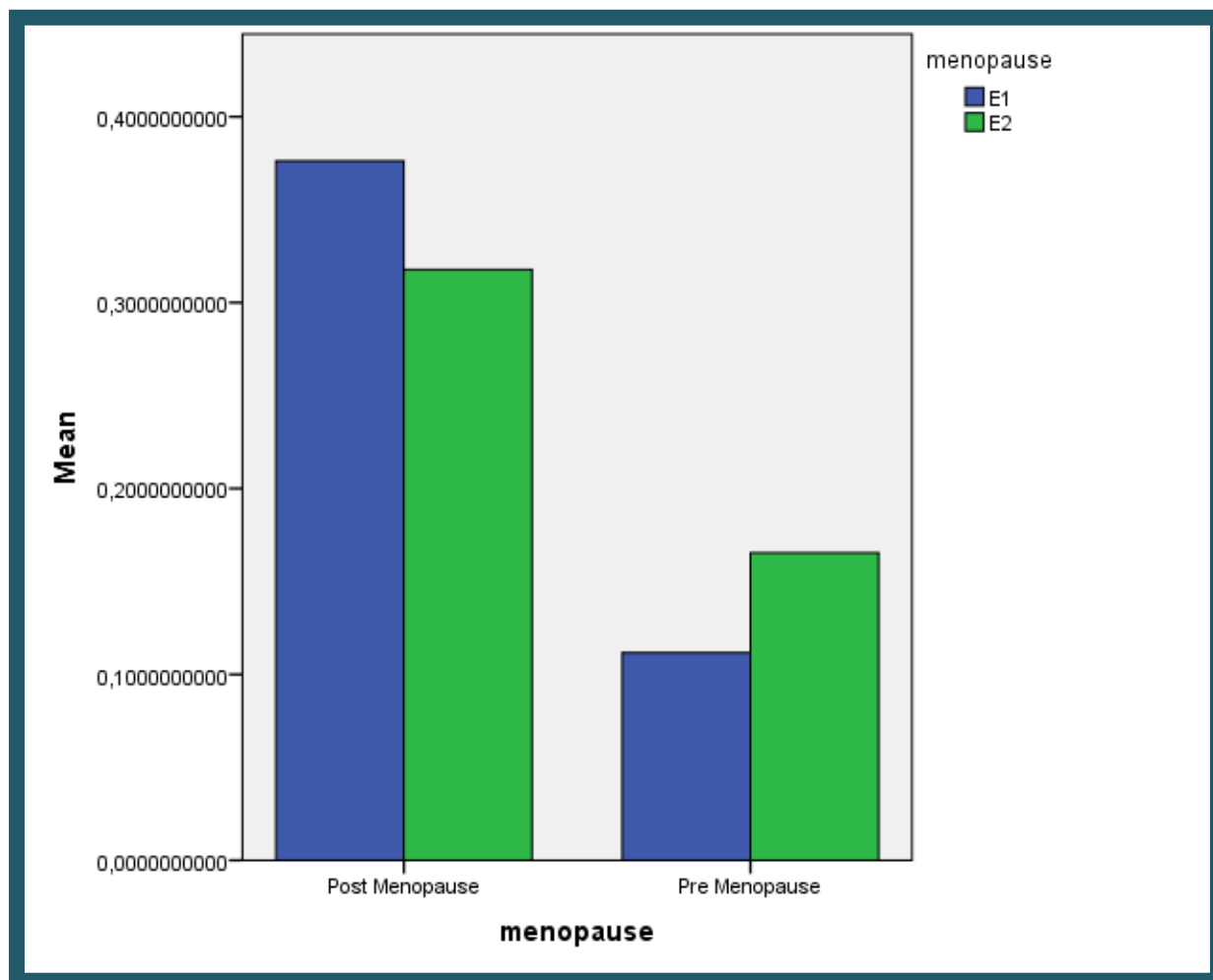
Από το ραβδόγραμμα, φαίνεται να υπερέχει ο λόγος E2 έναντι του E1, ανά περίπτωση γυναίκας. Παρόλο που αθροιστικά υπερέχει ο E1, ανά περίπτωση υπερέχει του E2 μόνο 4 φορές, στα τονισμένα με γκρί δείγματα. Εάν αφαιρέσουμε από το συνολικό άθροισμα του E1 την τιμή 0,98659717, η οποία είναι ζευγάρι με την ακραία τιμή 6,365599404 του E2 λόγου και συνεπώς, δεν περιλαμβάνεται στο ραβδόγραμμα, βλέπουμε ότι το άθροισμα των τιμών του E1 είναι ίσο με 4,279525364 και πάλι υψηλότερο από αυτό του E2. Σε αυτήν την περίπτωση $E1 / E2 = 1,023019673$. Άρα οι δύο λόγοι είναι σχεδόν ίσοι. Συμπερασματικά, μικρές διαφορές υπάρχουν μεταξύ της έκφρασης των δύο γονιδίων των δύο ειδικών υπομονάδων, ως προς την κοινή υπομονάδα. Ακόμη, οι δύο λόγοι, φαίνεται να έχουν μεταπτώσεις, ανάλογα με την ηλικία των γυναικών.

**Ραβδόγραμμα σύγκρισης των λόγων των δύο ειδικών
υπομονάδων, ως προς την κοινή, σε σχέση με την ηλικία**



Από το παραπάνω ραβδόγραμμα, είναι φανερό ότι οι λόγοι E1 και E2 δεν παραμένουν σταθεροί, αλλά μεταβάλλονται, ανάλογα με την ηλικία.

Ραβδόγραμμα σύγκρισης των λόγων των δύο ειδικών υπομονάδων, ως προς την κοινή σε σχέση με την εμμηνόπαυση



Από το ραβδόγραμμα αυτό, φαίνεται ότι η εμμηνόπαυση επηρεάζει την έκφραση των δύο ειδικών υπομονάδων, ως προς την κοινή, με φανερά μεγαλύτερες τιμές στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες. Φαίνεται να αντιστρέφεται η σχέση μεταξύ των δύο λόγων πριν και μετά την εμμηνόπαυση.

B.5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σύμφωνα με τα δεδομένα που έχουν προκύψει από προηγούμενες έρευνες, προκύπτει το συμπέρασμα ότι είναι βαρυσήμαντος ο ρόλος των BMP15 και GDF9 παραγόντων στη μετάβαση του ωοθυλακίου από το πρωτογενές στο δευτερογενές στάδιο, αλλά και η ανάπτυξη του ωοθυλακίου μέχρι το στάδιο του γραφαιανού.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι δύο υποδοχείς των παραγόντων αυτών και συγκεκριμένα τα επίπεδα mRNA για τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τις τρεις υπομονάδες τους, τις δύο ειδικές (TGFB1 – GDF9, BMP1b – BMP15) και τη μία κοινή (BMP2).

Για την ακρίβεια, έγινε προσπάθεια συσχέτισης: α) της ηλικίας και β) του σταδίου εμμηνόπαυσης 18 γυναικών, με τα επίπεδα έκφρασης των τριών γονιδίων.

Τα συμπεράσματα που προέκυψαν, είναι τα εξής:

- 1) Η ηλικία φαίνεται να έχει οριακά θετική συσχέτιση με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων, ιδιαίτερα του BMP2 και του BMP1b.
- 2) Η εμμηνόπαυση δεν φαίνεται να επηρεάζει την έκφραση του mRNA των υπομονάδων.
- 3) Η περίσσεια της κοινής BMP2 υπομονάδας, είναι πολλές φορές μεγαλύτερη από αυτή των ειδικών υπομονάδων. Ο λόγος αυτός, δεν παραμένει σταθερός ανάλογα με την ηλικία και την εμμηνόπαυση.
- 4) Η έκφραση των τριών γονιδίων είναι αλληλοεξαρτώμενη.
- 5) Ο φυσιολογικός γεννητικός κύκλος της γυναίκας, δημιουργεί μεγάλο εύρος τιμών στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, όπως φαίνεται στα Διαγράμματα Κουτιού. Το γεγονός αυτό, είναι αναμενόμενο και μάλιστα προαπαιτούμενο, για να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία των πειραμάτων μας, μιας και ο κύκλος κάθε γυναίκας διαφέρει.
- 6) Συμπερασματικά σε αντίθεση με την εμμηνόπαυση, η ηλικία φαίνεται να επηρεάζει θετικά την έκφραση mRNA των υπομονάδων BMP2, TGFB1, BMP1b.

B.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΛΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adashi E.Y., (1994). "Endocrinology of the ovary." Human Reproduction **9**(5): 815 - 827.
- Albertini DF, C. C., Benecchi E and Carabatsos MJ (2001). "Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development." Reproduction **121**: 647 - 653.
- Attisano L, W. J. (1998). "Mads and Smads in TGF beta signalling." Curr. Opin. Cell Biol. **10**(2): 188 - 194.
- Attisano L, W. J. (2002). "Signal transduction by the TGF-beta superfamily." Science **296**(5573): 1646 - 1647.
- Bodensteiner KJ, C. C., Moeller CL & Sawyer HR (1999). "Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries." Biology of reproduction(60): 381 - 386.
- Castillejo A, R. N., Murta-Nascimento C, Malats N, García-Closas M, Gómez-Martínez A, Lloreta J, Tardón A, Serra C, García-Closas R, Chanock S, Silverman DT, Dosemeci M, Kogevinas M, Carrato A, Soto JL, Real FX. (2009). "TGFB1 and TGFBR1 polymorphic variants in relationship to bladder cancer risk and prognosis." Int J Cancer. **124**(3): 608-613.
- Chand AL, P. A., Harris SE, Winship IM, Shelling AN. (2006). "Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure." Fertil Steril. **86**(4): 1009-1012.

- Chen T, J. C., Costello B, Singer N, Colligan B, Douglass L, Pemberton J, Deddens J, Graff JR, Carter JH. (2004). "An intronic variant of the TGFBR1 gene is associated with carcinomas of the kidney and bladder." Int J Cancer. **112**(3): 420-425.
- Chen, Y. G., Liu, F., and Massagué, J. (1997). "of TGFβ receptor inhibition by FKBP12. ." EMBO J.(16): 3866-3876.
- Das, P., Maduzia, L.L., and Padgett, R.W. (1999). "Genetic approaches to TGFβ signaling pathways." Cytokine & Growth Factor Reviews(10): 179 - 186.
- Datta, P. K., Chytil, A., Gorska, A.E., and Moses, H.L. (1998). "Identification of STRAP, a novel WD domain protein in transforming growth factor-β signaling." J. Biol. Chem.(273): 34671-34674.
- De Resende LO, V. A., Santana LF, Moreno DA, de Sá Rosa e Silva AC, Ferriani RA, Scrideli CA, Reis RM. (2012). "Single-cell expression analysis of BMP15 and GDF9 in mature oocytes and BMPR2 in cumulus cells of women with polycystic ovary syndrome undergoing controlled ovarian hyperstimulation." J Assist Reprod Genet.(10): 1057-1065.
- Derynck R, Z. Y., Feng XH (1998). "Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses." Cell **95**(6): 737-740.
- Di Pasquale E, B.-P. P. P. L. (2004). "Hypergonadotropic ovarian failure associated with an inherited mutation of human bone morphogenetic protein-15 (BMP15) gene." American Journal of Human Genetics(75): 106 - 111.

- Dixit H, R. L., Padmalatha V, Kanakavalli M, Deenadayal M, Gupta N, Chakravarty B, Singh L. (2005). "Mutational screening of the coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure." Menopause **12**(6): 749-754.
- Dong J, A. D., Nishimori K, Kumar TR, Lu N & Matzuk MM (1996). "Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis." Nature(383): 531 - 535.
- Dutt SS, C. N., Darbary HK, Swede H, Petrelli NJ, Stoler DL, Anderson GR. (2008). "Colorectal cancers in patients with the (9A/6A) polymorphism of TGFBR1 exhibit lesser inter-(simple sequence repeat) PCR genomic instability and present clinically at greater age." Mutat Res. **645**(1-2): 27-32.
- Eckery DC, W. L., Lawrence SB, Wylde KA, McNatty KP & Juengel JL (2002). "Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*)." Molecular and cellular endocrinology(192): 115–126.
- Elis S, D. J., Couty I, Persani L, Govoroun M, Blesbois E, Batellier F and Monget P (2007). "Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary." Journal of Endocrinology(194): 485 - 497.
- Fortune JE,(1994). "Ovarian follicular growth and development in mammals." Biology of reproduction **50**(2): 225 - 332.

- Galloway SM, M. K., Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW (2000). "Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner." Nature Genetics(25): 279–283.
- Gougeon A., (1986). "Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results". Human Reproduction **1**(2): 81 - 87.
- Hackelöer BJ, F. R., Robinson HP, Adam AH, Coutts JR (1979). "Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development." American Journal of Obstetrics and Gynecology **135**(1): 122-128.
- Hanrahan JP, G. S., Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R & Galloway SM (2004). "Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*)." Biology of reproduction(70): 900 - 909.
- Hashimoto O, M. R. S. S. (2005). "Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota." PNAS(102): 5426–5431.
- Hilier S.G.(2001). "Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development." Molecular and cellular endocrinology **179**(1- 2): 39 - 46.
- Ireland JJ(1987). "Control of follicular growth and development." Journal of Reproduction and Fertility. **34**: 39 - 54.

- Iyazono K, t. D. P. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." Nature **390**(6659): 465–471.
- Juengel J, H. N., Whiting L, McNatty K (2004). "Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes." Biol Reprod **70**(3): 557–561.
- Juengel JL, B. K., Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR & McNatty KP (2004). "Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules." Animal Reproduction Science(82–83): 447–460.
- Karen L Reader, D. A. H., Stan Lun, C Joy McIntosh, Andrea H Western, Roger P Littlejohn, Kenneth P McNatty, and Jennifer L Juengel (2011). "Signalling pathways involved in the cooperative effects of ovine and murine GDF9+BMP15-stimulated thymidine uptake by rat granulosa cells." Reproduction **142**(1): 123 - 131.
- Kedem A, F. B., Garor R, Ben-Zaken A, Gizunterman T, Felz C, Ben-Haroush A, Kravarusic D, Abir R. (2011). "Growth differentiating factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 both activate development of human primordial follicles in vitro, with seemingly more beneficial effects of GDF9." J Clin Endocrinol Metab. **96**(8): 1246-1254.
- Kidder G.M., M. A. A. (2002). "Gap junctions and ovarian folliculogenesis." Reproduction **123**: 613 - 620.

- Kovanci E, R. J., Simpson J, Heard M, Bishop C, Carson S (2007). "Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure." Fertil Steril **87**(1): 143 - 146.
- Kovanci E, R. J., Simpson JL, Heard MJ, Bishop CE, Carson SA. (2007). "Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure." Fertil Steril. **87**(1): 143-146.
- Knight P.G., Glistner E. (2003). "Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. ." Animal Reproduction Science **78**: 165–183.
- Liao RY, M. C., Qiu LX, Ding H, Chen Q, Pan HF. (2010). "TGFB1*6A/9A polymorphism and cancer risk: a meta-analysis of 13,662 cases and 14,147 controls." Mol Biol Rep. **37**(7): 3227-3232.
- Liu, F., Hata, A., Baker, J.C., Doody, J., Carcamo, J., Harland, R.M., and Massagué, J. (1996). "A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator. ." Nature(381): 620-623.
- Lopez H. , S. R., Wiltbank M.C. (2005). "Reproductive Hormones and Follicular Growth During Development of One or Multiple Dominant Follicles in Cattle." Biology of reproduction **72**(4): 788 - 795.
- Massagué Joan (1998). "TGF-beta signal transduction." Annu. Rev. Biochem(67): 753 - 791.

- Massagué Joan, S. J. a. W. D. (2005). "Smad transcription factors." Genes & Development(19): 2783 - 2810.
- Mazerbourg S, H. A. (2006). "Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands." Hum Reprod Update **12** (4): 373 - 383.
- McGrath SA, E. A., Lee SJ. (1995). "Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9." Mol Endocrinol **9**(1): 131-136.
- McKnight AJ, S. D., Patterson CC, Sadlier D, Maxwell AP. (2007). "Resequencing of genes for transforming growth factor beta1 (TGFB1) type 1 and 2 receptors (TGFB1, TGFB2), and association analysis of variants with diabetic nephropathy." BMC Med Genet. **8**: 5.
- McNatty K, H. N., Whiting L, Reader K, Lun S, Western A, Heath D, Smith P, Moore L, Juengel J (2007). "The Effects of Immunizing Sheep with Different BMP15 or GDF9 Peptide Sequences on Ovarian Follicular Activity and Ovulation Rate." Biol Reprod **76**(4): 552 - 560.
- McNatty KP, H. D., Lundy T, Fidler AE, Quirke L, O'Connell A, Smith P, Groome N, Tisdall DJ (1999). "Control of early ovarian follicular development." Journal of Reproduction and Fertility. **54**: 3-16.

- McNatty KP, J. J., Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP (2005). "Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function." Reproduction(129): 473–480.
- McTavish KJ, N. D., Hoang YD, Shimasaki S. (2013). "Granulosa cell tumor mutant FOXL2C134W suppresses GDF-9 and activin A-induced follistatin transcription in primary granulosa cells." Mol Cell Endocrinol. **372**(1-2): 57 - 64.
- Moore RK, O. F., Shimasaki S. (2003). "Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells." J Biol Chem.(278): 304 - 310.
- Mottershead DG, H. C., Mueller TD, Stanton PG, Gilchrist RB, McNatty KP. (2013). "Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 (GDF9:BMP15) synergism and protein heterodimerization." Proc Natl Acad Sci U S A. **110**(25): 2257.
- Otsuka F, Y. S., Erickson GF & Shimasaki S (2001). "Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating Hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression." Journal of Biological Chemistry(276): 11387–11392.
- Otsuka F, Y. Z., Lee T, Yamamoto S, Erickson GF, Shimasaki S. (2000). "Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions." J Biol Chem.(275): 39523–39528.

- Park GT, M. M. (2002). "Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates Dlx3 through Smad1 and Smad4: alternative mode for Dlx3 induction in mouse keratinocytes." Nucleic Acids Res. **30**(2): 515 - 522.
- Raftery, L. A. a. S., D.J. (1999). "TGF- β family signal transduction in Drosophila development: From Mad to Smads. ." Dev. Biol.(210): 251-268.
- Rossetti R, D. P. E., Marozzi A, Bione S, Toniolo D, Grammatico P, Nelson LM, Beck-Peccoz P, Persani L. (2009). "BMP15 mutations associated with primary ovarian insufficiency cause a defective production of bioactive protein." Hum Mutat. **30**(5): 804 - 810.
- Savage C, D. P., Finelli AL, Townsend SR, Sun CY, Baird SE, Padgett RW (1996). "Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components." Proc. Natl. Acad. Sci. **93**(2): 790 - 794.
- Shi FT, C. A., Huang HF, Leung PC. (2011). "Growth differentiation factor 9 (GDF9) suppresses follistatin and follistatin-like 3 production in human granulosa-lutein cells." PLoS One. **6**(8): e22866.
- Silva J.V.R., Van Der Hurk R., Van Tol H.T.A.,Roelen B.A.J., Figueiredo J.R. (2004). "Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15), and BMP Receptors in the Ovaries of Goats." Molecular reproduction and Development **70**: 11 - 19.

- Simpson CM, S. P., Walton KL, Chan KL, Ritter LJ, Gilchrist RB, Harrison CA. (2012). "Activation of latent human GDF9 by a single residue change (Gly 391 Arg) in the mature domain." Endocrinology **153**(3): 1301-1310.
- Singh KK, R. K., Mishra A, Karck M, Haverich A, Schmidtke J, Arslan-Kirchner M. (2006). "TGFB1 and TGFB2 mutations in patients with features of Marfan syndrome and Loeys-Dietz syndrome." Hum Mutat. **27**(8): 770-777.
- Su YQ, W. X., O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM & Eppig JJ (2004). "Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop." Developmental Biology(276): 64–73.
- Su YQ, W. X., O'Brien MJ, Pendola FL, Denegre JN, Matzuk MM & Eppig JJ (2004). "Synergistic roles of BMP15 and GDF9 in the development and function of the oocyte-cumulus cell complex in mice: genetic evidence for an oocyte-granulosa cell regulatory loop. ." Developmental Biology **276** 64–73.
- Vendola K.A., Z. J., Adesanya O.O., Weil S.J., Bondy C.A. (1998). "Androgens Promote Oocyte Insulin-Like Growth Factor I Expression and Initiation of Follicle Development in the Primate Ovary." Biology of reproduction **101**(12): 2622–2629.
- Vitt U, M. S., Klein C, Hsueh A (2002). "Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9." Biol Reprod **67**(2): 473-480.

- Wang B, W. Q., Ni F, Zhou S, Wang J, Cao Y, Ma X. (2010). "Analyses of growth differentiation factor 9 (GDF9) and bone morphogenetic protein 15 (BMP15) mutation in Chinese women with premature ovarian failure." Clin Endocrinol (Oxf). **72**(1): 135-136.
- Webb R., G. P. C., Gong J.-G., Armstrong D. G. (2004). "Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences." Journal of Animal Science **82**(13): 63 - 74.
- Wong WK, M. J., Knowles JA. (2006). "Evolutionary conservation and mutational spectrum of BMP2 gene." Gene **368**: 84-93.
- Yan C, W. P., DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL (2001). "Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function." Molecular Endocrinology(15): 854–866.
- Zhao H1, Q. Y., Kovanci E, Simpson JL, Chen ZJ, Rajkovic A (2007). "Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure." Fertil Steril. **88**(5): 1474-1476.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Μεσσήνης ΙΕ (2005). Επιτομή: Μαιευτική & Γυναικολογία. MD communications. Αθήνα. Κεφ 1-4. Σελ 15-50
- Messinis ΙΕ (2006). Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. Hum Reprod Upd.12:557-571
- Σκούρτη-Σταθάκη, Κ. κ. Κ., Δημήτριος (2004). "Study of the TGF-β signaling pathway in vivo, using recombinant adenoviruses." E-Locus Ιδρυματικό Καταθετήριο Σχολή/Τμήμα--Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών Επιστημών--Τμήμα Βιολογίας--Μεταπτυχιακές εργασίες ειδίκευσης.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

- www.fineartamerica.com
- www.iasis-farsala.gr
- el.wikipedia.org
- www.eugonia.com
- www.nature.com
- humupd.oxfordjournals.org
- www.jibs.com
- www.rbej.com
- 2.bp.blogspot.com
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>