



**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

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BMP-7 ΚΑΙ ΤΟΥ ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΗ ΤΗΣ

ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ ΣΕ

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

ΣΑΜΑΡΑ ΑΘΑΝΑΣΙΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2013

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Επιβλέπων

Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Αναπληρωτής Καθηγητής Κωνσταντίνος Νταφόπουλος

Επίκουρη Καθηγήτρια Ασπασία Τσέζου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Ωογένεση.....	1
2. Στεροειδογένεση.....	5
2.1 Η Βιολογική δράση των στεροειδών ορμονών	7
3. Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού-β(Transforming growth factor- β ή TGF-β)	8
4. Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins ή (BMPs).....	9
4.1 Βιολογικός ρόλος των BMPs	9
4.2 Δομή των BMPs	10
4.3 Υποδοχείς των BMPs	11
4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω των BMPs.....	13
5. Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη -7 (BMP-7)	16
5.1 Υποδοχείς της BMP-7 και σηματοδότηση	16
5.2 Ο ρόλος της BMP-7 στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα	17
5.3 BMP-7 και στεροειδογένεση	20
5.4 Ρύθμιση του BMP συστήματος και της FSH σηματοδότησης σε κοκκώδη κύτταρα.....	20
6. Εξωκυττάρια ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs	22
6.1 Η Dan οικογένεια ανταγωνιστών	22
7. Gremlin: ο ανταγωνιστής της BMP-7	24
7.1 Βιολογικός ρόλος του Gremlin	24
7.2 Ρόλος του Gremlin στα γεννητικά κύτταρα θήλεως	25
8. Η ισομορφή 1 του Gremlin (Gremlin-1).....	26

8.1 Ο ρόλος του Gremlin-1 στην αναπαραγωγή	27
--	----

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. Σκοπός	28
10. Υλικά και Μέθοδοι.....	28
10.1 Τα κοκκώδη κύτταρα	28
10.2 Πειραματικό μέρος.....	29
11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	34

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

12. Παραγωγή της 17β-οιστραδιόλης στις καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων στις 24,48 και 72 ώρες	35
13. Παραγωγή της προγεστερόνης στις καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων στις 24,48 και 72 ώρες	39
14. Δράση του ανταγωνιστή της BMP-7 στην παραγωγή 17β-οιστραδιόλης & προγεστερόνης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV: ΣΥΖΥΤΗΣΗ

Συζήτηση	51
----------------	----

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

54

ABSTRACT

56

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

57

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ο προσδιορισμός της δράσης των BMPs στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων αποτελεί αντικείμενο έρευνας για ολόκληρη την επιστημονική κοινότητα. Με την παρούσα εργασία επιχειρείται να καθοριστεί ο ρόλος της BMP-7 στην στεροειδογένεση ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων καθώς και την δράση του ανταγωνιστή της.

Η συγκεκριμένη εργασία διεξάχθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Βιολογία της Αναπαραγωγής. Τα πειράματα υλοποιήθηκαν στο Εργαστήριο της Μαιευτικής και Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την εποπτεία του Καθηγητή της Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ. Ιωάννη Ε. Μεσσήνη.

Για την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως τον Καθηγητή Ιωάννη Ε. Μεσσήνη που χάρις την άρτια επιστημονική του γνώση, την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατέστη εφικτή η πραγματοποίηση της ερευνητικής εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Βιολόγο και υποψήφια Διδάκτορα Ελένη Κατσιάνη για την διαρκή υποστήριξη, την πολύτιμη βοήθεια και συνεργασία της στην διεξαγωγή των πειραμάτων. Τέλος, ευχαριστίες οφείλω και στην Βιοχημικό και υποψήφια Διδάκτορα Ερμιόνη Πράπα για την ουσιαστική βοήθεια και τις συμβουλές της στην πειραματική διαδικασία.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ωθήκες εμφανίζονται κατά την εμβρυική ανάπτυξη ως μία πάχυνση του επιθηλίου που καλύπτει τη γεννητική ταινία. Η λειτουργία τους είναι χρονικά περιορισμένη και σχετίζεται με την αναπαραγωγική περίοδο της γυναίκας. Ο ρόλος των ωθηκών είναι διπλός, επάγουν την ανάπτυξη των ωθυλακίων (ωθυλακιογένεση) αλλά είναι και ενδοκρινείς αδένες, παράγοντας τα στεροειδή της αναπαραγωγής (*Μεσσήνης 2005*).

Στην ενήλικη γυναίκα, η λειτουργία των ωθηκών είναι αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης του άξονα υποθάλαμος- υπόφυση- ωθήκες. Η υποθαλαμική εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροφινών (gonadotrophin releasing hormone ή GnRH) παράγεται από τα νευρικά κύτταρα του υποθαλάμου και καταλήγει μέσω των απολήξεων τους στο μίσχο της υπόφυσης. Τα γοναδοτρόφα κύτταρα του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, παράγουν την ορμόνη ωρίμανσης του ωθυλακίου ή θυλακιοτρόφο ορμόνη (Follicle stimulating hormone ή FSH) καθώς και την ωχρινοτρόφο ορμόνη (Luteinizing hormone ή LH). Οι γοναδοτροφίνες ασκούν τη δράση τους στις ωθήκες και καθορίζουν τη λειτουργία αυτών (*Yen et al., 1977; Richards et al., 2010; Μεσσήνης 2005*).

Ο άξονας υποθάλαμος – υπόφυση - ωθήκες αλληλορυθμίζεται μέσω θετικής ή αρνητικής ανάδρασης από τοπικά παραγόμενες ουσίες των ωθηκών, οι οποίες διακρίνονται σε ωθηκικά στεροειδή οιστραδιόλη (E2), προγεστερόνη (P4), ανδρογόνα καθώς και σε ωθηκικά μη-στεροειδή ινχιμπίνη (inhibin), ακτιβίνη (activin), φολλιστατίνη (follistatin) και το παράγοντας άμβλυσης των γοναδοτροφινών (GnSAF) (*Messinis 2006*).

1. Ωογένεση

Τα πρώτα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εμφανίζονται στο έμβρυο στο ραχιαίο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού και μετατοπίζονται στις γεννητικές

κορυφογραμμές (McKD *et al.*, 1953; Smitz & Cortvrindt 2002). Μέσω συνεχών μιτωτικών διαιρέσεων ο αριθμός τους αυξάνεται στα 6 εκατομμύρια κατά την 20^η εβδομάδα της κύησης. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα υφίστανται ατρησία με αποτέλεσμα ο αριθμός τους κατά την εφηβεία να περιορίζεται στις 3000-4000. Μετά την ολοκλήρωση των μιτωτικών διαιρέσεων ακολουθεί η διαδικασία της μείωσης, και ο σχηματισμός των πρώτων αρχέγονων ωοθυλακίων (Oktem & Urman 2010). Η δημιουργία των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων αποτελεί μια εξελικτικά συντηρημένη διαδικασία (Tingen *et al.*, 2009).

Τα αρχέγονα ωοθυλάκια εμφανίζονται στην ωοθήκη από την 15^η εβδομάδα της κύησης έως τον 6^ο μήνα μετά την γέννηση (Baker *et al.*, 1963; McGee *et al.*, 2000). Το ωοκύτταρο τους βρίσκεται στη φάση της διπλοταινίας στην πρόφαση I, περιβάλλεται από έναν στοίχο επίπεδων κυττάρων (προκοκκώδη κύτταρα), και έχει διάμετρο στα 30-60μm (Μεσσήνης 2005; Oktem & Urman 2010). Τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια, με κύριο χαρακτηριστικό την αλλαγή της μορφολογίας των κοκκωδών κυττάρων, τα οποία μετατρέπονται σε κυβοειδή, επιτρέποντας την αύξηση της διαμέτρου του ωοθυλακίου (>60μm) (εικόνα 1).

Το επόμενο στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων είναι η δημιουργία των δευτερογενών ωοθυλακίων (διάμετρο >120μm) τα οποία αποτελούνται από πολλούς στοίχους κοκκωδών κυττάρων. Τότε για πρώτη φορά εμφανίζεται η διαφανής ζώνη (Rankin *et al.*, 1996; Μεσσήνης 2005). Τα κοκκώδη κύτταρα με τις κυτταροπλασματικές τους προσεκβολές διαπερνούν τη διαφανή ζώνη και δημιουργούν ένα είδος επικοινωνίας με τη μεμβράνη του ωοκυττάρου, μέσω των οποίων μεταφέρονται πληροφορίες και τροφικά στοιχεία στο ωοκύτταρο (εικόνα 1).

Η περαιτέρω ωρίμανση του ωοθυλακίου οδηγεί στην δημιουργία άντρου, στο οποίο εναποθέτεται το ωοθυλακικό υγρό προερχόμενο από τα κοκκώδη κύτταρα. Τα κύτταρα θήκης δημιουργούν μία στιβάδα κυττάρων (έσω και έξω θήκη) περιμετρικά της κοκκώδους στιβάδας και ενδιάμεσα τους σχηματίζεται μία μεμβράνη που ονομάζεται βασική. Κατά την πορεία της ανάπτυξης του ωοθυλακίου διακρίνονται διάφορα επιμέρους στάδια μέχρι το ωοθυλάκιο να γίνει γραφιανό ή προωοθυλακιορρηκτικό (εικόνα 1) (Μεσσήνης 2005). Σύμφωνα με τις μελέτες του Gougeon 1986, το χρονικό διάστημα που

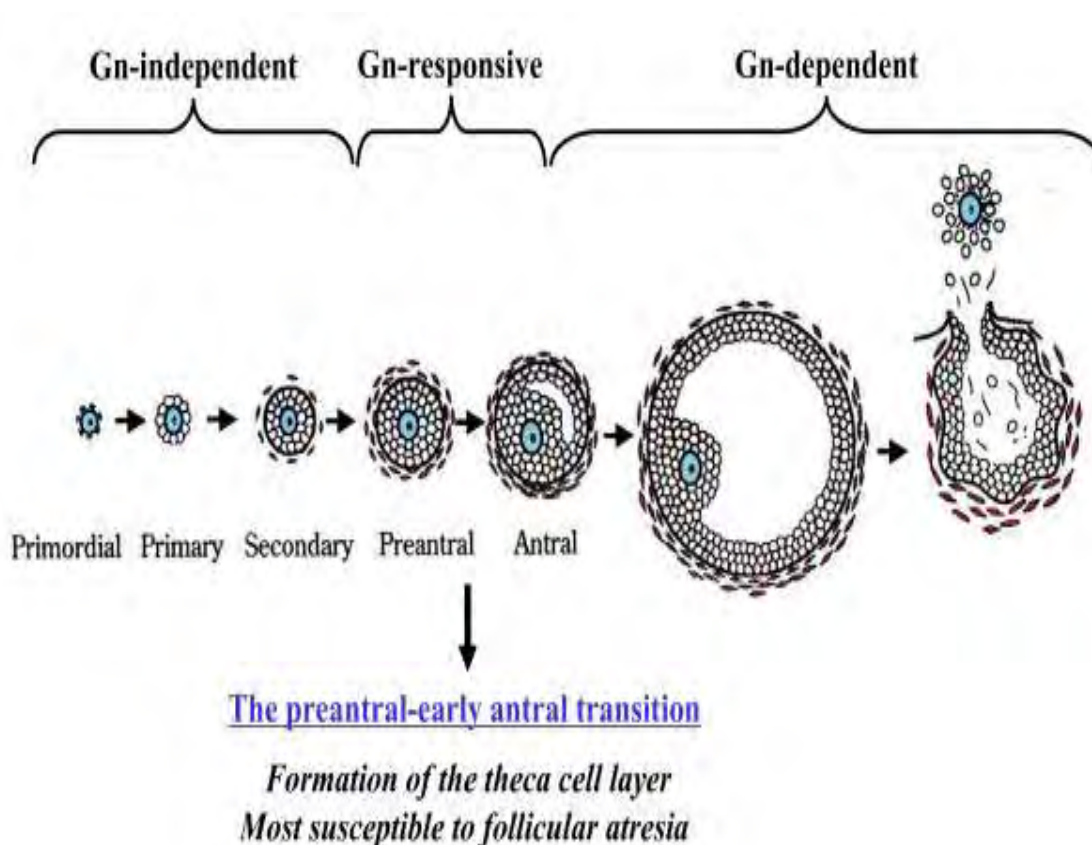
απαιτείται για την πλήρη ανάπτυξη του ωοθυλακίου υπολογίζεται περίπου στο ένα έτος.

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ωοθυλακίου (αρχέγονο έως δευτερογενές), δεν απαιτείται η παρουσία των γοναδοτροφινών. Μέχρι το κοιλοτικό στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων δεν είναι αναγκαία η ύπαρξη των γοναδοτροφινών, αλλά η παρουσία τους επάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων (σχήμα 1) (*Kumar et al., 1997*). Σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακική ανάπτυξη παίζουν παράγοντες, εκκρινόμενοι τόσο από την ωοθήκη ασκώντας παρακρινή δράση [ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού α (TGF- α), η αντιμυλλεριακή ορμόνη (AMH ή MIS), ο ινσουλινοεξαρτώμενος αυξητικός παράγοντας-1 (IGF-1), διάφορες νευροτροφίνες, η πρωτεΐνη του ογκογονιδίου του Wilms (WT1), η πρωτεΐνη του νευροβλαστώματος (pRb), το ογκογονίδιο *myc*, ο παράγοντας των βλαστοκυττάρων (SCF) και ο αυξητικός παράγοντας των νευρικών κυττάρων (NGF)] όσο και παράγοντες του ίδιου του ωοκυττάρου με αυτοκρινή δράση, (ο αναπτυξιακός παράγοντας διαφοροποίησης (GDF-9) και οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs)] (*Rizk et al., 2008*)

Η παρουσία των γοναδοτροφινών έχει κριθεί αναγκαία στα στάδια της ανάπτυξης που ακολουθούν, από το κοιλοτικό στάδιο μέχρι το προωοθυλακιόρρηκτικό (*Orisaka et al., 2009*). Οι γοναδοτροφίνες συμβάλλουν στη συσσώρευση, στην αύξηση του όγκου του ωοθυλακικού υγρού, στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων καθώς και στη δημιουργία του ωοφόρου δίσκου και της ακτινωτής στεφάνου. Στα στάδια αυτά στρατολογούνται τα ωοθυλάκια που θα ωριμάσουν ενώ τα υπόλοιπα οδηγούνται σε ατρησία. Από τα ωοθυλάκια που θα στρατολογηθούν μόνο ένα το κατάλληλο που θα επιλεγεί για ωοθυλακιόρρηξία και θα αποτελέσει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο (εικόνα 1) (*Μεσσήνης 2005*).

Εφ' όσον ολοκληρωθεί η διαδικασία της επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου ακολουθεί η διαδικασία της ωοθυλακιόρρηξίας, κατά την οποία το ωοθυλάκιο απελευθερώνεται έπειτα από την κατάλληλη επίδραση της LH (αιχμή της LH). Η επόμενη διαδικασία που λαμβάνει χώρα είναι η ωχρινοποίηση του ραγέντος ωοθυλακίου. Η ωχρινοποίηση του ξεκινάει σταδιακά πριν την ωοθυλακιόρρηξία και συνεχίζεται με ανερχόμενη πορεία.

Στη φάση αυτή λόγω της επίδρασης της LH, τα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου μετατρέπονται σε μεγάλα ωχρινικά κύτταρα ενώ τα κύτταρα της έσω θήκης σε μικρά ωχρινικά κύτταρα. Ταυτόχρονα, παρατηρείται η αύξηση της στάθμης της προγεστερόνης καθώς συνεχίζεται και η παραγωγή της οιστραδιόλης (Μεσσήνης 2005).



Εικόνα 1: Τα αναπτυξιακά στάδια του ωοθυλακίου και η επίδραση των γοναδοτροφινών (Orisaka et al, 2009)

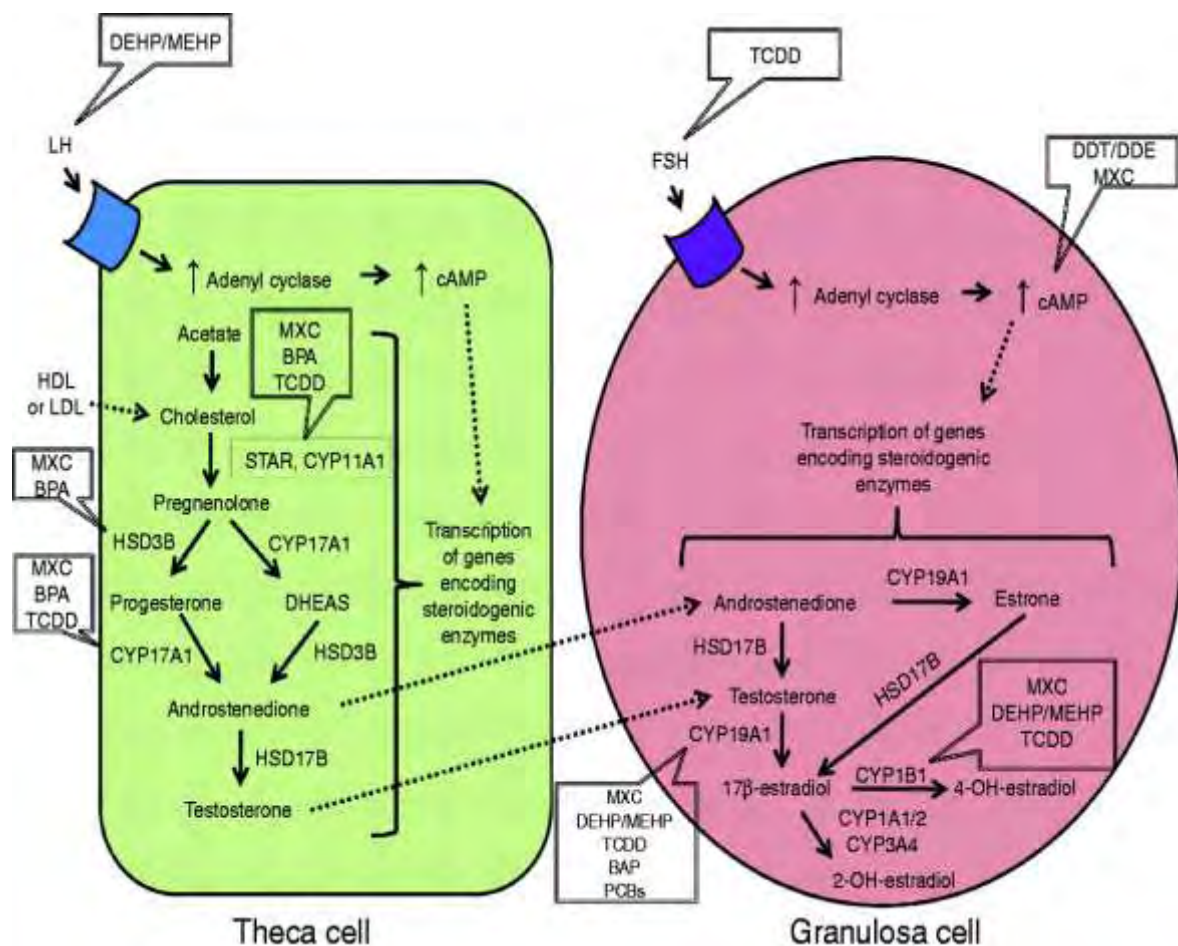
2. Στεροειδογένεση

Οι στεροειδείς ορμόνες που παράγονται από την ωοθήκη είναι η οιστραδιόλη, στις εκκρινόμενες μορφές οιστριόλη και οιστρόνη, τα ανδρογόνα και η προγεστερόνη. Αυτές παράγονται έπειτα από την αλληλεπίδραση των γοναδοτροφινών της υπόφυσης (FSH και LH) με τους αντίστοιχους υποδοχείς τους στα κοκκώδη κύτταρα και στα κύτταρα θήκης.

Σύμφωνα με θεωρία των «δύο κυττάρων και των δύο γοναδοτροφινών» η LH συνδέεται στον υποδοχέα της που εντοπίζεται στα κύτταρα θήκης, και επάγει την παραγωγή των ανδρογόνων (ανδροστενδιόνη και τεστοστερόνη) (*Craig et al., 2011*). Αυτά, διαχέονται στην κοκκώδη στιβάδα, όπου λόγω της διέγερσης τους από την FSH παράγουν αυξημένα ποσά αρωματάσης, η οποία αρωματοποιεί τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα (οιστρόνη, 17β-οιστραδιόλη) (*Μεσσήνης 2005; Craig et al., 2011*).

Ειδικότερα, το πρόδρομο μόριο της στεροειδογένεσης είναι η χοληστερόλη η οποία προέρχεται είτε από το οξικό οξύ είτε από τις χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (low-density lipoproteins ή LDLs) του πλάσματος (*Craig et al., 2011; Miller et al., 2011*). Η μετατόπιση της χοληστερόλης από την εξωτερική στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη επιτυγχάνεται με την οξεία στεροειδογενετική ρυθμιστική πρωτεΐνη (steroidogenic acute regulatory protein ή StAR) (*Strauss et al., 1999; Stocco 2001*). Εν συνεχεία, η επίδραση της LH στα κύτταρα θήκης, μέσω της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cyclic adenosine monophosphate ή cAMP) , διεγείρει την έκφραση του ενζύμου δεσμολάση της χοληστερόλης (cholesterol side-chain cleavage enzyme ή P450_{scc}) που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP11A. Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να διασπάει την πλευρική αλυσίδα της χοληστερόλης και να την μετατρέπει σε πρεγνεναλόνη (*Miller 1988*). Η πρεγνεναλόνη έχει την ειδικότητα να διαχέεται από τα μιτοχόνδρια στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο, όπου ακολουθώντας δύο επιμέρους μονοπάτια μετατρέπεται σε ανδροστενδιόνη . Η τελευταία μπορεί να ακολουθήσει δύο πορείες: α) να διαχυθεί στα κοκκώδη κύτταρα, όπου με την δράση της αρωματάσης του κυτοχρώματος 450 (aromatase cytochrom 450 ή P450_{arom}) που κωδικοποιείται από το γονίδιο CYP19A1 να μετατραπεί σε οιστρόνη ή με τη

δράση της 17β υδροξυστεροειδικής δεϋδρογενάσης (17β-HSD) να μετατραπεί σε τεστοστερόνη και τελικά σε 17β-οιστραδιόλη β) να μετατραπεί σε τεστοστερόνη με τη δράση του ενζύμου (17β- HSD) και έπειτα να διαχυθεί στα κοκκώδη κύτταρα όπου εκεί με τη δράση του συμπλέγματος της P450arom να μετατραπεί σε 17β- οιστραδιόλη (Miller 1988; Hanukoglu 1992; Penning 1997). Σε περιπτώσεις υπέρμετρης παραγωγής των οιστρογόνων, οι ίδιες οι ωθήκες επιστρατεύουν ειδικά ένζυμα για την διάσπαση τους, ώστε να αποφευχθούν οι βλάβες των ιστών. Συνεπώς, η οιστραδιόλη μετατρέπεται τόσο σε 2-υδροξυοιστραδιόλη από το CYP1A1/2 και από το CYP3A4 όσο και σε 4-υδροξυοιστραδιόλη από το CYP1B1(εικόνα 2) (Hayes et al., 1996; Tsuchiya et al., 2005).



Εικόνα 2: Η στεροειδογένεση στην ωθήκη (Craig et al, 2011).

2.1 Η βιολογική δράση των στεροειδών ορμονών

Οι στεροειδείς ορμόνες (οιστρογόνα και προγεστερόνη) δεν ασκούν την δράση τους μόνο στην ωοθήκη αλλά και σε άλλα όργανα του γεννητικού συστήματος όπως στους ωαγωγούς, στη μήτρα (ενδομήτριο και μυομήτριο), στον τράχηλο, στον κόλπο, στους μαστούς αλλά και στο ΚΝΣ (υπόφυση, υποθάλαμος) εξασφαλίζοντας την διατήρηση της αναπαραγωγής (*Drummond AE, 2006*). Εκτός του γεννητικού συστήματος σημαντική είναι και η δράση τους στα οστά, στο μεταβολισμό του λίπους, των πρωτεϊνών, των υδατανθράκων και στη διατήρηση της ισορροπίας ύδατος- ηλεκτρολυτών (*Jamnongjit & Hammes 2006*).

3. Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming growth factor- β ήTGF-β)

Ο TGF-β ανήκει σε μία υπεροικογένεια αυξητικών παραγόντων που ταυτοποιήθηκαν πριν από τρεις δεκαετίες. Οι πρώτες αναφορές κάνουν λόγο για την ιδιότητα αυτών των αυξητικών παραγόντων να επάγουν την αύξηση του νεφρού των ενήλικων ποντικών (*Roberts et al., 1981*)

Τα μέλη της υπεροικογένειας των TGF-β λαμβάνουν μέρος σε πολλαπλές λειτουργίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των διαφόρων ειδών (*Esch et al., 1987*). Καθοριστικός είναι ο ρόλος τους τόσο στην εμβρυική όσο και στην ενήλικη ζωή, εφ' όσον συμμετέχουν στην ανάπτυξη, την συντήρηση και την αναγέννηση των διαφόρων ιστών και οργάνων (*Esch et al., 1987; Hogan 1996; Massague 1998; Reddi 1998; Reddi 2005*). Οι TGF-β είναι αναγκαίοι για την ανάπτυξη των περισσότερων ειδών και σχετίζονται με την πολυπλοκότητα των περισσότερων ασπόνδυλων και σπονδυλωτών (*Savage-Dunn 2001; Miyazawa et al., 2002; Parker et al., 2004*).

Σε αντίθεση με τους πολλαπλούς ρόλους των μελών της υπεροικογένειας του TGF-β, η δομή τους παραμένει εξελικτικά συντηρημένη. Γι' αυτό το λόγο η ταξινόμηση τους, βασίζεται στον βαθμό διατήρησης της ακολουθίας στο καρβοξυτελικό τμήμα της περιοχής σηματοδότησης (*Lyons et al., 1991; Kingsley 1994*).

Με βάση το παραπάνω κριτήριο ταξινόμησης, τα μέλη του TGF-β διακρίνονται στις εξής υποοικογένειες: στην κλασική υποοικογένεια των TGF-β η οποία περιλαμβάνει αποκλειστικά τις ισομορφές του TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3). Στην εκτενέστερη υποοικογένεια των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών (BMPs), η οποία αποτελείται από 20 μέλη. Στην υποοικογένεια των αυξητικών παραγόντων διαφοροποίησης (GDFs), που ανήκουν τουλάχιστον 9 μέλη. Στην υποοικογένεια της ακτιβίνης/ανασταλτίνης με 5 μέλη να ταξινομούνται σε αυτή την υποομάδα και στην υποοικογένεια του νευροτροφικού παράγοντα των νευρογλοιακών κυττάρων (Glial cell –Derived Neurotrophic Factor ή GDNF) με τρία μέλη. Συμπληρωματικά, στην

υπεροικογένεια των TGF-β ανήκουν και η AMH ή MIS καθώς και ο nodal (*Knight et al., 2006*).

4.Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins ή BMPs)

Οι BMPs αποτελούν την ομοδιμερή υποοικογένεια των TGF-β παραγόντων. Στην υποοικογένεια τους ανήκουν τα περισσότερα μέλη των κυτοκινών, οι οποίες υπολογίζονται περίπου 20 στον αριθμό (*Knight et al., 2006;Gazzerro et al., 2006*). Οι BMPs για πρώτη φορά ανιχνεύθηκαν πριν από πέντε δεκαετίες από τον Urist και συν, ως τα ενεργά συστατικά του απομεταλλωμένου οστού και του εκχυλίσματος του, που είναι ικανά να επάγουν τον σχηματισμό οστού σε έκτοπες περιοχές (*Urist 1965; Urist et al., 1973, Urist et al., 1979*). Δύο δεκαετίες αργότερα οι επιστήμονες απομόνωσαν και κλωνοποίησαν το DNA αυτών των πρωτεϊνών (*Wozney et al., 1988*).

Τα επόμενα χρόνια πραγματοποιήθηκαν πολλές μελέτες σε πληθώρα οργανισμών, με σκοπό να προσδιοριστεί ο μηχανισμός δράσης και η λειτουργία των BMPs . Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών κατέληξαν στο συμπέρασμα, ότι στα περισσότερα είδη το σύστημα των BMPs αποτελείται από τα ίδια ρυθμιστικά μόρια που παρέμειναν ανέπαφα κατά την εξέλιξη. Χαρακτηριστικές είναι οι ομοιότητες των οστικών μορφογενετικών παραγόντων που έχουν εντοπιστεί στις διάφορες εξελικτικές βαθμίδες όπως στα κοράλλια, στα εχινόδερμα, στα πτηνά, στα σκουλήκια, στα βατράχια, στα κοτόπουλα, στα ποντίκια καθώς και στον άνθρωπο (*Kingsley 1994*).

4.1 Βιολογικός ρόλος των BMPs

Ο ρόλος των BMPs είναι εμφανής στην αναπτυξιακή διαδικασία διάφορων ιστών και οργάνων (*Merino et al., 1999*). Με την δράση τους ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την χημειοταξία και την απόπτωση σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους όπως στα επιθηλιακά, μεσεγχυματικά, αιμοποιητικά και νευρικά κύτταρα (*Zeisberg et al., 2008*). Οι BMPs μπορεί να

επιδρούν είτε άμεσα στα κύτταρα στόχους είτε έμμεσα σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία (*Macias et al., 1997*).

Καθοριστικός είναι ο ρόλος των BMPs στα οστά, στον χόνδρο, στα δόντια, στους νεφρούς, στο δέρμα, στα μαλλιά, στους μυς, στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού και νευρικού συστήματος, στον μεταβολισμό του σιδήρου και στην αγγειακή ομοίωση (*Derynck et al., 2008*). Επίσης τα τελευταία χρόνια διερευνάται ποιος είναι ο ρόλος των BMPs στο αναπαραγωγικό σύστημα και κυρίως στις γονάδες, και αποτελεί ένα νέο και αναπτυσσόμενο ερευνητικό πεδίο (*Dong et al., 1996; Zhao et al., 1996; Elvin et al., 1999; Hayashi et al., 1999; Shimasaki et al., 1999; Galloway et al., 2000; Otsuka et al., 2000; Mulsant et al., 2001; Otsuka et al., 2001; Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001*).

4.2 Δομή των BMPs

Η δομή των BMPs είναι όμοια με αυτή των υπολοίπων μελών της υπερικογένειας των TGF- β (*Lin et al., 2003*). Η αρχική μορφή της λειτουργικής πρωτεΐνης των BMPs πριν εκκριθεί από τα κύτταρα είναι μία μεγάλη προ-πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από ένα μοναδικό σηματοδοτικό πεπτιδίο (N- τελικό άκρο), την προ-περιοχή και την ώριμη περιοχή (C- τελικό άκρο).

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

Η ώριμη μορφή των BMPs περιέχει επτά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Τα έξι από αυτά συμμετέχουν στον σχηματισμό του κόμπου κυστίνης μιας μοναδικής τρισδιάστατης δομής για το μόριο. Το ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης που δεν συμμετέχει στο σχηματισμό του κόμπου κυστίνης δημιουργεί μία μοναδική δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των δύο υπομονάδων για τον σχηματισμό του ομοδιμερούς (*Wang et al.,*

1990;Israel et al., 1992;Schlunegger et al., 1992;Jones et al., 1994 Griffith et al., 1996;Vitt et al., 2001). Σε κάποιες περιπτώσεις που συνεκφράζονται πολλά διαφορετικά μέλη των BMPs μπορεί να δημιουργηθούν ετεροδιμερή αντί των ομοδιμερών που προαναφέρθηκαν. Αυτά έχουν το χαρακτηριστικό να συνενώνονται με μη ομοιοπολικό δεσμό και έχουν υψηλότερη βιολογική δραστικότητα απ' ό τι τα αντίστοιχα ομοδιμερή (Aono et al.,1995;Israel et al.,1996; Kusomoto et al., 1997;Suzuki et al.,1997) . Οι BMPs αποκτούν την ιδιότητα να είναι ανθεκτικές στη θερμότητα, τη μετουσίωση και στις ακραίες τιμές pH λόγω της ύπαρξης πολλών συντηρημένων καταλοίπων κυστεϊνών (Wozney et al., 1998).

Τέλος, χαρακτηριστικό των θηλαστικών είναι ότι η δομή των BMPs είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη καθ' όλη την εξέλιξη. Μελέτες που συνέκριναν τις ώριμες περιοχές των BMPs στον άνθρωπο και στα ποντίκια αποκάλυψαν ότι εμφάνιζαν ομολογία της τάξης του 90 με 100%. Βασιζόμενοι στην ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων, η υποοικογένεια των BMPs υποδιαιρείται σε επιμέρους υποομάδες. Οι υποομάδες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι εξής: BMP-2/-4, BMP-3, BMP-7/OP-1, BMP-9/BMP-10, BMP-11/GDF-8, BMP-12/BMP-13/BMP-14 και BMP-15 (Reddi et al., 1998).

4.3 Υποδοχείς των BMPs.

Οι BMPs για να δράσουν προσδένονται σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Γενικά οι υποδοχείς αποτελούνται: από μία εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης στην οποία εξειδικευμένα θα προσδεθεί το μόριο-προσδέτης, μία μοναδική διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή με ειδικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης.

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

Στους υποδοχείς τύπου I, ανήκουν επτά είδη υποδοχέων (activin receptor-like kinases 1-7 (ALK1-7)). Οι υποδοχείς αυτοί βάση της δομής και της λειτουργίας τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: την BMPR-I ομάδα που

περιέχει ALK-3(BMPR-IA) και ALK-6(BMPR-IB), την ALK-1 ομάδα που περιέχει την ALK-1 και ALK-2 και την ΤβR-I ομάδα που περιέχει την ALK-4/ActR-IB, την ALK-5/ΤβR-I και την ALK-7 (*Kawabata et al., 1998*).

Οι υποδοχείς τύπου II κατηγοριοποιούνται σε πέντε επιμέρους υποδοχείς: οι BMPR-II που είναι ειδικοί για τις BMP, οι ActR-IIA και ActR-IIB οι οποίες είναι ειδικές για τις ακτιβίνες, τις μυσστατίνες και κάποιες BMP, οι AMHR-II με ειδικότητα για την αντιμυλλέρια ορμόνη και οι υποδοχείς TGFβ-II που είναι ειδικοί για τον TGFβ (*ten Dijke et al., 1993; Yu et al., 2005;*).

Οι υποδοχείς των BMPs κατά την πρόσδεση των πρωτεϊνών δημιουργούν ετεροδιμερή σύμπλοκα. Ο σχηματισμός αυτός οφείλεται στο ότι οι BMPs, ως μόρια προσδέτες, εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια για τα ετεροδιμερή έναντι των μονομερών συμπλόκων (*ten Dijke et al., 1994a,b*).

Αμφιλεγόμενο ζήτημα αποτελεί για την επιστημονική κοινότητα το γενικό πρότυπο του ολιγομερισμού των BMPs υποδοχέων. Δυο θεωρίες υφίστανται σε ότι αφορά το πρότυπο σχηματισμού του συμπλέγματος. Η πρώτη υποστηρίζει ότι είναι όμοιο με αυτό της υπεροικογένειας των TGF-β ενώ η δεύτερη ακολουθεί τελείως διαφορετική πορεία (πρότυπο) ολιγομερισμού. Σύμφωνα με την πρώτη άποψη, το μόριο-προσδέτης συνδέεται με τον τύπου II υποδοχέα και μετά ενεργοποιεί τον τύπου I ενώ κατά τη δεύτερη θεωρία πρώτα το μόριο-προσδέτης συνδέεται στον τύπου I και μετά ενεργοποιεί τον τύπου II (*Liu et al., 1995; Macias-Silva et al., 1998; Nohe et al., 2002; Moore et al., 2003*). Μη λαμβάνοντας υπόψιν τον τρόπο ολιγομερισμού, το μόριο-προσδέτης αλληλεπιδρά με μεγάλη ειδικότητα σε ολόκληρο το σύμπλεγμα ώστε να επάγει την περαιτέρω ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού (*Kawabata et al., 1998; Massague et al., 1998*).

Ο ολιγομερισμός οδηγεί στην φωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του τύπου II (τύπου I) υποδοχέα που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την περιοχή κινάσης του τύπου I (τύπου II) υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση γίνεται στην ενδοκυττάρια GS παραμεμβρανική περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (*Wrana et al., 1992; Franzen et al., 1993*). Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος οδηγεί στην μετέπειτα μεταφορά του σήματος στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ανάλογα με την κυτταρική σειρά, το «κανονικό» ή το «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs (*Nohe et al., 2002*).

4.4 Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω των BMPs.

Κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των BMPs, ενεργοποιούνται δύο ειδών σηματοδοτικά μονοπάτια: το «κανονικό» που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών και το «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του BMP-μιτογόνου ενεργοποιητή των πρωτεϊνικών κινασών (BMP-mitogen-activated protein kinase ή BMP-MAPK) (*Heldin et al., 1997; Massague 1998; Itoh et al., 2000; von Bubnoff et al., 2001*).

α) BMP- Smad σηματοδοτικό μονοπάτι «κανονικό»:

Με την πρόσδεση του BMP στον υποδοχέα και τη δημιουργία του ετεροδιμερούς συμπλέγματος των BMPRs, φωσφορυλιώνονται οι περιοχές του υποδοχέα τύπου II (τύπου I) που είναι πλούσιες σε γλυκίνη/σερίνη. Η φωσφορυλίωση αυτών των περιοχών οδηγεί στη μετέπειτα ενεργοποίηση-φωσφορυλίωση ενός καταρράκτη σηματοδοτικών πρωτεϊνών της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών.

Οι πρώτες Smad που ενεργοποιούνται είναι οι R-Smad πρωτεΐνες (receptor-activated Smad), στις οποίες περιέχονται με σειρά ενεργοποίησης οι Smad1, Smad5 και Smad8. Αυτές οι Smad πρωτεΐνες ενεργοποιούνται και με τη σειρά τους δημιουργούν σύμπλοκο με την Smad4 πρωτεΐνη (common-partner Smad ή Co-Smad πρωτεΐνη) (*Moustakas et al., 2001*).

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

Η ενδοκυττάρια ρύθμιση των μεταγραφικών παραγόντων γίνεται με τους συνενεργοποιητές και με τους συναναστολείς, οι οποίοι ρυθμίζουν τους

μεταγραφικούς παράγοντες θετικά ή αρνητικά αντίστοιχα . Η ρύθμιση γίνεται σύμφωνα με τον τύπο του συνεργοποιητή ή του συναναστολέα ο οποίος αντιδρά με την MH1 ή MH2 περιοχή του συμπλόκου (*Itoh et al., 2000; Miyazono et al., 2001; ten Dijke et al., 2002*). Κάποιοι γνωστοί συνεργοποιητές που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι p300, OAZ, SMIF ενώ κάποιοι συναναστολείς είναι οι Ski πρωτεΐνες, SNIP1 και η πρωτεΐνη Tob. Συνεπώς, το σύμπλοκο πρωτεΐνης-υποδοχέα και οι συμπαράγοντες του κυττάρου επάγουν την θετική ή αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων (*Nakashima et al., 1999; Pearson et al., 1999; Hata et al., 2000; Kim et al., 2000; Wang et al., 2000; Yoshida et al., 2000; Bai et al., 2002*).

Επιπρόσθετα η ρύθμιση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών επιτυγχάνεται και μέσω των ειδικών Smad πρωτεϊνών, οι οποίες προσδένονται στα σηματοδοτικά μόρια της οικογένειας των Smad και αναστέλλουν την φωσφορυλίωση τους. Οι Smad6 και Smad7 πρωτεΐνες ανταγωνίζονται την φωσφορυλίωση των Smad1, Smad5 και Smad8 μέσω δράσης στον υποδοχέα τύπου II και έχουν αναγνωρισθεί ως Smad αναστολείς (inhibitory Smad ή I-Smad). Επίσης, η Smad6 αναστέλλει την πρόσδεση της Smad4 στην Smad1 με αποτέλεσμα να μην δημιουργείται το σύμπλοκο R-Smad/Co-Smad (εικόνα 3) (*Negarajan et al., 1999; Ishida et al., 2000*).

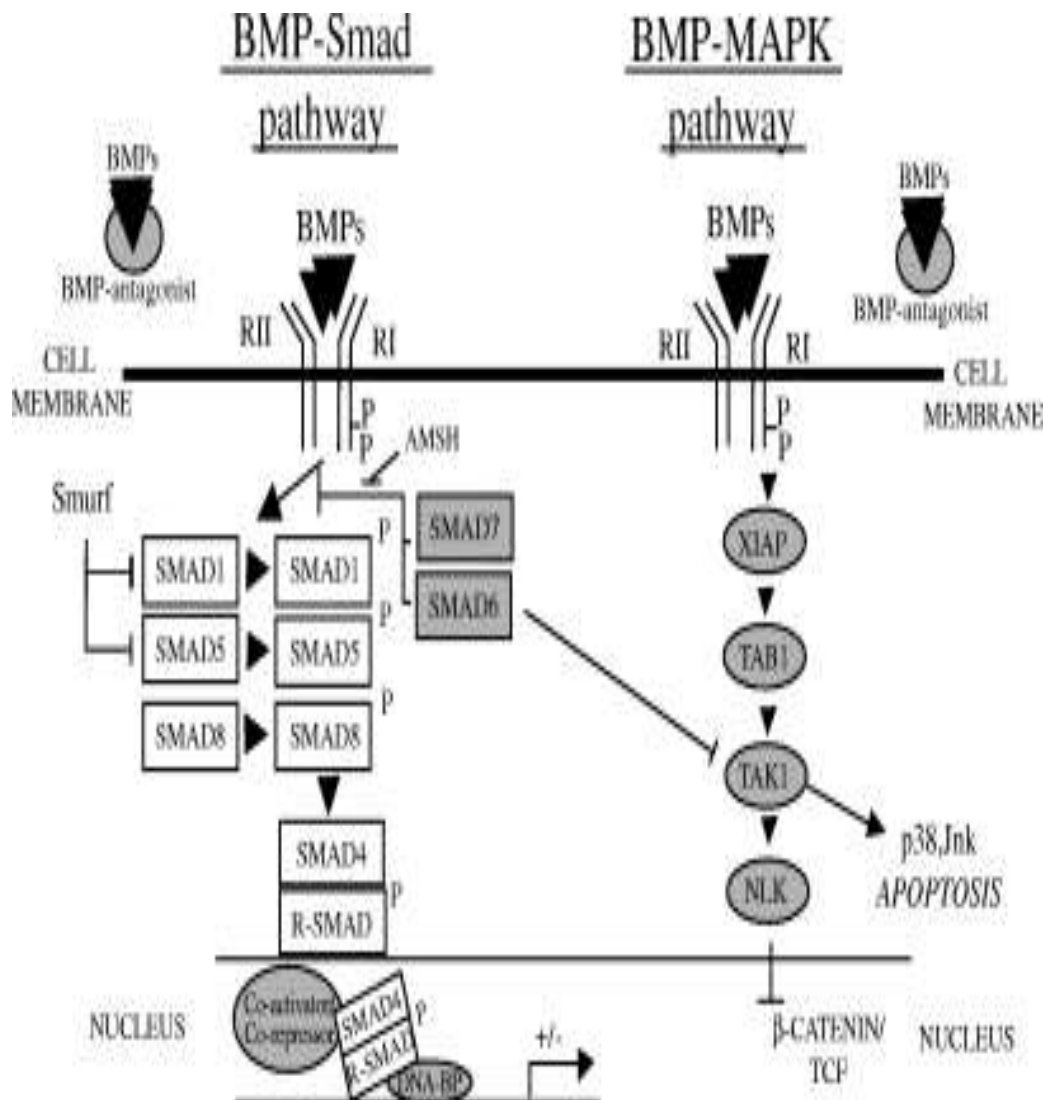
β) BMP-MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι «μη κανονικό»:

Η ενεργοποίηση του συμπλέγματος του υποδοχέα γίνεται με ταυτόσημο τρόπο με το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών. Συνεπώς, αφού ενεργοποιηθεί το σύμπλεγμα από το μόριο-προσδέτη, το σήμα μεταφέρεται στην ενδοκυττάρια πρωτεΐνη μετασχηματισμού XIAP, η οποία συνδέει τον BMP υποδοχέα με την πρωτεΐνη TAB1. Αυτήν με την σειρά της, θα ενεργοποιήσει την ακόλουθη πρωτεΐνη TAK1 (*Yamaguchi et al., 1999*).

Η TAK1 εν συνεχεία δύναται να ενεργοποιήσει δύο επιμέρους σηματοδοτικά μονοπάτια ανάλογα με το γονίδιο που απαιτείται να ενεργοποιηθεί κάθε φορά στο κύτταρο. Το ένα μονοπάτι ενεργοποιείται μέσω του NLK μορίου (Nemo-like kinase) το οποίο αποτελεί μέλος των MAP κινασών. Αυτό αναστέλλει την φωσφορυλίωση των TCF-/Lef-1 μεταγραφικών παραγόντων, οι οποίοι με τη σειρά τους θα αναστείλουν την μεταγραφή του Wnt/β-catenin γονιδίου, που συμμετέχει στην αναπτυξιακή διαδικασία και στην

καρκινογένεση (Ishitani *et al.*, 1999). Ακόμη, το δεύτερο σηματοδοτικό μονοπάτι που μπορεί να ενεργοποιηθεί είναι αυτό των του p38 μιτογόνου ενεργοποιητή των κινασών με το Erk1/2 και JNK μονοπάτι, που επάγει την απόπτωση στα κύτταρα.

Τέλος, το συγκεκριμένο σηματοδοτικό μονοπάτι μπορεί να ανασταλεί με ειδικές πρωτεΐνες της οικογένειας των Smad. Σε μελέτες που έχουν γίνει έχει αποδειχθεί ότι η Smad6 αναστέλλει την δράση του TAK1 μορίου (εικόνα 3) (Yamaguchi *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000).



Εικόνα 3: Τα σηματοδοτικά μονοπάτια της BMP (von Bubnoff & Cho 2001)

5 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 7 (BMP-7)

Η BMP-7 [πρωτεΐνη οστεογένεσης-1 (OP-1) ή (DVR-7)] είναι μία ομοδιμερής πρωτεΐνη μέλος της υπερικογενείας των TGF-β. Για πρώτη φορά ταυτοποιήθηκε περίπου πριν από δύο δεκαετίες, ως ο ισχυρός παράγοντας οστεογένεσης που μπορεί να απομονωθεί από το οστό βοοειδών (*Celeste et al., 1990; Ozkaynak et al., 1990*).

Σε πειράματα *in situ* υβριδισμού κατά την εμβρυογένεση ποντικών, ανιχνεύθηκε το mRNA της οστικής μορφογενετικής πρωτεΐνης-7 σε πολλαπλές περιοχές τους (*Lyons et al., 1995*). Η BMP-7 δεν αποτελεί μόνο παράγοντα ανάπτυξης του οστού αλλά συμμετέχει και στην διαδικασία της εμβρυογένεσης. Επιδρά στη δημιουργία της νωτοχορδής κατά την γαστριδίωση καθώς και σε μετέπειτα στάδια της οργανογένεσης της καρδιάς, του εντέρου, των νεφρών και των ματιών (*Dudley et al., 1995*).

Επιπλέον, σημαντικός είναι ο ρόλος της BMP-7 στους ενήλικους οργανισμούς. Υψηλή έκφραση της πρωτεΐνης έχει παρατηρηθεί στα νεφρικά σωληνάρια και μικρότερη ανιχνεύεται στην ωοθήκη, στο ενδομήτριο μη εγκύων και στις πλάκες ανάπτυξης των χόνδρων (*Vukicevic et al., 1994; Simon et al., 1999*).

Ο πλήρης προσδιορισμός της δομής της BMP-7 καθώς και των άλλων BMPs θα ανοίξει δρόμους για τη θεραπεία ασθενειών που οφείλονται σε αυτές τις πρωτεΐνες (*Griffith et al., 1996*).

5.1 Υποδοχείς της BMP-7 και Σηματοδότηση

Η BMP-7 προσδέεται με υψηλότερη ειδικότητα σε κάποιους καθορισμένους υποδοχείς τύπου I και τύπου II. Ειδικότερα προσδέεται στον ActRII και στον BMPRII τύπου II υποδοχέα και στους ALK2, ALK3 ή ALK6 υποδοχείς τύπου I (*Yamashita et al., 1995; Ebisawa et al., 1999; Aoki et al., 2001*).

Κατά τον ολιγομερισμό του υποδοχέα της οστικής BMP-7, το μόριο-προσδέτης συνδέεται στον τύπου II υποδοχέα και επάγει την στρατολόγηση

του τύπου I υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του μεταφέρει το σήμα στα υπόλοιπα σηματοδοτικά μόρια.

Μελέτες απέδειξαν ότι έχοντας τον ALK2 ως υποδοχέα τύπου I, επάγεται το σηματοδοτικό μονοπάτι των Smad1/5/8 (Wang SN et al., 2001). Άλλες αναφορές υποδεικνύουν ότι με τους υπόλοιπους τύπους του υποδοχέα I μπορεί να ενεργοποιηθεί και ένα επιπρόσθετο σηματοδοτικό μονοπάτι αυτό των Erk1/2 (Hartsough et al., 1997; Wang et al., 2001).

5.2 Ο ρόλος της BMP-7 στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.

α) Ρόλος της BMP-7 στην ωοθήκη:

Πολλές είναι οι μελέτες σε πειραματόζωα (κοτόπουλα, αρουραίους, πρόβατα, βοοειδή) που πραγματοποιήθηκαν τα τελευταία χρόνια, σχετικά με τον ρόλο των μορφογενετικών πρωτεϊνών στο θήλυ αναπαραγωγικό σύστημα (Onagbesan et al., 2003; Glister et al., 2005; Juengel et al., 2006).

Η ωοθήκη των ποντικών αποτέλεσε το κύριο μοντέλο μελέτης της επίδρασης των BMPs στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου. Δεδομένο αποτελεί πλέον η παρουσία της BMP-7 στο στάδιο μετατροπής του αρχέγονου ωοθυλακίου σε πρωτογενές. Ο ρόλος της σε αυτό το στάδιο είναι η επαγρύπνηση των αρχέγονων ωοθυλακίων. Πειράματα σε αρουραίους με *in vivo* έγχυση ανασυνδυασμένης BMP-7, ανέδειξαν το ρόλο της στην ενεργοποίηση των αρχέγονων ωοθυλακίων και στην ενίσχυση της ωοθυλακικής επιβίωσης. Το αποτέλεσμα αυτό ενίσχυσε το συμπέρασμα ότι η BMP-7 μειώνει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων και αυξάνει τον αριθμό των πρωτογενών, των προκοιλοτικών και στο κοιλοτικών ωοθυλακίων (Lee et al., 2001).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η δράση της BMP-7 και των TGF- β στο στάδιο μετατροπής του πρωτογενούς ωοθυλακίου σε δευτερογενές ωοθυλάκιο. Τα μόρια αυτά ταυτοποιήθηκαν σε αυτό το στάδιο, τη χρονική στιγμή που άρχιζαν να εμφανίζονται τα πρώτα κύτταρα θήκης (Erickson & Shimasaki 2003).

Κατά το προ-κοιλοτικό ή κοιλοτικό στάδιο των ωοθυλακίων όπου γίνεται η πλήρης ανάπτυξη των στιβάδων των κυττάρων της θήκης, έχει

αποδειχθεί ότι η BMP-7 εκφράζεται από τα κύτταρα της έσω θήκης τα οποία έρχονται σε επαφή με την βασική στιβάδα του ωοθυλακίου (*Erickson & Shimasaki 2003*). Εφ' όσον ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του κοιλοτικού ωοθυλακίου, η BMP-7 ασκεί τόσο αυτοκρινή δράση στα κύτταρα θήκης όσο και παρακρινή δράση στα κοκκώδη κύτταρα (*Knight & Glister 2006*).

Εκτενείς είναι οι αναφορές για τη παρακρινή δράση της BMP-7. Αρχικά, σε ωοθυλάκια αρουραίων αποδείχθηκε ότι η BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH εξασθενεί την παραγωγή της προγεστερόνης ενώ επαυξάνει την παραγωγή της οιστραδιόλης, χωρίς να επηρεάζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (*Shimasaki et al., 1999*). Επιπλέον, μελέτη σε κοκκώδη κύτταρα βοοειδών αποδείχθηκε ότι η BMP-7 αυξάνει την βασική και IGF επαγόμενη παραγωγή της οιστραδιόλης, αυξάνει την παραγωγή της ανασταλίνης A, της ακτιβίνης A, της φολλιστατίνης και αυξάνει τον αριθμό των κοκκωδών κυττάρων αλλά μειώνει την έκκριση της προγεστερόνης (*Glister et al., 2004*). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και μελέτες που πραγματοποιήθηκαν και σε άλλα θηλαστικά όπως στο πρόβατο (*Juengel et al., 2006*). Σε αντίθεση έρχεται μία μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κοκκώδη κύτταρα κοτόπουλου, όπου η BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH, συντελούσε στην αύξηση της προγεστερόνης (*Onagbesan et al., 2003*).

Ο Glister και συν., απέδειξαν την αυτοκρινή δράση της BMP-7 στα κύτταρα θήκης, η οποία αναστέλλει, τόσο της βασικής όσο και την επαγόμενη από την LH, παραγωγή ανδρογόνων καθώς αυξάνει και τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό των κυττάρων θήκης βοοειδών (*Glister et al., 2005*).

Πειράματα που έγιναν σε αρουραίους την προηγούμενη δεκαετία, απέδειξαν ότι παρά την ενεργή δράση της BMP-7 κατά την ωοθυλακιόγένεση, κατά την ωοθυλακιόρρηξία η έκφραση της μειώνεται σε μεγάλο ποσοστό (*Erickson & Shimasaki 2003*). Τέλος, στη πλειοψηφία των ωοθυλακίων που μεταπίπτουν σε ατρησία, η έκφραση των BMP μορίων συμπεριλαμβανομένης και της BMP-7, μειώνεται αισθητά όπως έδειξαν πειράματα σε ωοθήκες ενήλικων αρουραίων (*Lee et al., 2001*). Γεγονός που κρίνεται αναγκαίο λόγω του ρόλου της BMP-7 στην αναστολή της απόπτωσης και στην επαγωγή του μιτωτικού κυτταρικού πολλαπλασιασμού (*Dudley et al., 1995; Luo et al., 1995*).

β) Ρόλος της BMP-7 στις φυλετικές χορδές.

Ο ρόλος της BMP-7 στη φυσιολογική λειτουργία των φυλετικών χορδών δεν έχει ακόμη προσδιοριστεί. Αυτό που έχει αποδειχθεί είναι ότι οι BMPs και η BMP-7 ως αυξητικοί παράγοντες επάγουν την παθογένεση του όγκου στην περιοχή αυτή (*Erickson & Shimasaki 2003*).

γ) Ρόλος της BMP-7 στην μήτρα

Στον φυσιολογικό κύκλο των ποντικών, αρκετά μέλη των οστικών μορφογενετικών πρωτεϊνών καθώς και η BMP-7 εκφράζονται στην μήτρα. Σε πειράματα *in situ* υβριδισμού, έχει γίνει γνωστό ότι η BMP-7 εκφράζεται τόσο στα επιθηλιακά κύτταρα όσο και στα παρακείμενα στρωματικά κύτταρα του ενδομητρίου (*Lyons et al., 1989; Ozkaynak et al., 1997*). Η δράση της BMP-7 μειώνεται όταν το ενδομήτριο εκτίθεται σε οιστρογόνα, τα οποία και επάγουν τώρα την ικανότητα για πολλαπλασιασμό των κυττάρων (*Ozkaynak et al., 1997*).

Κατά την εγκυμοσύνη, η παρουσία των BMPs συμβάλλει στην φθαρτοποίηση του ενδομητρίου. Αμέσως μετά την εμφύτευση, η BMP-7 παύει να εκφράζεται από το επιθήλιο του ενδομητρίου και συνεχίζει να εκφράζεται κατά την φθαρτοποίηση στα στρωματικά κύτταρα (*Ying et al., 2000*).

Η δράση των BMPs δεν περιορίζεται μόνο στο ενδομήτριο αλλά δρουν και στον πλακούντα του εμβρύου. Η BMP-7 παρουσιάζει υψηλή έκφραση στα τροφοβλαστικά κύτταρα. Ο ρόλος της κυρίως εστιάζεται στην επαγωγή του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων του κατά την ανάπτυξη (*Ozkaynak et al., 1997*). Επιπλέον υπάρχουν αναφορές ότι η έκφραση της BMP-7 αναστέλλεται από την έκκριση hCG από κύτταρα της τροφοβλάστης. Συνεπώς η BMP-7 εκφράζεται στα πρώιμα στάδια της εγκυμοσύνης όπου τα τροφοβλαστικά κύτταρα δεν συνθέτουν ακόμα hCG (*Martinovic et al., 1996*).

5.3 BMP-7 και στεροειδογένεση

Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH αυξάνει την παραγωγή της οιστραδιόλης και μειώνει την παραγωγή της προγεστερόνης. Αυτό αποδίδεται στο ότι η BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH, μειώνει την παραγωγή του ενζύμου StAR. Ακόμη, αυξάνει την παραγωγή της αρωμάτισης P450 και προκαλεί ανεπαίσθητες αλλαγές στο ένζυμο P450_{sc} και στην 3β-HSD. Συνεπώς, η υψηλότερη παραγωγή της οιστραδιόλης οφείλεται στην αύξηση μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη (αυξημένη P450_{arom}) και η μειωμένη παραγωγή της προγεστερόνης και γενικότερα των ανδρογόνων σχετίζεται με την μειωμένη συγκέντρωση της χοληστερόλης (μειωμένη StAR), η οποία δεν μεταφέρεται από το εξωτερικό των μιτοχονδρίων στο εσωτερικό τους ώστε να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί στην στεροειδογένεση (Lee et al., 2001).

Σημαντική είναι η δράση της BMP-7 στην έκφραση των υποδοχέων της FSH και της LH στα ωοθυλάκια. Η BMP-7 επάγει την παραγωγή των υποδοχέων της FSH στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ευαισθησία των κυττάρων στην FSH και να προωθείται η ωοθυλακιογένεση (Lee et al., 2004). Η έκφραση των υποδοχέων της LH αντίθετα αναστέλλεται και οδηγεί στην αναστολή της ωχρινοποίησης των κοκκωδών κυττάρων (Shimasaki et al., 2004; Pangas et al., 2006).

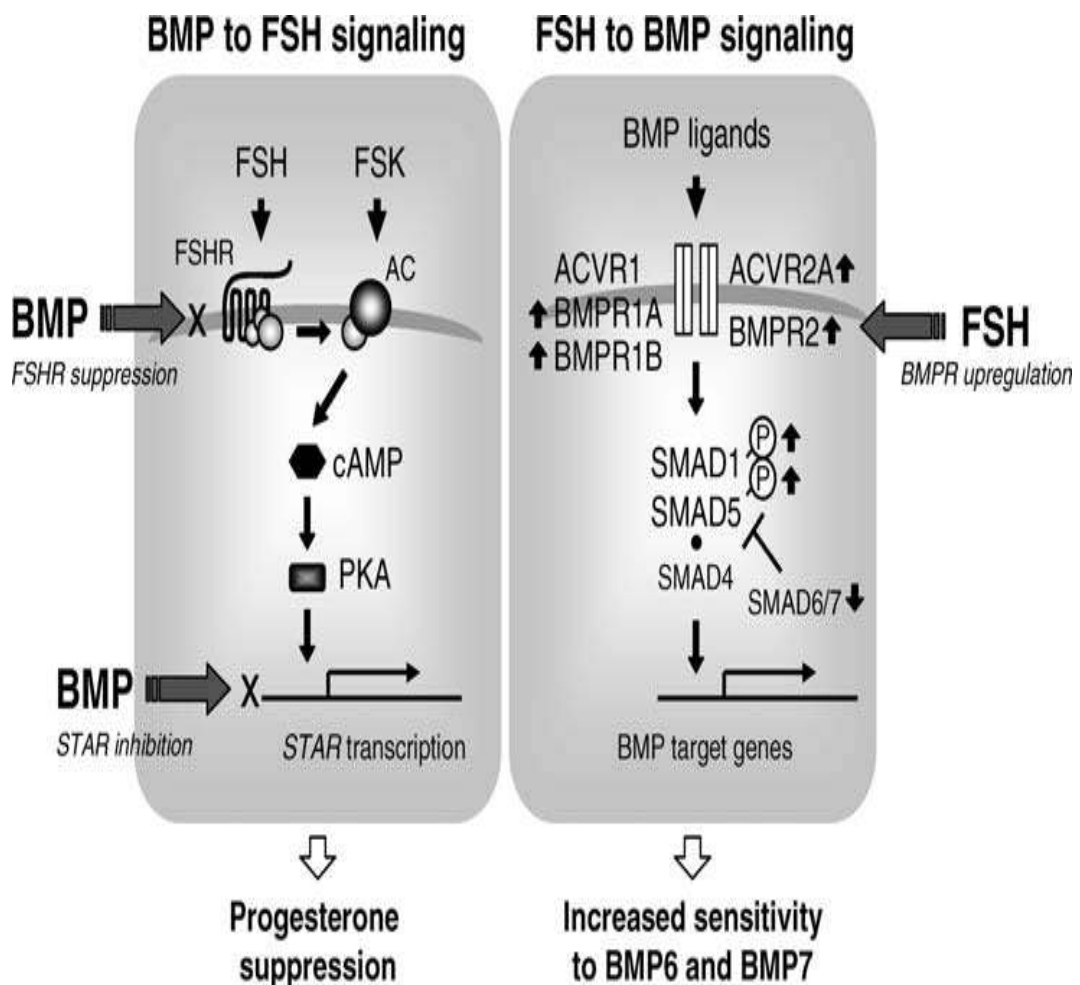
5.4 Ρύθμιση του BMP συστήματος και της FSH σηματοδότησης στα κοκκώδη κύτταρα

Σε πρόσφατη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα καρκινικής σειράς (human granulosa-like tumor cell line KGN), διαπιστώθηκε η ρύθμιση της FSH σηματοδότησης από την BMP αλλά και η ρύθμιση της BMP σηματοδότησης από την FSH.

Αρχικά, χορηγώντας τις BMPs μεταξύ αυτών και την BMP-7 η έκφραση των υποδοχέων της FSH φθίνει και το σήμα που επάγεται από τους υποδοχείς FSH εξασθενεί. Εν συνεχεία, cAMP και η PKA μειώνονται με

συνέπεια την ελάττωση της έκφρασης του γονιδίου της StAR. Η χαμηλότερη έκφραση της StAR, οδηγεί στη μείωση μεταφοράς της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια και της παραγωγής της προγεστερόνης (Miyoshi et al., 2006).

Επιπλέον, με την χορήγηση FSH στο σύστημα γίνεται αύξηση των υποδοχέων τύπου I (BMPR-IA, BMPR-IB) και τύπου II (BMPR-II, ActR-IIA). Η αύξηση των υποδοχέων οδηγεί στην αύξηση της έκφραση των Smad1/5/8 και στη μείωση της έκφρασης των ανασταλτικών Smad6/7, το οποίο καταλήγει σε υψηλότερη έκφραση του γονιδίου στόχου. Συμπερασματικά, με την ταυτόχρονη χορήγηση FSH-BMPs αυξάνεται η ευαισθησία του κυττάρου για τις BMPs καθώς αυξάνει ο αριθμός των υποδοχέων της (εικόνα 4) (Miyoshi et al., 2006).



Εικόνα 4: Ρύθμιση του BMP συστήματος και της FSH σηματοδότησης στα κοκκώδη κύτταρα (Miyoshi et al., 2006).

6 Εξωκυττάρια ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs

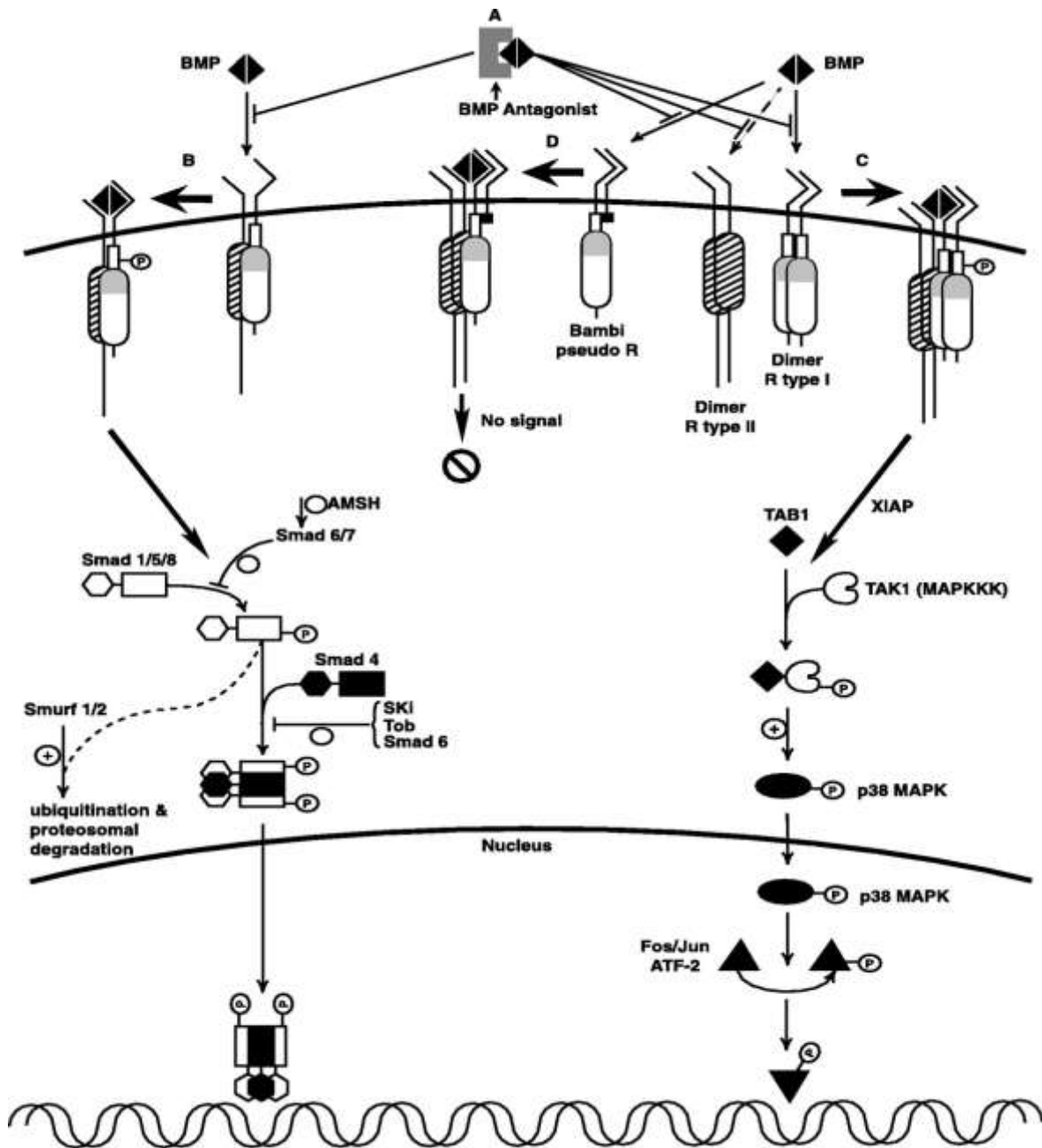
Η ρύθμιση της λειτουργίας των BMPs επιτελείται από μόρια ανταγωνιστές, που συνδέονται ειδικά στις ίδιες τις BMPs που βρίσκονται εξωκυττάρια. Οι ανταγωνιστές που έχουν ταυτοποιηθεί είναι οι εξής: ο noggin, η χορδίνη (chordin), η φολλιστατίνη (follistatin) και το γονίδιο που σχετίζεται με την φολλιστατίνη (follistatin and follistatin related-gene), το ventroptin, τα γονίδια twisted gastrulation, τα γονίδια της οικογένειας των Dan/Cerberus, το ογκοκατασταλτικό γονίδιο Dan, το gremlin και το ομόλογο της στα ποντίκια drm, η πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το Dan/Cerberus (PRDC), το caronte, το Dante(Dte) και το sclerastin(SOST) (*Piccolo et al., 1996; Topol et al., 1997; Hsu et al., 1998; Minabe Saegusa et al., 1998; Stanley et al., 1998; Pearce et al., 1999; Piccolo et al., 1999; Tsuchida et al., 2000; Aspenberg et al., 2001; Ray et al., 2001; Sakuta et al., 2001; van Bezooijen et al., 2002*).

6.1 Η Dan οικογένεια των ανταγωνιστών

Η Dan (Differential screening-selected gene aberrative in neuroblastoma) οικογένεια αναστολέων είναι μία ομάδα εκκριτικών πρωτεϊνών που συνδέονται και σχετίζονται με τις γλυκοπρωτεΐνες (BMPs). Στην οικογένεια των Dan πρωτεϊνών ανήκουν επτά μέλη: Dan, Cerberus, PRDC, dante, caronte, gremlin/drm, sclerostin/SOST (*Topol et al., 1997; Minabe Saegusa et al., 1998; Stanley et al., 1998; Pearce et al., 1999; Piccolo et al., 1999; van Bezooijen et al., 2002*).

Μελέτες έχουν αποκαλύψει το μεγάλο ποσοστό ομολογίας μεταξύ των πεπτιδίων των μελών της οικογένειας των Dan πρωτεϊνών. Στο γενικό πρότυπο τους κύριο δομικό χαρακτηριστικό είναι καρβοξυτελική περιοχή CR, η οποία δημιουργεί ένα λειτουργικό μοτίβο στην τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών που ονομάζεται κόμπος κυστίνης (*Pearce et al., 1999*). Με τη δομή αυτή γίνεται η αναδίπλωση της πρωτεΐνης σε τέτοιο βαθμό ώστε κάποια τμήματα με υδρόφοβα κατάλοιπα να αλληλεπιδρούν και να διευκολύνουν στον σχηματισμό όμο- ή έτερο- διμερών καθώς και άλλων ποικίλων αλληλεπιδράσεων πρωτεΐνης – πρωτεΐνης (*Vitt et al., 2001*).

Η δράση των ανταγωνιστών όπως και της οικογένειας Dan βασίζεται στην εξωκυτάρια σύνδεση τους με το μόριο στόχο (BMPs). Η αλληλεπίδραση αυτή των μορίων, οδηγεί στην αναστολή της δράσης των BMPs, η οποία σε φυσιολογική κατάσταση θα αλληλεπιδρούσε με τον υποδοχέα της και θα οδηγούσε στην ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού της (εικόνα 5) (Canalis et al., 2003).



Εικόνα 5: α) Μηχανισμός δράσης του ανταγωνιστή β) Τα δύο σηματοδοτικά μονοπάτια των BMP (Canalis et al., 2003).

7 Gremlin: Ο ανταγωνιστής της BMP-7

Το Gremlin είναι μία γλυκοπρωτεΐνη υψηλά συντηρημένη κατά την εξέλιξη των ειδών. Περίπου πριν από μία δεκαετία απομονώθηκε από έμβρυα *Xenopus*, ως ένας αντι- BMP παράγοντα για την ανάπτυξη του ραχιαίου-κοιλιακού άξονα (*Hsu et al., 1998*). Πειράματα σε αρουραίους, κατέληξαν ότι το γονίδιο gremlin κωδικοποιεί μία γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 20.7KDa η οποία υφίσταται γλυκοζυλίωση κατά την έκκριση της και αποκτά μοριακό βάρος 28KDa (*Topol et al., 2000*). Ακόμη, σε νεοπλασματικά κύτταρα διαπιστώθηκε η δράση του gremlin ως η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη που δρα ενάντια στο BMP-2, BMP-4 και BMP-7 (*Topol et al., 1997*).

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

7.1 Βιολογικός ρόλος του Gremlin.

Η δράση του gremlin είναι σημαντική κατά στην διαφοροποίηση και την ανάπτυξη των διαφορετικών τμημάτων ενός ιστού. Η διαβάθμιση στην συγκέντρωση των BMPs και των ανταγωνιστών τους στα διάφορα τμήματα του ιστού, είναι ικανή να επάγει ή να αναστείλει την ανάπτυξη και την διαφοροποίηση των τμημάτων του (*Botchkarev 2002*).

Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη το gremlin ως ανταγωνιστής των BMPs επηρεάζει την σκελετική ανάπτυξη καθώς και την ανάπτυξη της οστικής μάζας (*Wu et al., 2003; Sutherland et al., 2004; Winkler et al., 2004; Gazzero et al., 2005*). Ειδικότερα, σε ότι αφορά το gremlin η δράση του ταυτοποιήθηκε την περασμένη δεκαετία και επηρέαζε την ανάπτυξη της οστικής δομής και κυρίως στους οστεοβλάστες των ποντικών (*Gazzero et al., 2005*).

Σημαντική είναι επίσης η δράση του κατά την ανάπτυξη της νευρικής πλάκας, όπου είναι ικανό να ρυθμίζει τη δράση των BMPs (*Hsu et al., 1998*). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε κοτόπουλα, έδειξαν ότι το gremlin ρυθμίζει την ανάπτυξη των άκρων τους (*Merino et al., 1999*).

Η δράση των ανταγωνιστών (gremlin) μελετήθηκε και στο θύμο αδένα αλλά και στον μυελό των οστών, σε ότι αφορά την ανάπτυξη των αιμοποιητικών κυττάρων και των λεμφοκυττάρων. Η ικανότητα του αυτή οφείλεται στον έλεγχο του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs στην ωρίμανση των παραπάνω κυττάρων (*Passa et al., 2011*).

Παρ' όλο που το gremlin σχετίζεται με την ανάπτυξη φυσιολογικών δομών στο σώμα, σχετίζεται και με κάποιες σημαντικές ασθένειες όπως η πνευμονική ίνωση και η διαβητική νεφροπάθεια (*McMahon et al., 2000; Koli et al., 2006; Dolan et al., 2005; Walsh et al., 2008*). Η υπερέκφραση του gremlin σε ποντίκια επάγει την παθογένεση της πνευμονικής ίνωσης (*Myllarniemi et al., 2008*).

7.2 Ρόλος του gremlin στα γεννητικά κύτταρα θήλεος

Μελέτη των αναστολέων των BMPs πραγματοποιήθηκε σε ωοθυλάκια βοοειδών. Στα κοιλοτικά ωοθυλάκια καθώς αυξάνονταν το μέγεθος τους, μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο, παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση της ποσότητας του gremlin. Συνεπώς, πριν την επιλογή των ωοθυλακίων, τα μικρού μεγέθους ωοθυλάκια με άντρο (1-2mm) εμφανίζουν τη μέγιστη ποσότητα του gremlin όπου με την περαιτέρω ανάπτυξη τους η συγκέντρωση του φθίνει.

Το gremlin επηρεάζει σημαντικά την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου. Υψηλή έκφραση του gremlin παρατηρείται τόσο στα κοκκώδη κύτταρα όσο και στα κύτταρα θήκης των μεγάλων ωοθυλακίων, ανεξάρτητα από τη παρουσία οιστρογόνων (large E2 inactive follicle).

Στην ίδια μελέτη χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα θήκης, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της LH στην παραγωγή του gremlin και φάνηκε ότι η LH σε συνδυασμό με τις BMPs επάγει την έκφραση του gremlin (*Glister et al., 2011*).

Προγενέστερη μελέτη του Glister και των συν., σε κύτταρα θήκης βοοειδών διερεύνησε τη δράση των ανταγωνιστών, περιλαμβανομένου και του gremlin, στην παραγωγή ανδροστενδιόνης. Ο ανταγωνιστής είτε μόνος του είτε σε συνδυασμό με την BMP-7 και την LH, αυξάνει τη παραγωγή της ανδροστενδιόνης των κυττάρων (Glister et al., 2005).

Επιπλέον, μελέτη σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών ενισχύει το ρόλο του gremlin στην ωοθυλακιογένεση. Η έκφραση του gremlin ήταν αυξημένη κυρίως στο δευτερογενές ωοθυλάκιο ενώ μειώνονταν σε όλα τα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης του. Στα κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου που γεινιάζουν με το ωοκύτταρο η παρουσία του gremlin ήταν υψηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου. Σημαντικό είναι ότι ανεξάρτητα από την ανταγωνιστική δράση του gremlin στις BMPs, οι ίδιες επάγουν την παραγωγή του (Pangas et al., 2004)

Η παραπάνω μελέτη είναι η μοναδική που πραγματοποιήθηκε, γι' αυτό απαιτείται περεταίρω έρευνα σχετικά με την έκφραση των BMPs και των ανταγωνιστών τόσο κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου όσο και σε άλλα είδη. Οι ανταγωνιστές παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs κατά την ανάπτυξη του ωοθυλακίου, όμως επιπλέον έρευνες απαιτούνται για τη πλήρη διερεύνηση του μηχανισμού δράσης τους.

8 Η ισομορφή 1 του gremlin (Gremlin-1)

Η ισομορφή 1 του γονιδίου της gremlin στον άνθρωπο (gremlin-1) χαρτογραφήθηκε στο χρωμόσωμα 15 στην περιοχή q13-q15. Το gremlin για να αναστείλει την δράση των BMPs σχηματίζει μία ετεροδιμερή δομή με τις BMP-2, BMP-4 ή BMP-7, με αποτέλεσμα να αναστέλλει την ενεργοποίηση του υποδοχέα τους και την περαιτέρω ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού τους (Stanley et al., 1998;Merino et al., 1999;Lappin et al., 2000).

Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν ανέδειξαν τη δράση του gremlin-1 στην αναπτυξιακή διαδικασία πολλών οργάνων όπως των πνευμόνων, των άκρων του σώματος και των νεφρών καθώς και την δράση της στη

διαφοροποίηση των κυττάρων της νευρικής πλάκας (Lu et al., 2001; Shi et al., 2001).

Εκτός από την δράση του ως ανταγωνιστής των BMPs μπορεί να επηρεάσει και την δράση άλλων πρωτεϊνών και μορίων που ελέγχουν τις βασικές λειτουργίες του σώματος. Το gremlin-1 προσδένεται στο αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), μια ουσία ανεξάρτητη από τις BMPs και τροποποιεί την αγγειογένεση (Mitola et al., 2010).

Αξιοσημείωτη είναι επίσης και η δράση της gremlin-1 στην ογκογένεση. Καρκινώματα διαφόρων οργάνων όπως του τραχήλου της μήτρας, του ενδομητρίου, των πνευμόνων, των ωοθηκών, των νεφρών, του στήθους, του παχέως εντέρου και του παγκρέατος υπερεκφράζουν το gremlin-1, το οποίο έχει εντοπιστεί σε αυτά τα καρκινώματα αλλά δεν είναι πλήρως κατανοητός ο ακριβής ρόλος του σε όλες αυτές τις περιπτώσεις (Namkoong et al., 2006; Sha et al., 2009).

8.1 Ο ρόλος του gremlin-1 στην αναπαραγωγή

Για πρώτη φορά πριν από ένα χρόνο, έγινε η συσχέτιση του gremlin-1 σε κοκκώδη κύτταρα του ωοφόρου δίσκου των γυναικών με μειωμένες ωοθηκικές εφεδρείες. Στις γυναίκες αυτές βρέθηκε μειωμένη έκφραση του γονιδίου του gremlin-1 σχεδόν 3 φορές περισσότερο απ' ό τι στις φυσιολογικές γυναίκες (Jindal et al., 2012).

Σε προγενέστερες μελέτες διαπιστώθηκε ότι η έκφραση του gremlin-1 συσχετίζεται με την καλή ποιότητα της βλαστοκύστης, του εμβρύου, αλλά δεν επηρεάζει θετικά το ποσοστό κύησης (McKenzie et al., 2004; Cillo et al., 2007). Σε γυναίκες μεγαλύτερης ηλικίας από αυτήν της αναπαραγωγής, το gremlin-1 έχει συσχετιστεί με την καλή αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων τους (Anriaenssens et al., 2011). Συμπερασματικά το gremlin-1 κατέχει σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακική ανάπτυξη και στην ωοκυτταρική λειτουργία αλλά κρίνεται αναγκαίο να μελετηθεί εκτενέστερα ο ρόλος του στο ωοθυλάκιο και στην γυναικεία αναπαραγωγική φυσιολογία.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

9. Σκοπός

Η παρούσα ερευνητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδραση της BMP-7 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων.

10. Υλικά και μέθοδοι

10.1 Τα κοκκώδη κύτταρα

Ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα 90 γυναικών ηλικίας 20 έως 40 ετών χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της στεροειδογένεσης έπειτα από τη δράση της BMP-7 και του αναστολέα της Gremlin-1 σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων. Τα κοκκώδη κύτταρα απομονώνονταν από το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που υποβάλλονταν σε πρωτόκολλα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στις γυναίκες αυτές γίνονταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση χορηγώντας ανασυνδυασμένη FSH, GnRH αγωνιστή καθώς και για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγούνταν hCG, 36 ώρες πριν την ωοληψία. Αξίζει να επισημάνουμε ότι η χρησιμοποίηση του ωοθυλακικού υγρού των γυναικών γίνονταν με την πλήρη συγκατάθεση τους.

10.2 Πειραματικό μέρος

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

α) Διαδικασία απομόνωσης - καθαρισμού των κοκκωδών κυττάρων

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

5. Τέλος, γίνεται η μέτρηση των κοκκωδών κυττάρων και η εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους.

β) Καταμέτρηση και Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων:

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

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

Αριθμός κυττάρων/ml:

Μέσος όρος ζώντων κυττάρων(Z) x συνολικό όγκο (ml) των κυττάρων στο σωλήνα x αραιώση (=2) x 10⁴

Αριθμός κυττάρων στο δείγμα:

Κύτταρα/ml x αρχικό όγκο εναιωρήματος των κυττάρων στο σωλήνα

Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων (%):

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

Πίνακας 1: Καταμέτρηση και Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων

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

γ) Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με BMP-7:

1. Οι καλλιέργειες υποβάλλονται σε προ-επώαση 48 ωρών στον κλίβανο, θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό ώστε να προωθηθεί η επικόλληση και η ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια καλλιέργειας.
2. Με το τέλος της προ-επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο μέσο καλλιέργειας ελεύθερο ορού στο οποίο προστίθεται ανδροστενδιόνη (A4) σε συγκέντρωση 0.1M (A₄, Sigma USA), ως υπόστρωμα αρωματοποίησης.
3. Οι καλλιέργειες διαχωρίστηκαν στις εξής παρακάτω ομάδες

Χρόνος Επώασης	Συνδυασμός Ορμονών			
	24 ώρες	Ομάδα ελέγχου (A4)	A4 +BMP-7 (100ng/ml)	A4 +BMP-7 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)
48 ώρες	Ομάδα ελέγχου (A4)	A4 +BMP-7 (100ng/ml)	A4 +BMP-7 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)	A4 +FSH (10ng/ml)
72 ώρες	Ομάδα ελέγχου (A4)	A4 +BMP-7 (100ng/ml)	A4 +BMP-7 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)	A4 +FSH (10ng/ml)

Πίνακας 2: Συνδυασμοί ορμονών στις καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων

4. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση σε ποικίλα χρονικά διαστήματα 24 ώρες, 48 ώρες και στις 72 ώρες.
5. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος για κάθε καλλιέργεια γίνεται η συλλογή του υπερκείμενου και αποθήκευση στους -80° C μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης.
6. Η μέθοδος για την μέτρηση των ορμονών που ακολουθήθηκε ήταν η ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA).

δ) Η καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με *gremlin* -1:

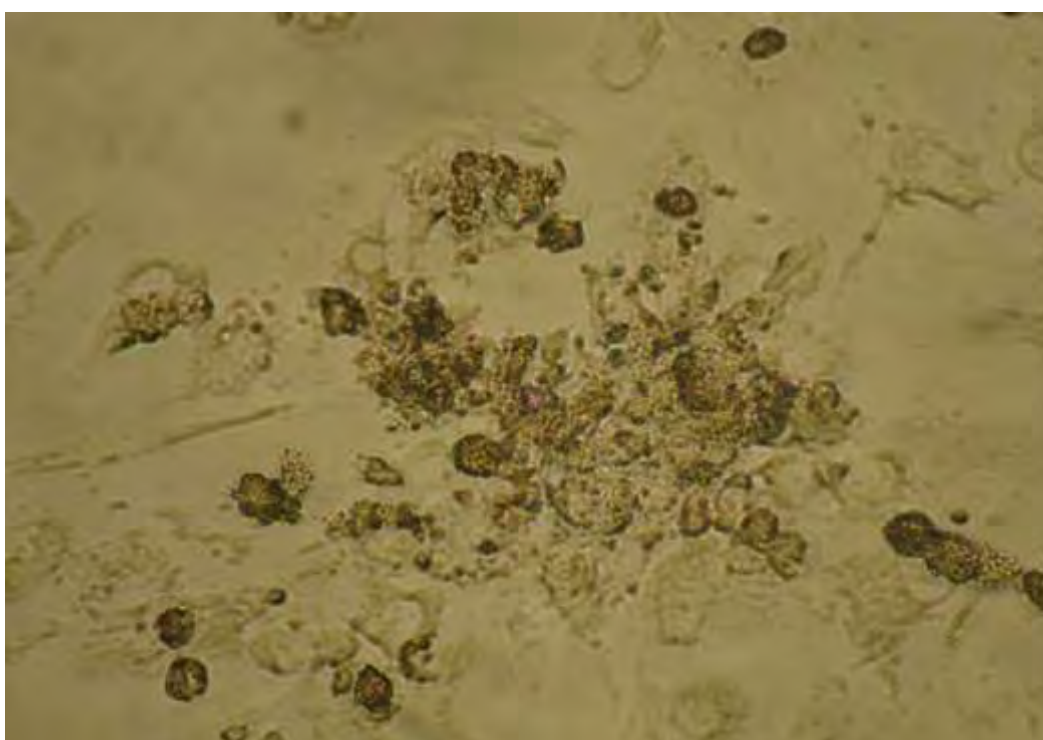
Εφόσον πραγματοποιήθηκε η επώαση των κοκκωδών κυττάρων και εντοπίστηκε το χρονικό διάστημα όπου η δράση της BMP-7 είναι αποτελεσματικότερη ακολούθησε η επώαση των κυττάρων με συνδυασμό ορμόνης και αναστολέα της στη συγκεκριμένη χρονική ομάδα. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις του αναστολέα της BMP-7 *gremlin*-1, ώστε να προσδιοριστεί ποια είναι η συγκέντρωση ή οποία προκαλεί

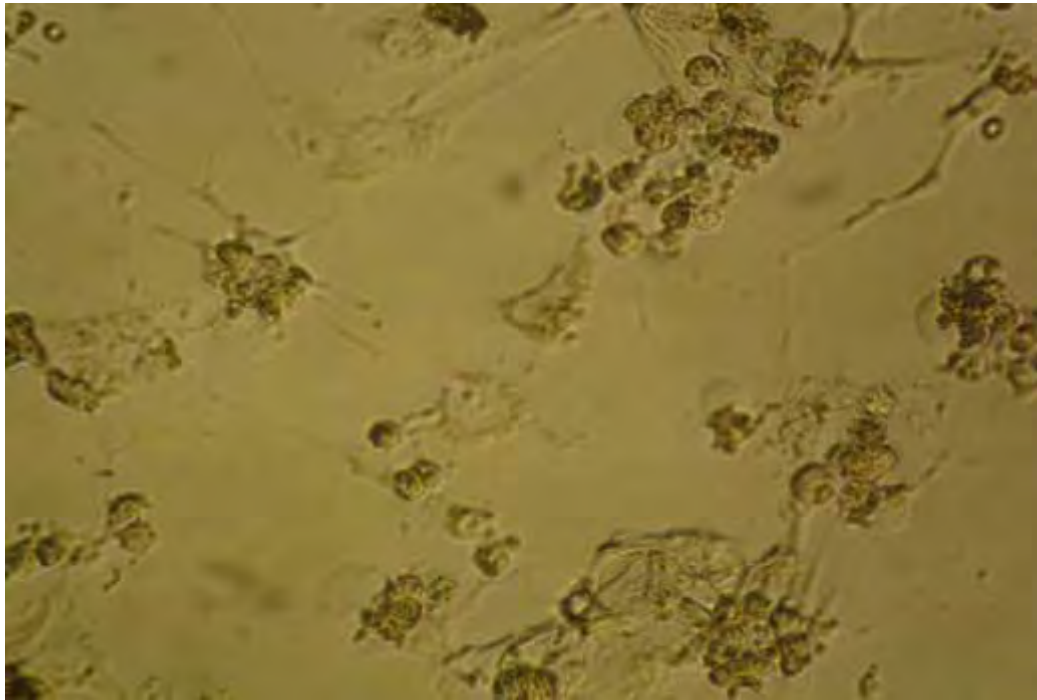
αναστολή της δράσης της ορμόνης. Οι συγκεντρώσεις αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

48 ώρες	Gremlin 50ng/ml	Gremlin 100ng/ml	Gremlin 500ng/ml	Gremlin 1μg/ml
	Gremlin 50ng/ml + BMP-7 100ng/ml	Gremlin 100ng/ml + BMP-7 100ng/ml	Gremlin 500ng/ml + BMP-7 100ng/ml	Gremlin 1μg/ml + BMP-7 100ng/ml
	Gremlin 50ng/ml + BMP-7 100ng/ml + FSH (10ng/ml)	Gremlin 100ng/ml + BMP-7 100ng/ml + FSH (10ng/ml)	Gremlin 150ng/ml + BMP-7 100ng/ml + FSH (10ng/ml)	Gremlin 1μg/ml + BMP-7 100ng/ml + FSH (10ng/ml)

Πίνακας 3: Συνδυασμοί ορμονών στις καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων

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





Εικόνα 6: Καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων μετά από επώαση 24 ωρών με τον ανταγωνιστή

11. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων του πειράματος χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA). Η παρούσα στατιστική μέθοδος επιλέχθηκε για να προσδιοριστεί η στεροειδογένεση στα κοκκώδη κύτταρα όσον αφορά την έκκριση της 17 β - οιστραδιόλης και της προγεστερόνης μετά από την επίδραση της BMP-7(24h,48h και 72h) και του ανταγωνιστή της (48h). Οι συσχετισμοί που πραγματοποιήθηκαν αφορούσαν τόσο την δράση των ορμονών μεμονωμένα όσο και σε συνδυασμό με την FSH. Δεδομένου ότι οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων μελέτης δεν ήταν ανεξάρτητες γίνονταν συγχρόνως πολλαπλές συγκρίσεις και μετά-αναλύσεις με τη στάθμη σημαντικότητας (P) να διορθώνεται κατά Bonferroni. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίζονταν ως $\alpha=5\%$. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS 17.0

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**12. Παραγωγή της 17β-οιστραδιόλης στις καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων στις 24,48 και 72 ώρες.**

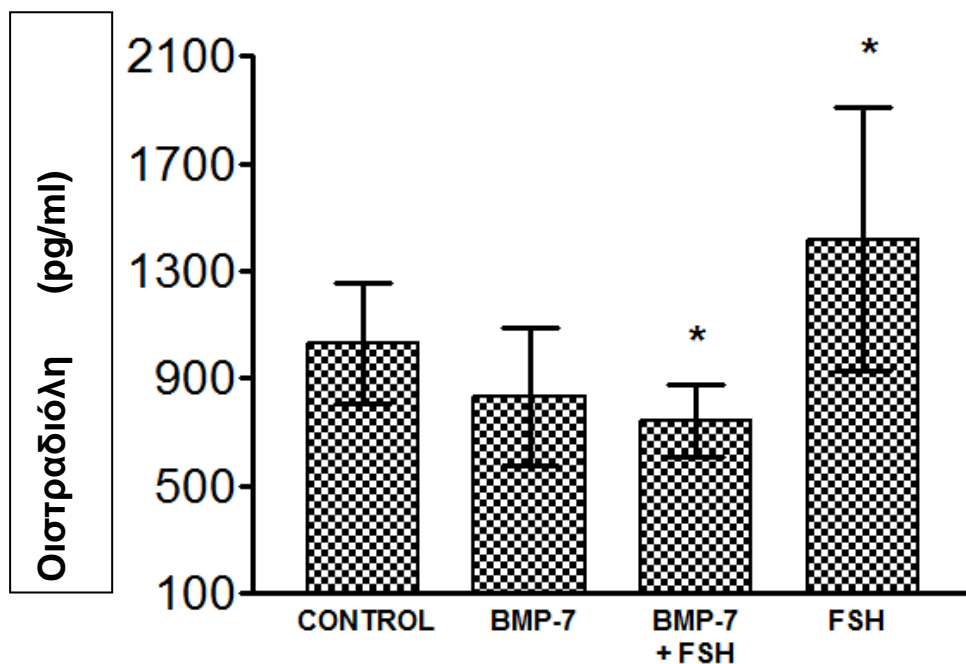
A) Τα αποτελέσματα επίδρασης των ορμονών BMP-7(100ng/ml), BMP-7(100ng/ml) + FSH(10ng/ml) και FSH(10ng/ml) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου όσον αφορά την έκκριση της οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις **24 ώρες** αναγράφονται στο παρακάτω πίνακα.

Bonferroni – Estradiol 24h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
E ₂ 24h	Control	BMP-7	203.00000	193.67781	1.000
		BMP-7+ FSH	290.40000	193.67781	0.919
		FSH	-385.14000	193.67781	0.385
	BMP-7	Control	-203.00000	193.67781	1.000
		BMP-7+ FSH	87.40000	193.67781	1.000
		FSH	-588.14000*	193.67781	0.047
	BMP-7 + FSH	Control	-290.40000	193.67781	0.919
		BMP-7	-87.40000	193.67781	1.000
		FSH	-675.54000*	193.67781	0.018
FSH	Control	385.14000	193.67781	0.385	
	BMP-7	588.14000	193.67781	0.047	
	BMP-7+ FSH	675.54000	193.67781	0.018	

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 4: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή οιστραδιόλης στις 24 ώρες.



Εικόνα 7: Συσχέτιση της επίδραση της BMP-7(100ng/ml), της BMP-7 (100ng/ml)+FSH(10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) στην παραγωγή της οιστραδιόλης (pg/ml) από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 24 ώρες

Από τις παραπάνω αναλύσεις προκύπτει ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης μετά από επίδραση με BMP-7, BMP-7+FSH και FSH δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Αντιθέτως, η παραγωγή οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία επωάστηκαν με το συνδυασμό ορμονών BMP-7 + FSH, μειώνονταν συγκριτικά με αυτή της ομάδας FSH και παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά ($P < 0.05$).

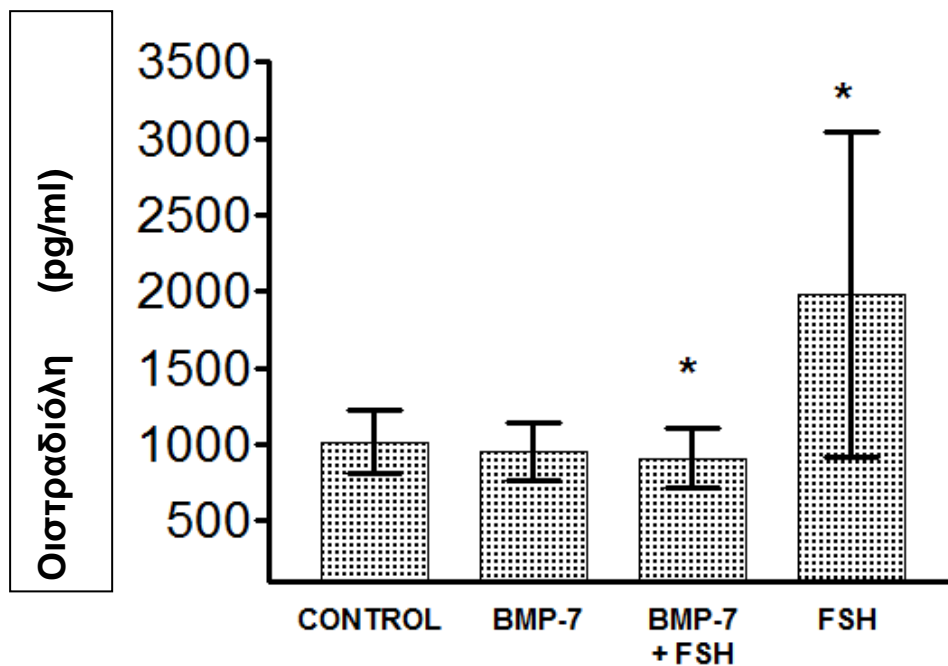
B) Τα αποτελέσματα των ορμονικών επιδράσεων σε **48 ώρες** καλλιέργειας παρουσιάζονται στο πίνακα 5 και στην εικόνα 8.

Bonferroni – Estradiol 48h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
E ₂ 48h	Control	BMP-7	65.60000	351.28370	1.000
		BMP-7+FSH	104.20000	351.28370	1.000
		FSH	-964.68000	351.28370	0.086
	BMP-7	Control	-65.60000	351.28370	1.000
		BMP-7+FSH	38.60000	351.28370	1.000
		FSH	-1030.28000	351.28370	0.059
	BMP-7 +FSH	Control	-104.20000	351.28370	1.000
		BMP-7	-38.60000	351.28370	1.000
		FSH	-1068.88000*	351.28370	0.047
	FSH	Control	964.68000	351.28370	0.086
		BMP-7	1030.28000	351.28370	0.059
		BMP-7+FSH	1068.88000*	351.28370	0.047

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 5: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες.



Εικόνα 8: Συσχέτιση της BMP-7(100ng/ml), της BMP-7 (100ng/ml) + FSH(10ng/ml) και της FSH (10ng/ml) στην παραγωγή της οιστραδιόλης από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 48 ώρες

Η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που παρατηρείται, όπως και συμβαίνει και στις καλλιέργειες 24 ωρών, είναι μεταξύ των ομάδων BMP-7+FSH και FSH ($P<0.05$), όπου προκύπτει μείωση στη παραγωγή οιστραδιόλης από τη δράση της BMP-7.

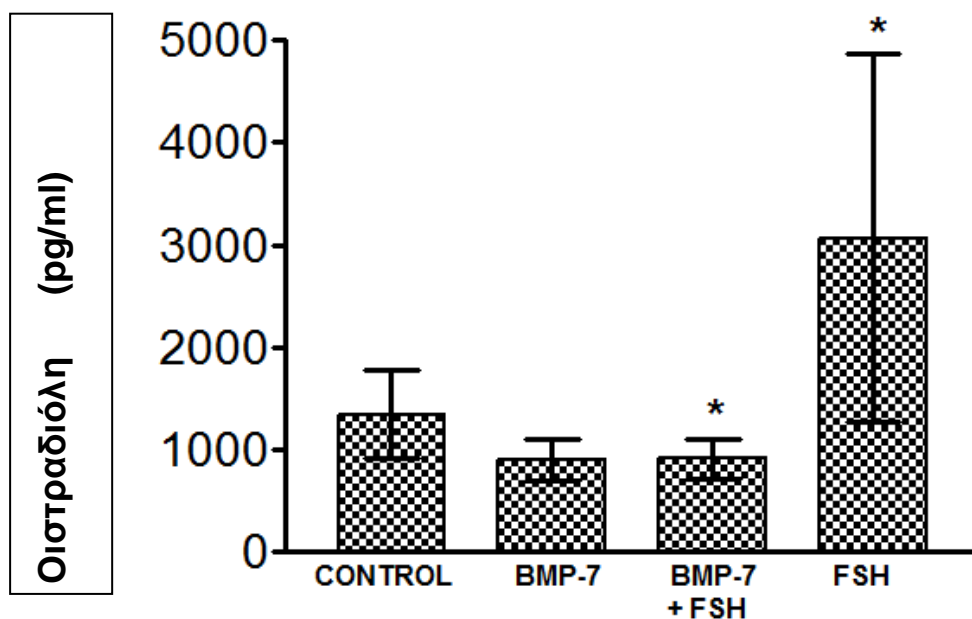
Γ) Τα αποτελέσματα που παρατηρήθηκαν κατά τις καλλιέργειες των 24 και 48 ωρών δείχνουν να επαναλαμβάνονται και στο διάστημα των **72 ωρών** όπως περιγράφονται από το πίνακα 6 και την εικόνα 9 με μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων BMP-7+FSH και FSH ($P<0.05$).

Bonferroni – Estradiol 72h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
E ₂ 72h	Control	BMP-7	448.48000	591.28995	1.000
		BMP-7+FSH	432.08000	591.28995	1.000
		FSH	-1718.92000	591.28995	0.062
	BMP-7	Control	-448.48000	591.28995	1.000
		BMP-7+FSH	-16.40000	591.28995	1.000
		FSH	-2167.40000*	591.28995	0.013
	BMP-7+FSH	Control	-432.08000	591.28995	1.000
		BMP-7	16.40000	591.28995	1.000
		FSH	-2151.00000*	591.28995	0.013
	FSH	Control	1718.92000	591.28995	0.062
		BMP-7	2167.40000*	591.28995	0.013
		BMP-7+FSH	2151.00000*	591.28995	0.013

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 6: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή οιστραδιόλης στις 72 ώρες



Εικόνα 9: Συσχέτιση της BMP-7(100ng/ml), της BMP-7(100ng/ml)+FSH(10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) στην παραγωγή της οιστραδιόλης από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 72 ώρες

13. Παραγωγή της προγεστερόνης στις καλλιέργειες των κοκκωδών κυττάρων στις 24,48 και 72 ώρες.

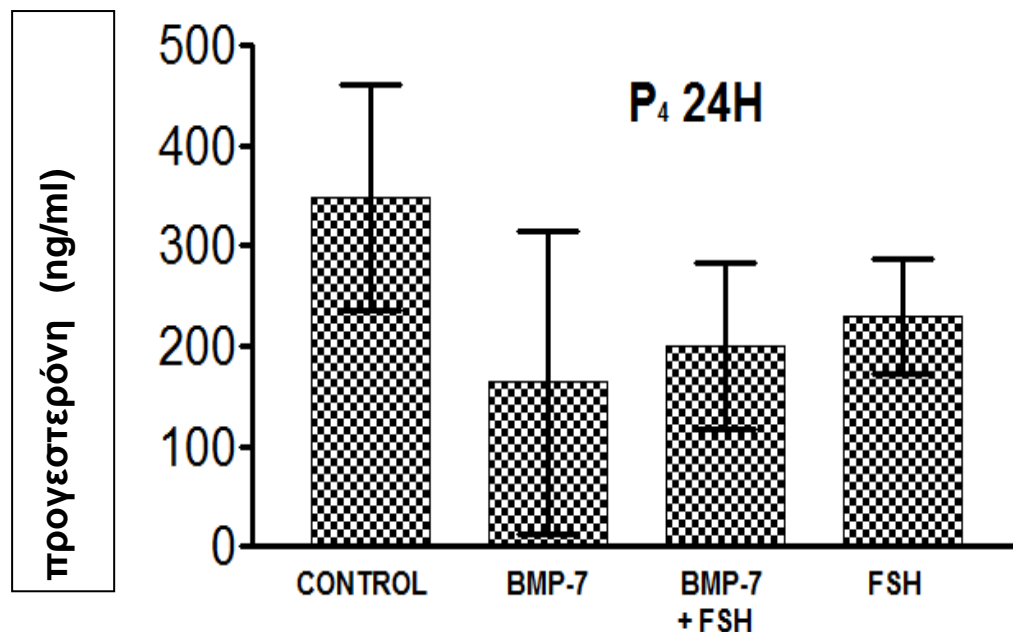
Τα αποτελέσματα της επίδρασης της BMP-7(100ng/ml), της BMP-7(100ng/ml) + FSH (10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου όσον αφορά την έκκριση της προγεστερόνης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 24, 48 και 72 ώρες περιγράφονται από τους πίνακες 7,8, 9 και τις εικόνες 10,11, 12 αντίστοιχα.

Bonferroni – Progesterone 24h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P ₄ 24h	Control	BMP-7	184.52000	67.34555	0.087
		BMP-7 + FSH	148.32000	67.34555	0.256
		FSH	118.28000	67.34555	0.589
	BMP-7	Control	-184.52000	67.34555	0.087
		BMP-7+FSH	-36.20000	67.34555	1.000
		FSH	-66.24000	67.34555	1.000
	BMP-7 +FSH	Control	-148.32000	67.34555	0.256
		BMP-7	36.20000	67.34555	1.000
		FSH	-30.04000	67.34555	1.000
	FSH	Control	-118.28000	67.34555	0.589
		BMP-7	66.24000	67.34555	1.000
		BMP-7+FSH	30.04000	67.34555	1.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 7: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες.



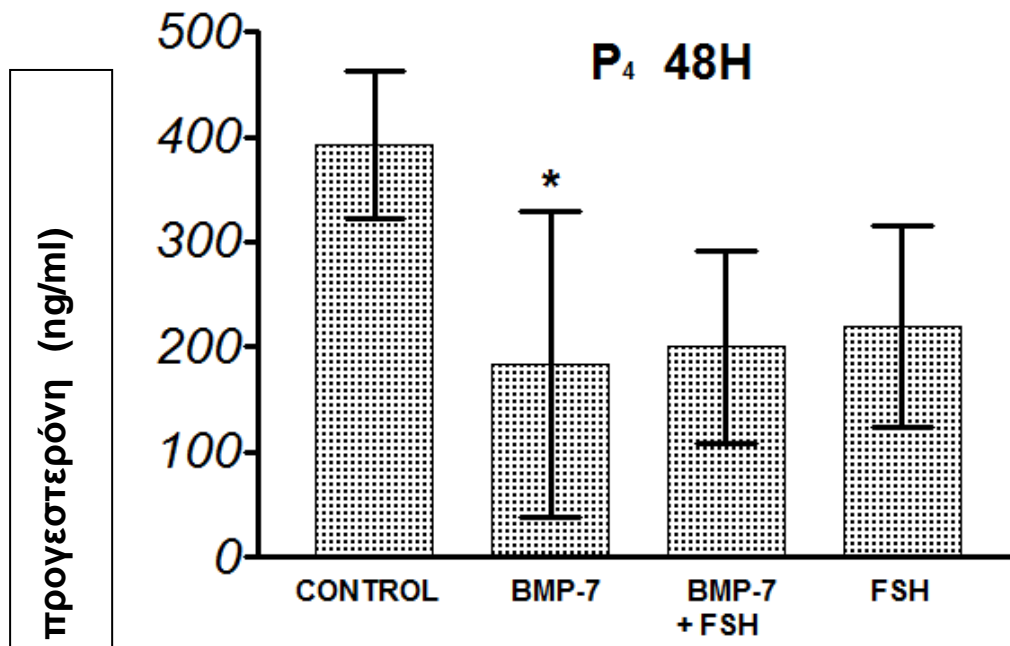
Εικόνα 10: Συσχέτιση BMP-7(100ng/ml), της BMP-7(100ng/ml)+FSH(10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) στην παραγωγή της προγεστερόνης από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 24ώρες.

Bonferroni – Progesterone 48h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P ₄ 48h	Control	BMP-7	208.00000*	66.16132	0.038
		BMP-7+FSH	191.92000	66.16132	0.063
		FSH	172.56000	66.16132	0.114
	BMP-7	Control	-208.00000*	66.16132	0.038
		BMP-7+FSH	-16.08000	66.16132	1.000
		FSH	-35.44000	66.16132	1.000
	BMP-7+FSH	Control	-191.92000	66.16132	0.063
		BMP-7	16.08000	66.16132	1.000
		FSH	-19.36000	66.16132	1.000
	FSH	Control	-172.56000	66.16132	0.114
		BMP-7	35.44000	66.16132	1.000
		BMP-7+FSH	19.36000	66.16132	1.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 8: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες.



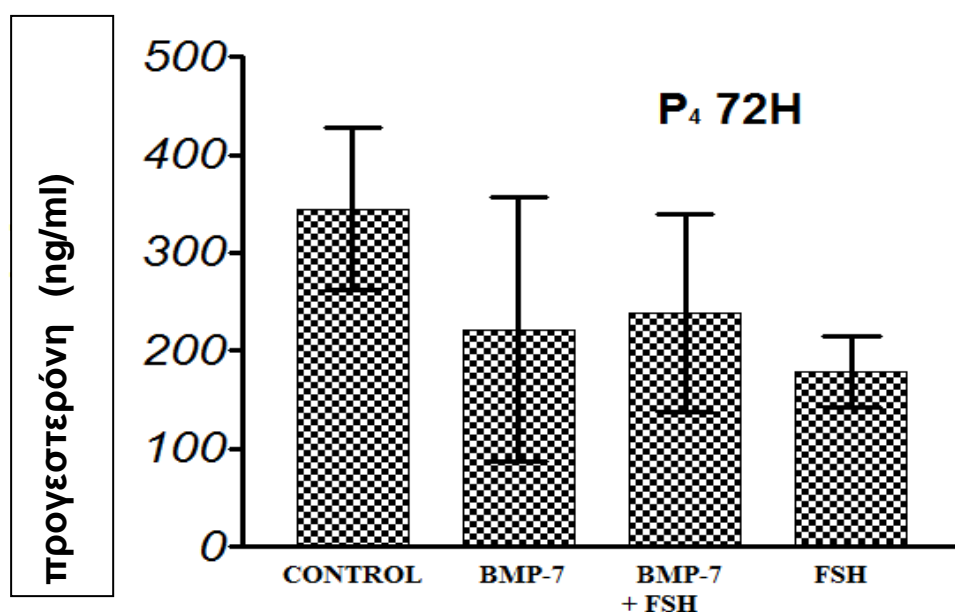
Εικόνα 11: Συσχέτιση της BMP-7 (100ng/ml), της BMP-7 (100ng/ml)+ FSH (10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) στην παραγωγή της προγεστερόνης από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 48 ώρες

Bonferroni – Progesterone 72h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P ₄ 72h	Control	BMP-7	123.08000	60.65864	0.357
		BMP-7+FSH	106.56000	60.65864	0.589
		FSH	166.30000	60.65864	0.087
	BMP-7	Control	-123.08000	60.65864	0.357
		BMP-7+FSH	-16.52000	60.65864	1.000
		FSH	43.22000	60.65864	1.000
	BMP-7 +FSH	Control	-106.56000	60.65864	0.589
		BMP-7	16.52000	60.65864	1.000
		FSH	59.74000	60.65864	1.000
	FSH	Control	-166.30000	60.65864	0.087
		BMP-7	-43.22000	60.65864	1.000
		BMP-7+FSH	-59.74000	60.65864	1.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 9: Επίδραση της BMP-7, της BMP-7+FSH και της FSH στην παραγωγή προγεστερόνης στις 72 ώρες.



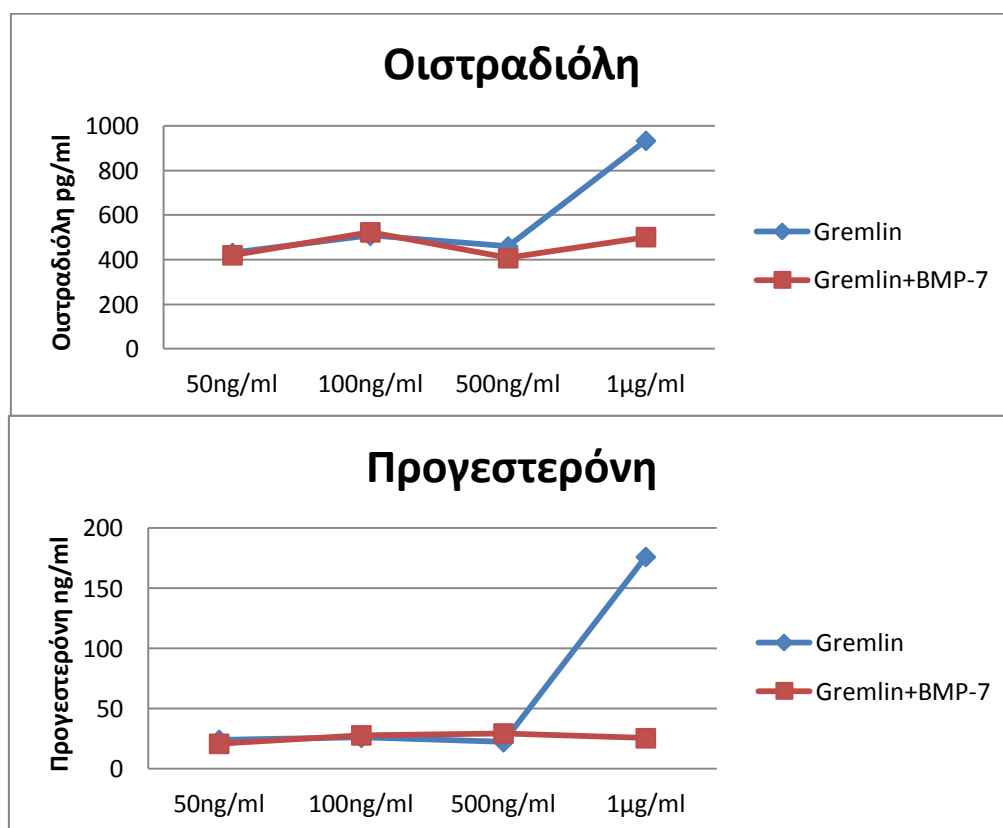
Εικόνα 12: Συχέτιση της BMP-7(100ng/ml), της BMP-7(100ng/ml)+FSH(10ng/ml) και της FSH(10ng/ml) στην παραγωγή προγεστερόνης από καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 72ώρες

Παρατηρώντας τις παραπάνω αναλύσεις, δεν παρατηρείται καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην έκκριση προγεστερόνης από καλλιεργημένα κοκκώδη κυττάρια, τόσο κατά το διάστημα των 24 όσο και κατά των 72 ωρών, σε όλες τις ομάδες μελέτης.

Στατιστικά σημαντική μείωση της έκκρισης προγεστερόνης σημειώθηκε απο την επίδραση της BMP-7 στο διάστημα καλλιέργειας 48ωρών συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου.

14. Δράση του ανταγωνιστή της BMP-7 στην παραγωγή 17β-οιστραδιόλης & προγεστερόνης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων.

Τα αποτελέσματα δράσης του ανταγωνιστή Gremlin-1 στη συγκέντρωση του 1μg/ml, όπως προέκυψε μετά από δοκιμές και τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης (Εικόνα. 13), στη διάρκεια καλλιέργειας 48 ωρών περιγράφονται στον πίνακα 10.



Εικόνα 13: Πρότυπη καμπύλη των συγκεντρώσεων του Gremlin-1

Παραγωγή Οιστραδιόλης

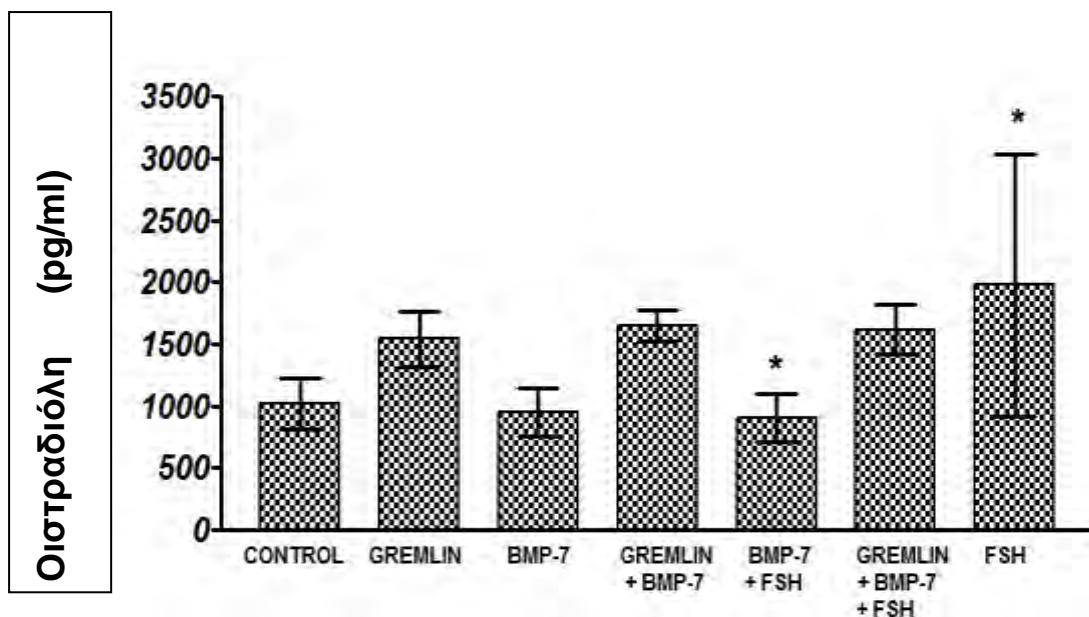
Bonferroni – Estradiol 48h

Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
E2	Control	Gremlin	-527.80000	276.69687	1.000
		BMP-7	65.60000	276.69687	1.000
		Gremlin +BMP-7	-632.80000	276.69687	.629
		BMP-7+FSH	104.20000	276.69687	1.000
		Gremlin+ BMP-7+FSH	-604.00000	276.69687	.789
		FSH	-964.68000*	276.69687	.034
	Gremlin	Control	527.80000	276.69687	1.000
		BMP-7	593.40000	276.69687	.857
		Gremlin +BMP-7	-105.00000	276.69687	1.000
		BMP-7+FSH	632.00000	276.69687	.633
		Gremlin+ BMP-7+FSH	-76.20000	276.69687	1.000
		FSH	-436.88000	276.69687	1.000
	BMP-7	Control	-65.60000	276.69687	1.000
		Gremlin	-593.40000	276.69687	.857
		Gremlin +BMP-7	-698.40000	276.69687	.369
		BMP-7+FSH	38.60000	276.69687	1.000
		Gremlin+ BMP-7+FSH	-669.60000	276.69687	.468
		FSH	-1030.28000*	276.69687	.018
	Gremlin +BMP-7	Control	632.80000	276.69687	.629
		Gremlin	105.00000	276.69687	1.000
		BMP-7	698.40000	276.69687	.369
		BMP-7+FSH	737.00000	276.69687	.266
		Gremlin+ BMP-7+FSH	28.80000	276.69687	1.000
		FSH	-331.88000	276.69687	1.000

BMP-7 +FSH	Control	-104.20000	276.69687	1.000
	Gremlin	-632.00000	276.69687	.633
	BMP-7	-38.60000	276.69687	1.000
	Gremlin+ BMP-7	-737.00000	276.69687	.266
	Gremlin+ BMP-7+FSH	-708.20000	276.69687	.340
	FSH	-1068.88000*	276.69687	.013
Gremlin +BMP- 7+FSH	Control	604.00000	276.69687	.789
	Gremlin	76.20000	276.69687	1.000
	BMP-7	669.60000	276.69687	.468
	Gremlin +BMP-7	-28.80000	276.69687	1.000
	BMP-7+FSH	708.20000	276.69687	.340
	FSH	-360.68000	276.69687	1.000
FSH	Control	964.68000*	276.69687	.034
	Gremlin	436.88000	276.69687	1.000
	BMP-7	1030.28000*	276.69687	.018
	Gremlin +BMP-7	331.88000	276.69687	1.000
	BMP-7+FSH	1068.88000*	276.69687	.013
	Gremlin+ BMP-7+FSH	360.68000	276.69687	1.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 10: Επίδραση του ανταγωνιστή(Gremlin-1) στην παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 13: Συσχέτιση του ανταγωνιστή(Gremlin 1μg/ml) με την παραγωγή οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 48 ώρες.

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε ότι αφορά την ανασταλτική δράση του Gremlin-1 αλλά παρατηρείται μια τάση αύξησης της τιμής της οιστραδιόλης της τάξης του 42.5% στην ομάδα μελέτης BMP-7+ Gremlin-1 έναντι της ομάδας BMP-7 (1647.0 pg/ml και 949.0 pg/ml αντίστοιχα).

Αύξηση επίσης εμφανίζεται και μεταξύ των ομάδων BMP-7 + FSH + Gremlin και BMP-7 + FSH της τάξης του 43.8% (1619.0 pg/ml και 910.0 pg/ml αντίστοιχα).

Παραγωγή της προγεστερόνης

Bonferroni – Progesterone 48h

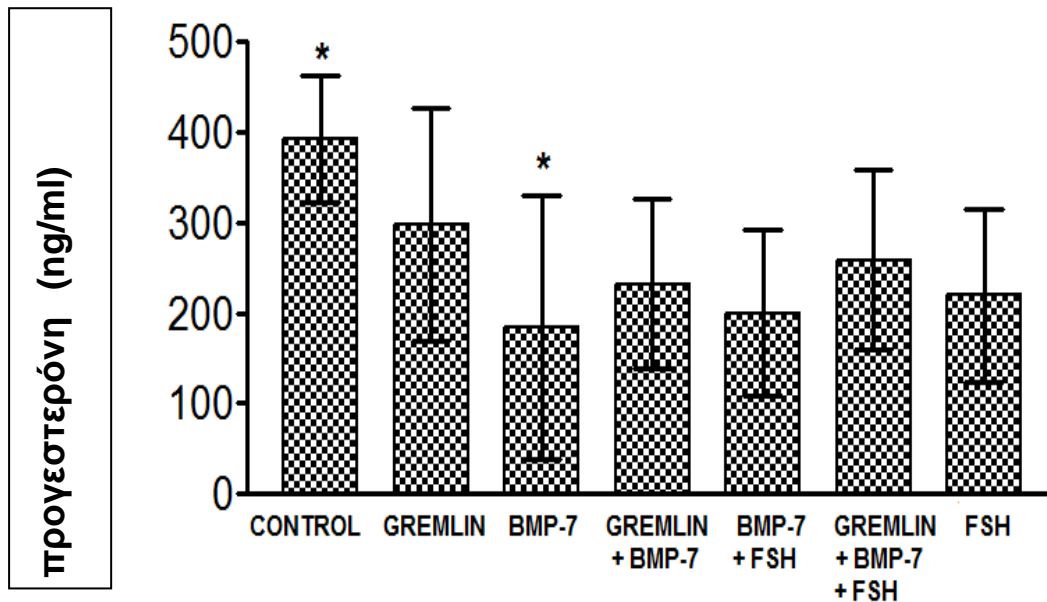
Dependent Variable	(I) GROUP	(J) GROUP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
P4	Control	Gremlin	94.40000	67.06466	1.000
		BMP-7	208.00000	67.06466	.092
		Gremlin +BMP-7	160.00000	67.06466	.505

	BMP-7+FSH	191.92000	67.06466	.166
	Gremlin+ BMP-7+FSH	133.20000	67.06466	1.000
	FSH	172.56000	67.06466	.329
Gremlin	Control	-94.40000	67.06466	1.000
	BMP-7	113.60000	67.06466	1.000
	Gremlin +BMP-7	65.60000	67.06466	1.000
	BMP-7+FSH	97.52000	67.06466	1.000
	Gremlin+ BMP-7+FSH	38.80000	67.06466	1.000
	FSH	78.16000	67.06466	1.000
BMP-7	Control	-208.00000	67.06466	.092
	Gremlin	-113.60000	67.06466	1.000
	Gremlin +BMP-7	-48.00000	67.06466	1.000
	BMP-7+FSH	-16.08000	67.06466	1.000
	Gremlin+ BMP-7+FSH	-74.80000	67.06466	1.000
	FSH	-35.44000	67.06466	1.000
Gremlin +BMP-7	Control	-160.00000	67.06466	.505
	Gremlin	-65.60000	67.06466	1.000
	BMP-7	48.00000	67.06466	1.000
	BMP-7+FSH	31.92000	67.06466	1.000
	Gremlin+ BMP-7+FSH	-26.80000	67.06466	1.000
	FSH	12.56000	67.06466	1.000
BMP-7 +FSH	Control	-191.92000	67.06466	.166
	Gremlin	-97.52000	67.06466	1.000
	BMP-7	16.08000	67.06466	1.000
	Gremlin +BMP-7	-31.92000	67.06466	1.000
	Gremlin+ BMP-7+FSH	-58.72000	67.06466	1.000
	FSH	-19.36000	67.06466	1.000
Gremlin+ BMP7+ FSH	Control	-133.20000	67.06466	1.000
	Gremlin	-38.80000	67.06466	1.000
	BMP-7	74.80000	67.06466	1.000
	Gremlin +BMP-7	26.80000	67.06466	1.000
	BMP-7+FSH	58.72000	67.06466	1.000
	FSH	39.36000	67.06466	1.000

FSH	Control	-172.56000	67.064966	.329
	Gremlin	-78.16000	67.06466	1.000
	BMP-7	35.44000	67.06466	1.000
	Gremlin +BMP-7	-12.56000	67.06466	1.000
	BMP-7+FSH	19.36000	67.06466	1.000
	Gremlin+ BMP-7+FSH	-39.36000	67.06466	1.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%

Πίνακας 11: Επίδραση του ανταγωνιστή(Gremlin-1) στην παραγωγή προγεστερόνης στις 48 ώρες καλλιέργειας.



Εικόνα 14: Συσχέτιση του ανταγωνιστή(Gremlin 1μg/ml) με την παραγωγή προγεστερόνης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων στις 48 ώρες.

Σύμφωνα με το παραπάνω πίνακα η έκκριση προγεστερόνης δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μετά την προσθήκη του αναστολέα Gremlin-1. Εντοπίζονται μόνο μικρής τάξης αύξηση στην τιμή της P4, 20.6% μεταξύ των ομάδων μελέτης BMP-7 + Gremlin και BMP-7 (232.0 ng/ml και 184.0 ng/ml αντίστοιχα).

Στις ομάδες BMP-7 + FSH (200.8 ng/ml) και BMP-7 + FSH + Gremlin (258.8 ng/ml) η αύξηση ανερχόταν στο 22.4%.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένη μελέτη, προσδιορίζουν την δράση της BMP-7 στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων. Καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επωάστηκαν με BMP-7 για διαφορετικά χρονικά διαστήματα (24 ώρες, 48 ώρες και 72 ώρες). Εφόσον προσδιορίστηκε η χρονική στιγμή κατά την οποία παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές από τη δράση της BMP-7 (48 ώρες), χορηγήθηκε αναστολέας της ορμόνης (Gremlin-1) με σκοπό να επιβεβαιωθεί ο ακριβής ρόλος της BMP-7 στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών..

Προγενέστερες αναφορές σε κοκκώδη κύτταρα αρουραίων, ανέδειξαν ότι η BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH επάγει την παραγωγή οιστραδιόλης και αναστέλλει την παραγωγή της προγεστερόνης αντίθετα η BMP-7 δεν είχε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών. Συνεπώς έγινε κατανοητό ότι η BMP-7 ρυθμίζει θετικά την δράση της FSH κατά την ωοθυλακιογένεση (*Shimasaki et al., 1999*). Ο ρόλος της BMP-7 στην ωοθυλακιογένεση επιβεβαιώθηκε και σε μία ακόμη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους *Lee και συν., 2001*. Συγκεκριμένα αποδείχθηκε ότι η BMP-7 επάγει την μετατροπή των αρχέγονων ωοθυλακίων σε πρωτογενή, σε προ-κοιλοτικά και σε κοιλοτικά ωοθυλάκια. Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και μελέτες που έγιναν σε πρόβατα, σε βοοειδή και σε αίγες (*Glister et al., 2004; Juengel et al 2006; Frota et al. 2011*)

Αντιθέτως, στα κοτόπουλα προσδιορίστηκε ότι η ίδια η BMP-7 καθώς και σε συνδυασμό με τις γοναδοτροφίνες επαύξανε την παραγωγή της προγεστερόνης, με αποτέλεσμα να αποτελεί σημαντικό μόριο κατά την διαφοροποίηση του ωοθυλακίου και κατά την διατήρηση της ιεραρχικής σειράς στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων (*Onagbesan et al., 2003*).

Διφορούμενες είναι οι απόψεις της επιστημονικής κοινότητας σε ότι αφορά τη δράση του ανταγωνιστή της BMP-7 (Gremlin) στη λειτουργία των ωοθηκών. Σε κύτταρα θήκης βοοειδών αποδείχθηκε ότι ο ανταγωνιστής αυξάνει την παραγωγή των ανδρογόνων σε αντίθεση με την BMP-7 που

αποτελούσε ανασταλτικό παράγοντα για την παραγωγή τους (*Glister et al., 2005*). Σε μία δεύτερη μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε βοοειδή από τον Glister και τους συν., 2011 ταυτοποιήθηκε η δράση των ανταγωνιστών καθώς και του Gremlin στην ρύθμιση της BMP σηματοδότησης σε όλα τα στάδια της ωοθυλακιογένεσης. Αλλά, υπό έρευνα είναι ο συσχετισμός του ρόλου των ανταγωνιστών (Gremlin) στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών της αναπαραγωγής.

Η παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε καλλιέργειες ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων, απέδειξε η παραγωγή της οιστραδιόλης επηρεάζεται από τη BMP-7 σε καλλιέργειες διάρκειας 24, 48 και 72 ωρών.

Στατιστικά σημαντική διαφορά ($P<0.05$) παρατηρήθηκε μεταξύ των καλλιεργειών που επωάστηκαν με BMP-7+FSH και αυτές που επωάστηκαν μόνο με FSH και στα τρία χρονικά διαστήματα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα η προσθήκη BMP-7 σε συνδυασμό με την FSH μείωνε την επαγόμενη από την FSH παραγωγή οιστραδιόλης. Γεγονός που υποδηλώνει ότι η BMP-7 δρα ανασταλτικά του ρόλου της FSH, η οποία και επάγει την αρωματοποίηση στα κοκκώδη κύτταρα, κατά συνέπεια και την παραγωγή οιστραδιόλης. Το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης σε ότι αφορά την οιστραδιόλη έρχεται σε αντίθεση με τη βιβλιογραφία, επισημαίνοντας ότι οι αναφορές περιορίζονται σε πειραματόζωα (*Shimasaki et al., 1999; Onagbesan et al., 2003; Glister et al., 2011*)

Η BMP-7, έμμεσα επηρεάζει την αρωματοποίηση των ανδρογόνων και επιπρόσθετα του ρόλου της στην επαγωγή ανάπτυξης των ωοθυλακίων συντελεί και στη ρύθμιση παραγωγής της οιστραδιόλης, αποτρέποντας ίσως την ανεξέλικτη μετατροπή των αρχέγονων ωοθυλακίων στα μετέπειτα στάδια ανάπτυξης.

Η παραγωγή της προγεστερόνης εμφάνιζε στατιστικά σημαντική ($P<0.05$) μείωση σε σχέση την ομάδα ελέγχου υπό την επίδραση της BMP-7 στις 48 ώρες καλλιέργειας. Διαφορά υποδηλώνει τον ανασταλτικό ρόλο της BMP-7 στην παραγωγή της προγεστερόνης. Το αποτέλεσμα είναι σε συμφωνία με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε αρουραίους οι οποίες έδειξαν μείωση της προγεστερόνης από δράση της BMP-7 χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά (*Shimasaki et al., 1999*). Στις υπόλοιπες

ομάδες δοκιμών που πραγματοποιήθηκαν δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την παραγωγή της προγεστερόνης.

Η BMP-7 όπως προκύπτει, αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τη παραγωγή προγεστερόνης, συνεπώς και της ωχρινοποίησης των κοκκωδών κυττάρων. Αποτέλεσμα το οποίο συμφωνεί με αναφορές όπου κάνουν λόγο για τη συμμετοχή της BMP-7 στην ωοθυλακιογένεση, ενώ σε αντίθεση κατά τη φάση της ωχρινοποίησης η παρουσία της ορμόνης αυτής είναι ανεπαίσθητη (*Erickson et al., 2003*).

Όσον αφορά τον ανταγωνιστή (Gremlin), οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν δεν έδειξαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των ομάδων BMP-7 και BMP-7+Gremlin, BMP-7+FSH και BMP-7+FSH+Gremlin. Ανεξάρτητα από το στατιστικό αποτέλεσμα, συγκρίνοντας τους μέσους όρους των τιμών της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στις παραπάνω ομάδες, υπάρχουν ενδείξεις ότι το Gremlin αναστέλλει τη δράση της BMP-7. Με την επίδραση του Gremlin αίρεται η αναστολή που προκαλεί η BMP-7 στην FSH επαγόμενη παραγωγή της οιστραδιόλης σε ποσοστό μεγαλύτερο του 40%. Επίσης, αναστέλλεται και η ελάττωση της προγεστερόνης υπό την δράση της BMP-7 αλλά σε ποσοστά που δεν ξεπερνούν το 20%.

Από τα αποτελέσματα της δράσης του Gremlin σίγουρα δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές αλλά ενδείξεις ότι προκαλεί αναστολή της δράσης της BMP-7. Γι' αυτό επιφυλασσόμαστε για περαιτέρω δοκιμές στο μέλλον σχετικά με τη δοσολογία του Gremlin καθώς και για τη χρησιμοποίηση περισσότερων δειγμάτων στις ομάδες μελέτης.

Συμπερασματικά, η BMP-7 είναι σημαντική για την στεροειδογένεση των ωοθηκών. Είναι υπεύθυνη για την αναστολή της δράσης της FSH, μειώνοντας το ποσοστό αρωματοποίησης των ανδρογόνων καθώς και για την μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης. Έχει ρόλο στην ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης, της ωοθυλακιορρηξίας καθώς και της ωχρινοποίησης των ωοθυλακίων.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη -7 (BMP-7) ανήκει στην υπεροικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού-β (TGF-B). Η BMP-7, παράγεται από τα κύτταρα θήκης και δρα αυτοκρινικά αλλά και παρακρινικά στα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας επηρεάζοντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την παραγωγή των στεροειδών ορμονών.

Η δράση της BMP-7, μέχρι τώρα, έχει μελετηθεί μόνο σε πειραματόζωα και δεν υπάρχουν αναφορές για το ρόλο της σε ότι αφορά τη στεροειδογένεση στον άνθρωπο.

Σκοπός της μελέτης ήταν να καθοριστεί η δράση της BMP-7 στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων αλλά και η ανασταλτική δράση του ανταγωνιστή της (Gremlin-1). Προσδιορισμός των επιπέδων της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο υπερκείμενο καλλιεργείων ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, πραγματοποιήθηκε μέσω ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA), μετά την επώαση με τους εξής συνδυασμούς ορμονών: Ανδροστενδιόνη (A_4), A_4 + BMP-7, A_4 + BMP-7 + FSH και A_4 + FSH για 24 48 και 72 ώρες. Στη συνέχεια καλλιέργειες επωάστηκαν με τη προσθήκη του αναστολέα της ορμόνης Gremlin-1 στους εξής συνδυασμούς: A_4 + BMP-7+ Gremlin-1 και A_4 + BMP-7 + FSH + Gremlin-1 για 48 ώρες.

Οι στατιστικές αναλύσεις έδειξαν ότι BMP-7 + FSH μείωνε την παραγωγή της οιστραδιόλης σε σχέση με την FSH ομάδα σε όλα τα χρονικά διαστήματα. Σε ότι αφορά την παραγωγή προγεστερόνης στατιστικά σημαντική μείωση σημειώθηκε μόνο κατά τις 48 ώρες, μεταξύ της ομάδας BMP-7 και της ομάδας ελέγχου A_4 . Επιπλέον το Gremlin-1 δεν έδωσε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων μελέτης αλλά μόνο ενδείξεις ότι αναστέλλει τη δράση της BMP-7.

Η BMP-7 είναι σημαντική για την στεροειδογένεση στην ανθρώπινη ωοθήκη. Συμμετέχει στην ωοθυλακιόγένεση, την ωοθυλακιόρρηξία και την ωχρινοποίηση των ωοθυλακίων επηρεάζοντας τα επίπεδα της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Η παρούσα μελέτη αποτελεί βασική έρευνα που

χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, για να προσδιοριστεί ο ακριβής ρόλος της BMP-7 και να υπάρξει κλινική εφαρμογή της δράσης της.

ABSTRACT

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

Nowadays, despite previous studies which conducted in laboratory animals, there is no reference to the role of BMP-7 in human ovarian steroidogenesis.

The purpose of this research was to determine the effect of BMP-7 in human steroidogenesis at granulosa cells and the inhibitory action of her antagonist (Gremlin-1). The secreted estradiol and progesterone in the culture of luteinized granulosa cells was estimated using the technique of radioimmunoassay (RIA).The measures become after granulosa cells incubation with the following combinations of hormones: androstenedione (A_4), A_4 + BMP-7, A_4 + BMP-7 + FSH και A_4 +FSH for 24,48 and 72 hours. Then, cultures were incubated with antagonist (Gremlin-1) in the following groups: A_4 + BMP-7+ Gremlin-1 and A_4 + BMP-7 + FSH + Gremlin-1 for 48 hours.

The statistical analyses, demonstrated that in all time intervals BMP-7 + FSH reduce the production of estradiol in relation to FSH group. For the production of progesterone statistically significant decrease occurred only during the 48 hours between the BMP-7 group and the control group A_4 . Furthermore, no statistically significant differences gave the action of Gremlin-1 between groups but only indications that inhibit the activity of BMP-7.

In conclusion, we inferred that BMP-7 is essential for steroidogenesis in human ovaries. It is able to regulate the levels of estradiol and progesterone during follicular development, ovulation and luteinization. This study is basic research that needs further investigation to determine the exact role of BMP-7 and her clinical relevance

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

Adriaenssens T, Segers I, Wathlet S and Smitz J (2011). The cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation. *J Assist Reprod Genet.* 28:31-40.

Anderson RA, Sciorio R, Kinnell H, Bayne RA, Thong KJ, de Sousa PA and Pickering S (2009) Cumulus gene expression as a predictor of human oocyte fertilization, embryo developmental competence establish a pregnancy. *Reprod.* 138:629-637.

Aoki H, Fujii M, Imamura T, Takehara K, Kato M and Miyazono K (2001). Synergistic effects of different bone morphogenetic protein type I receptors on alkaline phosphatase induction. *J Cell Sci.* 114:1483-1489.

Aono A, Hazana M, Notoya K, Takitomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S and Fujisawa Y (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 210:670-677.

Aspenderg P, Jeppson C and Economides AN (2001). The bone morphogenetic proteins antagonist noggin inhibits membranous ossification. *J Bone Miner Res.* 16:497-500.

Bai RY, Koester C, Ouyang T, Hahn SA, Hammerschmidt M, Peschel C and Duyster J (2002). SMIF, a smad-4 interacting protein that functions as a co-activator in TGF-beta signaling. *Nat Cell Biol.* 4:181-190.

Baker TG (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Land B Biol.* 158:417-433.

- Botchkaren VA (2002). Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle. *Biol Dermat Found.* 120(1):36-47.
- Canalis E, Economides AN and Gazzero Elisabetta (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton. *Endocr Rev.* 24(2):218-235.
- Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA and Wozney JM (1990). Identification of transforming growth factor β family members present in bone- inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci.* 87:9843-9847.
- Christenson L and Strauss J III (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim et Biophys Acta.* 1529:175-187.
- Craig ZR, Wang W and Flaws JA (2011). Endocrine- disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reprod.* 142:633-646.
- Derynck R (1994). TGF-beta-receptor mediated signaling. *Trends in Biochemical Sciences.* 19:548-553.
- Derynck R and Miyazono K (2008). TGF- β and the TGF- β family in the “ TGF- β family”. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. 29-43
- Dolan V, Murphy M, Sadlier D, Lappin D, Doran P, Godson C, Martin F, O' Meare Y, Schmid H, Henger A, Kretzler M, Droquett A, Mezzano S and Brady HR (2005). Expression of gremlin a bone morphogenetic protein antagonist in human diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis.* 45:1034-1039.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N and Matzuk M (1996). Growth differentiation factor- 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature.* 383:531-535.

- Drummond AE (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol and Endocrinol.*4:16
- Dudley AT, Lyons KM and Robertson EJ (1995). A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes & Development.* 9:2795-2807.
- Ebisawa T, Tada K, Kitajima I, Tojo K, Sampeth TK, Kawabata M, Miyazono K and Imamura T (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci.* 112:3519-3527.
- Elvin LA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM and Matzuk MM (1999). Paracrine action of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol.*13:1035-1048.
- Erickson GF and Shimasaki S (2003). The spatiotemporal expression patterns of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol & Endocr.*1:9
- Esch FS, Shimasaki S, Mercado M, Cooksey K, Ling N, Ying S, Veno N and Guillemin R (1987). Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol.*1:849-855.
- Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH and Miyazono K (1993). Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell.*75:681-692.
- Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH and Ritvos O (2000). Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 25:279-283.

- Gazzerro E, Pereira RC, Jorgetti V, Olson S, Economides AN and Canalis E (2005). Skeletal overexpression of gremlin impairs bone formation and causes osteopenia. *Endocrinol.*146:655-665.
- Gazzerro E and Canalis E (2006). Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* 7:51-65.
- Gillo F, Brevini TA, Antonini S, Paffoni A, Ragni G and Gandolfi F (2007). Association between human oocyte developmental competence and expression levels of some cumulus genes. *Reprod.* 134:645-650.
- Glister C, Kemp CF and Knight PG (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reprod.* 127:239-254.
- Glister C, Richards SL and Knight PG (2005). Bone morphogenetic proteins (BMP)-4-6-7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced androgen production by bovine theca internal cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in theca BMP signaling? *Endocrinol.*146:1883-1892.
- Glister C, Sutchell L and Knight PG (2011). Granulosa and thecal expression of bone morphogenetic protein- and activin-binding protein mRNA transcripts during bovine follicle development and factors modulating their expression in vitro. *Reprod.*142:581-591.
- Gougeon A (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod.* 1(2):81-87.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC and Carlson WD (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:878-883.

- Hanukoglu I (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem and Mol Biol.* 43:779-804.
- Hartsough MT and Mulder KM (1997). Transforming growth factor- beta signaling in epithelial cells. *Pharmacollagen Ther.* 75:21-41.
- Hata A, Seoane S, Lagna C, Montaluo I, Hemmati- Brivanloo A and Massague J (2000). OAZ uses distinct DNA and protein binding zinc fingers in separate BMP-smad and Olf signaling pathways. *Cell.*100:229-240
- Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M and Hsueh AS (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.*140:1236-1244
- Hayer C, Spink D, Spink B, Cao J and Walker N (1996). 17 β - Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *PNAS.* 93:9776-9781.
- Heldin CH, Miyazono K and ten Dijke P (1997). TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature.* 390:465-471.
- Hillier SG, Wickings EJ, Illingworth PI, Yong EL, Reichert LE Jr, Baird DT and McNeilly AS (1991). Control of immunoactive inhibin production by human granulosa cells. *Clin Endocrinol.* 35:71-78.
- Hogan BL (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development.* 10(13):1580-1594.
- Hsu DR, Economides AN, Wang X, Eimon PM and Harland RM (1998). The Xenopus dorsalizing factor gremlin identifies a novel family of secreted proteins that antagonize BMP activities. *Mol Cell.* 1:673-683.

- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M and Miyazono K (2000). Smad6 is a smad1/5-induced smad inhibitor characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse smad6 promoter. *J Biol Chem.* 239:1-14
- Ishitani T, Ninomiya- Tsui J, NagaiS-I, Nishika M, Meneghini M, Barker N, Waterman M, Bowerman B, Clevers H, Shibura H and Matsumoto K (1999). The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signaling between beta-catenin and transcription factor TCF. *Nature.* 399:798-802
- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Kaufmann RJ, Rosen V, Cox KA and Wozney JM (1996). Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth factors.*13:291-300.
- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK and Kaufman RJ (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth factors.* 7:139-150.
- Itoh S, Itoh F, Goumanis MS and ten Dijke (2000). Signaling of transforming growth factor- beta family members through smad proteins. *Eur J Biochem.* 267:6954-6967.
- Jamnongjit M and Hammes SR (2006). Ovarian steroids: The good, the bad and the signals that raise them. *Cell cycle.* 5(11):1178-1183.
- Jindal S, Greenseid K, Berger D, Santoro N and Pal L (2012). Impaired Gremlin1(Grem1) expression in cumulus cells in young women with diminished ovarian reserve (DOR). *J Assist Reprod Genet.* 29:159-162.
- Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC and Tucker RF (1994). Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth factors.* 11:215-225.

- Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ and McNatty KP (2006). The role of bone morphogenetic protein 2,4,6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction Reviews*. 131:501-513.
- Kawabata M, Imamura T and Miyazono K (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth factor Rev*.9:49-61.
- Kim RH, Wang D, Tsang M, Martins J, Huff C, de Caestecker MP, Parks WT, Meng X, Lechleider RT, Wana T and Roberts AB (2000). A novel smad nuclear interaction protein (SNIP1) suppressing p300- dependent TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*. 14:1605-1616.
- Kimura N, Matsuo R, Shibuya H, Nakashima K and Taga T (2000). BMP-2-induced apoptosis is mediated by TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem*. 275:17647-17652.
- Kingsley DM (1994). The TGF- β superfamily, new members, new receptors and new genetic tests of function in different organisms. *Genes & Dev*. 8:133-146.
- Knight PG and Glister C (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction Reviews*. 132:191-206.
- Koli K, Myllarniemi M, Vuoriken K, Salmenkivi K, Ryyananen MS, Kinnula VL and Keski-Oja J (2006). Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 169:61-71.
- Kumar TR, Wang Y, Lu N and Matzuk MM (1997) Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 15:201-204.
- Kusanagi K, Inove H, Ishidoo Y, Mishima HK, Kawabata M and Miyazono K (2000). Characterization of a bone morphogenetic protein- responsive smad-binding element. *Mol Biol Cell*. 11:555-565.

- Kusumato K, Bessho K, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y and Iizuka T (1997). Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant Xenopus BMP-4/-7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 239:575-579.
- Lappin DW, Hensey C, McMahon R, Godson C and Brady HR (2000). Gremlin glomeruli and diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 9:469-472
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK and Shimasaki S (2001). Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod.* 65:994-999.
- Lee WS, Yoon SJ, Yoon TK, Cha KY, Lee SH, Shimasaki S, Lee S and Lee KA (2004). Effects of bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) on primordial follicular growth in the mouse ovary. *Mol Reprod Dev.* 69:159-163.
- Li W, Chen F, Nagarajan RP, Liu X and Chen Y (2001). Characterization of the DNA-binding property of smad5. *Biochem Biophys Res Commun.* 286:1163-1169
- Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ and Kretser DM (2003). Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction.* 126:133-148.
- Liu F, Ventura F, Doody J and Massague J (1995). Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.* 15:3479-3486.
- Lu MM, Yang H, Zhang L, Shu W, Blair DG and Morrisey EE (2001). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin regulates proximal-distal patterning of the lung. *Dev Dyn.* 222:667-680.
- Luo G, Hofmann C, Bronckers AL, Sockci M, Bradley A and Karsenty G (1995). BMP-7 is an inducer of nephrogenesis and is also required for eye

development and skeletal patterning. *Genes Dev.* 9:2808-2820.

Lyons K, Graycar JL, Lee A, Hashmi S, Lindquist PB, Chen EY, Hogan BL and Derynck R (1999). Vgr-1 a mammalian gene related to *Xenopus* Vg-1 is a member of the transforming growth factor β gene superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:4554-4558.

Lyons KM, Hogan BLM and Robertson EJ (1995). Colocalization of BMP7 and BMP2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech Dev.* 50:71-83.

Lyons KM, Jones CM and Hogan BLM (1991). The DVR gene family in embryonic development. *Trends Genet.* 7:408-412.

Macias D, Ganan Y, Sampath TK, Piedra Me, Ros MA and Hurlle JM (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124:1109-1117.

Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, Buchwald M and Wrana JL (1998). Specific activation of *smd1* signaling pathways by the BMP-7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem.* 279(40):25628-25636.

Maheshwari A and Fowler PA (2008). Primordial follicular assembly in humans- revisited. *Zygote.* 4:285-296.

Martinovic S, Latin V, Suchanek E, Staulijenic Bukavina A, Sampeth KT and Vukicevic S (1996). Osteogenic protein-1 is produced by human fetal trophoblast in vivo and regulates the synthesis of chorionic gonadotrophin and progesterone by trophoblasts in vitro. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 34:103-109.

Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-791.

- Massague J and Cen Y-C (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14:627-644.
- Mc KD, Hertig AT, Adam EC and Danziger S (1953). Histochemical observations on the germ cells of human embryos. *Anat Rec.* 2:201-219.
- McGee and Hsueh AJ (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2:200-214.
- McKenzie LJ, Pangas SA, Carson SA, Kovanci E, Cisneros P, Buster JE, Amato P and Matzuk MM (2004). Human cumulus granulosa cell gene expression a predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Hum Reprod.* 19:2869-2874.
- McMahon R, Murphy M, Clarkson M, Taal M, Mackenzie HS, Godson C, Martin F and Brady HR (2000). IHG-2 a mesangial cell gene induced by high glucose, is human gremlin. Regulation by extracellular glucose concentration cyclic mechanical strain and transforming growth factor- β 1. *J Biol Chem.* 275:9901-9904.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN and Hurler JM (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development.* 126:5515-5522.
- Messinis IE (2006). Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Upd.* 12:557-571.
- Miller W (1988). *Molecular Biology of steroid hormone synthesis.* *Endocr Rev.* 9:295-318.
- Miller WL and Auchus RJ (2011). The molecular biology, biochemistry and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 32(1):81-151.

- Minabe Saegusa C, Saegusa H, Tsukahama M and Noguchi S (1998). Sequence and expression of a novel mouse gene PRDC(protein related to DAN and Cerberus) identified by a gene trap approach. *Dev Growth Differ.*40:343-353.
- Mitola S, Ravelli C, Moroni E, Salvi V, Ledi D, Ballmer-Hofer K, Zammataro L and Presta M (2010). Gremlin is a novel antagonist of the major proangiogenic receptor VEGFR2. *Blood.*116:3677-3680.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T and Miyazono K (2002). Two major smad pathways in TGF-beta superfamily signaling. *Genes Cells.* 7(12):1191-1204.
- Miyazono K, Hellmann U, Wernstedt C and Heldin CH (1988). Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1. *J Biol Chem.* 263:6407-6415.
- Miyazono K, Kusanagi K and Inoue H (2001). Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. *J Cell Physiol.* 187:265-276.
- Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T and Makino H (2006). Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Repr.* 74:1073- 1082
- Moore RK, Otsuka F and Shimasaki S (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *J Biol Chem.*278:304-310.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S and Heldin C-H (2001). Smad regulation in TGF- beta signal transduction. *J Cell Sci.* 114:4359-4369.
- Mulsant P, Lecerf F, Fabre S, Schibler L, Monget P, Lanneluc I, Pisselet C, Riquet J, Monniaux D, Callebaut I, Criqui E, Thimonier J, Teyssier J, Bodin L, Cognie Y, Chitour N and Elsen JM (2001). Mutation in bone

morphogenetic protein receptor- IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:5104-5109.

Myllarniemi M, Lindholm P, Ryynameen MS, Kliment VL, Oury TD and Koli K (2008). Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 177:321-329.

Nakamura K, Shirai T, Morishita S, Ushida S, Saeki-Miura K and Makishima F (1999). p38 Mitogen activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth differentiation factor 5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res*. 250:351-363.

Nakashima K, Yanagisawa M, Arakawa H, Kimura N, Hisatsuno T, Kawabata M, Miyazono K and Taqa T (1999). Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*. 284:479-482.

Namkoong H, Shin SM, Kim HK, Ha SA, Cho GW, Hur SY, Kim TE and Kim JW (2006). The bone morphogenetic protein antagonist gremlin1 is overexpressed in human cancers and interacts with YWHAH protein *BMC. Cancer*. 6:74.

Negarajan RP, Zhang J, Li W and Chen Y (1999). Regulation of smad7 promoter by direct association with smad3 and smad4. *J Biol Chem*. 274:33412-33418.

Nohe A, Hassel S, Ehrich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI and Knaus P (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. 277:5330-5338.

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

Onagbesan OM, Bruggeman P, Van AS, Tone K, Williams J and Decuypere E (2003). BMPS and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7

on granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 285:E973-E983.

Orisaka M, Tajima K, Tsang BK and Kostuji F (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovar Res.* 2:9.

Otsuka F, Moore RK and Shimasaki S (2001). Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein- 6 in the ovary. *J Biol Chem.* 276:32889-32895

Otsuka F, Yao Z, Lee TH, Yamamoto S, Erickson GF and Shimasaki S (2000). Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J Biol Chem.* 275:39523-39528.

Ozkaynak E, Jin DF, Jelic M, Vukicevic S and Oppermann H (1997). Osteogenic protein-1 mRNA is the uterine endometrium. *BiochemBiophys Commun.* 234:242-246.

Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Sampath TK and Oppermann H (1990). OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- β family. *Embo J.* 9:2085-2093.

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

Pangas SA, Li X, Robertson ES and Matzuk MM (2006). Premature luteinization and cumulus cell defects in ovarian-specific smad4 knockout mice. *Mol Endocrinol.* 20:1406-1422.

Parker L, Stathakis DG and Arora K (2004). Regulation of BMP and activin signaling in *Drosophila*. *Progress in Molecular & Subcellular Biology.* 34:73-101.

Passa O, Tsavalos S, Belyaev NN, Petryk A, Potocnik AJ and Graf D (2011). Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their

antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironment and functional implications. *Immunol.*134:349-359.

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

Pearson KL, Hunter T and Janknecht R (1999). Activation of smad1-mediated transcription by p300/CBP. *Biochem Biophys Res Commun.* 1487:354-364.

Penning T (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 18:281-305.

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

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

Rankin T, Familiar M, Lee E, Ginsberg A, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Drago J, Westphal H and Dean J (1996). Mice homozygous for an insertional mutation in the *Zp3* gene lack a zona pellucid and are infertile. *Develop.* 9:2903-2910.

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

Reddi AH (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology.* 16(3):247-252.

Reddi AH (2005). BMPs: from bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth factor Reviews.* 16(3):249-376.

- Richards JS and Panga SA (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Implic.* 120(4):963-972.
- Rizk B RBM, Garcia- Velasco JA, Sallam HN and Makrigiannakis A (2008). *Infertility and Assisted Reproduction.* Cambridge university press. Chap 2. pp10-24.
- Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM and Sporn MB (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(9):5339-5343
- Sakuta H, Suzuki R, Takahashi H, Kato A, Shintani T, Iemura S, Yamamoto T, Ueno N and Noda M (2001). Ventoptin: a BMP4 antagonist expressed in a double-gradient pattern in the retina. *Science.* 293:111-115.
- Savage-Dunn C (2001). Targets of TFG-beta-related signaling in *Caenorhabditis elegans.* *Cytokine & Growth factor Reviews.* 12(4):305-312.
- Schlunegger MP and Grutter MG (1992). An unusual feature revealed by the crystal structure at 2.2Å resolution of human transforming growth factor- β 2. *Nature.* 358:430-434.
- Sha G, Zhang Y, Zhang C, Wan Y, Zhao Z, Li C and Lang J (2009). Elevated levels of gremlin-1 in ectopic endometrium and perithelial serum in patients with endometriosis. *Fertil Steril.* 91:350-358.
- Shi W, Zhao J, Anderson KD and Warburton D (2001). Gremlin negatively modulates BMP-4 induction of embryonic mouse lung branching morphogenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 280:L1030-1039.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F and Erickson GF (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev.* 25:72-101.

- Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, Kim H, Iemura S, Veno N, Sampath K, Chang RJ and Erickson GF (1999). A functional of bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:7282-7287.
- Simon M, Maresh JG, Harris SE, Hernandez JD, Arar M, Olson MS and Abboud HE (1999). Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney. *Am J Physiol*. 276:F382-F389.
- Smits JEJ and Cortvriendt RG (2002). The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reprod Reviews*. 123:185-202.
- Souza CJH, MacDougall C, Campbell BK, McNeilly AS and Baird DT (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1B (BMPRII) gene. *J Endocrinol*. 169:R1-R6.
- Stanley E, Biben C, Kotecha S, Fabri L, Tajbakhsh S, Wang C-C, Hatzistaurou T, Roberts B, Drinkwater C, Lah M and Harvey RP (1998). DAN is a secreted glycoprotein related to *Xenopus* Cerberus. *Mech Dev*. 77:173-174.
- Stocco D (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Ann Rev Physiol*. 63:193-213
- Strauss J III, Kallen C, Christenson L, Watari H, Devoto L, Arakane F and Kiriakidou M (1999). The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Rec Prog Horm Resear*. 54:394.
- Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG and Latham JA (2004). Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone*. 35:828-835.

- Suzuki A, Kaneko E, Maeda J and Veno N (1997). Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:153-156.
- ten Dijke P, Goumans MS, Itoh F and Itoh S (2002). Regulation of cell proliferation by smad proteins. *J Cell Physiol.* 191:1-16.
- ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K and Heldin CH (1994a). Characterization of type I receptors for transforming growth factor- beta and activin. *Science.* 264:101-104.
- ten Dijke P, Yamashita H, Sampath TK, Reddi AH, Estevez M, Riddle DL, Ichijo H, Heldin CH and Miyazono K (1994b). Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem.* 269:16985- 16988.
- tenDijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldi CH and Miyazono K (1993). Activin receptor- like kinases: a novel subclass of cell- surface receptors with predicted serine/ threonine kinase activity. *Oncogene.* 8:2879-2887.
- Tingen C, Kim A and Woodruff TK (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod.* 15(12):795-803.
- Topol LZ, Bardot B, Zhang Q, Resow J, Huillard E, Marx M, Calothy G and Blair DG (2000). Biosynthesis, post-translation modification and functional characterization of drm/gremlin. *J Biol Chem.* 275:8785-8793.
- Topol LZ, Marx M, Laugier D, Bogdanova NN, Boubnov NV, Clausen PA, Calothy C and Blair DG (1997). Identification of drm a novel gene whose expression is suppressed in transformed cells and which can inhibit growth of normal but not transformed cells in culture. *Moll Cell Biol.* 17:4801-4810.

- Tsuchida K, Arai KY, Kuramoto Y, Yamakawa N, Hasegawa Y and Sugino H (2000). Identification and characterization of a novel follistatin- like protein as a binding protein for the TGF- β family. *J Biol Chem.* 275:40788-40796.
- Tsuchiya Y, Nakajima M and Yokoi T (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Canc Lett.* 227:115-124.
- Urist MR (1965). Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150:893-899.
- Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, Dorfman RL, Boyd SD, McDowell RM and Chien C (1973). Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 70:3511-3515.
- Urist MR, Mikulski A and Lietze A (1979). Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:1828-1832.
- Van Bezooijen RL, Karperien M, Visser A, Hamersma H, Winkler D, Hayes T, Skonier J, Staehling-Hampton K, Latham JA, Papapoulos SE, Lowik CWG (2002). BMP-antagonist sclerostin is expressed in mineralized bone and blocks BMP-induced bone formation in vitro. *J Bone Miner Res.* 16(Suppl 1):S163.
- Vitt UA, Hsu SY and Hsueh AJW (2001). Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol.* 15:681-694.
- von Bubnoff A and Cho KWY (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrate pathway or network? *Dev Biol.* 239:1-14
- Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi AH and Sampath TK (1999). Localization of osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) during human embryonic development: High affinity binding to basement membranes. *Biochem Biophys Res Commun.* 198:693-700.

- Walsh DW, Roxburgh SA, McGettigan P, Berthier CC, Higgins DG, Kretzler M, Cohen CD, Mezzano S, Brazil DP and Martin F (2008). Co-regulation of gremlin and Notch signaling in diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Acta*.1782:10-21.
- Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DH, McQuid D, Moutsatsos IK, Nove J and Wozney JM (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87:2220-2224.
- Wang S-N, Lapage J and Hirschberg R (2001). Loss of tubular bone morphogenetic protein-7 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 12:2392-2399.
- Wang W, Mariani FW, Harland RM and Luo K (2000). Ski represses bone morphogenetic protein signaling in *Xenopus* and mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci*. 97:14394-14399
- Wilson T, Wu X-Y, Juengel JL, Ross IK, Lumsden JM, Lord EA, Dodds KG, Walling GA, McEwan JC, O'Connell AR, McNatty KP and Montgomery GW (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. *Biol Reprod*. 64:1225-1235.
- Winkler DG, Yu C, Geoghegan JC, Ojala EW, Skonier JE, Shpektor D, Sutherland MK and Latham JA (2004). Noggin and sclerostin bone morphogenetic protein antagonists form a mutually inhibitory complex. *J Biol Chem*. 279:36293-36298.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitscock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM and Wang CA (1988). Novel regulators of bone formation molecular clones and activities. *Science*. 242:1528-1534.

- Wozney JR and Rosen V (1998). Bone morphogenetic proteins and the bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Rel Res.* 346:26-37.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF and Massague J (1992). TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71:1003-1014.
- Wu XB, Li Y, Schneider A, Yu W, Rajendren G, Iqbal J, Yamamoto M, Alam M, Brunet LJ, Blair HC, Zaidi M and Abe E (2003). Impaired osteoblastic differentiation reduced bone formation and severe osteoporosis in noggin-over expressing mice. *J Clin Invest.* 112:924-934.
- Yamaguchi K, Nagai S-I, Ninomiya-Tsui J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H and Natsumoto K (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J.* 18:179-187.
- Yamaguchi K, Shirakade K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E and Matsumoto K (1995). Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF- β signal transduction. *Science.* 270:2008-2011.
- Yamashita H, ten Dijke P, Huylebroeck D, Sampath TK, Andries M, Smith JC, Heldin CH and Miyazono K (1995). Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects. *J Cell Biol.* 130:217-226.
- Yen SSC (1977). Regulation of the hypothalamic- pituitary- ovarian axis in women. *J Reprod Fert.* 51:181-191.
- Ying Y and Zhao G-Q (2000). Detection of multiple bone morphogenetic protein messenger ribonucleic acids and their signal transducer smad1, during mouse decidualization. *Biol Reprod.* 63:1781-1786.

Yoshida Y, Tanaka S, Umemero H, Minowa O, Usui M, Ikematsu N, Hosoda E, Imamura T, Kuno J, Yamashita T, Miyazono K, Noda T and Yamamoto T (2000) Negative regulation of BMP/Smad Signaling by Tob in osteoblasts. *Cell*. 103:1085-1097.

Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E and Bloch KD (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 280:24443-24450.

Zeisberg M and Kalluri R (2008). Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 23:1395-1398.

Zhang D, Gaussin V, Taffet GE, Belaguli NS, Yamada M, Schwartz RJ, Michael LH, Overbeek PA and Schneider MD (2000). TAK1 is activated in the myocardium after pressure overload and is sufficient to provoke heart failure in transgenic mice. *Nat Med*. 5:556-563

Zhao GQ, Deng K, Labosky PA, Liaw L and Hogan BL (1996). The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. *Genes Dev*. 10:1657-1669.

Ελληνική βιβλιογραφία:

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