



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση εμμηνόπαυσης στα επίπεδα έκφρασης των
BMPR-Ια και BMPR-Ιβ mRNA ωθηκικού ιστού»

ΕΥΑΝΘΙΑ ΑΓΓΕΛΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2013

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ- ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ, ΚΛΙΝΙΚΟΣ ΕΜΒΡΥΟΛΟΓΟΣ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Αρχικά τον Καθηγητή κύριο Βαμβακόπουλο Νικόλαο για την άψογη συνεργασία που είχαμε τους μήνες αυτούς, την φιλοξενία του στον εργαστηριακό του χώρο και την συνεχή καθοδήγηση του. Να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κύριο Ιωάννη Μεσσήνη και τον Κλινικό Εμβρυολόγο κύριο Γεώργιο Σπυρίδων Ανυφαντή για την καθοδήγηση τους στη διάρκεια των σπουδών μου. Επίσης να ευχαριστήσω τον κύριο Σπύρο Κουρή για την συμβολή του στην πειραματική διαδικασία, την συνάδελφο και φίλη Αλίκη Κεραμίδα για την συνεργασία που είχαμε εντός και εκτός του εργαστηρίου. Τέλος να ευχαριστήσω την οικογένειά μου και τους κοντινούς μου ανθρώπους που ήταν δίπλα μου σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΩΟΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ	3
ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ	4
ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ	5
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ	6
ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	9
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	10
ΣΥΛΛΟΓΗ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ	10
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA	11
ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA	12
REAL TIME PCR	12
ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	14
ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ REAL-TIME PCR	15
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	15
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	16
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	27

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ωοθυλακιογένεση στη γυναίκα είναι μια συνεχής διαδικασία από την εμβρυική ζωή μέχρι την εμμηνόπαυση. Στις ωοθήκες υπάρχουν ωοθυλάκια σε όλα τα στάδια από το αρχέγονο μέχρι το προωοθυλακιόρρηκτικό. Προκειμένου να υπάρχει σωστή ανάπτυξη των ωοθυλακίων και κατά συνέπεια φυσιολογική αναπαραγωγική λειτουργία στη γυναίκα απαιτείται η συνεργασία πολλών και διαφορετικών παραγόντων στα διάφορα στάδια της ωοθυλακιογένεσης.

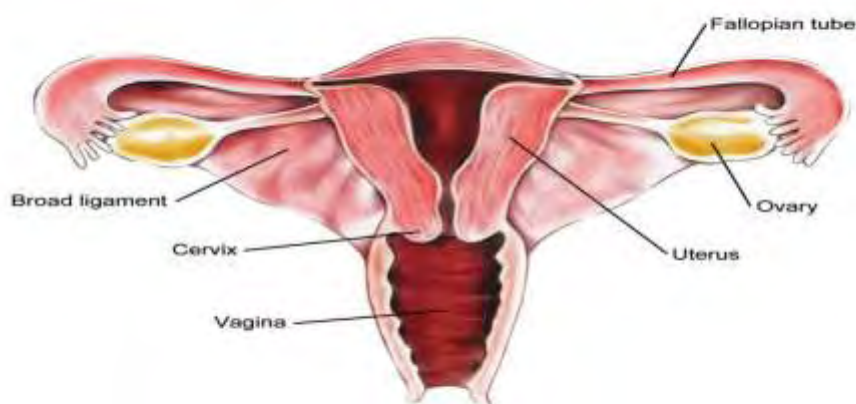
Η υπερ-οικογένεια TGFβ είναι η μεγαλύτερη οικογένεια εκκρινόμενων πρωτεϊνών στα θυλαστικά και τα μέλη της σχετίζονται σε πολλές αναπτυξιακές και φυσιολογικές διαδικασίες. Στην ωοθυλακιογένεση και συγκεκριμένα στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων από το αρχέγονο μέχρι το πρωτογενές και το δευτερογενές στάδιο, συμμετέχουν παράγοντες όπως ο BMP15, ο BMP6 και ο GDF9 που εκκρίνονται από το ωοκύτταρο, ο BMP2, ο BMP5, ο BMP6, η AMH, η inhibin και η activin από τα κοκκώδη κύτταρα και από τα κύτταρα της θήκης οι παράγοντες BMP4, BMP7, TGFβ. Οι παράγοντες αυτοί είναι υπεύθυνοι για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και δρουν μέσω δύο τύπων υποδοχέων, τύπου I και τύπου II σχηματίζοντας σύμπλοκα.

Στην παρούσα μελέτη μελετάμε την έκφραση δύο υποδοχέων που ανήκουν στην κατηγορία τύπου I, του BMPR1a και του BMPR1β σε ωοθηκικό ιστό που συλλέξαμε κατά τη διάρκεια χειρουργείων ολικής υστερεκτομής μετ'εξαρτημάτων. Μετά την ομογενοποίηση του ιστού απομονώσαμε ολικό RNA και το μετατρέψαμε σε cDNA το οποίο με την επιλογή ειδικών εκκινητών για τα δύο γονίδια το επεκτήναμε στο μηχανήμα της Real Time PCR. Για να είναι οι μετρήσεις μας αξιόπιστες επεκτείνουμε παράλληλα με τα mRNA των γονιδίων μας και τον γενικό δείκτη ιστικής ζωτικότητας GAPDHmRNA, σαν μάρτυρα, και τα αποτελέσματα εκφράζονται σαν λόγος του ειδικού προς το γενικό δείκτη ωοθηκικής έκφρασης (BMPR1αmRNA/GAPDHmRNA και BMPR1βmRNA/GAPDHmRNA) κάθε ιστού. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων δεκατεσσάρων συνολικά περιστατικών (7 προ-εμμηνόπαυσια και 7 μετεμμηνόπαυσιακά) έδειξε ότι οι λόγοι BMPR1αmRNA/GAPDHmRNA και BMPR1βmRNA/GAPDHmRNA παραμένουν σταθεροί και αμετάβλητοι, είναι ανεξάρτητοι και δεν επηρεάζονται από την κατάσταση της εμμηνόπαυσης και την ηλικία των γυναικών. Τα αποτελέσματα αυτά λοιπόν φαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι στην ομάδα των γυναικών που μελετήθηκε, ο ωοθηκικός ιστός βρίσκεται σε κατάσταση λειτουργικής ετοιμότητας. Φαίνεται συνεπώς ότι η βιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος της γυναίκας δεν διαφέρει ιδιαίτερα από τη γενικότερη βιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος του άντρα της αντίστοιχης ηλικιακής ομάδας.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

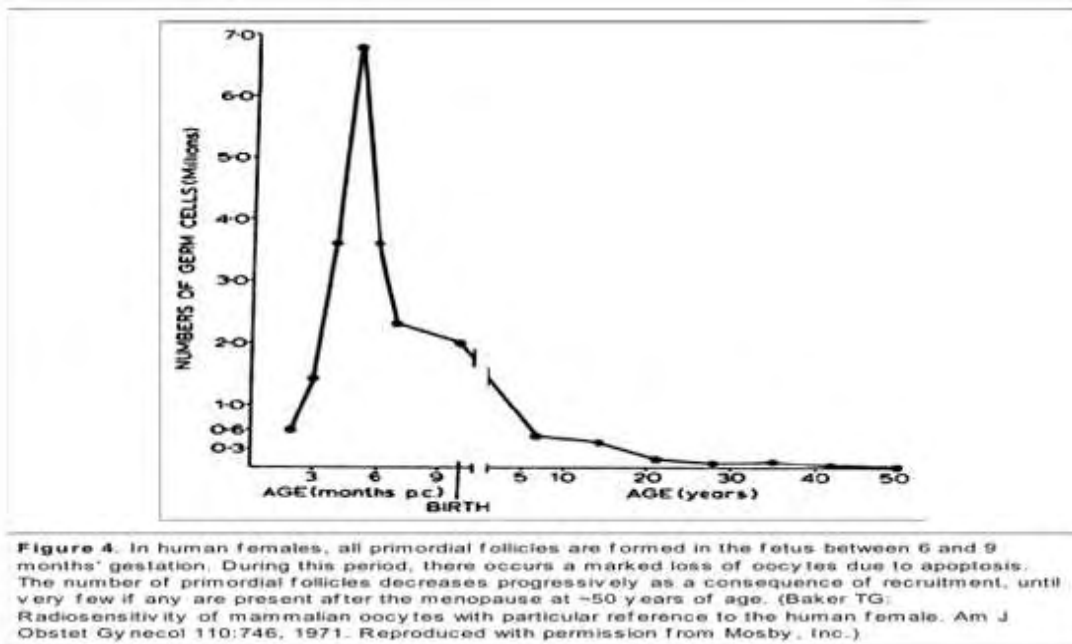
ΩΟΘΗΚΕΣ ΚΑΙ ΩΟΘΥΛΑΚΙΑ

Οι ωοθήκες είναι τα κύρια όργανα αναπαραγωγής του γυναικείου συστήματος. Είναι ενδοκρινείς αδένες με διπλό ρόλο. Είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των ωαρίων αλλά και την έκκριση στεροειδών και μη ορμονών (εικόνα 1)



Εικόνα 1 Θέση των ωοθηκών στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα.

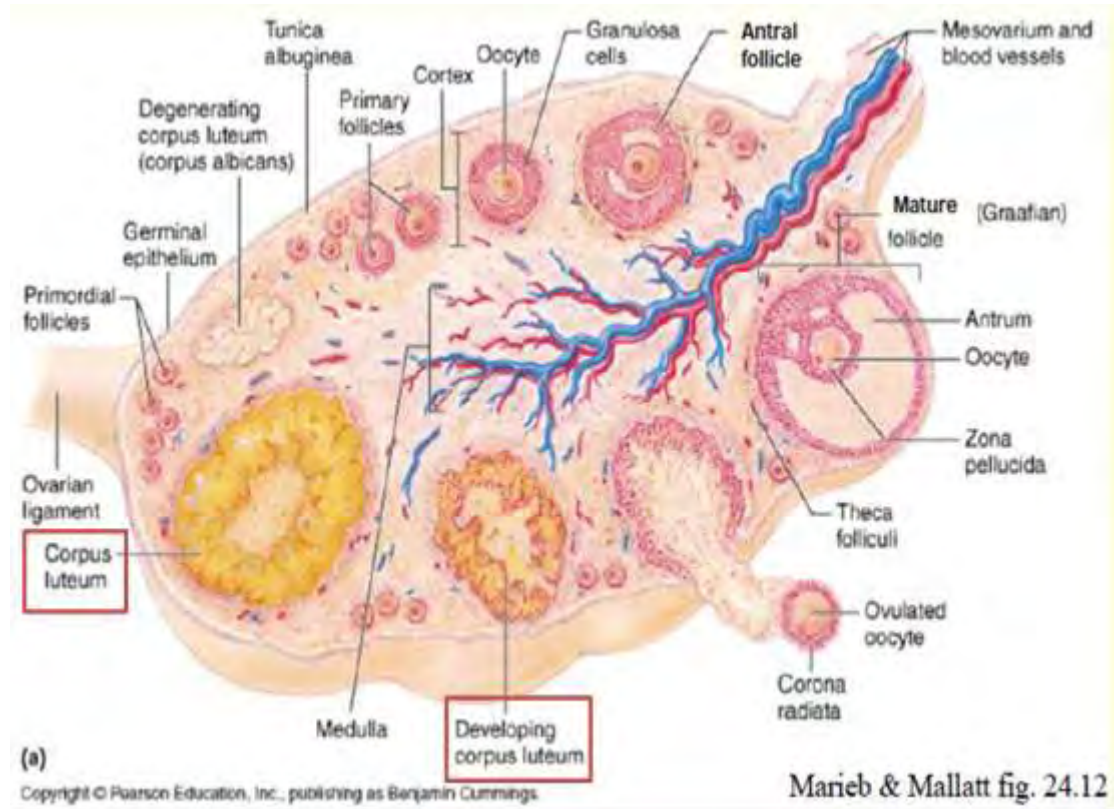
Κύριο χαρακτηριστικό των ωοθηκών είναι ότι λειτουργούν για ορισμένο χρονικό διάστημα στη ζωή μιας γυναίκας καθορίζοντας έτσι την διάρκεια της αναπαραγωγικής της ηλικίας. Η έναρξη της λειτουργίας τους ορίζεται από την εμφάνιση της πρώτης περιόδου (εμμηναρχή) και η λήξη με την εμφάνιση της τελευταίας (εμμηνόπαυση). Τα ωοθυλάκια που αποτελούν τις βασικές μονάδες του αναπαραγωγικού συστήματος βρίσκονται στις ωοθήκες από την 20^η εβδομάδα κύησης όπου ο αριθμός τους φτάνει τα 6 εκατομμύρια. Από το σημείο αυτό και μετά ο αριθμός τους υφίσταται συνεχή μείωση με αποτέλεσμα τη στιγμή της γέννησης να υπάρχουν στις ωοθήκες 1 εκατομμύριο ωοθυλάκια ενώ κατά την έναρξη της ήβης έχουν μειωθεί στις 300 χιλιάδες (εικόνα 2).



Εικόνα 2 Αριθμός των ωοθυλακίων από το σχηματισμό τους μέχρι την εξάντληση των αποθεμάτων τους.

ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

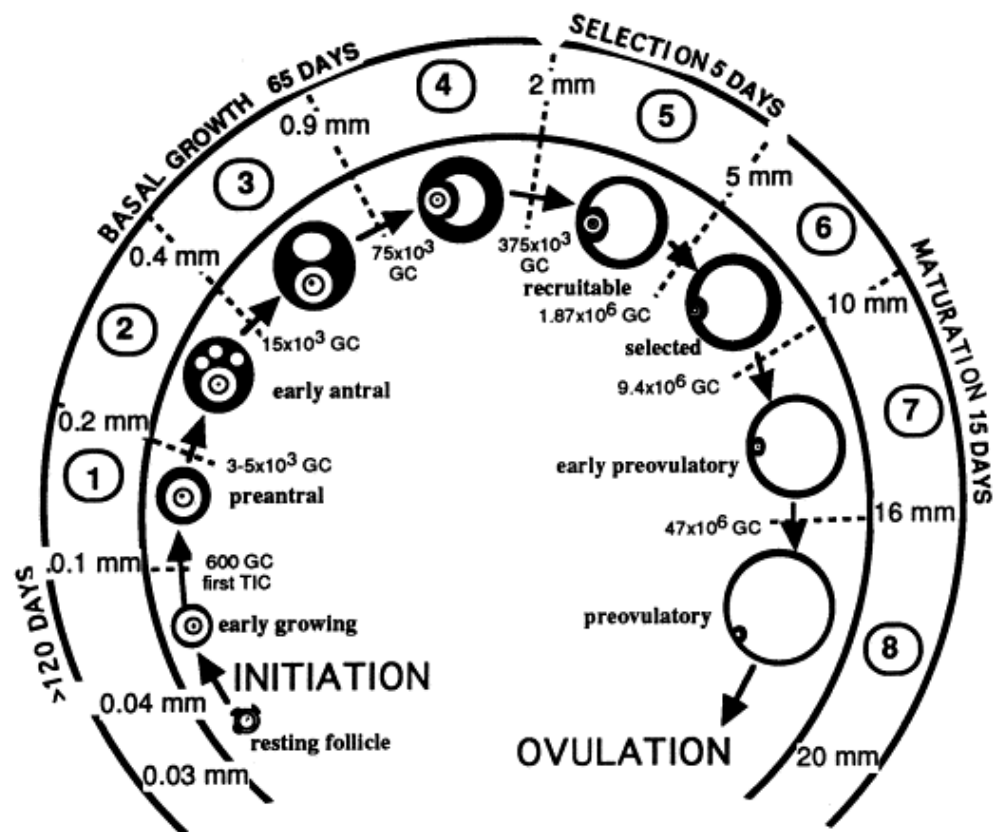
Τα ωοθυλάκια βρίσκονται στις ωοθήκες σε διάφορες μορφές (εικόνα 3). Η αρχική μορφή απ την οποία προκύπτουν όλες οι υπόλοιπες είναι το αρχέγονο ωοθυλάκιο το οποίο έχει διάμετρο 30-60μm και αποτελείται από το ωοκύτταρο στο στάδιο της δικτυοστενίας και μια στιβάδα προκοκκωδών κυττάρων να το περιβάλλουν. Στη συνέχεια το πρωτογενές ωοθυλάκιο στο οποίο τα κοκκώδη κύτταρα έχουν κυβοειδές σχήμα, αμέσως μετά το δευτερογενές προκοιλοτικό όπου έχουν σχηματιστεί πολλές στιβάδες κοκκωδών κυττάρων (κοκκώδη στιβάδα) γύρω από τη διάφανη ζώνη που περικλείει το ωάριο. Στο ώριμο προκοιλοτικό ωοθυλάκιο έχει σχηματιστεί μία ακόμα στιβάδα κυττάρων- έσω θήκη- έξω από την κοκκώδη στιβάδα και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Ανάμεσα στην κοκκώδη στιβάδα και στα κύτταρα της έσω θήκης υπάρχει η βασική μεμβράνη και γύρω από την έσω θήκη η έξω θήκη. Με το σχηματισμό του άντρου το ωοθυλάκιο φτάνει στο στάδιο του κοιλοτικού ωοθυλακίου και τέλος στο ώριμο γρααφιανό ή προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο(18-20mm).



Εικόνα 3 Διάφορες μορφές ωοθυλακίων στην ανθρώπινη ωοθήκη

ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ

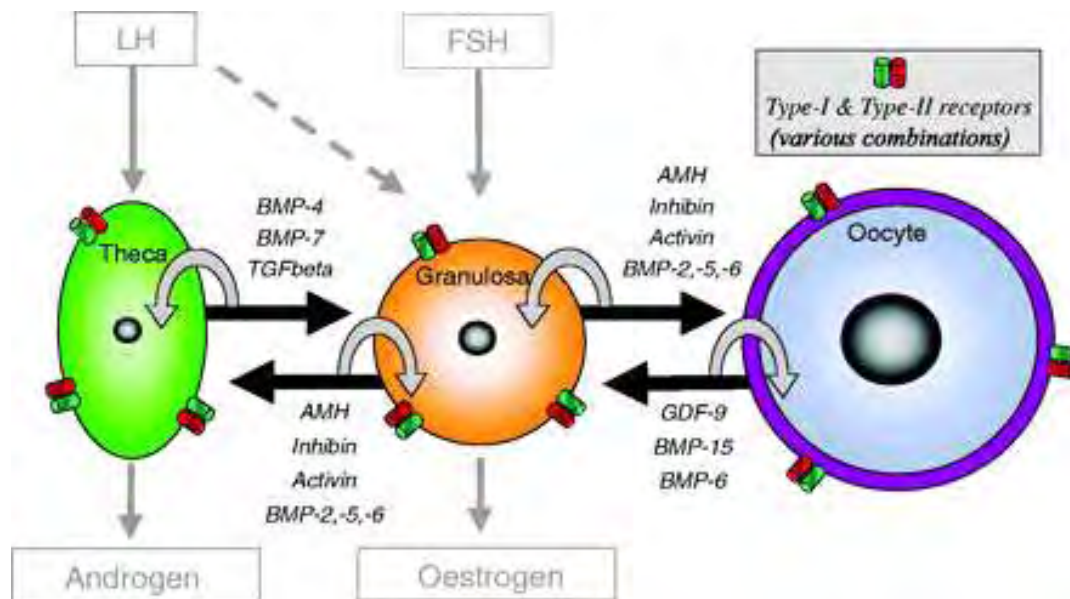
Από τα κοιλιοτικά ωοθυλάκια κάθε μήνα ένα επιλέγεται για περαιτέρω ανάπτυξη και φτάνει στο στάδιο του γραφιανού ωοθυλακίου που υφίσταται ρήξη. Η ωοθυλακιογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία ανάπτυξης. Εκτιμάται ότι από το στάδιο του αρχέγονου ωοθυλακίου μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό (γραφιάνο) ωοθυλάκιο απαιτείται ένα περίπου έτος (Gougeon, 1986) (Messinis, 2008). Τα ωοθυλάκια ταξινομούνται με βάση το μέγεθος τους και τον αριθμό των κοκκωδών τους κυττάρων σε 8 κατηγορίες αρχίζοντας από το στάδιο του προκοιλιοτικού ωοθυλακίου (κατηγορία 1), η κατηγορία 2 αντιστοιχεί στο στάδιο του αρχόμενου κοιλιοτικού, η κατηγορία 5 στο κοιλιοτικό μεγέθους 5mm και τέλος η κατηγορία 8 στο προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (εικόνα 4).



Εικόνα 4 Κατάταξη των ωοθυλακίων.

ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΩΝ

Η ανάπτυξη αυτή των ωοθυλακίων απαιτεί ακριβή συντονισμό τόσο ενδοωοθυλακικών όσο και εξωωοθυλακικών παραγόντων (Edson, Nagaraja, & Matzun, 2009) (Sugiura, Su, Li, Wigglesworth, Matzuk, & Erppig, 2010) καθώς η ωοθυλακιόρρηξία στο μέσο του καταμήνιου κύκλου αποτελεί τη βάση της γονιμότητας στα θηλυκά θηλαστικά (Shimasaki, Zachow, Li, & al, 1999) (Erickson, 1995). Απαιτείται αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων καθώς και μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων της θήκης (Erppig, 2001). (Knight & Glistler, 2006) Τα πιο προχωρημένα στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων συμπεριλαμβανομένου του σταδίου επιλογής του κυρίαρχου ωοθυλακίου εξαρτώνται επίσης από ενδοκρινή σήματα και ιδιαίτερα από τις γοναδοτροφίνες και από μεταβολικές ορμόνες που δρουν σε υποδοχείς στους δύο τύπους σωματικών κυττάρων και αλληλεπιδρούν με ποικιλία τοπικά παραγόμενων παραγόντων με αυτοκρινή/παρακρινή τρόπο ώστε να συντονίσουν και να ελέγξουν την κυτταρική λειτουργία (Knight & Glistler, 2006) . (εικόνα 5)

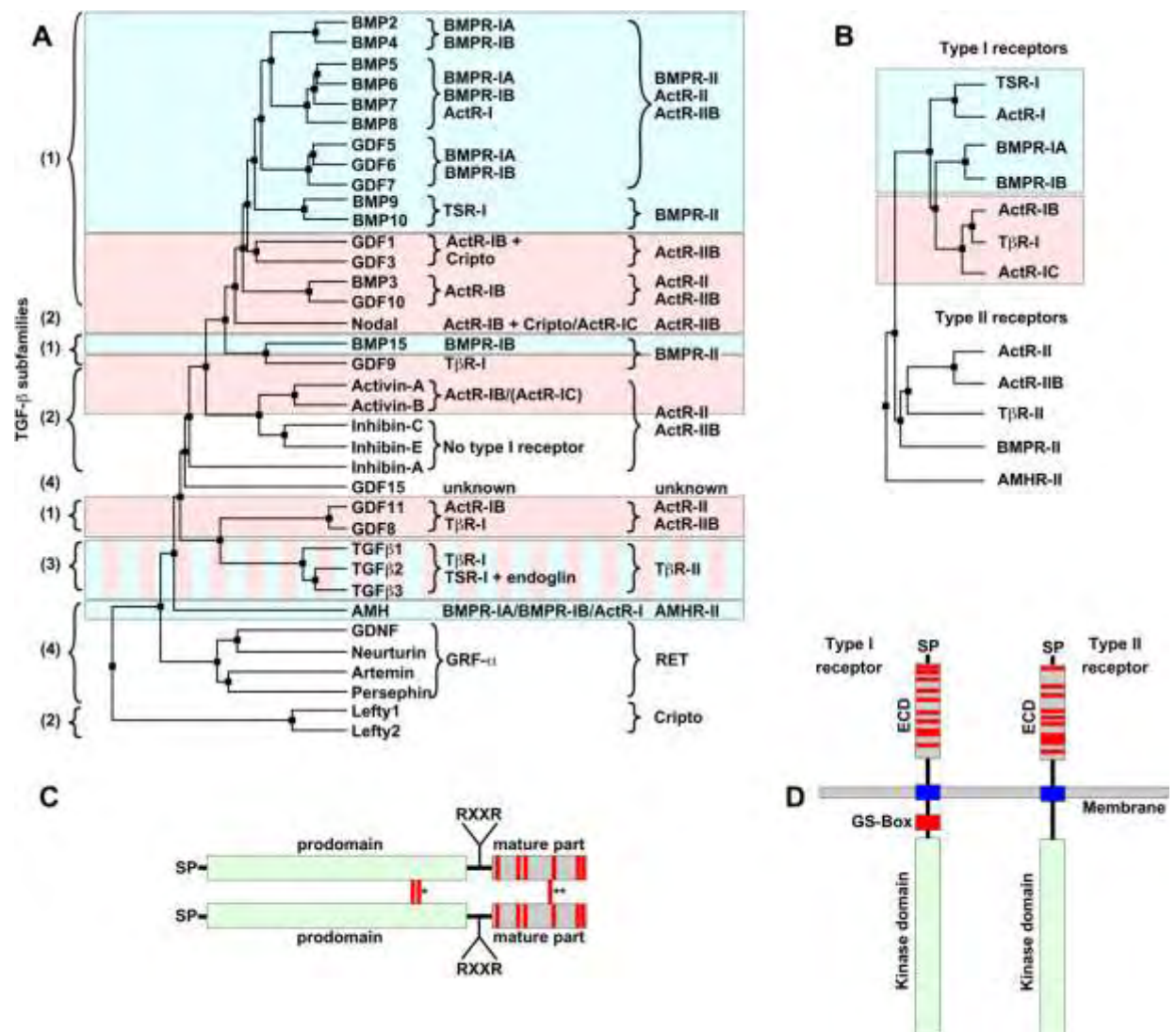


Εικόνα 5 Μέλη της υπερικογένειας TGF-β συμμετέχουν σε αμφίδρομη επικοινωνία μεταξύ του ωοκυττάρου και των κοκκωδών κυττάρων και μεταξύ των κοκκωδών και των κυττάρων της θήκης. (τα γκρι βελάκια δηλώνουν αυτοκρινή δράση ενώ τα μαύρα παρακρινή τρόπο δράσης)

Το ίδιο το ωάριο παράγει και εκκρίνει αυξητικούς παράγοντες ώστε να συντονίσει την αναπτυξιακή πορεία που ακολουθεί το ωοθυλάκιο (Eppig, 2001) (Matzuk, Burns, Viveiros, & Eppig, 2002) (Sugiura & Eppig, 2005) (Su, Sugiura, & Eppig, 2009) (Sugiura, Su, Li, Wigglesworth, Matzuk, & Eppig, 2010) περιλαμβανομένων των BMPs (bone morphogenetic proteins).

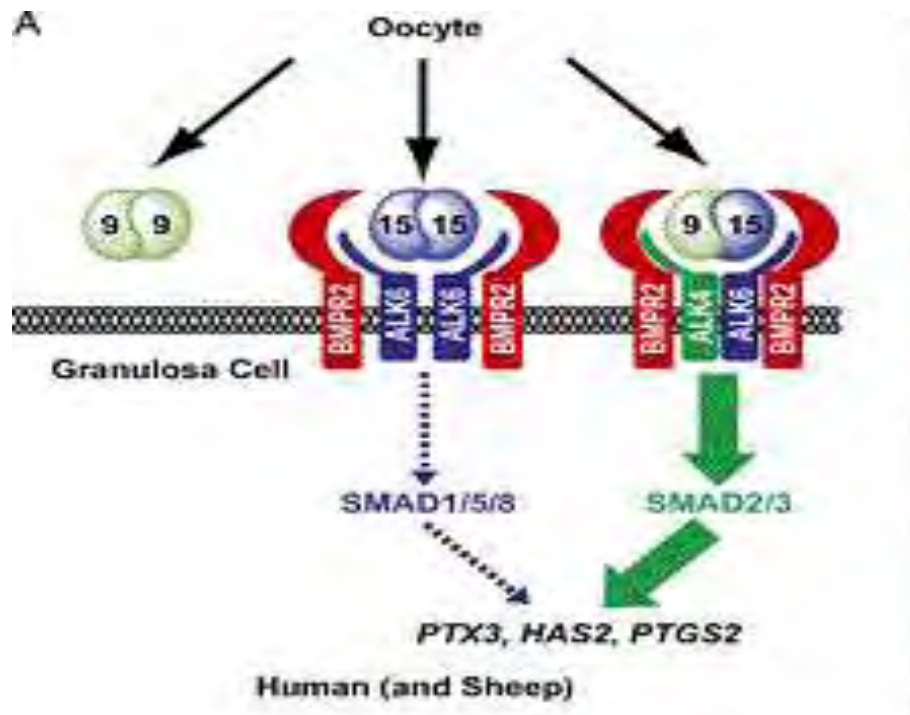
Οι BMPs αποτελούν μια μεγάλη ομάδα πολυπεπτιδίων που ανήκουν στην υπερικογένεια των TGFβ και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην μορφογένεση των ιστών και στην λειτουργία τους (Shimasaki, Moore, Otsuka, & Erickson, 2004) (Wang & Roy, 2009), στην ρύθμιση της ανάπτυξης, διαφοροποίησης και απόπτωσης διαφόρων τύπων κυττάρων (Glister, Kemp, & Knight, 2004). Αρκετοί BMPs συμμετέχουν στην ωοθυλακική εξέλιξη με αυτοκρινικούς/ παρακρινικούς μηχανισμούς (Elvin, Clark, Wang, Wolfman, & Matzuk, 1999), (Shimasaki, Zachow, Li, & al, 1999). Για παράδειγμα ο BMP-4 και ο BMP-7 εκφράζονται στα κύτταρα της θήκης σε αρουραίους (Shimasaki, Zachow, Li, & al, 1999), ο BMP-3 εκφράζεται στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα του ανθρώπου (Jaatinen, Rosen, Tuuri, & Ritvos, 1996), ο BMP-15 και ο BMP-6 εκφράζονται από τα ωοκύτταρα σε πρώιμα στάδια ωοθυλακίων και σε πρωτογενή ωοθυλάκια στα τρωκτικά και σε αρχέγονα ωοθυλάκια σε αγελάδες και πρόβατα (McGrath, Esquela, & Lee, 1995) (Jaatinen, et al.) (Bodensteiner, Clay, Moeller, & Sawyer, 1999) (Elvin, Yan, & Matzuk, Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility., 2000) (McNatty, Juengel, Wilson, Galloway, & Davis, 2001) (Knight & Glister, 2006). Ο BMP-15 όπως και ο GDF-9 εκφράζονται από το ωοκύτταρο σε πρώιμα στάδια της ωοθυλακιογένεσης στον άνθρωπο και συγκεκριμένα ο BMP-15 είναι παρόν σε πρωτογενή ωοθυλάκια όταν αυτά περικλείονται πλήρως από μία τουλάχιστον σειρά κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων (Otsuka, Yao, Lee, Yamamoto, Erickson, & Shimasaki, 2000). Σε αντίθεση με τον GDF-9 ο BMP-15 εκφράζεται επίσης και εκτός ωοθήκης (Otsuka & Shimasaki, 2002) (Mueller & Nickel, 2012).

Οι BMPs φαίνεται να δρουν στα κύτταρα στόχους μέσω δύο τύπων υποδοχών, ο τύπος I περιλαμβάνει τους BMPR1α (ALK3) και BMPR1β(ALK6), ενώ ο δεύτερος τύπος τον BMPR-II (Shimasaki, Zachow, Li, & al, 1999) (Shimasaki, Moore, Otsuka, & Erickson, 2004) (Wang & Roy, 2009) , (εικόνα 6).



Εικόνα 6 Α. Φυλογενετική ανάλυση των προσδετών της υπερικογένειας TGFβ. Β. Φυλογενετικό δένδρο των TGFβ υποδοχών τονίζοντας την ταξινόμηση των υποδοχών τύπου I και τύπου II. C. Οι προσδέτες TGFβ συνθέτονται ως διμερή προ-πρωτεΐνες και περιλαμβάνουν ένα N-τελικό άκρο-σήμα (SP), μια μεγάλη prodomain και ένα C-τελικό άκρο. D. Η αρχιτεκτονική των υποδοχών τύπου I και τύπου II.

Ενώ οι δύο τύποι υποδοχών έχουν διαφορές στην εξωκυττάρια περιοχή- περιοχή δέσμευσης του προσδέτη (Newfeld, Wisotzkey, & Kumar, 1999), η κατάταξή τους γίνεται με την παρουσία ενός τμήματος πλούσιου σε γλυκίνη/σερίνη (GS-box) κοντά στο διαμεμβρανικό τμήμα του υποδοχέα τύπου I (εικόνα 6) (Mueller & Nickel, 2012). Ο BMP-15 δρα είτε σχηματίζοντας ομοδιμερή BMP-15/BMP-15 είτε σχηματίζοντας ετεροδιμερές με τον GDF-9, και χρειάζεται δύο υποδοχείς από κάθε τύπο σχηματίζοντας έτσι ετεροτετραμερές σύμπλοκο υποδοχών (εικόνα 7) (Mueller & Nickel, 2012) (Peng, et al., 2013)



Εικόνα 7 Τρόπος δράσης του ομοδιμερούς και του ετεροδιμερούς συμπλόκου

Η ενεργοποίηση του συμπλόκου των υποδοχέων γίνεται με φωσφορυλίωση του υποδοχέα τύπου I από τον τύπου II και στη συνέχεια φωσφορυλιώνονται οι πρωτεΐνες Smad. Οι Smad πρωτεΐνες είναι μεταγραφικοί παράγοντες που μετά την ενεργοποίησή τους μεταφέρονται στον πυρήνα και σε συνεργασία με συν-ενεργοποιητές και συν-καταστολείς ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (Mueller & Nickel, 2012). Το ομοδιμερές BMP-15/BMP-15 δεσμεύεται σε σύμπλοκο υποδοχέων BMPRIβ/BMPRII και ενεργοποιεί το μονοπάτι των SMAD1/5/8 ενώ το ετεροδιμερές BMP-15/GDF-9 σε σύμπλοκο BMPRIβ/BMPRII/ALK-4 και ενεργοποιεί το μονοπάτι των SMAD2/3 (εικόνα 7) (Mueller & Nickel, 2012) (Peng, και συν., 2013)

ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορίσει αν η εμμηνόπαυση επηρεάζει την έκφραση των BMPRIα και BMPRIβ mRNA και αν οι λόγοι BMPRIα/GAPDH και BMPRIβ/GAPDH επηρεάζονται από την ηλικία της γυναίκας.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΣΥΛΛΟΓΗ ΩΟΘΗΚΙΚΟΥ ΙΣΤΟΥ

Η λήψη του ιστού πραγματοποιήθηκε στη διάρκεια χειρουργείων ολικής υστερεκτομής μετέξαρτημάτων, στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και κατόπιν συνεννοήσεως με τους υπεύθυνους γιατρούς- χειρουργούς. (πίνακας 1) Ο ιστός τοποθετήθηκε αμέσως σε eppendorf των 2ml με TRIzol 700μl και αποθηκεύτηκε σε κατάψυξη (-20°C) μέχρι την ομογενοποίηση του. Το TRIzol είναι ένα αντιδραστήριο που παρέχει υψηλής ποιότητας άθικτο RNA από διάφορα είδη κυττάρων και ιστών. Χρησιμοποιείται είτε για απομόνωση ολικού RNA είτε για ταυτόχρονη απομόνωση RNA DNA και πρωτεϊνών από ποικίλες βιολογικές πηγές περιλαμβανομένων δειγμάτων ανθρώπινης, ζωικής, φυτικής, βακτηριακής και ιικής προέλευσης. Η ομογενοποίηση έγινε αρχικά με τον τεμαχισμό κάθε δείγματος με τη χρήση νυστερίων και στη συνέχεια με τη χρήση ομογενοποιητή μέχρι το δείγμα να αποκτήσει μια ομοιόμορφη μορφή.

Πίνακας 1. Βιολογικά χαρακτηριστικά γυναικών μελέτης:

ΠΡΟ= Προεμμηνοπαυσιακό στάδιο, ΜΕΤ= Μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο.

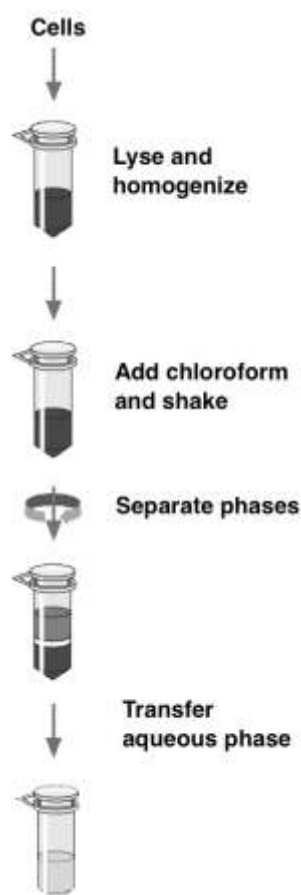
ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΣΤΑΔΙΟ	ΗΛΙΚΙΑ
1	ΠΡΟ	47
2	ΠΡΟ	43
3	ΠΡΟ	46
4	ΜΕΤ	63
5	ΜΕΤ	72
6	ΜΕΤ	75
7	ΜΕΤ	57
8	ΠΡΟ	52
9	ΠΡΟ	48
10	ΠΡΟ	44
11	ΜΕΤ	61
12	ΠΡΟ	46
13	ΜΕΤ	75
14	ΜΕΤ	75

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA

Στάδια απομόνωσης RNA

1. Ομογενοποίηση.

Προσθήκη TRIzol μέχρι τελικό όγκο 1.2ml και προσθήκη 1/10 του όγκου χλωροφόρμιο σε κάθε δείγμα με διαδοχικές αναρροφήσεις με πιπέτα και χρήση Vortex για λύση κυττάρων.



2. Διαχωρισμός φάσεων

Μετά την ομογενοποίηση με τη χρήση του Vortex η οποία έχει διάρκεια 10 λεπτών στις 2.400 στροφές (rpm) ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 12.000 στροφές (rpm) στους 4°C. Μετά τη φυγοκέντρηση σε κάθε σωληνάριο έχουν σχηματιστεί τρεις διακριτές φάσεις: η υποκείμενη που περιέχει χλωροφόρμιο, η μεσόφαση που περιέχει κύτταρα και πρωτεΐνες και η ανώτερη υδατική φάση στην οποία βρίσκεται απομονωμένο το RNA. (εικόνα 8)

3. Κατακρήμνιση.

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

4. Επαναδιάλυση του RNA

Φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στις 12.000 στροφές (rpm) στους 4°C. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα αφού στεγνώσει καλά διαλυτοποιείται με προσθήκη

50μl ddH₂O και κάθε δείγμα αποθηκεύεται στους -80°C.



Εικόνα 8 Διαχωρισμός φάσεων μετά τη φυγοκέντρηση.

ΣΥΝΘΕΣΗ cDNA

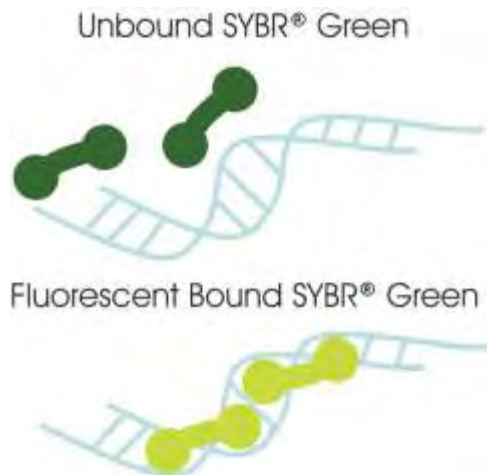
Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση του cDNA είναι το εξής:

- Αναμιγνύουμε 10μl RT Reaction Mix και 2μl RT Enzyme Mix.
- Προσθέτουμε 10μl RNA σε κάθε σωληνάριο και 12μl από το mix.
- Κάνουμε ελαφρύ vortex στα σωληνάρια και τα τοποθετούμε στο μηχάνημα της PCR στο πρόγραμμα RT Super1
 - 25⁰C για 10 min
 - 50⁰C για 30 min
 - 85⁰C για 5 min
 - 4⁰C for ever
- Έπειτα προσθέτουμε 1μl από E. Coli RNase H και βάζουμε τα σωληνάρια μας στο RT2 πρόγραμμα της PCR.
 - 37⁰C για 20 min
- Στη συνέχεια προετοιμάζουμε τα δείγματα μας για το μηχάνημα της RT PCR.

REAL TIME PCR

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων της έκφρασης των γονιδίων είναι πλέον βασικό εργαλείο στα περισσότερα εργαστήρια μοριακής βιολογίας. Μετρώντας την ποσότητα του πυρηνικού RNA μπορούμε να υπολογίσουμε σε ποιο βαθμό το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράζεται (Schmittgen & Livak, 2008)

Η real-time PCR είναι μια παραλλαγή της κλασικής PCR που επιτρέπει την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων αλλά και την παρακολούθηση της προόδου της καθώς πραγματοποιείται. και στηρίζεται στη χρήση φθορίζων χρωστικής. Υπάρχουν δύο είδη φθορίζων αντιδραστηρίων, το SYBR[®] Green και το TaqMan[®].

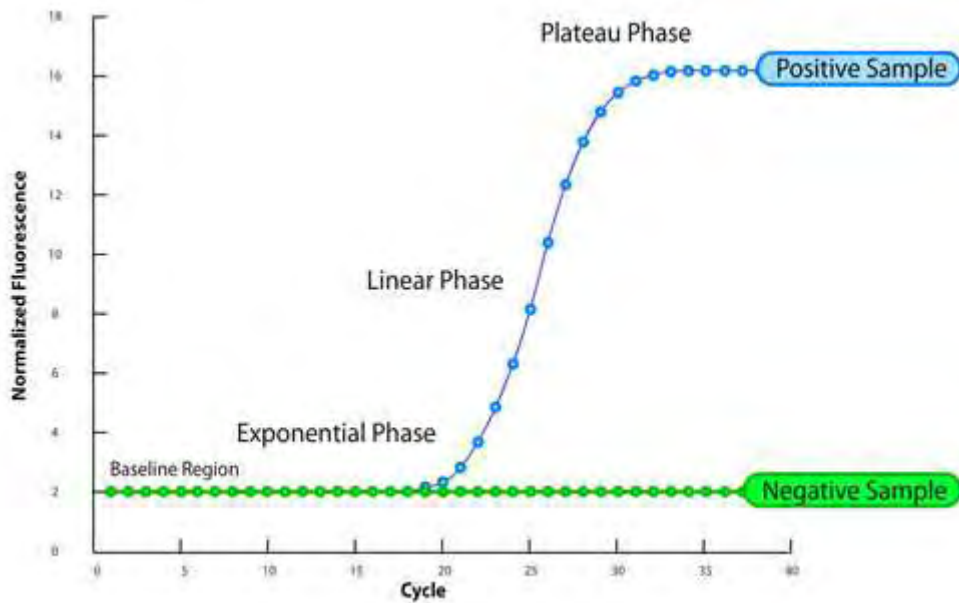


Το SYBR® Green λειτουργεί σαν το βρωμιούχο αιθίδιο, δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA που είναι το προϊόν της PCR. Η χρωστική SYBR Green I όταν παρεμβάλλεται σε δίκλωνο DNA τότε φθορίζει έντονα πράσινο χρώμα, ενώ όταν βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα εμφανίζει σχετικά χαμηλό φθορισμό. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται ως αναλογική συνάρτηση της συγκέντρωσης του δίκλωνου DNA στο διάλυμα (Stratagene, 2006). Καθώς προχωράει η αντίδραση της

real-time PCR το μηχάνημα παρακολουθεί και καταγράφει την αύξηση του φθορισμού (Boukout & Mangelsdorf, 2003)

Υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης, η απόλυτη (absolute quantification) και η σχετική ποσοτικοποίηση (relative quantification). Η πρώτη μέθοδος υπολογίζει τον αριθμό των αντιγράφων του γονιδίου συνήθως σχετίζοντας το PCR σήμα με μια καμπύλη αναφοράς (standard curve). Η σχετική ποσοτικοποίηση συσχετίζει την έκφραση του γονιδίου που μας ενδιαφέρει με την έκφραση ενός γονιδίου αναφοράς του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Schmittgen & Livak, 2008). Συνήθως χρησιμοποιούνται housekeeping γονίδια λόγω της σταθερής έκφρασης τους σε όλους τους κυτταρικούς τύπους. Το GAPDH, η β-actin, το cyclophilin, και το 18S rRNA είναι τα πιο κοινά σε χρήση (Boukout & Mangelsdorf, 2003).

Η real-time PCR μπορεί να διαιρεθεί σε τέσσερις βασικές φάσεις (εικόνα 9): την γραμμική φάση (πρώτοι 10-15 κύκλοι) όπου αρχίζει η PCR αντίδραση και η εκπομπή φθορισμού σε κάθε κύκλο δεν ανεβαίνει από το background. Την εκθετική φάση όπου η ποσότητα φθορισμού φτάνει το σημείο threshold το οποίο είναι σημαντικά πιο υψηλό από το background. Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό είναι γνωστός ως Ct ή ως crossing point (CP). Η τιμή αυτή είναι σημαντική για τον υπολογισμό πειραματικών αποτελεσμάτων. Την log-γραμμική φάση στην οποία η PCR φτάνει στη βέλτιστη περίοδο ενίσχυσης και το προϊόν υφίσταται διπλασιασμό σε κάθε κύκλο σε ιδανικές συνθήκες αντίδρασης. Και τέλος την φάση πλατό όταν τα υλικά της αντίδρασης είναι περιορισμένα και η ένταση του φθορισμού δεν είναι πλέον χρήσιμη για υπολογισμό δεδομένων. (Wong & Medrano, 2005)



Εικόνα 9 Φάσεις της αντίδρασης της Real-time PCR.

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο απαιτεί μόνο ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινήτων (validated primer pair) επιπλέον από τα συνήθη αντιδραστήρια της κλασικής PCR.

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Το γονίδιο του BMPR-Ia βρίσκεται στο χρωμόσωμα 10 και του BMPR-Ib στο χρωμόσωμα 4. Από την genebank βρέθηκε η αλληλουχία του mRNA των δυο γονιδίων και έγινε ο σχεδιασμός των εκκινήτων προσέχοντας τα εξής:

- Μέγεθος του κάθε εκκινήτη ~20bp
- Περιεκτικότητα σε GC ~50%
- Προϊόν PCR ~200bp

Το mRNA του BMPR-Ib έχει τέσσερις διαφορετικές παραλλαγές (variants), έτσι σχεδιάστηκαν εκκινήτες κοινοί και για τις τέσσερις παραλλαγές.

Η σύνθεση των εκκινήτων έγινε από την Invitrogen.

Πίνακας 2. Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν για real-time PCR

Γονίδιο	Αλληλουχία εκκινητών (5' →3')	Αναλογία GC
BMPR-Ia	Forward: AAACGCTACATGGCTCCCGA	55% GC
	Reverse: CGCATATCTTCGTATGACGG	50% GC
BMPR-Ib (4 variants)	Forward: CCAAACCGGTGGAGCAGTGA	60% GC
	Reverse : CTGTTGGCTTTCTGCAGAGA	50% GC

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ REAL-TIME PCR

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της real-time PCR είναι το Quantifast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Σε κάθε σωληνάριο προσθέτουμε:

- 5μl cDNA του υπό εξέταση δείγματος
- 10μl sybr green mix,
- 1,5μl forward primer,
- 1,5μl reverse primer
- 3μl απεσταγμένο νερό.

Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε GAPDH mRNA, που εκφράζεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα και έχει σταθερά επίπεδα έκφρασης.

Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

- Hold I: στους 95°C για 3 min, για αποδιάταξη DNA (denaturation)
- Cycling: στους 95°C για 10 sec, 55°C για 10 sec και 72°C για 20 sec, ώστε να γίνει η σύνδεση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο DNA (primer annealing)
- Hold II: στους 72°C για 5 min, ώστε να πραγματοποιηθεί επιμήκυνση των συνδεδεμένων εκκινητών και σύνθεση DNA (extension)
- Melt: όπου από τους 65°C πάει στους 95°C. 30 sec διαρκεί το 1^ο στάδιο και στη συνέχεια κάθε δευτερόλεπτο αυξάνει η θερμοκρασία κατά 1°C.

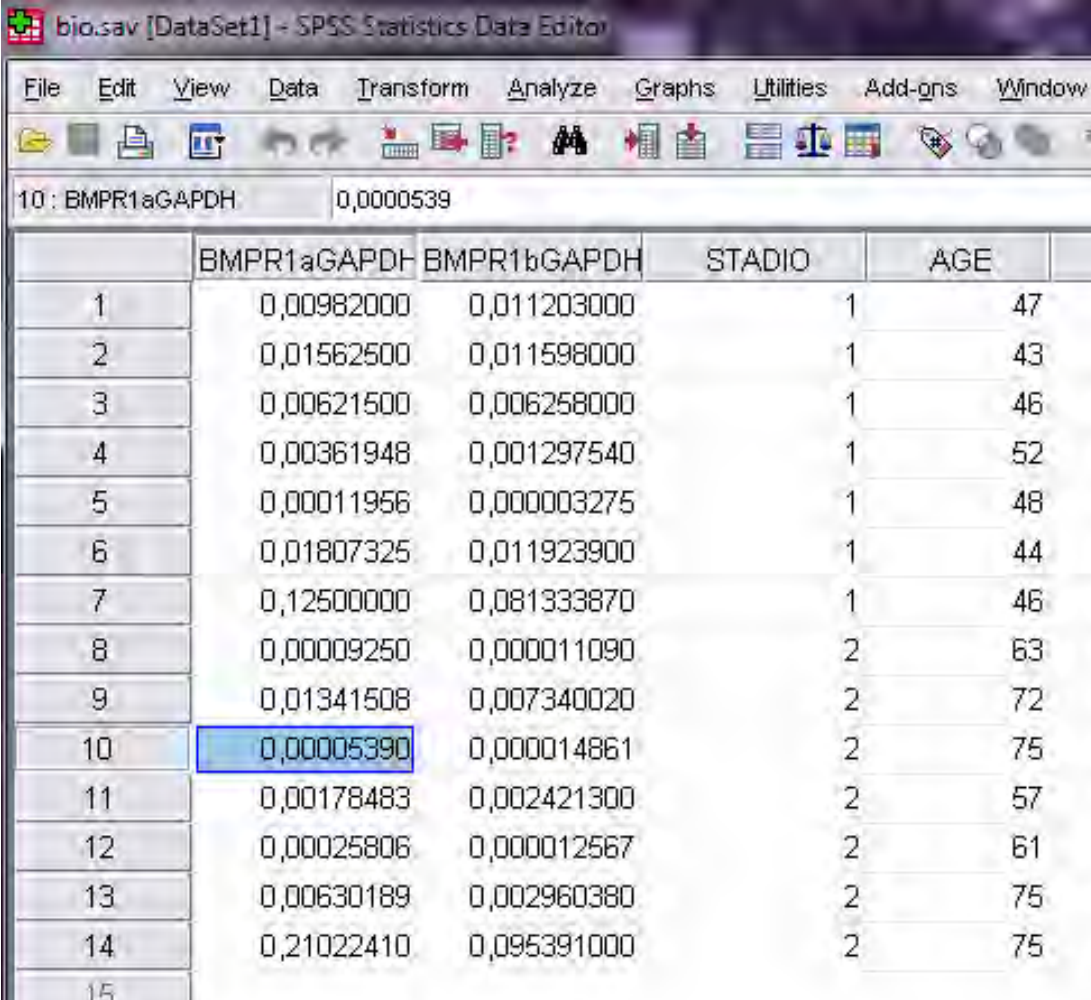
ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το πρόγραμμα του Microsoft excel και του Rotor Gene Corbett software, όπου η συγκέντρωση του BMPR-Ia και του BMPR-Ib mRNA του κάθε δείγματος δίνεται αναλογικά ως προς την συγκέντρωση GAPDH mRNA του ίδιου δείγματος. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση t-test ανεξάρτητων δειγμάτων και έλεγχο συσχέτισης του στατιστικού προγράμματος SPSS.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων μας χρησιμοποιήσαμε τις τιμές που πήραμε από το μηχάνημα της Real Time PCR για το ΒΜΡ1α, ΒΜΡ1β και το GAPDH. Μέσω του προγράμματος Rotor Gene Corbett Software του Η/Υ υπολογίσαμε τον λόγο ΒΜΡ1α/GAPDH και ΒΜΡ1β/GAPDH.

Η στατιστική ανάλυση έγινε με το πρόγραμμα SPSS17. Αρχικά το δείγμα μας χωρίστηκε σε 7 γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση (συμβολισμός 1) και σε 7 γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση (συμβολισμός 2) (εικόνα 10).



	BMPR1aGAPDH	BMPR1bGAPDH	STADIO	AGE
1	0,00982000	0,011203000	1	47
2	0,01562500	0,011598000	1	43
3	0,00621500	0,006258000	1	46
4	0,00361948	0,001297540	1	52
5	0,00011956	0,000003275	1	48
6	0,01807325	0,011923900	1	44
7	0,12500000	0,081333870	1	46
8	0,00009250	0,000011090	2	63
9	0,01341508	0,007340020	2	72
10	0,00005390	0,000014861	2	75
11	0,00178483	0,002421300	2	57
12	0,00025806	0,000012567	2	61
13	0,00630189	0,002960380	2	75
14	0,21022410	0,095391000	2	75
15				

Εικόνα 10 Κατάταξη και διαχωρισμός των δειγμάτων στο πρόγραμμα SPSS17. Φαίνονται οι λόγοι ΒΜΡ1α/GAPDH και ΒΜΡ1β/GAPDH, το στάδιο πρό-εμμηνόπαυσης ή μετ-εμμηνόπαυσης και η ηλικία της γυναίκας.

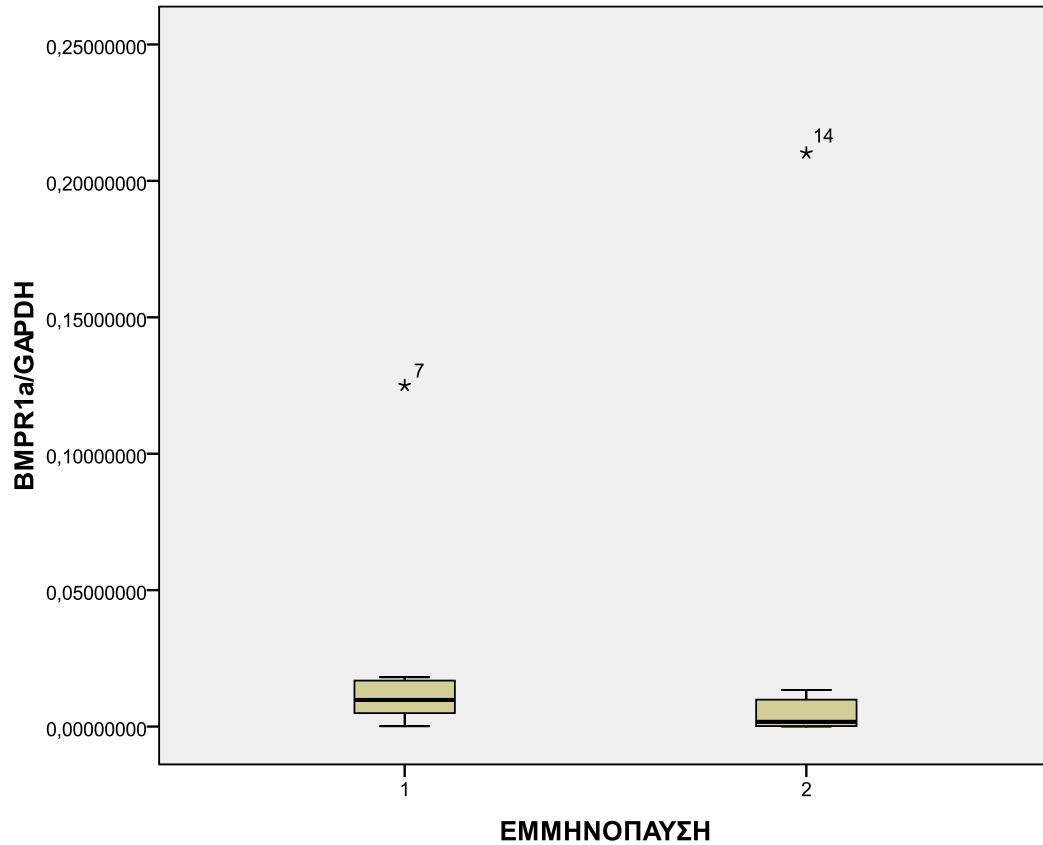
Στόχος μας ήταν να εξετάσουμε αν η εμμηνόπαυση επηρεάζει την έκφραση των γονιδίων ΒΜΡ1α και ΒΜΡ1β, και αν οι τιμές ΒΜΡ1α/GAPDH και ΒΜΡ1β/GAPDH σχετίζονται με την ηλικία.

Αρχικά υπολογίσαμε τα μέτρα θέσεως και διασποράς του δείγματός μας καθώς και διαστήματα εμπιστοσύνης για την μέση τιμή με κριτήριο την εμμηνόπαυση για κάθε γονίδιο ξεχωριστά (Εικόνα 11.) . Η έκφραση του γονιδίου Bmpr1a στις γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση έχει μέση τιμή μικρότερη στα δείγματα πριν την εμμηνόπαυση όπως και τυπική απόκλιση.

			Descriptives	
ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ			Statistic	Std. Error
Bmpr1a/GAPDH	1	Mean	,0254960414	,01675710201
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	
			-,0155071101 ,0664991929	
		5% Trimmed Mean	,0213778483	
		Median	,0098200000	
		Variance	,002	
		Std. Deviation	,04433512461	
		Minimum	,00011956	
		Maximum	,12500000	
		Range	,12488044	
		Interquartile Range	,01445377	
		Skewness	2,533	,794
		Kurtosis	6,544	1,587
	2	Mean	,0331614800	,02956805217
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound Upper Bound	
			-,0391889373 ,1055118973	
		5% Trimmed Mean	,0251639778	
		Median	,0017848300	
		Variance	,006	
		Std. Deviation	,07822971281	
		Minimum	,00005390	
		Maximum	,21022410	
		Range	,21017020	
		Interquartile Range	,01332258	
		Skewness	2,625	,794
		Kurtosis	6,912	1,587

Εικόνα 11 Η έκφραση του γονιδίου Bmpr1a στις γυναίκες πριν και μετά την εμμηνόπαυση.

Φαίνεται η μέση τιμή να είναι μικρότερη στα δείγματα πριν την εμμηνόπαυση όπως και η τυπική απόκλιση.

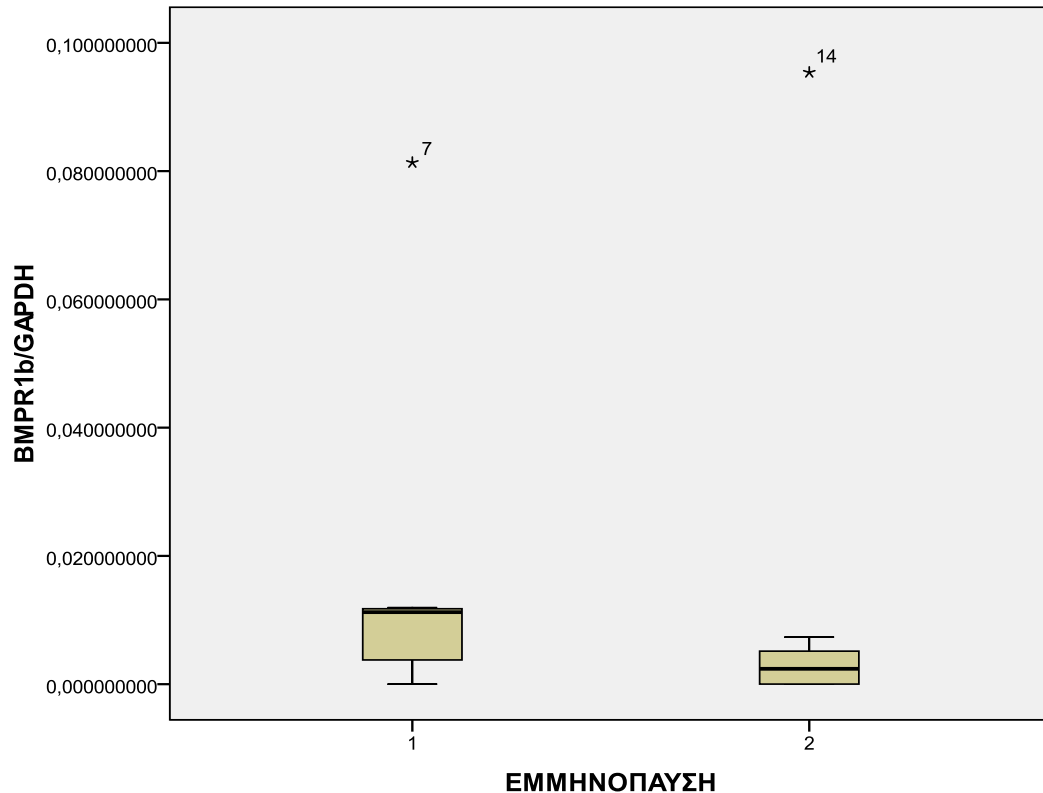


Εικόνα 12 Συμφωνα με το παραπάνω θηκόγραμμα παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα της εικόνας 11 επηρεάζονται από τα ακραία σημεία 7, 14. Αφού η κατανομή της μετ-εμμηνοπαυσης έχει σαφώς μικρότερη διάμεσο και διασπορά αν εξερέσουμε τις ακραίες τιμές. Καθώς και ότι η κατανομή των προ-εμμηνοπαυσιακών γυναικών είναι συμμετρική ενώ των μετ-εμμηνοπαυσιακών είναι θετικά ασύμμετρη.

Descriptives
Descriptives

ΕΜΜΗΝΟΠΑΥΣΗ		Statistic	Std. Error
BMPR1b/GAPDH	1	Mean	,01765965503
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-,00870304799
		Upper Bound	,04402235804
	5% Trimmed Mean	,01510310863	
	Median	,01120300000	
	Variance	,001	
	Std. Deviation	,028504972923	
	Minimum	,000003275	
	Maximum	,081333870	
	Range	,081330595	
	Interquartile Range	,010626360	
	Skewness	2,479	,794
	Kurtosis	6,354	1,587
2	Mean	,01545017400	
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-,01724150040
		Upper Bound	,04814184840
	5% Trimmed Mean	,01186674389	
	Median	,00242130000	
	Variance	,001	
	Std. Deviation	,035348245320	
	Minimum	,000011090	
	Maximum	,095391000	
	Range	,095379910	
	Interquartile Range	,007327453	
	Skewness	2,616	,794
	Kurtosis	6,875	1,587

Εικόνα 13 Αντίστοιχα με την εικόνα 11, για το γονίδιο BMPR1β βλέπουμε την μέση τιμή να έχει ελάχιστα μεγαλύτερη τιμή στις προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες από ότι στις μετεμμηνοπαυσιακές ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την τυπική απόκλιση.



Εικόνα 14 Κατασκευάζοντας το ανάλογο θηκόγραμμα συμπεραίνουμε ότι τα παραπάνω μετρα θέσεως και διασποράς δεν αρκουν για να βγάλουμε ασφαλή συμπεράσματα καθώς οι τιμές τους επηρεάζονται από ακραία σημεία 7, 14 και η διασπορά - διαμεσος της πρώτης κατανομής είναι μεγαλύτερη από την δευτερη αν εξαιρέσουμε της ακραίες τιμές.

Για την εξαγωγή ασφαλέστερων συμπρερασμάτων εκτελέσαμε T-Test για ανεξάρτητα δείγματα ελέγχοντας αν οι μέσες τιμές - διασπορές έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά στην παραγωγή BMPR1α και BMPR1β mRNA. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά (εικόνα 15).

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-Test for Equality of Means					
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	Lower
BMPR1α/GAPDH	Equal variances assumed	.827	-.225	12	.825	-.00786543857	-.08171527580	.06638438885
	Equal variances not assumed		-.226	9,464	.826	-.00786543857	-.08394268957	.06861171243
BMPR1β/GAPDH	Equal variances assumed	.142	.729	12	.900	.002206481029	-.035185954583	.036604916650
	Equal variances not assumed		.729	11,464	.900	.002206481029	-.035373053227	.039792015284

Εικόνα 15 Τα αποτελέσματα μετά το T-Test

Μετά τον έλεγχο υπόθεσης που κάναμε για τις μέσες τιμές αποδεχθήκαμε την αρχική υπόθεση ότι δηλαδή δεν διαφέρουν, σε στάθμη σημαντικότητας 95% αφού η τιμή του Sig είναι $0,825 > 0,05$ για το BMPR1α και $0,900 > 0,05$ για το BMPR1β και αντίστοιχα. Στο Levene's test για της διασπορές τα αποτελέσματα ήταν ίδια αφού οι τιμές του sig είναι για το BMPR1α $0,827 > 0,05$ και για το BMPR1β είναι $0,142 > 0,05$.

Εξετάζοντας τώρα την συσχέτιση των BMPR1α και BMPR1β mRNA με την ηλικία των γυναικών του δείγματος (εικόνα 16).

Correlations

		BMPR1a/GAPDH	ΗΛΙΚΙΑ
BMPR1a/GAPDH	<u>Pearson Correlation</u>	1	,191
	Sig. (2-tailed)		,514
	N	14	14
ΗΛΙΚΙΑ	Pearson Correlation	,191	1
	Sig. (2-tailed)	,514	
	N	14	14

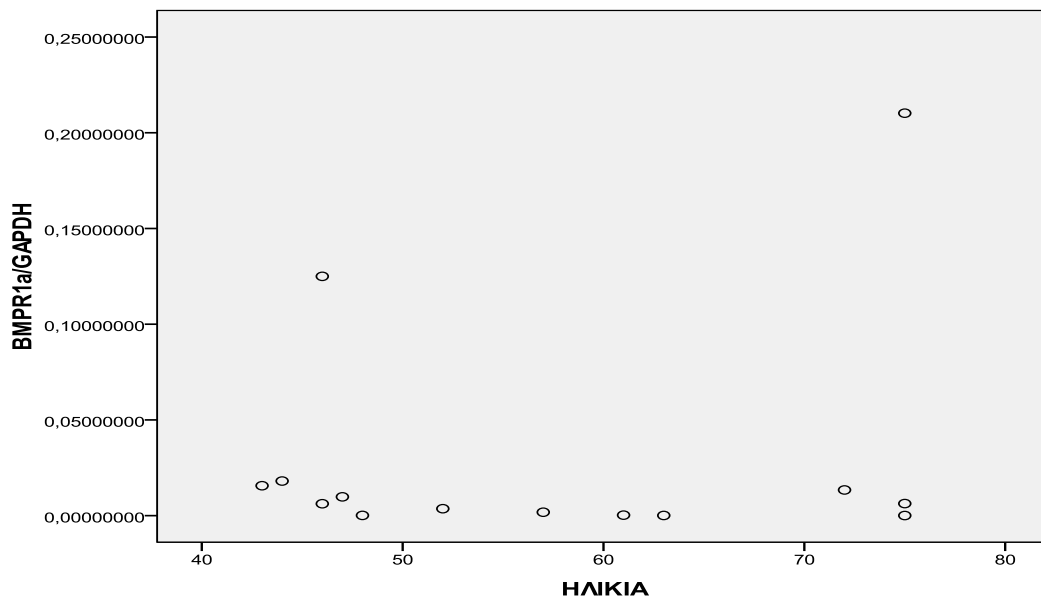
Correlations

Correlations

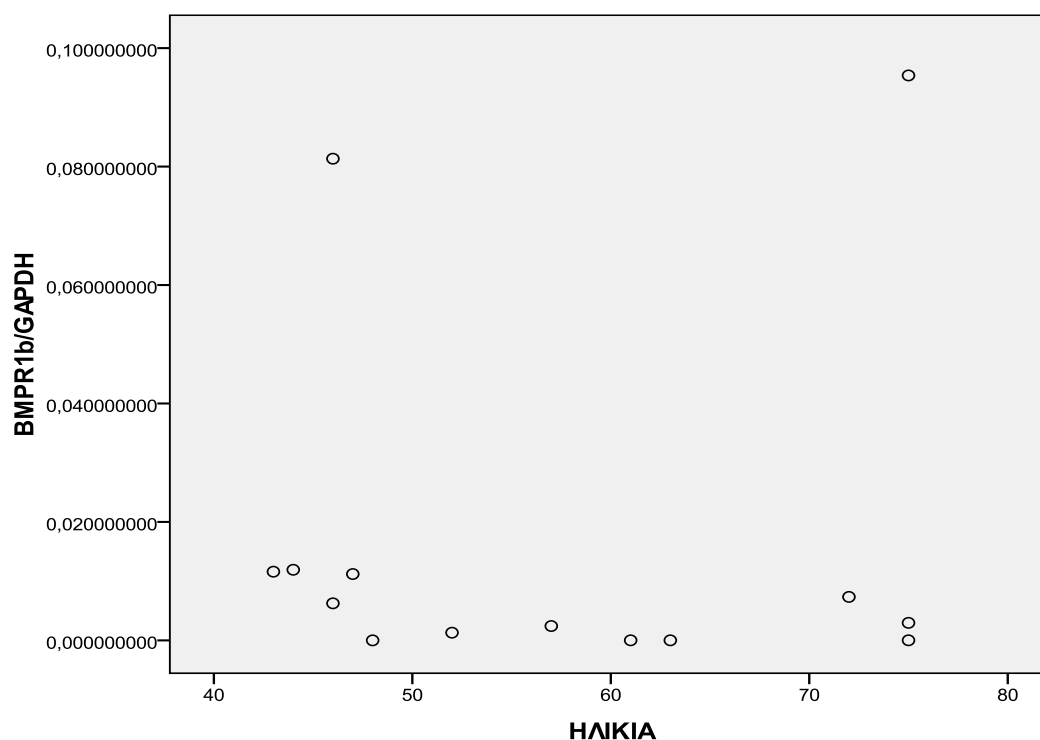
		BMPR1b/GAPDH	ΗΛΙΚΙΑ
BMPR1b/GAPDH	<u>Pearson Correlation</u>	1	,076
	Sig. (2-tailed)		,797
	N	14	14
ΗΛΙΚΙΑ	Pearson Correlation	,076	1
	Sig. (2-tailed)	,797	
	N	14	14

Εικόνα 16 Συσχέτιση των λόγων BMPR1α/GAPDH και BMPR1β/GAPDH με την ηλικία.

Διαπιστώσαμε ότι δεν είναι στατιστικά σημαντική ούτε ως προς το BMPR1α αλλά ούτε ως προς το BMPR1β mRNA(εικόνα 16) αφού η τιμή του παρατηρούμενου επιπέδου σημαντικότητας(Sig) είναι μεγαλύτερη από 0.05 και στις δύο εκφράσεις των γονιδίων.



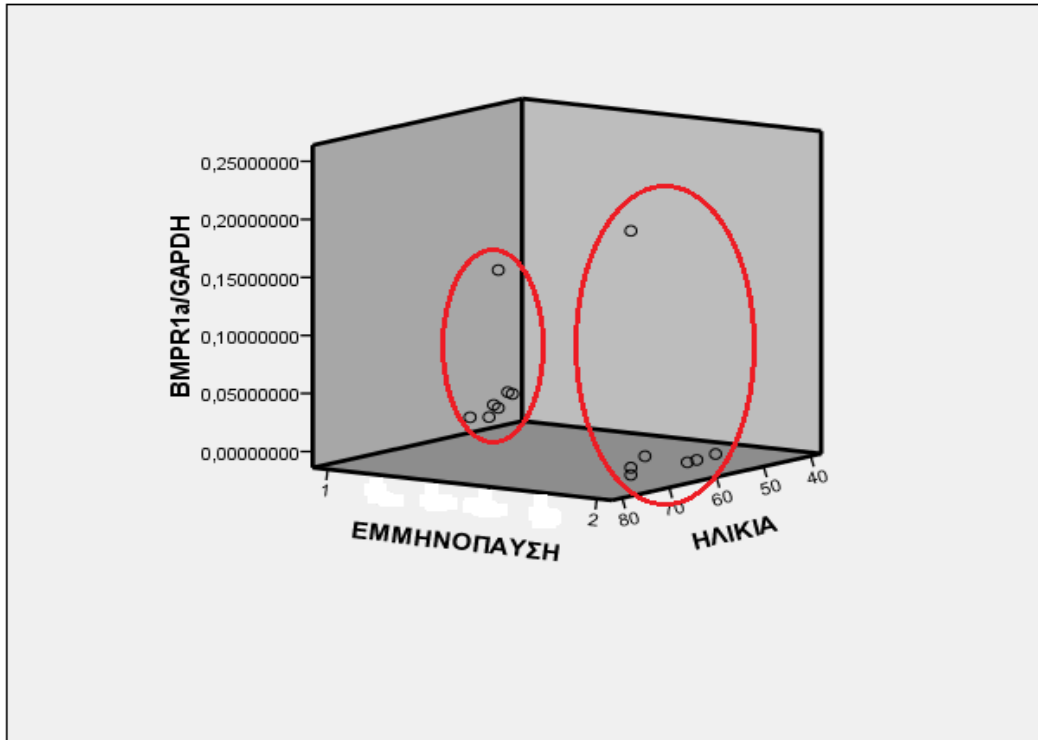
Εικόνα 17 Διάγραμμα ηλικίας και λόγου BMPR1α/GAPDH



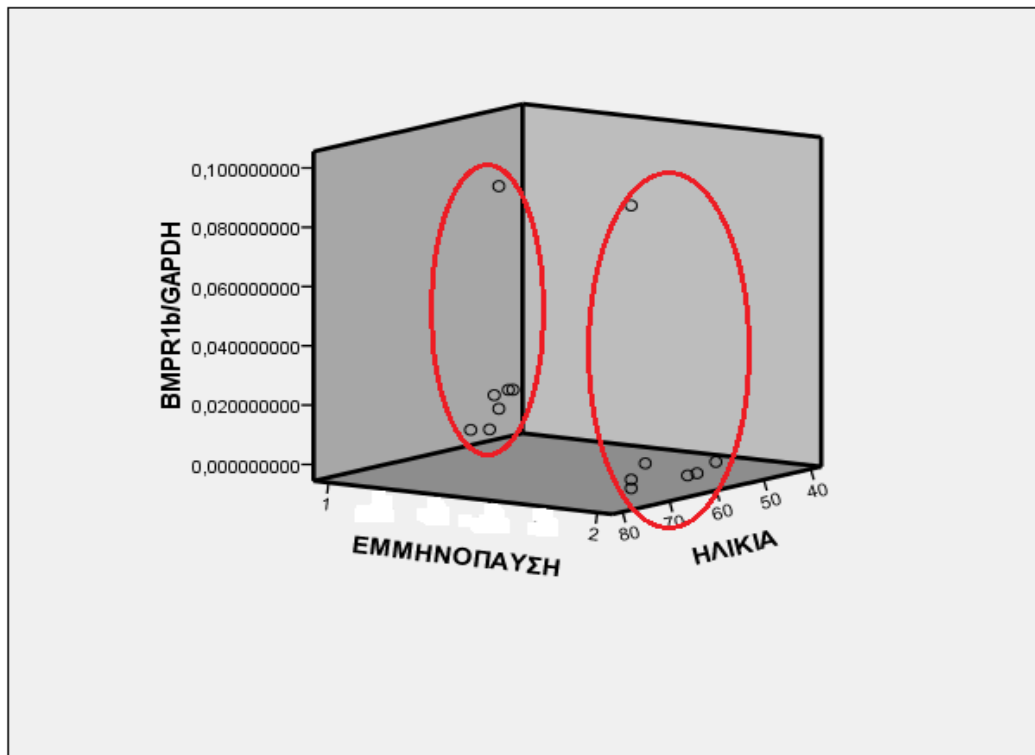
Εικόνα 18 Διάγραμμα ηλικίας και λόγου BMPR1β/GAPDH

Πράγμα που φαίνεται και στα δύο διαγράμματα αφού παρατηρείται μια πολύ μικρή πτωτική τάση στις τιμές των λόγων BMPR1α/GAPDH και BMPR1β/GAPDH όσο αυξάνει η ηλικία αν εξαιρέσουμε τις ακραίες τιμές(εικόνα 17,εικόνα18.).

Τέλος αυτό γίνεται καλύτερα αντιληπτό αν προσθέσουμε ακόμα ένα αξονα και κατασκευάσουμε τρισδιάστα γραφήματα με άξονες τον λόγο της έκφρασης των γονιδίων, την ηλικία και την εμμηνόπαυση (εικόνα 19).



Εικόνα 19 3-D γράφημα για το γονίδιο BMPR1α



Εικόνα 20 3-D γράφημα για το γονίδιο BMPR1β

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Καθώς το ωοθυλάκιο εισέρχεται στην εξελικτική πορεία της ωοθυλακιογένεσης δέχεται την δράση πολλών παραγόντων οι οποίοι το επηρεάζουν ρυθμίζοντας και συντονίζοντας την ανάπτυξη του από το αρχέγονο μέχρι το προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Η ωοθυλακιογένεση χωρίζεται σε τρεις φάσεις ανάλογα το εξελικτικό στάδιο και την εξάρτηση από τις γοναδοτροφίνες. Η πρώτη περιλαμβάνει την εξέλιξη του αρχέγονου ωοθυλακίου σε πρωτογενές και στη συνέχεια σε δευτερογενές και είναι ανεξάρτητη από τις γοναδοτροφίνες. Η δεύτερη περιλαμβάνει την εξέλιξη από το προαντρικό σε πρώιμο αντρικό στάδιο και είναι ευαίσθητη σε γοναδοτροφίνες. Τέλος η τρίτη φάση εξαρτάται αποκλειστικά από τις γοναδοτροφίνες και περιλαμβάνει την εξέλιξη πέρα από το πρώιμο αντρικό στάδιο, την στρατολόγηση, την επιλογή και την ωοθυλακιορρηξία.

Στην πρώτη φάση της ωοθυλακιογένεσης κρίσιμο ρόλο παίζουν παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα της θήκης (BMP-4, BMP-7, TGF- β), από τα κοκκώδη κύτταρα (AMH, inhibin, activin, BMP-2, BMP-5, BMP-6) και από το ίδιο το ωοκύτταρο (BMP-15, GDF-9, BMP-6) ασκώντας αυτοκρινή/παρακρινή δράση. Ο BMP-15 παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ωοθυλακίου καθώς σε περίπτωση μεταλλαγών του έχει παρατηρηθεί υπογονιμότητα στα ζώα (Hanrahan, Gregan, Mulsant, Mullen, Davis, & Powell, 2004) , ενώ σε γυναίκες υπεργοναδοτροφική ωοθηκική ανεπάρκεια (Di Pasquale, Beck-Peccoz, & Persani, 2004) είτε με πρωτοπαθή είτε δευτεροπαθή αμηνόρροια (Rossetti, et al., 2009). Φαίνεται ότι ο BMP15 δρα σχηματίζοντας είτε ομοδιμερή BMP15/BMP15, είτε ετεροδιμερή BMP15/GDF9 μέσω υποδοχέων τύπου I και τύπου II, ενώ τους ίδιους υποδοχείς χρησιμοποιούν και οι παράγοντες BMP2, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7.

Καθώς ο BMP15 χρησιμοποιεί εκλεκτικά τον BMPR1 β σαν υποδοχέα τύπου I, στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την έκφραση του υποδοχέα αυτού που σχηματίζει σύμπλοκο με το ομοδιμερές BMP15/BMP15 και το ετεροδιμερές BMP15/GDF9 (BMPR1 β ή ALK6) καθώς και του υποδοχέα που χρησιμοποιούν διάφοροι BMPs που συμμετέχουν στην ωοθυλακιογένεση BMPR1a (ALK3). Έγινε λοιπόν προσπάθεια να συσχετιστεί η κατάσταση της εμμηνόπαυσης και η ηλικία της γυναίκας με τους λόγους BMPR1a/GAPDH και BMPR1 β /GAPDH mRNA.

Τα αποτελέσματα μας μετά τις αναλύσεις που κάναμε δεν δείχνουν στατιστικά σημαντική διαφορά στους λόγους αυτούς σε γυναίκες που βρίσκονται σε προεμμηνοπαυσιακό στάδιο και σε αυτές που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση. Παρόλα αυτά, γνωρίζοντας τον σημαντικό ρόλο που παίζουν οι BMPs όπως και τον τρόπο με τον οποίο μεταδίδεται η δράση τους μέσω των υποδοχέων τύπου I και τύπου II, καθώς και τον ιδιαίτερο ρόλο που φαίνεται να διαδραματίζει ο υποδοχέας BMPRII, περισσότερες μελέτες απαιτούνται ώστε να ξεκαθαριστεί αν η εμμηνόπαυση επηρεάζει τη δράση τους ή των υποδοχέων τους, καθώς και να κατανοήσουμε τον ακριβή μηχανισμό με τον οποίο οι παράγοντες αυτοί δρουν και πως επηρεάζουν την γυναικεία γονιμότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bodensteiner, K., Clay, C., Moeller, C., & Sawyer, H. (1999). Molecular cloning of the ovine growth differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction* (60), σσ. 381-386.
2. Boukout, A., & Mangelsdorf, D. (2003, December). Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal*.
3. Di Pasquale, E., Beck-Peccoz, P., & Persani, L. (2004). Hypergonadotropic Ovarian Failure Associated with an Inherited Mutation of Human Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene. *The American Journal of Human Genetics* (75), σσ. 106-111.
4. Edson, M., Nagaraja, A., & Matzun, M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 30, σσ. 624-712.
5. Elvin, J., Clark, A., Wang, P., Wolfman, N., & Matzuk, M. (1999). Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* (13), σσ. 1035-1048.
6. Elvin, J., Yan, C., & Matzuk, M. (2000). Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* (159), σσ. 1-5.
7. Eppig, J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* (122), σσ. 829-838.
8. Erickson, G. F. (1995). *Endocrinology and Metabolism*, σσ. 973-1015.
9. Glistler, C., Kemp, F., & Knight, P. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4,-6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction* (127), σσ. 239-254.
10. Gougeon, A. (1986). Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Human Reproduction* (1), σσ. 81-7.
11. Hanrahan, J., Gregan, S., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G., & Powell, R. (2004). Mutations in the genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation Rate and sterility in Cambridge and Belclare Sheeps (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction* (70), σσ. 900-909.
12. Jaatinen, R., Laitinen, M., Vuojolainen, K., Aaltonen, J., Louhio, H., Heikinheimo, K., και συν. (n.d.). Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Molecular and Cellular Endocrinology* (156), σσ. 189-193.
13. Jaatinen, R., Rosen, V., Tuuri, T., & Ritvos, O. (1996). Identification of ovarian granulosa cells as a novel site of expression for bone morphogenetic protein-3 (BMP-3/osteogenin) and regulation of BMP-3 messenger ribonucleic acids by chorionic gonadotropin in cultured human granulosa-luteal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (81), σσ. 3877-3882.
14. Knight, P., & Glistler, C. (2006). Focus on TGF-β signaling: TGF-β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* (132), σσ. 191-206.

15. Matzuk, M., Burns, K., Viveiros, M., & Eppig, J. (2002). Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science* (296), σσ. 2178-2180.
16. McGrath, S., Esquela, A., & Lee, S. (1995). Oocyte-specific expression of growth differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology* (9), σσ. 131-136.
17. McNatty, K., Juengel, J., Wilson, T., Galloway, S., & Davis, G. (2001). Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reproduction Fertility and Development* (13), σσ. 549-555.
18. Messinis, I. E. (2008). Mechanisms of follicular development: The role of gonadotrophins. Στο B. Rizk, J. A. Garcia- Velasco, H. N. Sallam, & A. Makrigiannakis, *Infertility and Assisted Reproduction*. Cambridge University Press.
19. Mueller, T., & Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Letter* (586), σσ. 1846-1859.
20. Newfeld, S., Wisotzkey, R., & Kumar, S. (1999). Molecular evolution of a developmental pathway: phylogenetic analyses of transforming growth factor-beta family ligands, receptors and Smad signal transducers. *Genetics* (152), σσ. 783-795.
21. Otsuka, F., & Shimasaki, S. (2002). A novel function of bone morphogenetic protein-15 in the pituitary: selective synthesis and secretion of FSH by gonadotropes. *Endocrinology* (143), σσ. 4938-4941.
22. Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G., & Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry* (275), σσ. 39523-39528.
23. Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R., και συν. (2013, February). Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *PNAS*, σσ. 776-785.
24. Rossetti, R., Di Pascuale, E., Marozzi, A., Toniolo, D., Grammatico, P., Nelson, L., και συν. (2009, May). BMP15 mutations associated with Primary Ovarian Insufficiency cause a defective production of bioactive protein. *Hum. Mutat.* (30), σσ. 804-810.
25. Schmittgen, T., & Livak, K. (2008, June). Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. *Nature* (3), σσ. 1101-1108.
26. Shimasaki, S., Moore, R., Otsuka, F., & Erickson, G. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* (25), σσ. 72-101.
27. Shimasaki, S., Zachow, R., Li, D., & al, e. (1999, June). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, σσ. 7282-7287.
28. Su, Y., Sugiura, K., & Eppig, J. (2009). Mouse oocyte control of granulosa cell development and function: paracrine regulation of cumulus cell metabolism. *Semin Reprod Med* (27), σσ. 32-42.
29. Sugiura, K., & Eppig, J. (2005). Society for reproductive biology founder's lecture 2005. Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev* (17), σσ. 667-674.

30. Sugiura, K., Su, Y.-Q., Li, Q., Wigglesworth, K., Matzuk, M., & Eppig, J. (2010, December). Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. *Mol Endocrinol* 24(12), σσ. 2303-2314.
31. Wang, C., & Roy, S. (2009). Expression of bone morphogenetic protein receptor (BMPR) during perinatal ovary development and primordial follicle formation in the hamster: possible regulation by FSH. *Endocrinology* (150), σσ. 1886-1896.
32. Wong, M., & Medrano, J. (2005, July). Real-time PCR for mRNA quantification. *Biotechniques* (39), σσ. 75-85.