



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

ΕΚΦΡΑΣΗ GDF9 mRNA ΣΕ ΩΟΘΗΚΙΚΟ ΙΣΤΟ

.....

.....

ΕΛΕΝΗ ΑΡΑΚΛΙΩΤΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ
Επιβλέπων: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ
ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΗΛΙΑΣ ΖΙΝΤΖΑΡΑΣ
ΑΝΑΠΛ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΣ

.....

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη του εργαστηρίου Βιολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Σπύρο Κουρή και Μαρία Σάτρα για την πολύτιμη βοήθεια τους.

Περίληψη

Η βιολογία του ωοθηκικού αυξητικού παράγοντα GDF9 (Growth Differentiation Factor 9), παρουσιάζει πρόσφορο έδαφος έρευνας καθώς διαθέτει πολύπλευρο αναπτυξιακό και αναπαραγωγικό δυναμικό. Απαραίτητο βιολογικό υπόστρωμα αποτέλεσε η διαθεσιμότητα ωοθηκικού ιστού γυναικών που υποβάλλονται σε ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων, προκειμένου να αξιολογηθεί η σχέση των επιπέδων έκφρασης του GDF9 mRNA με την εμμηνόπαυση και την ηλικία γυναικών άνω των 40 ετών. Για το σκοπό αυτό ολικό RNA ιστού ομογενοποιείται, μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) και επεκτείνεται με ειδικά ζεύγη εκκινητών GDF9 με μεθοδολογία ποσοτικής PCR (Real- Time PCR). Για την αξιοπιστία των μετρήσεων επεκτείνεται παράλληλα με τον ειδικό δείκτη ωοθηκικής λειτουργικότητας GDF9 mRNA και ο γενικός δείκτης ιστικής ζωτικότητας GAPDH mRNA, ως μάρτυρας, και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως λόγος του ειδικού προς το γενικό δείκτη (GDF9 mRNA/GAPDH mRNA) κάθε ιστού. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων 15 συνολικά περιστατικών έδειξε ότι ο λόγος GDF9 mRNA/GAPDH mRNA παραμένει σταθερός και αμετάβλητος, είναι ανεξάρτητος και δεν επηρεάζεται από την κατάσταση της εμμηνόπαυσης και την ηλικία των γυναικών μετά τα 40 έτη. Τα μέχρι στιγμής αποτελέσματα του μικρού σχετικά δείγματος περιστατικών που μελετήθηκαν, δείχνουν ότι η GDF9 mRNA-εξαρτώμενη λειτουργικότητα της ωοθήκης είναι ανεξάρτητη και δεν επηρεάζεται από την εμμηνόπαυση και την ηλικία μετά τα 40 έτη και υποστηρίζουν την υπόθεση ότι στην ομάδα των γυναικών που μελετήθηκε, ο ωοθηκικός ιστός βρίσκεται σε κατάσταση λειτουργικής ετοιμότητας. Φαίνεται συνεπώς ότι η βιολογία του θήλεος αναπαραγωγικού συστήματος δεν διαφέρει ιδιαίτερα από τη γενικότερη βιολογία του άρρενος αναπαραγωγικού συστήματος της αντίστοιχης ηλικιακής ομάδας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	σελ. 5
<i>Growth Differentiation Factor (GDF9)</i>	σελ. 5
Υπεροικογένεια <i>TGF-β (superfamily)</i>	σελ. 5
Δομή γονιδίου και πρωτεΐνης <i>GDF9</i>	σελ. 5
Σε ποιους ιστούς εκφράζεται το <i>GDF9 mRNA</i>	σελ. 7
Εκφραση και ρόλος <i>GDF9</i> από την ωοθυλακιογένεση μέχρι την ωορρηξία.....	σελ. 7
Αρχική έκκριση από το ωοκύτταρο.....	σελ. 7
Πρόοδος ωοθυλακίων από το πρωτογενές στο αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο.....	σελ. 8
Ανάπτυξη κοιλοτικού ωοθυλακίου και μηχανισμός επιλογής ωοθυλακίων.....	σελ. 9
Ωορρηξία, ωχρινοποίηση και σχηματισμός ωχρού σωματίου.....	σελ. 10
<i>GDF9</i> και επιδράσεις του στη γονιμότητα.....	σελ. 12
Επίδραση του <i>GDF9</i> στην ωρίμανση και ποιότητα ωαρίων.....	σελ. 12
<i>GDF9</i> και εμμηνόπαυση.....	σελ. 14
Σκοπός μελέτης.....	σελ. 15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ. 16
Απομόνωση ολικού RNA.....	σελ. 16
Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	σελ. 17
Δημιουργία συμπληρωματικού DNA με τυχαίους εκκινητές.....	σελ. 17
Επιλογή ειδικού ζεύγους εκκινητών.....	σελ. 17
Ποσοτική <i>Real-Time PCR</i>	σελ. 18
Ηλεκτροφόρηση προϊόντος <i>PCR</i> σε πήκτωμα αγαρόζης.....	σελ. 19
Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	σελ. 19
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	σελ. 21
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ. 27
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ. 29

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. *Growth Differentiation Factor (GDF9)*

Ο αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης GDF9 είναι μέλος της υπερικογένειας TGF-β (Transforming Growth Factor superfamily), που εμφανίζει μεγάλη ιστοειδική κατανομή και ποικίλες αναπτυξιακές και αναπαραγωγικές δράσεις. Ο GDF9 απαιτείται στην ωοθυλακική ανάπτυξη μετά το πρώιμο ωοθυλακικό στάδιο τρωκτικών και ανθρώπου και διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στο σχηματισμό του αρχέγονου ωοθυλακίου προβάτων, βοοειδών και χάμστερ (Aaltonen et al. 1999, Bodensteiner et al. 2000, Dong et al. 1996, Wang & Roy 2004). GDF9 mRNA εκφράζεται σε ωκύτταρα και άλλους ιστούς (Fitzpatrick et al. 1998).

2. *Υπερικογένεια TGF-β (superfamily)*

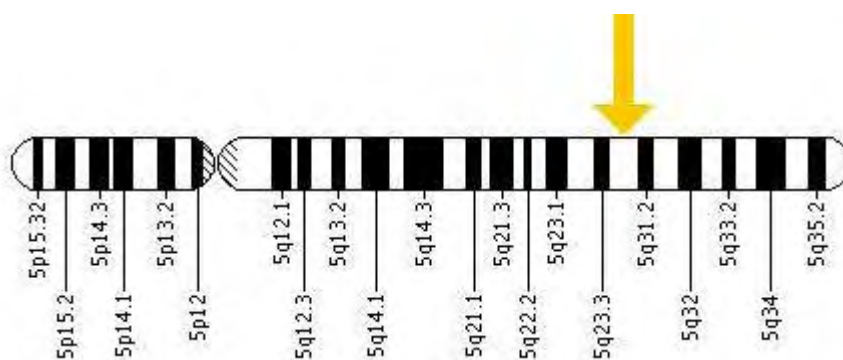
Η υπερικογένεια των TGF-β είναι μια δομικά συντηρημένη πολύ-λειτουργική ομάδα πρωτεϊνών, που αριθμεί 35 τουλάχιστον μέλη στα σπονδυλωτά. Οι πρωτεΐνες TGF είναι ευρέως κατανομημένες στο σώμα, λειτουργούν ως εξωκυτταρικοί σύνδεσμοι και συμμετέχουν σε ευρύ φάσμα φυσιολογικών διαδικασιών (Massague & Wotton 2000). Κοινό χαρακτηριστικό των μελών της υπερικογένειας είναι η ομο- ή ετερο-διμερής κατανομή των βιολογικά ενεργών δομών τους, μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με διασπασμένες (cleaved) καρβοξυτελικές περιοχές μεγαλύτερων προ-πρωτεϊνών.

Τα μέλη της υπερικογένειας, ταξινομούνται σε υποικογένειες όπως: η TGF-β υποικογένεια που περιλαμβάνει τις TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, οι Bone Morphogenetic Proteins (BMP) με 20 τουλάχιστον μέλη, οι Growth and Differentiation Factors (GDF), οι activin/ inhibin που συμπεριλαμβάνει τις activin A, AB, B, inhibins A, B, η υποικογένεια των νευροτροφικών παραγόντων κυττάρων γλοίας (GDNF) που περιλαμβάνει τους GDNF, artemin και neurturin, καθώς και πολλά άλλα μέλη όπως οι anti-Müllerian ορμόνη και nodal (Knight & Glister 2006).

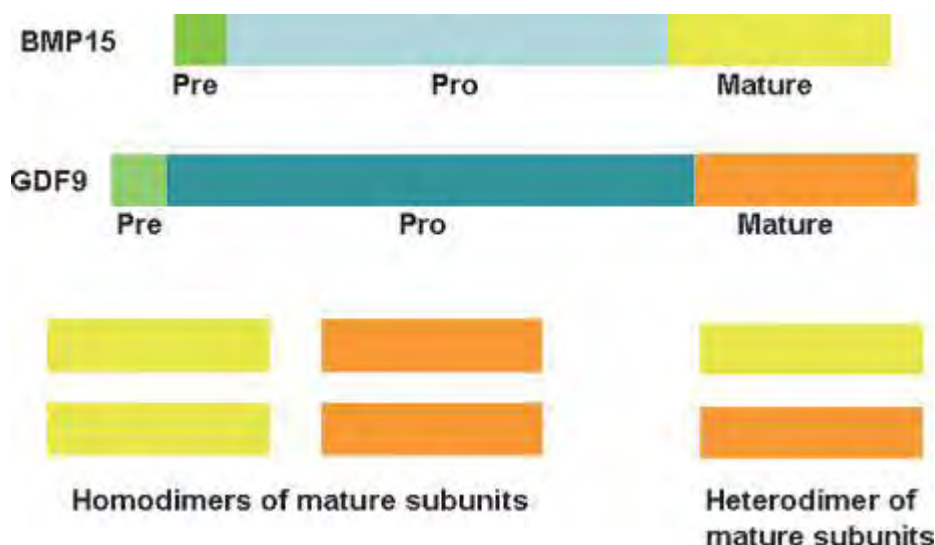
3. *Δομή γονιδίου και πρωτεΐνης GDF9*

Η καρβοξυτελική (–COOH) περιοχή της πρωτεΐνης GDF9 έχει 21-34% ομολογία με τα άλλα μέλη της υπερικογένειας TGF-β και καμία ομολογία στην προ-περιοχή (Fitzpatrick et al. 1998). Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον παράγοντα GDF9 εδράζεται στον μακρύ βραχίονα του 5^{ου} χρωμοσώματος στην θέση 5q31.1 και πιο συγκεκριμένα βρίσκεται μεταξύ των ζευγών βάσεων 132,196,877 έως 132,200,476 (εικόνα 1). Αποτελείται από δύο εσώνια και δύο εξώνια και το ώριμο μετάγραφό του κωδικοποιεί προ-πρωτεΐνη με σηματοδοτικό πεπτίδιο, προ-περιοχή και ώριμο πεπτίδιο (εικόνα 2). Το σηματοδοτικό πεπτίδιο κωδικοποιείται από το πρώτο εξώνιο, η προπεριοχή από στοιχεία και των δύο εξωνίων και το ώριμο πεπτίδιο από το

δεύτερο εξώνιο. Η προ-πρωτεΐνη παραμένει σε λανθάνουσα κατάσταση όσο η προ-περιοχή παραμένει σε σύμπλεγμα με την ώριμη περιοχή (Wakefield et al. 1989, Gray et al. 1990). Η προ-περιοχή είναι απαραίτητη για ενδοκυτταρικό διμερισμό και έκκριση ενός βιολογικά ενεργού ομο-διμερούς της ώριμης περιοχής (Gray et al. 1990). Το ομο-διμερές προσδένεται και ενεργοποιεί υποδοχείς της υπερικογένειας των διαμεμβρανικών υποδοχέων με δράση σερίνης/ θρεονίνης σε κύτταρα στόχους (Dijke et al. 1994). Η βιολογική δράση του αυξητικού παράγοντα GDF9 εξαρτάται από την μετα-πρωτεολυτική ικανότητα σχηματισμού ομοδιμερών ή ετεροδιμερών (Massagué et al. 1994, Liao et al. 2003, Liao et al. 2004 25-27). Η πρωτεΐνη GDF9 ρυθμίζει την μίτωση των κοκκωδών κυττάρων δια μέσου των Smad-εξαρτώμενων και Smad-μη εξαρτώμενων σηματοδοτικών μονοπατιών (Huang et al., 2009). Στα ανθρώπινα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, η GDF9 αυξάνει την έκφραση mRNA κυκλίνης D1 και E, καθώς και τη σύνθεση και φωσφορυλίωση κυκλίνης D1 και Rb.



Εικόνα 1: Απεικόνιση της θέσης που εδράζεται το DGF9 γονίδιο στο 5^ο χρωμόσωμα.



Εικόνα 2: Σχηματική απεικόνιση των BMP15 και GDF9 μορίων.

4. Σε ποιους ιστούς εκφράζεται το GDF9 mRNA

Η πρωτεΐνη GDF9 εκφράζεται στα ανθρώπινα ωοκύτταρα κατά την διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης (Shimasaki et al. 2004, Laitinen et al. 1998, Dube et al. 1998, McGrath et al. 1995 20,22-24) επηρεάζοντας πιθανόν τη γονιμότητα (*Endocrinology* 139: 2571–2578, 1998). Το GDF9 mRNA εκφράζεται επίσης στους όρχεις, την υπόφυση, τη μήτρα και τον μυελό των οστών, με άγνωστη μέχρι στιγμής σημασία.

Σε όρχεις ποντικών το GDF9 mRNA εκφράζεται σε δύο τύπους γεννητικών κυττάρων: στα μεγάλα σπερματοκύτταρα, που βρίσκονται στο τελευταίο στάδιο παχυταινίας στη πρόφαση της μείωσης I και στις ανώριμες κυκλικές σπερματίδες. Πιθανόν δρα ως παρακρινής αυξητικός παράγοντας ρυθμίζοντας την ανάπτυξη και διαφοροποίηση γεννητικών κυττάρων ή κυττάρων Sertoli (Fitzpatrick et al. 1998). Στην ωοθήκη το GDF9 mRNA μεταγράφεται στα πρωτογενή ωοθυλάκια, αλλά όχι στα αρχέγονα. Η παρουσία του αυξητικού παράγοντα στα ωοθυλάκια δείχνει ότι είναι απαραίτητος στην ωοθυλακιογένεση και γονιμότητα (Fitzpatrick et al. 1998), ρυθμίζοντας πιθανόν την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων και των κυττάρων θήκης (Dong et al. 1996, Gosden 1996).

5. Εκφραση και ρόλος GDF9 από την ωοθυλακιογένεση μέχρι την ωορρηξία

5 α. Αρχική έκκριση από το ωοκύτταρο

Τρία μέλη της υπερικογένειας των TGF-β, οι GDF9, BMP15 (γνωστό και ως GDF9B) και BMP6, εκφράζονται επιλεκτικά στα αρχικά στάδια των ωοθυλακίων: πρωτογενή ωοθυλάκια τρωκτικών και αρχέγονα ωοθυλάκια προβάτων και αγελάδων (McGrath et al. 1995, Jaatinen et al. 1999, Bodensteiner et al. 1999, Elvin et al. 2000, McNatty et al. 2001). Οι υποδοχείς τύπου-I και -II των πρωτεϊνών αυτών, εκφράζονται στα αρχικά στάδια του ωοθυλακίου από προ-κοκκώδη και κοκκώδη κύτταρα, που είναι πιθανοί στόχοι παρακρινούς σηματοδότησης. Ποντίκια με null μεταλλαγές στο γονίδιο GDF9 είναι υπογόνιμα με αδρανή ωοθυλακική ανάπτυξη στα αρχικά στάδια (Dong et al. 1996, Carabatsos et al. 1998), γεγονός που υποδηλώνει ότι η GDF9 είναι απαραίτητη για περεταίρω ωοθυλακική εξέλιξη. Αγωγή σε αρουραίους με GDF9 in vivo (Vitt et al. 2000b) ή in vitro (Nilsson & Skinner 2002) προήγαγε την εξέλιξη των πρωτογενών ωοθυλακίων από το αρχικό στο τελικό στάδιο. Παρ' όλα αυτά δεν είναι σαφές αν ο GDF9 επηρεάζει την μετάβαση από το αρχέγονο στο πρωτογενές στάδιο. Σε GDF9 knockout ποντίκια παρατηρήθηκαν αδρανή ωοθυλάκια με ανώμαλα κοκκώδη κύτταρα και αυξημένη έκφραση KL (Kit Ligand), που αυξάνει την στρατολόγηση κυττάρων θήκης από περιβάλλοντα κύτταρα στρώματος (Parrot & Skinner 2000) και συμμετέχει στην πρώιμη ανάπτυξη του ωοκυττάρου (Manova et al. 1993). Η αποτυχία απόκτησης στρώματος θήκης (theca layer), συνδέεται με παρακρινή δράση του GDF9 στα περιβάλλοντα σωματικά κύτταρα (Dong et al. 1996, Carabatsos et al. 1998, Elvin et al. 1999). Στα υπογόνιμα αυτά ποντίκια, η ανάπτυξη του ωοκυττάρου και ο σχηματισμός διάφανης ζώνης συνεχίζει φυσιολογικά, ενώ διαταράσσονται άλλες πλευρές της ωοκυτταρικής διαφοροποίησης. Μεταλλαγές του γονιδίου GDF9 προβάτου επηρεάζουν τη γονιμότητα (Galloway et al. 2000, McNatty

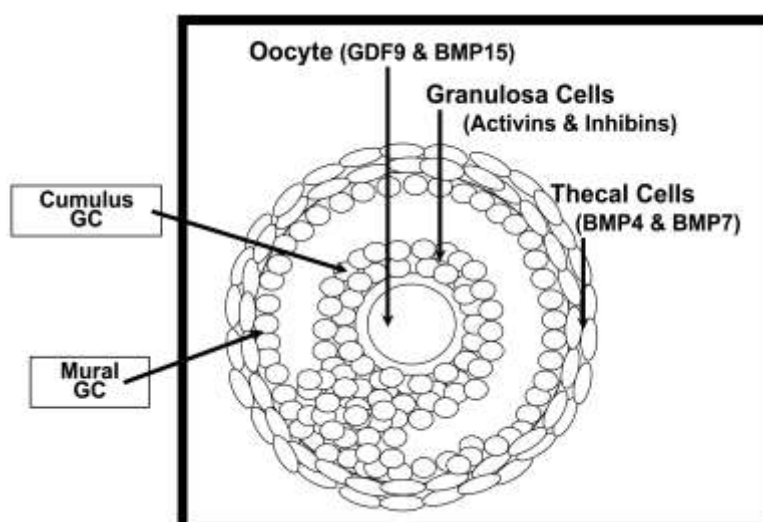
et al. 2005), πιθανά λόγω μειωμένης παραγωγής ώριμης πρωτεΐνης ή ανεπαρκούς σύνδεσής της σε υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης. Προβατίνες ετεροζυγώτες στις μεταλλάξεις αυτές, έχουν αυξημένο αριθμό ωορρηξιών, ενώ ομοζυγώτες είναι υπογόνιμες. Επιπρόσθετα, ωοθυλάκια ωοθηκών ομοζυγωτών δεν αναπτύσσονται πέρα από το πρωτογενές στάδιο (Juengel et al. 2002, McNatty et al. 2005). Συνεπώς, η πρωτεΐνη GDF9 έχει σημαντικές δράσεις στα ωοθυλακικά σωματικά κύτταρα (προκοκκώδη και/ή κοκκώδη κύτταρα) των αρχέγονων και/ή των πρωτογενών ωοθυλακίων που είναι απαραίτητα για οποιαδήποτε ωοθυλακική πρόοδο.

5 β. Πρόοδος ωοθυλακίων από το πρωτογενές στο αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο

Η ανάπτυξη των πρωτογενών ωοθυλακίων στο τελευταίο προκοιλοτικό/αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο περιλαμβάνει ωοκυτταρική μεγέθυνση, σχηματισμό διάφανης ζώνης, εκτενή πολλαπλασιασμό κοκκωδών κυττάρων για σχηματισμό πολύστιβου ιστού, σχηματισμό βασικής μεμβράνης, συμπύκνωση κυττάρων στρώματος γύρω από τη βασική μεμβράνη ώστε να σχηματίσουν κλειστή στιβάδα θήκης και κοιλοτήτες που σταδιακά ενώνονται στη μοναδική κοιλότητα του άντρου. Υπάρχουν διαφορές μεταξύ των ειδών ως προς τη χρονική στιγμή της διαδικασίας. Για παράδειγμα τα ωοθυλάκια των τρωκτικών αποκτούν καλά καθορισμένη στιβάδα θήκης πολύ πριν από τα ωοθυλάκια των μηρυκαστικών και των πρωτεύοντων. Επίσης στα τρωκτικά, η εξάρτηση των ωοθυλακίων από τις γοναδοτροφίνες συμβαίνει στο τελευταίο προκοιλοτικό στάδιο, ενώ στα μηρυκαστικά και τα πρωτεύοντα καθυστερεί μέχρι τα μέσα του κοιλοτικού σταδίου. Θεωρείται ότι ο ρόλος των γοναδοτροφινών στη πρόοδο του αρχόμενου κοιλοτικού ωοθυλακίου είναι περισσότερο ευνοϊκός παρά απαραίτητος (e.g. Dufour et al. 1979, Cortvrindt et al. 1997). Φαίνεται ότι τοπικοί κυρίως παράγοντες όπως, GDF9 και BMP15 που προέρχονται από το ωοκύτταρο, activins που προέρχονται από κοκκώδη κύτταρα, BMP4 και BMP7 που προέρχονται από κύτταρα θήκης και TGF- β που προέρχεται από κοκκώδη κύτταρα και κύτταρα θήκης, ρυθμίζουν την μετάβαση του ωοθυλακίου από το πρωτογενές στο δευτερογενές στάδιο και ως επακόλουθο την ωοθυλακική ανάπτυξη στο τελευταίο προκοιλοτικό/αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο (εικόνα 3) (McNatty et al. 1999, Erickson & Shimasaki 2003, Drummond et al. 2003, Bristol & Woodruff 2004).

Έκθεση ωοθηκικού ιστού τρωκτικών (Hayashi et al. 1999, Nilsson & Skinner 2002, 2003, Wang & Roy 2004) και ανθρώπων σε πρωτεΐνη GDF9 in vitro, προήγαγε την εξέλιξη του πρωτογενούς ωοθυλακίου. Αντίστροφα, η ωοθυλακική ανάπτυξη μετά το πρωτογενές στάδιο δεν συμβαίνει ούτε στα GDF9 null ποντίκια (Dong et al. 1996), ούτε σε προβατίνες ομοζυγώτες για μεταλλαγές που αδρανοποιούν το γονίδιο GDF9 (Hanrahan et al. 2004), ούτε σε προβατίνες ανοσοποιημένες (actively immunized) σε GDF-9 (Juengel et al. 2002). Ο ρόλος συνεπώς του GDF9 φαίνεται υποχρεωτικός (Knight & Glister 2006). Επίσης έρευνες δείχνουν ότι ο GDF9 φαίνεται να προάγει την ωοθυλακική επιβίωση, κατά τη μετάβαση του ωοθυλακίου στο κοιλοτικό στάδιο, καταστέλλοντας την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων και την ατρησία των ωοθυλακίων (Orisaka et al., 2006). Αυτό μπορεί να επιτευχθεί εν μέρει με διέγερση της έκφρασης των ωοθυλακικών υποδοχέων της FSH (FSHR) από GDF9, καθώς είναι απαραίτητη η επάρκεια των επιπέδων FSHR στα κοκκώδη κύτταρα για FSH-εξαρτώμενη κοιλοτική ωοθυλακική ανάπτυξη (Otsuka et al. 2011).

Σύμφωνα με *in vivo* μελέτη, ο αυξητικός παράγοντας GDF9 έχει κεντρικό ρόλο στον έλεγχο των λειτουργιών των κυττάρων θήκης, καθώς ενδοπεριτοναϊκές εγχύσεις GDF9 σε ανώριμους αρουραίους προήγαγε την εξέλιξη αρχέγονων και πρωτογενών ωοθυλακίων σε μικρά προκοιλοτικά ωοθυλάκια και προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του δείκτη CYP17 στα κύτταρα θήκης (Vitt et al., 2000b). Ο GDF9 διεγείρει την παραγωγή τεστοστερόνης σε καλλιέργειες προκοιλοτικών ωοθυλακίων αρουραίων. Δεδομένου ότι ο ανταγωνιστής του υποδοχέα ανδρογόνων flutamide μπλοκάρει την GDF9-υποκινούμενη προκοιλοτική ανάπτυξη, προτάθηκε ότι ο GDF9 επιδρά στα κύτταρα θήκης όπως και στα κοκκώδη κύτταρα επάγοντας την ανάπτυξη των προκοιλοτικών ωοθυλακίων σε αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο (Orisaka et al., 2009).



Εικόνα 3: Έκκριση GDF9 και BMP15 από το ωοκύτταρο, Activins από τα κοκκώδη κύτταρα, BMP4 και BMP7 από τα κύτταρα θήκης.

5 γ. Ανάπτυξη κοιλοτικού ωοθυλακίου και μηχανισμός επιλογής ωοθυλακίων

Η ωοθυλακική εξέλιξη κατά το κοιλοτικό στάδιο ανάπτυξης χαρακτηρίζεται από συνεχή πολλαπλασιασμό κοκκωδών κυττάρων και κυττάρων θήκης, αύξηση αιμοφόρων αγγείων θήκης και περαιτέρω μεγέθυνση της διαμέτρου και του όγκου του ωοκυττάρου. Το αυξανόμενο μέγεθος του ωοθυλακίου και η ιστοειδική του πολυπλοκότητα επιβάλλουν περιορισμούς στη μεταφορά των μορίων σηματοδότησης που εκκρίνονται μεταξύ των κυττάρων σε διαφορετικά ενδοωοθυλακικά διαμερίσματα με διάχυση. Διαφορετικοί ωοθυλακικοί κυτταρικοί τύποι πιθανώς εκτίθενται σε διαφορετικά μίγματα/cocktails σηματοδοτικών μορίων που εξαρτώνται από την σχετική θέση τους (Knight & Glister 2006).

Όπως αναφέρθηκε, η FSH μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη προκοιλοτικών ωοθυλακίων. Αντίθετα η αύξηση του ωοθυλακίου πέρα από το τελευταίο προκοιλοτικό/αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο (που ποικίλει μεταξύ των ειδών) συνοδεύεται από αυξημένη εξάρτηση σε FSH. Ωοκυτταρικοί GDF9, BMP15 και BMP6 τρωκτικών προάγουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και την FSH-εξαρτώμενη ωοθυλακική λειτουργία με παρακρινή ρύθμιση. Διαφορετική έκθεση στους παράγοντες αυτούς μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία ορισμένων

ωοθυλακίων στην FSH, επιλέγοντάς τα ως κυρίαρχα ωοθυλάκια που συνεχίζουν να αυξάνουν σε πρωοθυλακιορρηκτικό στάδιο.

Εκτός του καλά καταγεγραμμένου ρόλου τους στην πρώιμη ωοθυλακική ανάπτυξη, οι BMPs και ο αυξητικός παράγοντας GDF9 δρουν και σε αναπτυσσόμενα κοιλοτικά ωοθυλάκια. Καταγράφηκαν διακυμάνσεις έκφρασης BMPs και GDF9 σε διαφορετικά διαμερίσματα του κοιλοτικού ωοθυλακίου τρωκτικών, ανθρώπων και μηρυκαστικών (Elvin et al. 2000, Erickson & Shimasaki 2003, Glister et al. 2004, Shimasaki et al. 2004, Juengel & McNatty 2005). Ειδικότερα, BMP6, BMP15 και GDF9 εκφράζονται σε ωκύτταρα, BMP2, BMP5 και BMP6 σε κοκκώδη κύτταρα και BMP2, BMP3b, BMP4 και BMP7 σε κύτταρα θήκης.

Τα ωκύτταρα στα κοιλοτικά ωοθυλάκια, επηρεάζουν μέσω ωκύτταρο-εκκρινόμενων παραγόντων (BMP15 και GDF9 που παράγονται αποκλειστικά από τα ωκύτταρα, μαζί με τον BMP6) τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν, ρυθμίζοντας παράλληλα το μικροπεριβάλλον τους (Eppig 2001, Gilchrist et al. 2004). Η έκφραση υποδοχέων BMP στα ωκύτταρα (Souza et al. 2002, Erickson & Shimasaki 2003, Glister et al. 2004) υποστηρίζει τη συμμετοχή των BMPs στην ρύθμιση της ωοκυτταρικής ανάπτυξης και ωρίμανσης.

Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 μπορεί να ασκεί την επίδραση του μέσω της ρύθμισης της δράσης των γοναδοτροφινών. Οι Vitt et al. (2000a) έδειξαν καταστολή της FSH-επαγόμενης παραγωγής προγεστερόνης και οιστραδιόλης από GDF9 και μείωση FSH-εξαρτώμενου σχηματισμού υποδοχέων LH. Ενώ οι BMP6, BMP15 και GDF9 αναστέλλουν την διέγερση της έκκρισης προγεστερόνης από τις γοναδοτροφίνες (Otsuka et al. 2001a,b), μόνο ο GDF9 καταστέλλει την δραστηριότητα της P450arom (Vitt et al. 2000a, Yamamoto et al. 2002). Πρόσφατα, οι McNatty et al. (2005) μελέτησαν τις επιδράσεις των παραγόντων αυτών σε κοκκώδη κύτταρα μηρυκαστικών (πρόβατα και αγελάδες). Γενικά GDF9 και BMP15 εμφανίζουν αξιοσημείωτη συνέργεια, και μόνοι ή σε συνδυασμό κατέστειλαν τη παραγωγή προγεστερόνης από FSH και διέγειραν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, όπως είχε παρατηρηθεί σε αρουραίους και ανθρώπους.

5 δ. Ωορρηξία, ωχρινοποίηση και σχηματισμός ωχρού σωματίου

Η ωοθυλακιογένεση κλιμακώνεται με απελευθέρωση του συμπλέγματος ωκύτταρο-ακτινωτή στέφανος (cumulus-oocyte complex) και σχηματισμό ωχρού σωματίου με ωχρινοποίηση. Το νεοσχηματισμένο ωχρο σωματίο συνθέτει και εκκρίνει μεγάλα ποσά προγεστερόνης (και οιστρογόνων στα πρωτεύοντα) απαραίτητα για υποστήριξη πιθανής εγκυμοσύνης. Αν δεν επιτευχθεί γονιμοποίηση και εμφύτευση εμβρύου, η στεροειδογένεση παύει και το ωχρο σωματίο εκφυλίζεται. Φαίνεται να συμμετέχουν μέλη της υπεροικογένειας TGF- β στη δυναμική ακολουθία μορφολογικών και λειτουργικών αλλαγών/μεταβολών του ωχρού σωματίου. Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 παίζει σημαντικό ρόλο στα τελευταία στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης πριν την ωορρηξία. Πριν το κύμα της LH, τα κύτταρα θήκης απαιτούν GDF9 για να υποστηρίξουν μεταβολικούς καταρράκτες όπως γλυκόλυση και βιοσύνθεση στερόλης (Sugiura et al., 2005). Η μειωμένη σύνθεση χοληστερόλης από οξικό άλας στο σύμπλεγμα ωκύτταρο-ακτινωτή στέφανος BMP15 null ποντικών και

σε μεγαλύτερο βαθμό BMP15^{-/-} GDF9^{+/-} double mutant ποντικών, ενισχύει αυτή την άποψη.

Θα πρέπει να τονιστεί, ότι δεν υπάρχει ξεκάθαρη απόδειξη ότι εμπλέκονται μέλη της υπερικογένειας TGF-β στην ίδια τη διαδικασία της ωορρηξίας. Τουναντίον, η αποτυχία ωορρηξίας ως ανταπόκριση της διατάραξης των συνδετών της υπερικογένειας TGF-β και/ή των υποδοχέων τους μπορεί να θεωρηθεί σαν μια συνέπεια της αποτυχίας των ωοθυλακίων να αναπτυχθούν φυσιολογικά έως το πρωοθυλακιορρηκτικό στάδιο (Knight & Glistler 2006).

Υποστηρίζεται ότι η διαδικασία ωχρινοποίησης βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο των ωκύτταρο-προερχόμενων αναστολέων ωχρινοποίησης. Έχει θεωρηθεί ότι η έκκριση αναστολέων αποτρέπει την ωχρινοποίηση και καταστέλλει την σύνθεση προγεστερόνης μέχρι την ωορρηξία (Knight & Glistler 2006). Μια πρωτοποριακή εργασία από τους Falck et al. το 1959, έδειξε ότι ανέπαφα πρωοθυλακιορρηκτικά ωοθυλάκια λαγού δεν ωχρινοποιήθηκαν όταν μεταμοσχεύθηκαν στον μπροστινό θάλαμο του ματιού. Αντίθετα, γυμνά από ωκύτταρο εμφυτεύματα, όπου παρέμειναν τα τοιχώματα του ωοθυλακίου και τα κοκκώδη κύτταρα, πραγματοποίησαν μορφολογική ωχρινοποίηση (Falck, 1959). Επομένως το ωκύτταρο ήταν αυτό που έδρασε ώστε να αναστείλει την ωχρινοποίηση των άλλων ωοθυλακικών κυττάρων. Οι Nalbandov et al. το 1970 επιβεβαίωσαν αυτήν την παρατήρηση με κυρίαρχα ωοθυλάκια λαγού *in situ* δείχνοντας ότι η αφαίρεση προκαλούσε αυθόρμητη ωχρινοποίηση κοκκωδών και κυττάρων θήκης, ενώ η έκκριση προγεστερόνης αυξήθηκε σε επίπεδα που παράγονται από το ωχρο σωματίο (El-Fouly et al., 1970; Nalbandov, 1970). Αυτές οι μελέτες ήταν απαραίτητες στην εδραίωση της θεωρίας πως το ωκύτταρο εμπλέκεται στην ωχρινοποίηση του κυρίαρχου ωοθυλακίου, πιθανότατα με έκκριση ωχρινοποιητικών αναστολέων.

Δεκαετίες αργότερα εδραιώθηκε η άποψη ότι μέλη της υπερικογένειας TGF-β που παράγονται στην ωοθήκη, αναστέλλουν τη παραγωγή προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, οι ωκυτταρικοί BMP6, BMP15 και GDF9 αναστέλλουν την ωχρινική δραστηριότητα σε καλλιεργούμενα κοκκώδη κύτταρα π.χ. αναστέλλουν τη παραγωγή προγεστερόνης, προάγουν την έκκριση οιστραδιόλης, προάγουν τον πολλαπλασιασμό κοκκωδών κυττάρων (Shimasaki et al. 1999, Otsuka et al. 2001a,b, Glistler et al. 2004). Έτσι, είναι πολύ πιθανό η απώλεια των παραγόντων αυτών κατά την ωορρηξία να επιδρά στα εναπομείναντα ωοθυλακικά κύτταρα και να προάγει την ωχρινοποίηση (Knight & Glistler 2006).

Οι δράσεις του αυξητικού παράγοντα GDF9 στην ανθρώπινη ωοθήκη έχουν μελετηθεί σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα καθώς η συγκέντρωση ικανής ποσότητας κοκκωδών κυττάρων για μελέτη είναι δύσκολη. Στα ωχρινοποιημένα ανθρώπινα ωκύτταρα, ο GDF9 δεν έχει άμεσες επιδράσεις στη βασική ή την FSH-εξαρτώμενη παραγωγή προγεστερόνης, σε αντίθεση με τις δράσεις του στα κοκκώδη κύτταρα τρωκτικών. Ο GDF9 αντιστρέφει την καταστολή activin A από FSH-εξαρτώμενη προγεστερόνη (Shi et al., 2010) ενώ αυξάνει την έκκριση inhibin B από activin A (Shi et al., 2009b). Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 έχει ανιχνευθεί σε ωχρινοποιημένα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα και φαίνεται να σχετίζεται με αυτοκρινή αύξηση έκκρισης inhibin B, που προάγει η activin A σε ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα (Shi et al., 2009a). Φαίνεται ότι αυξανόμενη έκφραση GDF9 κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης στον άνθρωπο, αυξάνει την απόκριση των κοκκωδών κυττάρων στην activin A και τα επίπεδα inhibin B.

6. GDF9 και επιδράσεις του στη γονιμότητα

Το ωοκύτταρο παίζει σημαντικό ρόλο στην ωοθυλακική αύξηση και ανάπτυξη μέσω των δικών του αυξητικών παραγόντων, που δρουν παρακρινικά στα κοκκώδη κύτταρα. Γονιδιακές μεταλλαγές του αυξητικού παράγοντα GDF9 είναι αιτία γονιμότητας ή υπογονιμότητας σε ποντίκια, πρόβατα και ανθρώπους. Γυναίκες με πρώιμη ωοθυλακική ανεπάρκεια (POF) (Dixit et al., 2006; Laissue et al., 2006; Kovanci et al., 2007; Zhao et al., 2007) και μητέρες διζυγωτικών διδύμων με πολυωοθυλακιόρρηξία (Montgomery et al., 2004; Palmer et al., 2006) φέρουν πολλές μεταλλαγές GDF9 (Otsuka et al. 2011).

Τρεις μεταλλαγές: GDF-9P103S, GDF-9P374L, και GDF-9R454C, απαντούν σε συντηρημένες αμινοξικές θέσεις και σχετίζονται με αυξημένο ρυθμό ωοθυλακιόρρηξίας (Palmer et al., 2006), ενώ η GDF-9P103S βρίσκεται τόσο σε μητέρες διζυγωτικών διδύμων όσο και σε γυναίκες με POF. Έτσι ο αυξητικός παράγοντας GDF9 πιθανόν μεταβάλλει τον ωοθυλακιόρρηκτικό ρυθμό. Άλλη έρευνα γονιδιακών μεταλλαγών GDF9 δεν βρήκε συσχέτιση 5 πολυμορφισμών (SNPs) (rs10491279, rs254285, rs11739194, rs39830, rs30178) με ευαισθησία γυναικών σε PCOS (Sproul et al. 2010).

Πολλές μεταλλάξεις βρίσκονται σε προπεριοχή της προπρωτεΐνης GDF9. Από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά τη μετα-μεταφραστικής διαδικασίας των TGF-β είναι ότι η προπεριοχή είναι απαραίτητη για τον διμερισμό της ώριμης πρωτεΐνης (Shimasaki et al., 2004). Καθώς οι μεταλλαγές στη προπεριοχή επηρεάζουν τον διμερισμό της προπρωτεΐνης, έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην παραγωγή διμερών ώριμης πρωτεΐνης. Μεταλλαγές στη προπεριοχή του GDF9 βρέθηκαν σε γυναίκες με POF και διζυγωτικά δίδυμα και ίσως προκαλούν ελαττωματική επεξεργασία των προπρωτεϊνών και κακοαναδίπλωση προπρωτεϊνικών διμερών (Otsuka et al. 2011).

Οι ωοθήκες θηλυκών ποντικών ανενεργών για τον GDF9 ηλικίας 25 έως 31 εβδομάδων περιείχαν είτε μονές μονόπλευρες, είτε αμφίπλευρες θυλακοειδής κύστες με γραμμωτή όψη από διάφορα στρώματα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων (Dong et al., 1996). Αυτός ο κυστικός ωοθηκικός φαινότυπος ομοιάζει με το φαινότυπο ωοθηκών γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS). Το PCOS είναι το συχνότερο αίτιο ανωοθυλακιόρρηξίας, υπογονιμότητας και πρόκλησης διαταραχών του καταμήνιου κύκλου στις γυναίκες, ενώ προσβάλλει το 5% με 10% όλων των γυναικών αναπαραγωγικής ηλικίας (Knochenhauer et al., 1998). Ανάλυση ανθρώπινων ιστών ωοθήκης από γυναίκες με PCOS αποκάλυψε ότι η έκφραση του GDF9 mRNA καθυστερεί σημαντικά και μειώνεται κατά τη διάρκεια των φάσεων ανάπτυξης και διαφοροποίησης (Teixeira Filho et al., 2002).

Σε έρευνα των Wei et al. το 2011, συγκεντρώθηκαν ωάρια γυναικών με PCOS αλλά και φυσιολογικών, κατόπιν ωοθηκικής διέγερσης και έγινε σταδιακή ωρίμανση των ωαρίων με *in vitro* ωρίμανση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του GDF9 mRNA στα ωοκύτταρα των φυσιολογικών γυναικών παρουσίασε δυναμικές αλλαγές. Συγκεκριμένα, η έκφραση του αυξητικού παράγοντα μειώθηκε από το GV στάδιο στο MI που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Chen et al. το 2009, στη συνέχεια αυξήθηκε από το MI στο MII στάδιο και απέκτησε τα μέγιστα επίπεδα έκφρασης στο τελικό ώριμο στάδιο. Αντίθετα, στα ωοκύτταρα γυναικών με PCOS δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στην έκφραση του GDF9. Επίσης στην ίδια ομάδα γυναικών, η έκφραση του GDF9 στα ώριμα ωάρια δεν έφτασε τα επίπεδα των φυσιολογικών ωαρίων.

7. Επίδραση του GDF9 στην ωρίμανση και ποιότητα ωαρίων

Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 επιδρά στην ωρίμανση των ωοκυττάρων *in vitro* και τη βιωσιμότητα των εμβρύων (Yeo et al., 2008). Αυτό καταδεικνύεται από πειράματα όπου η προσθήκη εξωγενούς GDF9 σε συμπλέγματα ωοκυττάρων με κοκκώδη κύτταρα ποντικών που καλλιεργούνται με FSH πριν από *in vitro* γονιμοποίηση και μεταφορά σε θήλεις-αποδέκτες, δεν επηρέασε το ρυθμό εμφύτευσης ή το εμβρυϊκό και πλακουντιακό βάρος, αλλά αύξησε τον αριθμό των ζώντων εμβρύων (Yeo et al. 2008).

Η ωοκυτταρική ωρίμανση απαιτεί συνδυασμό πυρηνικής και κυτταροπλασματικής ωρίμανσης. Ο προσδιορισμός της πυρηνικής ωρίμανσης είναι ευκολότερος και ακριβέστερος της κυτταροπλασματικής, μέσω εντοπισμού του germinal vesicle breakdown και του 1^{ου} πολικού σωματίου. Με το τρόπο αυτό βρέθηκε σημαντική σχέση μεταξύ πυρηνικής ωρίμανσης και επιπέδων ώριμου GDF9, που υποστηρίζει το ρόλο του παρακρινή αυτού παράγοντα στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου.

Η σχέση μεταξύ ποιότητας ωοκυττάρου και συγκέντρωσης ωοθυλακικού υγρού καταδείχθηκε με διάφορους βιοχημικούς δείκτες σε πολλές μελέτες (Revelli et al. 2009). Επειδή οι GDF9 και BMP15 εκκρίνονται από το ίδιο το ωοκύτταρο, μπορεί να είναι πιο αξιόπιστοι προγνωστικοί δείκτες ωοκυτταρικής ωρίμανσης. Σύμφωνα με αυτή την έρευνα και η πρωτεολυτική αποκοπή αλλά και τα επίπεδα των ώριμων GDF9 μπορεί να είναι παράμετροι εμβρυϊκής ποιότητας. Ανασυνδυασμένος GDF9 προάγει αύξηση και διαφοροποίηση καλλιέργειών πρώιμων ωοθυλακίων ποντικών *in vitro*. Οι Hreinsson et al. το 2002, κατέγραψαν ότι ανασυνδυασμένος GDF9 προάγει την αύξηση, ανάπτυξη και επιβίωση των ανθρώπινων ωοθυλακίων. Έγχυση εξωγενούς GDF9 στο καλλιεργητικό μέσο ωρίμανσης ωοκυττάρων ποντικών, προάγει τη βιωσιμότητα και την επακόλουθη ανάπτυξη των εμβρύων (Yeo et al. 2008). Η ικανότητα *in vitro* ωρίμανσης ωοκυττάρων μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης βελτιώθηκε με χορήγηση GDF9 ή BMP15 σε συμπλέγματα ωοκύτταρο- ακτινωτή στέφανος (Hussein et al. 2006). Επιπρόσθετα, και τα αποτελέσματα από ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό υποστηρίζουν την άποψη ότι η IVF μπορεί να βελτιωθεί με προσθήκη της ώριμης μορφής του παράγοντα GDF9 στο καλλιεργητικό μέσο των ωοκυττάρων.

Επίσης, η ίδια έρευνα έδειξε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των ώριμων μορφών του GDF9 και BMP15 στο ωοθυλακικό υγρό. Ο BMP15 του ποντικού απαντά σαν πολυμερές προπεριοχών και ώριμων πρωτεϊνών όταν συνδυάζεται με τον GDF9 (McIntosh et al. 2008). Επιπλέον, οι επιδράσεις των μεταλλαγών του BMP15 ήταν εμφανείς μόνο όταν οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες BMP15 συνεκφράζονταν με GDF9 (Hashimoto et al. 2005; McNatty et al. 2005b). Τα αποτελέσματα των Gode et al. (2011) υποστηρίζουν ότι ο GDF9 επηρεάζει σημαντικά τον BMP15 στον άνθρωπο.

Το ωοθυλακικό υγρό περιέχει συστατικά πλάσματος, αίματος και εκκριτικής δραστηριότητας ωοκυττάρου και κοκκωδών κυττάρων αλλά και κυττάρων θήκης (Revelli et al. 2009). Επειδή οι GDF9 και BMP15 επηρεάζουν την ανάπτυξη του ωοκυττάρου κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης, τα επίπεδα τους στο ωοθυλακικό υγρό μπορεί να είναι σημαντικά για τη ωοκυτταρική λειτουργία και κατά συνέπεια για τη ποιότητα των εμβρύων (Gode et al. 2011)

Οι ώριμες μορφές GDF9 και BMP15, όπως προαναφέρθηκε, μπορεί να είναι ομοδιμερή ή ετεροδιμερή (McNatty et al. 2004). Παρ' όλα αυτά στους ανθρώπους, η σημαντικότητα των προμορφών, των ώριμων μορφών και των διμερών παραμένει ασαφής. Δεν ανιχνεύθηκαν ώριμες μορφές BMP15 και GDF9 στο ωοθυλακικό υγρό 39.5% και 4,9% των υπογόνιμων γυναικών της μελέτης, αντίστοιχα (Gode et al. 2011). Στις γυναίκες αυτές, μπορεί να υπάρχει κάποιο πρόβλημα στην παραγωγή ώριμων μορφών BMP15 και GDF9. Για παράδειγμα, μεταλλάξεις στα γονίδια GDF9 και BMP15 μπορεί να οδηγούν σε μειωμένη παραγωγή πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, ατελής μεταμεταγραφική διαδικασία των προμορφών μπορεί να συντελεί σε μειωμένη παραγωγή ώριμων μορφών. Διαταραχές στην πρωτεολυτική διαδικασία των προμορφών αποτρέπει την απελευθέρωση ώριμων περιοχών. Απαιτούνται περεταίρω αναλύσεις για να διασαφηνιστούν προβλήματα παραγωγής βιολογικά ενεργών μορφών των αυξητικών αυτών παραγόντων (Gode et al. 2011).

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι οι GDF9 και BMP15 επηρεάζουν τη στεροειδογένεση και προλαμβάνουν την πρόωρη ωχρινοποίηση (Spicer et al. 2008, Yamamoto et al. 2002). Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 μόνος του δεν διεγείρει τη στεροειδογένεση, ενώ συνχρήρηση GDF9 καταστέλλει την παραγωγή προγεστερόνης και οιστραδιόλης από την FSH (Vitt et al. 2000). Βρέθηκε ακόμα ένας αρνητικός συσχετισμός μεταξύ των ώριμων μορφών του GDF9 και των επιπέδων της προγεστερόνης στο ωοθυλακικό υγρό, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο παρακρινής αυτός παράγοντας έχει κάποιο ρόλο στην ωχρινοποίηση. Φαίνεται συνεπώς, ότι τα αυξημένα επίπεδα των ώριμων μορφών του GDF9 στο ωοθυλακικό υγρό, συσχετίζονται σημαντικά με την πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων και την ποιότητα των εμβρύων (Gode et al. 2011).

8. GDF9 και εμμηνόπαυση

Η μέση ηλικία εμμηνόπαυσης στις γυναίκες είναι 51 έτη, με ευρεία διακύμανση από τα 40 μέχρι τα 60 (Treloar et al. 1998, te Velde et al. 2002). Η ηλικία της εμμηνόπαυσης καθορίζεται και από γενετικούς παράγοντες. Μελέτες διδύμων, *sib-pair* και μητέρας-κόρης, έδειξαν συμμετοχή της κληρονομικότητας από 31-87% (Snieder et al. 1998, de Bruin et al. 2001, van Asselt et al. 2006). Η ηλικία της εμμηνόπαυσης αποτελεί περίπλοκο κληρονομικό γνώρισμα, καθώς επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς και τον τρόπο ζωής.

Η εμμηνόπαυση επέρχεται όταν η δεξαμενή των ωοθυλακίων στις ωοθήκες εξαντλείται και αδυνατεί να υποστηρίξει νέους καταμήνιους κύκλους (te Velde et al. 1998). Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, η δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων σχηματίζεται και περιέχει το μέγιστο 6-7 εκατομμύρια ωοκύτταρα την 20^η εβδομάδα κύησης (Block 1952). Κατόπιν η δεξαμενή των αρχέγονων ωοθυλακίων μειώνεται δραματικά στα 300- 400 χιλιάδες ωοκύτταρα κατά τη γέννηση του θήλεος (Block 1953, Forabosco et al. 1991). Συνεχής στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων στην δεξαμενή των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της ζωής, που αναφέρεται ως αρχική στρατολόγηση. Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής, ο αυξανόμενος αριθμός των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων που οδηγούνται στο κοιλωτικό στάδιο και η μείωση των ωοθυλακίων λόγω ατρησίας οδηγούν σε σταδιακή μείωση του αριθμού της αρχικής δεξαμενής των ωοθυλακίων με τελικό αποτέλεσμα την εμμηνόπαυση (McGee et al. 2000). Οι ακριβείς μηχανισμοί που ρυθμίζουν τον αρχικό προικισμό των αναπτυσσόμενων

ωοθηκών με ωοθυλάκια και ο ρυθμός με τον οποίο χάνονται τα αρχέγονα ωοθυλακία παραμένουν ασαφείς. Εκτιμάται ότι μέλη της υπερικογένειας TGF- β ρυθμίζουν την αρχική στρατολόγηση των ωοθυλακίων (Findlay et al. 2002, Knight et al. 2002, Knight et al. 2006). Οι AMH και AMHR2 (Kevenaar et al. 2006, Durlinger et al. 2002), GDF9 και BMP15 συσχετίστηκαν με ωοθηκική γήρανση και πρώιμη ωοθηκική ανεπάρκεια (Di Pasquale et al. 2006, Dixit et al. 2006, Laissue et al. 2006, Tiotiu et al. 2010) και FOXL2 με πρώιμη ωοθυλακική ανεπάρκεια (POI). Συμμετέχοντας στην αρχική στρατολόγηση των ωοθυλακίων μπορεί να θεωρηθούν και σαν κύρια γονίδια καθορισμού της ηλικίας εμμηνόπαυσης.

Οι Voorhuis et al. το 2011 έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ GDF9 και ηλικίας εμμηνόπαυσης. Πιθανόν, αυτά τα γονίδια (AMH, GDF9, FOXL2) να μην εμπλέκονται στον χρόνο της φυσικής εμμηνόπαυσης. Επίσης πιθανό είναι ότι τα SNPs που μελετήθηκαν να είναι λίγα και η παρούσα μελέτη να μην επαρκούσε ώστε να εντοπίσει τον συσχετισμό. Τέλος, είναι πιθανό ότι περίπλοκα χαρακτηριστικά, όπως ο χρόνος της εμμηνόπαυσης, δεν επηρεάζονται μονογονιδιακά αλλά μπορεί να επηρεάζονται από συνδυασμό γονιδίων με το περιβάλλον (φαινόμενο που ονομάζεται επίσταση) (Cordell 2002).

Διαγραφή (deletion) GDF9 οδηγεί σε μειωμένο πολλαπλασιασμό κοκκωδών κυττάρων, ανώμαλη ανάπτυξη ωοκυττάρου και αποτυχία ανάπτυξης ωοθυλακίων μετά το πρωτογενές στάδιο (Dong et al. 1996). Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 αναστέλλει την απόπτωση των κοκκωδών κυττάρων και την ωοθυλακική ατρησία. Συνέργεια GDF9 και BMP15 αναστέλλει τη διέγερση της έκκρισης προγεστερόνης από γοναδοτροφίνες (Knight et al. 2006, Spicer et al. 2006). Επιπλέον, το ωοκύτταρο οργανώνει πολλαπλασιασμό των κυττάρων που το περιβάλλουν, την απόπτωση, τον μεταβολισμό και την επέκτασή τους μέσω έκκρισης των παρακρινών αυτών παραγόντων (Gilchrist et al. 2008).

9. Σκοπός μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να προσδιορίσει αν η εμμηνόπαυση και η ηλικία γυναικών άνω των 40 ετών επηρεάζουν την ωοθηκική έκφραση του GDF9 mRNA.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Ασθενείς: Γυναίκες σε διάφορα στάδια εμμηνόπαυσης υποβλήθηκαν σε ολική υστερεκτομή μετά των εξαρτημάτων για θεραπευτικούς λόγους (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Βιολογικά χαρακτηριστικά γυναικών μελέτης: Π= Προεμμηνοπαυσιακό στάδιο, Μ= Μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο.

<u>Αριθμός δείγματος</u>	<u>Ηλικία (έτη)</u>	<u>Στάδιο Εμμηνόπαυσης</u>
P01	55	Μ
P02	67	Μ
P03	66	Μ
P04	45	Π
P05	48	Π
P06	72	Μ
P07	42	Π
P08	53	Μ
P09	46	Π
P10	45	Π
P11	52	Μ
P12	61	Μ
P13	42	Π
P14	40	Π
P15	68	Μ

10. Απομόνωση ολικού RNA

Δείγματα ωοθηκικού ιστού των γυναικών του Πίνακα 1, αφού ξεπλυθούν σε φυσιολογικό ορό, τοποθετούνται σε σωληνάρια erpendorf των 2 ml που περιέχουν 500μl Trizol (Invitrogen) (Chomczynski & Sacchi 1987, Chomczynski & Sacchi 2006) και αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι περεταίρω επεξεργασίας. Ακολουθεί ομογενοποίηση του ιστού, προσθήκη 1/10 (v/v) χλωροφόρμιο στο ομογενοποίημα για λύση των κυττάρων, ανάδευση για τουλάχιστον 10 λεπτά σε vortex και φυγοκέντρηση στις 12000rpm και 4°C για 15 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρησης σχηματίζονται σε κάθε σωληνάριο τρεις φάσεις: η υποκείμενη φάση που περιέχει χλωροφόρμιο αλλά και άλλα οργανικά στοιχεία, η μεσόφαση που περιέχει το DNA και η ανώτερη υδατική φάση που περιέχει το RNA του ιστού (εικόνα 4), την οποία συλλέγουμε σε νέο σωληνάριο erpendorf των 2ml, προσθέτουμε ίσο όγκο ισοπροπυλικής αλκοόλης, αναδεύουμε και τοποθετούμε στους -20°C για 24 ώρες για κατακρήμνιση του RNA.

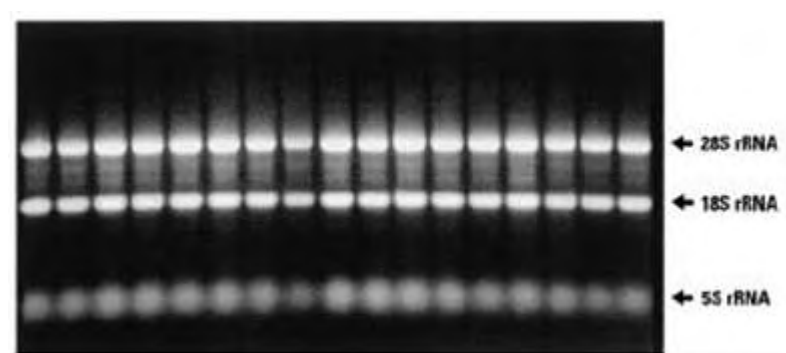


Εικόνα 4: Υδατική φάση: RNA, Μεσόφαση: DNA, Οργανική φάση: πρωτεΐνες, λιπίδια.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12000rpm και 4°C για 30 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο και ξεπλένεται το ίζημα RNA (μικρό λευκό) με 500μl 70% αιθανόλη. Στεγνώνεται το ίζημα σε θερμοκρασία δωματίου, διαλύετε σε 30-50μl απεσταγμένο νερό (ddH₂O) και αποθηκεύετε στους -80°C.

11. Ηλεκτροφόρηση ολικού RNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ποιότητα του RNA ελέγχεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Ιδανικά, αναμένουμε τρεις ζώνες οι οποίες αντικατοπτρίζουν τα 28S RNA, 18S RNA και 5SRNA (εικόνα 5).



Εικόνα 5: Δείγματα RNA μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

12. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA με τυχαίους εκκινητές

Χρησιμοποιήθηκε το first-strand synthesis Superscript III kit (Invitrogen). Σε κωνικά PCR erpendorf των 200μl τοποθετούνται 10μl 2X RT reaction mix, 2μl RT enzyme mix και 10μl ολικό RNA. Αναδεύουμε ελαφρά με vortex και βάζουμε τα σωληνάρια στο πρόγραμμα RT SUPER1 του θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler).

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

Προσθέτουμε 1μl E.coli RNase H και επωάζουμε στο πρόγραμμα RT2 του θερμοκυκλοποιητή, 37°C για 20 λεπτά, ώστε να διασπάσει το ένζυμο ότι RNA έχει απομείνει.

13. Επιλογή ειδικού ζεύγους εκκινητών

Από την τράπεζα γονιδίων fasta βρέθηκε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί το DGF9 mRNA βρίσκεται στο χρωμόσωμα 5 στην τοποθεσία 5: 132,196,873-132,202,576 και αποτελείται από δύο εξώνια και δύο εσώνια (πίνακας 2). Στόχος ήταν η κατασκευή εκκινητών που οριοθετούν δεξιά και αριστερά το δεύτερο μεγάλο εσώνιο και επεκτείνουν ένα κομμάτι mRNA μεγέθους 134 bp. Στην περίπτωση που θα παίρναμε DNA και όχι mRNA, οι εκκινητές θα όριζαν κομμάτι μεγέθους 1740 bp. Η σύνθεση του ζεύγους των εκκινητών (forward και reverse) μήκους 24 bp και περιεκτικότητα 50% σε GC έγινε από την Invitrogen.

Πίνακας 2: Κωδικοποιημένη περιγραφή του GDF9 γονιδίου.

Name	Transcript ID	Length, bp	Protein ID	Biotype
GDF9 001	ENST00000378673	2640	ENSP00000367942	Protein coding
GDF9 201	ENST00000296875	2020	ENSP00000296875	Protein coding
GDF9 002	ENST00000464378	566	No protein product	processed transcript
GDF9 003	ENST00000472320	541	No protein product	processed transcript

14. Ποσοτική Real-Time PCR

Τελικό βήμα της μελέτης είναι διεξαγωγή ποσοτικής Real-Time PCR. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το Quantifast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen). Σε κάθε σωληνάριο προσθέτουμε 5μl cDNA του υπό εξέταση δείγματος και από 10μl sybr green mix, 1μl forward primer, 1μl reverse primer και 3μl απεσταγμένο νερό. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε GAPDH mRNA, που εκφράζεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα.

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο πρόγραμμα:

- Hold I: στους 95°C για 3 λεπτά, για αποδιάταξη DNA (denaturation)

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

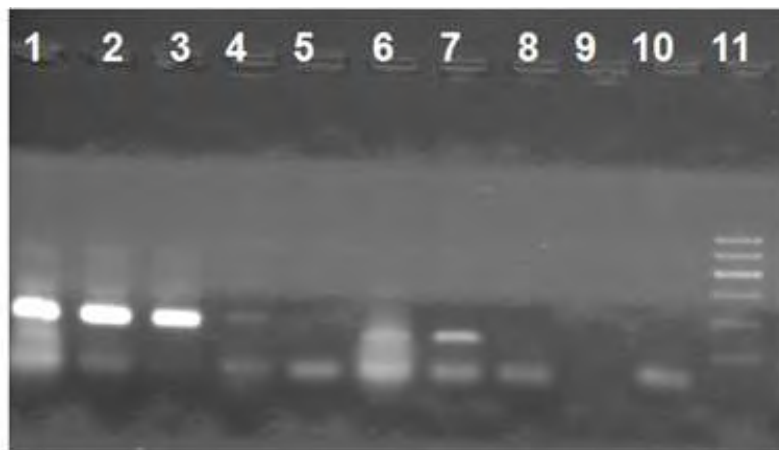
Ο συνολικός χρόνος για 45 κύκλους ποσοτικής RT-PCR είναι 130 λεπτά, ενώ κάποιες φορές προστέθηκαν 5 ακόμα κύκλοι για καλύτερα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της ποσοτικής RT-PCR προβάλλονται με χαρακτηριστικό γράφημα.

15. Ηλεκτροφόρηση προϊόντος PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Η επιβεβαίωση του προϊόντος της RT-PCR και η εξακρίβωση ότι επεκτάθηκε το επιθυμητό τμήμα DNA, γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο (εικόνα 6).

16. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν μέσω προγράμματος του Microsoft excel και του rotor gene Corbett software (εικόνα 7), όπου η συγκέντρωση GDF9 mRNA κάθε δείγματος δίνεται αναλογικά ως προς την συγκέντρωση GAPDH mRNA του ιδίου δείγματος. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση t-test ανεξάρτητων δειγμάτων και έλεγχος συσχέτισης του στατιστικού προγράμματος SPSS.



Εικόνα 6: Ηλεκτροφόρηση δειγμάτων (2, 4, 5, 6) μετά την RT- PCR.

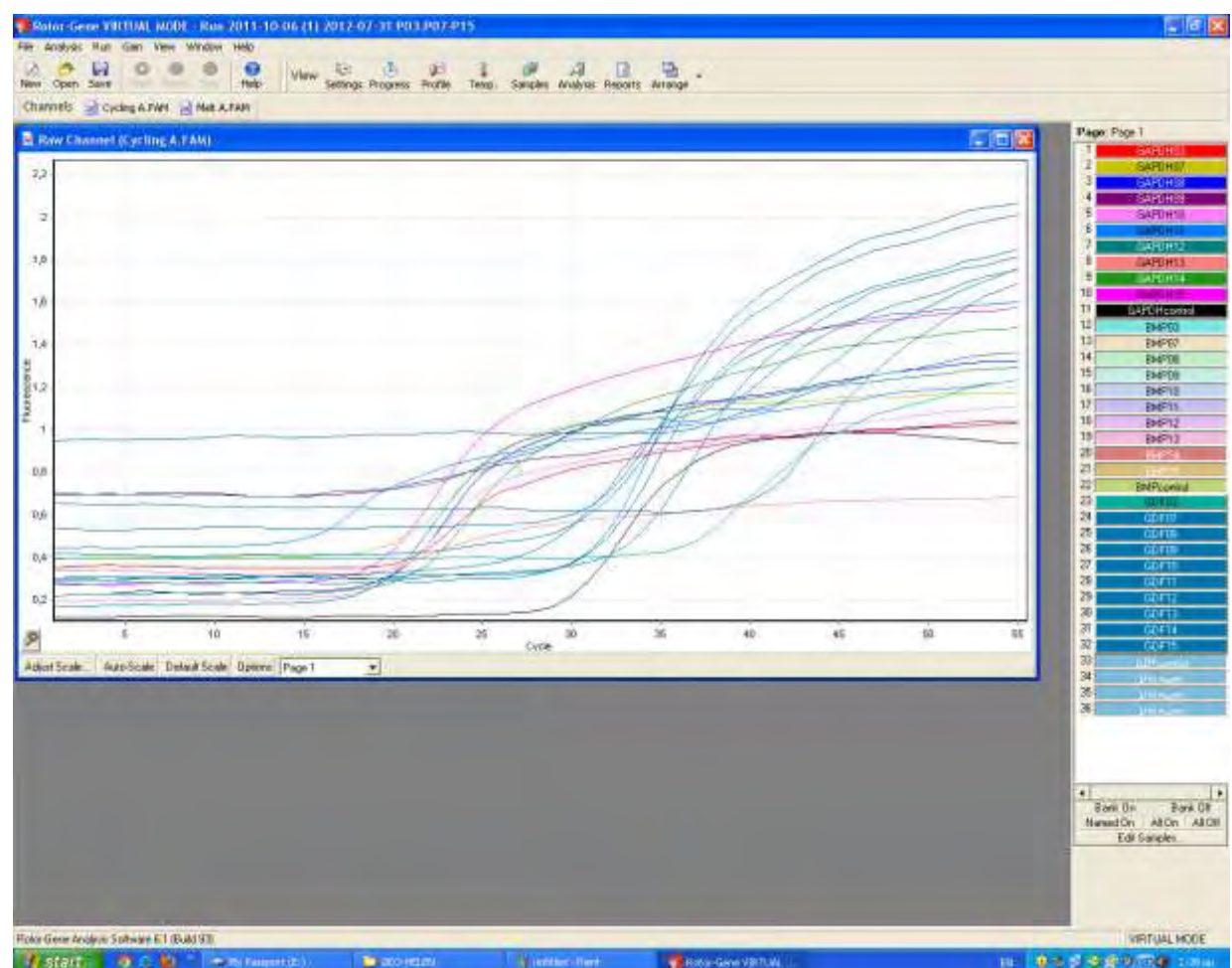
Θέση 1-4 : GAPDH δειγμάτων 2, 4, 5, 6, αντίστοιχα

Θέση 5 : GAPDH negative

Θέση 6-9 : GDF9 δειγμάτων 2, 4, 5, 6, αντίστοιχα

Θέση 10 : GDF9 negative

Θέση 11 : 100 bp ladder



Εικόνα 7: Χαρακτηριστική απεικόνιση των αποτελεσμάτων της RT- PCR με χρήση rotor gene Corbett software.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Με χρήση εφαρμογών του προγράμματος Microsoft excel ποσοτικοποιήθηκε το GDF9 mRNA στον ιστό ωοθηκών των 15 δειγμάτων της μελέτης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως αναλογία ως προς την τιμή του γενικού δείκτη ιστικής ζωτικότητας GAPDH mRNA του εκάστοτε δείγματος. Για τον λόγο αυτό, η τιμή του GAPDH mRNA αποδίδεται πάντα σταθερή και ίση με την μονάδα. Τα αποτελέσματα δίνονται αναλυτικά στους πίνακες 3 και 4.

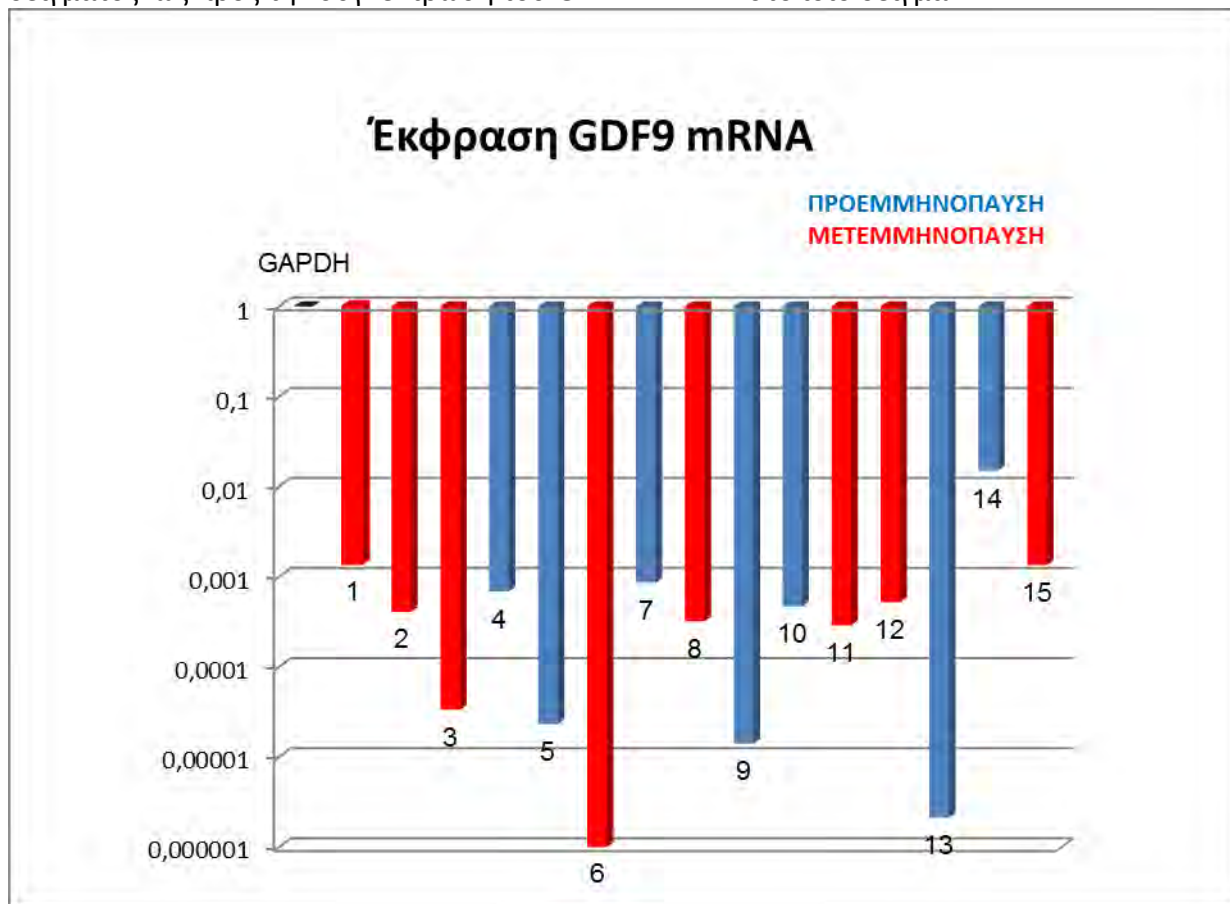
Πίνακας 3: Καταγραφή της τιμής της συγκέντρωσης του GDF9 mRNA σε ωοθηκικό ιστό γυναικών (δείγματα 1- 15) ως προς την τιμή της έκφρασης του GAPDH mRNA του ίδιου δείγματος. Επίσης δίνονται η ηλικία και το στάδιο εμμηνόπαυσης των γυναικών της μελέτης.

Αριθμός δείγματος	Αναλογία GDF9 mRNA δείγματος x ως προς GAPDH mRNA x	Ηλικία (έτη)	Στάδιο Εμμηνόπαυσης
GAPDH	1		
1	0,001390674	55	M
2	0,000407758	67	M
3	3,34E-05	66	M
4	0,000685764	45	Π
5	2,31E-05	48	Π
6	0	72	M
7	0,00085606	42	Π
8	0,000322145	53	M
9	1,40E-05	46	Π
10	0,000468391	45	Π
11	0,000288328	52	M
12	0,000519712	61	M
13	2,12E-06	42	Π
14	0,015092755	40	Π
15	0,001352646	68	M

*όπου E-ω= $10^{-ω}$

Π= Προεμμηνόπαυση M= Μετεμμηνόπαυση

Πίνακας 4: Σχηματική απεικόνιση της τιμής της συγκέντρωσης του GDF9 mRNA κάθε δείγματος ως προς την συγκέντρωση του GAPDH mRNA στο ίδιο δείγμα.



Επόμενο βήμα ήταν να γίνει διαχωρισμός των γυναικών της μελέτης σε δύο κατηγορίες όσον αφορά το αν βρίσκονται σε προ- ή μετεμμηνοπαυσιακό στάδιο. Με χρήση της εφαρμογής t-test για ανεξάρτητα δείγματα του στατιστικού προγράμματος SPSS ελέγχθηκε αν οι μέσες τιμές των δύο αυτών ομάδων έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την έκκριση GDF9 mRNA. Τα αποτελέσματα δίνονται στους πίνακες 5,6 και 7.

Από τον πίνακα 6 βλέπουμε πως η τιμή της t- κατανομής με στάθμη σημαντικότητας 5% είναι $t = 0,351$. Επειδή $t = 0,351$ είναι μεγαλύτερη από την τιμή $p = 0,05$, συμπεραίνουμε πως η διαφορά των μέσων τιμών των δύο δειγμάτων δεν είναι στατιστικά σημαντική, δηλαδή η έκφραση του GDF9 mRNA σε ιστό ωοθηκών δεν εξαρτάται από την εμμηνόπαυση.

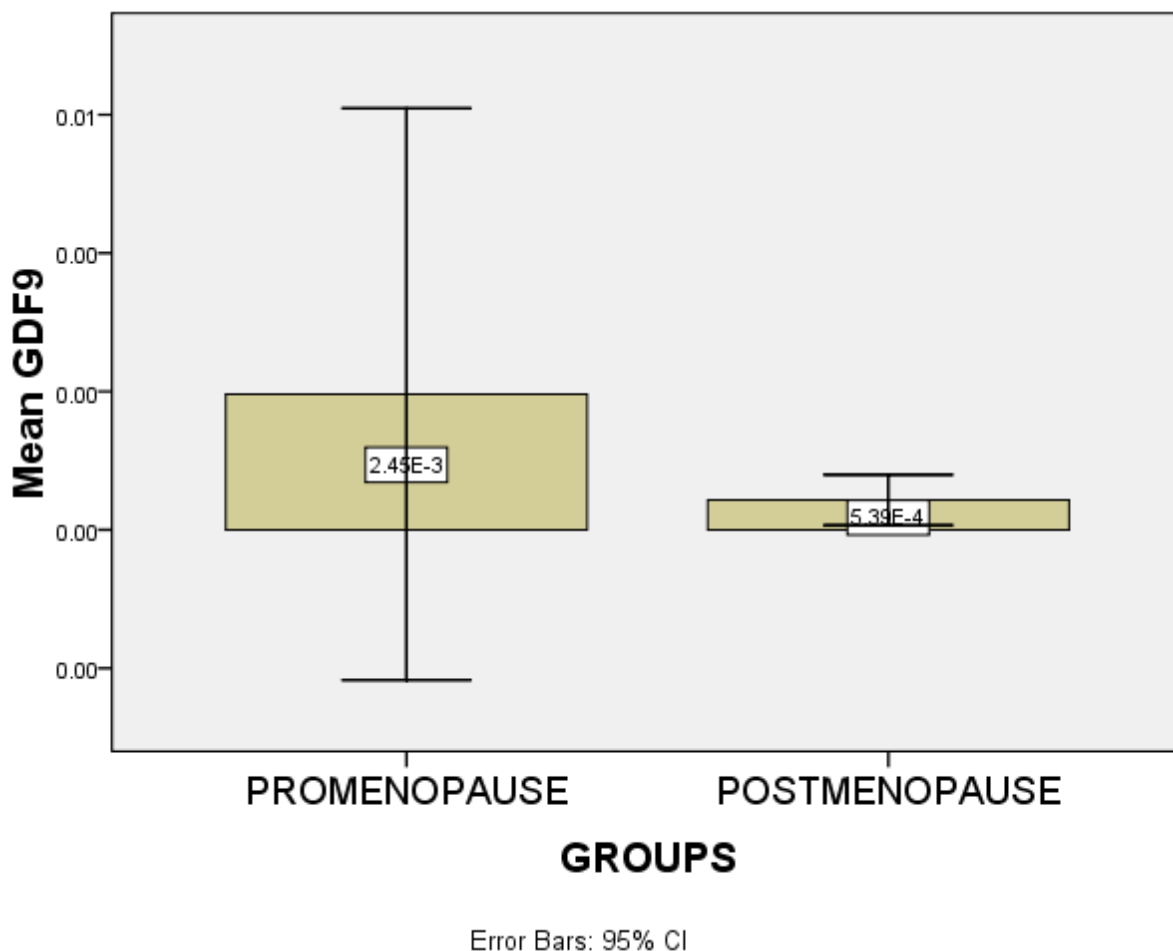
Πίνακας 5: Καταγράφεται ο αριθμός των ατόμων, η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα της μέσης τιμής των δύο ομάδων της μελέτης (Προεμμηνοπαυσιακές, Μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες), αντίστοιχα.

GROUPS		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
GDF9	PROMENOPAUSE	7	.0024	.00559	.00211
	POSTMENOPAUSE	8	.0005	.00054	.00019

Πίνακας 6: Καταγράφονται τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης των δύο ομάδων γυναικών. Μέσα σε κόκκινο κύκλο φαίνεται το % σημείο της t κατανομής και μέσα σε πράσινο τετράγωνο το 95% διάστημα εμπιστοσύνης της διαφοράς των μέσων τιμών των δύο δειγμάτων.

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
GDF9	Equal variances assumed	5.138	.041	.967	13	.351	.00191	.00197	-.00238	.00618
	Equal variances not assumed			.901	6.099	.402	.00191	.00212	-.00328	.00708

Πίνακας 7: Σχηματική απεικόνιση των μέσων τιμών των δύο ομάδων γυναικών (Προεμμηνοπαυσιακές, Μετεμμηνοπαυσιακές) σε ραβδόγραμμα.



Τέλος, έγινε προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης του GDF9 mRNA, στους ωοθηκικούς ιστούς των γυναικών της μελέτης, με την ηλικία. Έγινε έλεγχος συσχέτισης θεωρώντας την ηλικία ως ανεξάρτητη μεταβλητή και την τιμή της έκφρασης του GDF9 mRNA ως εξαρτημένη μεταβλητή. Τα αποτελέσματα δίνονται στους πίνακες 8, 9 και 10.

Από την ανάλυση βλέπουμε πως η τιμή του συντελεστή περιορισμού R^2 είναι ίση με 0,112 (πίνακας 8). Ο R^2 δείχνει το πόσο καλά η γραμμή παλινδρόμησης αντιπροσωπεύει τα δεδομένα της μελέτης. Στην προκειμένη περίπτωση, μόνο το 11% των τιμών του GDF9 mRNA εξηγείται από την γραμμική του σχέση με την ηλικία των γυναικών.

Για να υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ ηλικίας και έκφρασης GDF9 mRNA, αναμένουμε μία γραμμή παλινδρόμησης $y = a + bx$ και $b \neq 0$. Από τον πίνακα 9 βλέπουμε πως το a παίρνει την τιμή 0,008 αλλά το b παίρνει την τιμή 0, γεγονός που μας πληροφορεί πως δεν υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ αυτών των δύο τιμών. Το συμπέρασμα αυτό επιβεβαιώνεται και από την σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης των δύο τιμών (πίνακας 10).

Πίνακας 8: Στον κόκκινο κύκλο δίνεται το R^2 = συντελεστής περιορισμού.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.334 ^a	.112	.043	.00372

a. Predictors: (Constant), AGE

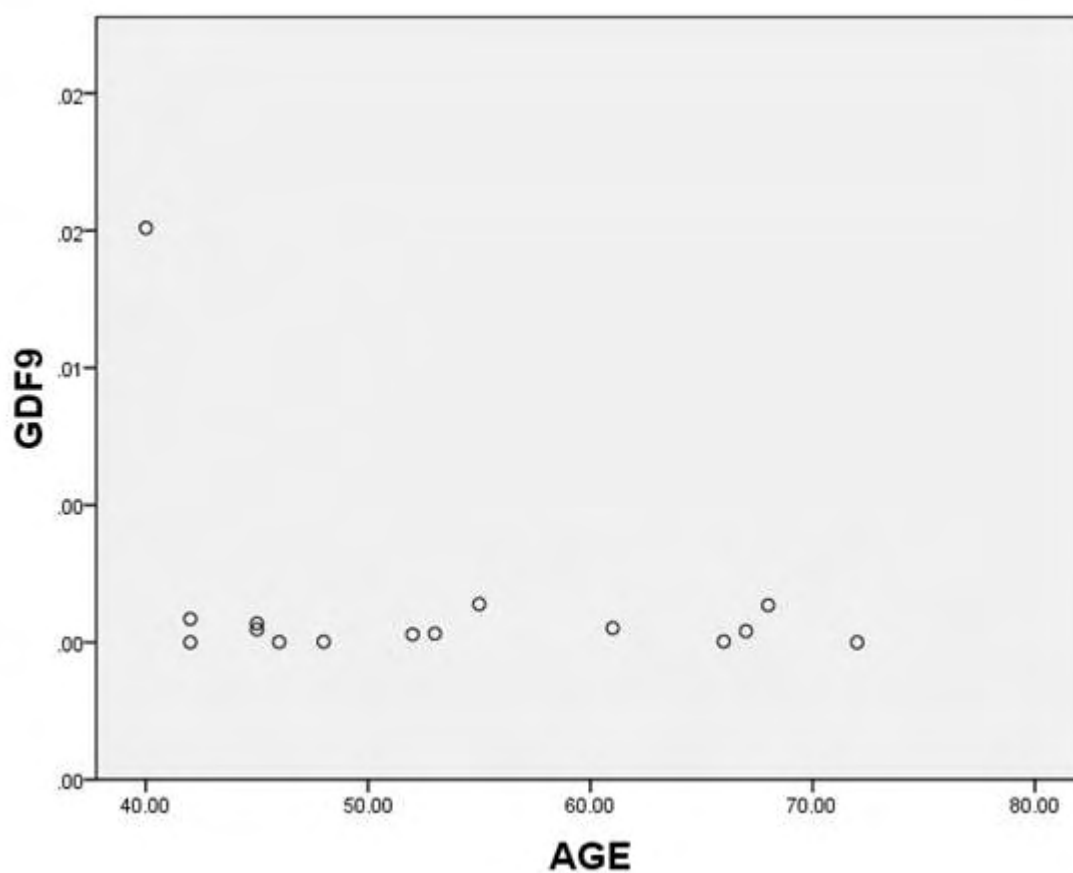
Πίνακας 9: Στον κόκκινο κύκλο δίνεται η τιμή του α , στο πράσινο τετράγωνο δίνεται η τιμή του b , στο κίτρινο τετράγωνο και στον μπλε κύκλο δίνονται οι τιμές που καθορίζουν την στατιστική σημαντικότητα. Τέλος, στον μωβ κύκλο δίνονται οι τιμές για το 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Coefficients^a

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	95.0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1 (Constant)	.008	.005		1.538	.148	-.003	.019
AGE	.000	.000	.334	1.277	.224	.000	.000

a. Dependent Variable: GDF9

Πίνακας 10: Σχηματική απεικόνιση της συσχέτισης μεταξύ ηλικίας γυναικών της μελέτης και τιμών έκφρασης του GDF9 mRNA στους ωθητικούς τους ιστούς.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 εκφράζεται στα ανθρώπινα ωοκύτταρα κατά την διάρκεια της ωοθυλακιογένεσης (Shimasaki et al. 2004, Laitinen et al. 1998, Dube et al. 1998, McGrath et al. 1995 20,22-24). Κατά την αρχική του έκκριση από το ωοκύτταρο ο GDF9 έχει σημαντικές δράσεις στα ωοθυλακικά σωματικά κύτταρα (προκοκκώδη και/ή κοκκώδη κύτταρα) των αρχέγονων και/ή των πρωτογενών ωοθυλακίων που είναι απαραίτητα για οποιαδήποτε ωοθυλακική πρόοδο. Στη συνέχεια, φαίνεται πως τοπικοί κυρίως παράγοντες όπως και οι GDF9 και BMP15 που προέρχονται από το ωοκύτταρο, ρυθμίζουν την μετάβαση του ωοθυλακίου από το πρωτογενές στο δευτερογενές στάδιο και ως επακόλουθο την ωοθυλακική ανάπτυξη στο τελευταίο προκοιλοτικό/αρχόμενο κοιλοτικό στάδιο (McNatty et al. 1999, Erickson & Shimasaki 2003, Drummond et al. 2003, Bristol & Woodruff 2004). Ο αυξητικός παράγοντας GDF9 παίζει επίσης σημαντικό ρόλο στα τελευταία στάδια της ωοθυλακικής ανάπτυξης πριν την ωορρηξία. Πριν το κύμα της LH, τα κύτταρα της θήκης απαιτούν GDF9 για να υποστηρίξουν μεταβολικούς καταρράκτες όπως γλυκόλυση και βιοσύνθεση στερόλης (Sugiura et al., 2005). Παρ' όλα αυτά, δεν υπάρχει ξεκάθαρη απόδειξη ότι εμπλέκονται μέλη της υπερκοινογένειας TGF-β στην ίδια τη διαδικασία της ωορρηξίας. Τουναντίον, η αποτυχία ωορρηξίας ως ανταπόκριση της διατάραξης των συνδετών της υπερκοινογένειας TGF-β και/ή των υποδοχέων τους μπορεί να θεωρηθεί σαν μια συνέπεια της αποτυχίας των ωοθυλακίων να αναπτυχθούν φυσιολογικά έως το προωοθυλακιόρρηκτο στάδιο (Knight & Glistler 2006).

Γονιδιακές μεταλλαγές του αυξητικού παράγοντα GDF9 είναι αιτία γονιμότητας ή υπογονιμότητας σε ποντίκια, πρόβατα και ανθρώπους. Γυναίκες με πρώιμη ωοθυλακική ανεπάρκεια (POF) (Dixit et al., 2006; Laissue et al., 2006; Kovanci et al., 2007; Zhao et al., 2007) και μητέρες διζυγωτικών διδύμων με πολυωοθυλακιόρρηξία (Montgomery et al., 2004; Palmer et al., 2006) φέρουν πολλές μεταλλαγές GDF9 (Otsuka et al. 2011). Επομένως, ο GDF9 πιθανόν να μεταβάλλει τον ωοθυλακιόρρηκτο ρυθμό.

Μελέτες έδειξαν συμμετοχή της κληρονομικότητας από 31-87% (Snieder et al. 1998, de Bruin et al. 2001, van Asselt et al. 2006) ενώ, η ηλικία της εμμηνόπαυσης αποτελεί πολυπαραγοντικό κληρονομικό γνώρισμα. Η εμμηνόπαυση επέρχεται όταν η δεξαμενή των ωοθυλακίων στις ωοθήκες εξαντλείται και αδυνατεί να υποστηρίξει νέους καταμήνιους κύκλους (te Velde et al. 1998). Κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής ζωής, ο αυξανόμενος αριθμός των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων που οδηγούνται στο κοιλοτικό στάδιο και η μείωση των ωοθυλακίων λόγω ατρησίας οδηγούν σε σταδιακή μείωση του αριθμού της αρχικής δεξαμενής των ωοθυλακίων με τελικό αποτέλεσμα την εμμηνόπαυση (McGee et al. 2000). Οι AMH και AMHR2 (Kevenaar et al. 2006, Durlinger et al. 2002), GDF9 και BMP15 συσχετίστηκαν με ωοθηκική γήρανση και πρώιμη ωοθηκική ανεπάρκεια (Di Pasquale et al. 2006, Dixit et al. 2006, Laissue et al. 2006, Tiotiu et al. 2010) και FOXL2 με πρώιμη ωοθυλακική ανεπάρκεια (POI). Συμμετέχοντας στην αρχική στρατολόγηση των ωοθυλακίων μπορεί να θεωρηθούν και σαν κύρια γονίδια καθορισμού της ηλικίας εμμηνόπαυσης. Οι Voorhuis et al. 2011 έδειξαν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ GDF9 και ηλικίας εμμηνόπαυσης.

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε με σκοπό να προσδιοριστεί αν η ωοθηκική έκφραση των επιπέδων GDF9 mRNA επηρεάζεται από την εμμηνόπαυση και την ηλικία των γυναικών άνω των 40 ετών.

Το πρώτο βήμα ήταν ο διαχωρισμός των γυναικών της μελέτης σε δύο κατηγορίες με κριτήριο το αν βρίσκονταν πριν ή μετά την εμμηνόπαυση. Στόχος ήταν να προσδιορίσουμε την μέση τιμή της έκφρασης του GDF9 mRNA σε κάθε ομάδα και στη συνέχεια τη μεταξύ τους σύγκριση. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μέσες τιμές των δύο ομάδων (πίνακας 6).

Στη συνέχεια, θέλαμε να προσδιορίσουμε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης GDF9 mRNA στην ωοθήκη και της ηλικίας των γυναικών. Τα αποτελέσματα μας, καταδεικνύουν πως δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο αυτών παραγόντων και πως η έκφραση του GDF9 κυμαίνεται σε σταθερά επίπεδα (πίνακας 10). Τα αποτελέσματα της μελέτης έρχονται σε συμφωνία με μελέτη των Voorhuis et al. (2011) που έδειξαν πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ GDF9 και ηλικίας έναρξης της εμμηνόπαυσης.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα της μελέτης, συμπεραίνουμε πως η GDF9 mRNA-εξαρτώμενη λειτουργικότητα της ωοθήκης είναι ανεξάρτητη και δεν επηρεάζεται από την εμμηνόπαυση και την ηλικία μετά τα 40 έτη. Έτσι, υποστηρίζεται η υπόθεση ότι στην ομάδα των γυναικών που μελετήθηκε, ο ωοθηκικός ιστός βρίσκεται σε κατάσταση λειτουργικής ετοιμότητας όσον αφορά τον αυξητικό παράγοντα GDF9.

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για να επιβεβαιωθούν τα προκαταρκτικά αυτά αποτελέσματα ώστε να διασαφηνιστεί η έκφραση, ο ακριβής ρόλος του αυξητικού παράγοντα GDF9 και η συσχέτιση του με την λειτουργικότητα των ωοθηκών, καθώς τα αποτελέσματα της μελέτης βασίστηκαν σε μικρό αριθμό περιστατικών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aaltonen J., et al., 1999 Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(8): p. 2744-50.

Block E., 1952 Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)*, 14:108–123

Block E., 1953 A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat (Basel)*, 17: 201–206

Bodensteiner K.J., et al., 2000 Expression of growth and differentiation factor-9 in the ovaries of fetal sheep homozygous or heterozygous for the inverdale prolificacy gene (FecX(I)). *Biol Reprod*, 62(6): p. 1479-85.

Bodensteiner KJ., Clay CM., Moeller CL. & Sawyer HR., 1999 Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biology of Reproduction*, 60 381–386.

Bristol SK. & Woodruff TK., 2004 Follicle-restricted compartmentalization of transforming growth factor beta superfamily ligands in the feline ovary. *Biology of Reproduction*, 70 846–859.

Carabatsos MJ., Elvin J., Matzuk MM. & Albertini DF., 1998 Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, 204 373–384.

Chen Y., Zhao S., Qiao J., Liu P., Lian Y. & Zheng X., 2009 Expression of bonemorphogenetic protein-15 in human oocyte and cumulus granulosa cells primed with recombinant follicle-stimulating hormone followed by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril*, 92:2045–6.

Chomczynski P. & Sacchi N., 2006 The Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform Extraction: Twenty-Something Years on, *Nature Protocols*, Vol. 1, No. 2, pp. 581-585. doi:10.1038/nprot.2006.83

Chomczynski P. & Sacchi N., 1987 Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol- Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry*, Vol. 162, No. 1, pp. 156-159. doi:10.1016/0003-2697(87)90021-2

Cordell HJ., 2002 Epistasis: what it means, what it doesn't mean and statistical methods to detect it in humans. *Hum Mol Genet*, 11:2463– 2468

Cortvrindt R., Smitz J. & Van Steirteghem AC., 1997 Assessment of the need for follicle stimulating hormone in early preantral mouse follicle culture in vitro. *Human Reproduction*, 12 759–768.

de Bruin JP., Bovenhuis H., van Noord PA., Pearson PL., van Arendonk JA., te Velde ER., Kuurman WW. & Dorland M., 2001 The role of genetic factors in age at natural menopause. *Hum Reprod*, 16:2014–2018

Di Pasquale E., Rossetti R., Marozzi A., Bodega B., Borgato S., Cavallo L., Einaudi S., Radetti G., Russo G., Sacco M., Wasniewska M., Cole T., Beck-Peccoz P., Nelson LM. & Persani L., 2006 Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1976–1979

Dixit H., Rao LK., Padmalatha VV., Kanakavalli M., Deenadayal M., Gupta N., Chakrabarty B. & Singh L., 2006. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*, 119:408–415.

Dong, J., et al., 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383(6600): p. 531-5.

Dong J., Albertini DF., Nishimori K., Rajendra Kumar T., Lu N. & Matzuk MM., 1996 Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531–535

Drummond AE., Dyson M., Le MT., Ethier JF. & Findlay JK., 2003 Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202 53–57.

Dube JL., Wang P., Elvin J., Lyons KM., Celeste AJ. & Matzuk MM., 1998 The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12 1809–1817.

Dufour J., Cahill LP. & Mauleon P., 1979 Short- and long-term effects of hypophysectomy and unilateral ovariectomy on ovarian follicular populations in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 57 301–309.

Durlinger AL., Visser JA. & Themmen AP., 2002 Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Reproduction*, 124: 601–609

El-Fouly MA., Cook B., Nekola M. & Nalbandov AV., 1970 Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology*, 87:288– 293.

Elvin JA., Yan C. & Matzuk MM., 2000 Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 159 1–5.

Elvin JA., Yan C., Wang P., Nishimori K. & Matzuk MM., 1999 Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology*, 13 1018–1034.

Eppig JJ., 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122 829–838.

Erickson GF. & Shimasaki S., 2003 The spatiotemporal expression pattern of the bonemorphogenetic proteinfamily inratovary cell types duringthe estrous cycle. Reproductive Biology and Endocrinology, 1 9.

Falck B., 1959 Site of production of oestrogen in rat ovary as studied in micro-transplants. Acta Physiol Scand, 47:1–101.

Findlay JK., Drummond AE., Dyson ML., Baillie AJ., Robertson DM. & Ethier JF., 2002 Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor- b superfamily. Mol Cell Endocrinol, 191:35–43

Fitzpatrick S.L., et al., 1998 Expression of growth differentiation factor-9 messenger ribonucleic acid in ovarian and nonovarian rodent and human tissues. Endocrinology, 139(5): p. 2571-8.

Forabosco A., Sforza C., De Pol A., Vizzotto L., Marzona L. & Ferrario VF., 1991 Morphometric study of the human neonatal ovary. Anat Rec, 231:201–208

Galloway SM., 2004 Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). Biology of Reproduction, 70 900–909.

Galloway SM., McNatty KP., Cambridge LM., Laitinen MP., Juengel JL., Jokiranta TS., McLaren RJ., Luiro K., Dodds KG., Montgomery GW., Beattie AE., Davies GH. & Ritvos O., 2000 Mutations in an oocyte derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. Nature Genetics, 25 279–283.

Gilchrist RB., Lane M. & Thompson JG., 2008 Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. Hum Reprod Update, 14:159–77.

Gilchrist RB., Ritter LJ. & Armstrong DT., 2004 Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. Animal Reproduction Science, 82 431–446.

Glister C., Kemp CF. & Knight PG., 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, 127 239–254.

Gosden R., 1996 The vocabulary of the egg. Nature, 383:485–486

Gray AM. & Mason AJ., 1990 Requirement for activin A and transforming growth factor-b1 in homodimer assembly. Science, 247:1328–1330

Groome NP., Latinen M., Ritvos O. & Juengel JL., 2005 Oocyteexpressed genes affecting ovulation rate. Molecular and Cellular Endocrinology, 234 57–66.

Guo Q., Kumar TR., Woodruff T., Hadsell LA., DeMayo FJ. & Matzuk MM., 1998 Overexpression of mouse follistatin causes reproductive defects in transgenic mice. *Molecular Endocrinology*, 12 96–106.

Hanrahan JP., Gregan SM., Mulsant P., Mullen M., Davis GH., Powell R., Hasegawa Y., Miyamoto K., Abe Y., Nakamura T., Sugino H., Eto Y., Shibai H. & Igarashi M., 1988 Induction of follicle-stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 156 668–674.

Hashimoto O., Moore RK. & Shimasaki S., 2005 Posttranslational processing of mouse and human BMP15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:5426–31.

Hayashi M., McGee EA., Min G., Klein C., Rose UM., van Duin M. & Hsueh AJ., 1999 Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 140 1236–1244.

Hreinsson JG., Scott JE., Rasmussen C., Swahn ML., Hsueh AJ. & Hovatta., O 2002 Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87 316–321.

Huang Q., Cheung AP., Zhang Y., Huang HF., Auersperg N. & Leung PC., 2009 Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296:E1344–E1353.

Hussein TS., Thompson JG. & Gilchrist RB., 2006 Oocyte secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Dev Biol* 296:514–21.

Jaatinen R., Laitinen MP., Vuojolainen K., Aaltonen J., Louhio H., Heikinheimo K., Lehtonen E. & Ritvos O., 1999 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*, 156 189–193.

Juengel JL. & McNatty KP., 2005 The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update*, 11 143–160.

Juengel JL., Hudson NL., Heath DA., Smith P., Reader KL., Lawrence SB., O'Connell AR., Laitinen MP., Cranfield M., Groome NP., Ritvos O. & McNatty KP., 2002 Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, 67 1777–1789.

Kevenaar ME., Themmen AP., Rivadeneira F., Uitterlinden AG., Laven JS., van Schoor NM., Lips P., Pols HA. & Visser JA., 2007 A polymorphism in the AMH type II receptor gene is associated with age at menopause in interaction with parity. *Hum Reprod*, 22:2382– 2388

Knight PG. & Glister C., 2006 TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132:191–206

Knight PG. & Glister C., 2003 Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim Reprod Sci*, 78:165–183

Knochenhauer ES., Key TJ., Kahsar-Miller M., Waggoner W., Boots LR. & Azziz R., 1998 Prevalence of the polycystic ovary syndrome in unselected black and white women of the southeastern United States: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 3078–3082.

Kovanci E., Rohozinski J., Simpson JL., Heard MJ., Bishop CE. & Carson SA., 2007 Growth differentiating factor-9 mutations may be associated with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 87:143–146.

Krisher RL., 2004 The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*, 82(E-Suppl):E14-23.

Laitinen M., Vuojolainen K., Jaatinen R., Ketola I., Aaltonen J., Lehtonen E., Heikinheimo M. & Ritvos O., 1998 A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mechanics of Development*, 78 135- 140.

Laissue P., Christin-Maitre S., Touraine P., Kuttann F., Ritvos O., Aittomaki K., Bourcigaux N., Jacquesson L., Bouchard P., Frydman R., Dewailly D., Reyss AC., Jeffery L., Bachelot A., Massin N., Fellous M. & Veitia RA., 2006 Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. *Eur J Endocrinol*, 154:739–744

Liao WX., Moore RK., Otsuka F. & Shimasaki S., 2003 Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. Implication of the aberrant ovarian phenotype of BMP- 15 mutant sheep. *Journal of Biological Chemistry*, 278 3713–3719.

Liao WX., Moore RK. & Shimasaki S., 2004 Functional and molecular characterization of naturally occurring mutations in the oocyte-secreted factors bone morphogenetic protein-15 and growth and differentiation factor-9. *Journal of Biological Chemistry*, 279 17391–17396.

Manova K., Huang EJ., Angeles M., De Leon V., Sanchez S., Pronovost SM., Besmer P. & Bachvarova RF., 1993 The expression pattern of the c-kit ligand in gonads of mice supports a role for the c-kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Developmental Biology*, 157 85–99.

Massagué J. & Wotton D., 2000 Transcriptional control by the TGF β / Smad signaling system. *EMBO Journal*, 19 1745–1754.

Massagué J., Attisano L. & Wrana JL., 1994 The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in Cell Biology*, 4 172–178.

- Massagué J., 1996 TGF- β signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, 85:947–950
- McGee EA. & Hsueh AJ., 2000 Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 21:200–214
- McGrath SA., Esquela AF. & Lee S-J., 1995 Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol*, 9:131–136
- McIntosh CJ., Lun S., Lawrence S., Western AH., McNatty KP. & Juengel JL., 2008 The proregion of mouse BMP15 regulates the cooperative interactions of BMP15 and GDF9. *Biol Reprod*, 79:889–96.
- McNatty KP., Smith P., Moore LG., Reader K., Lun S., Hanrahan JP., Groome NP., Latinen M., Ritvos O. & Juengel JL., 2005 Oocyteexpressed genes affecting ovulation rate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234 57–66.
- McNatty KP., Juengel JL., Reader KL., Lun S., Myllymaa S., Lawrence SB., et al., 2005b Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction*, 129:473–80
- McNatty KP., Moore LG., Hudson NL., Quirke LD., Lawrence SB., Reader K., et al., 2004 The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction*, 128:379–86.
- McNatty KP., Juengel JL., Wilson T., Galloway SM. & Davis GH., 2001 Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. *Reproduction Fertility and Development*, 13 549–555.
- McNatty KP., Heath DA., Lundy T., Fidler AE., Quirke L., O’Connell A., Smith P., Groome N. & Tisdall DJ., 1999 Control of early ovarian follicular development. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 54 3–16.
- Monteiro RM., Roelen BA. & Bevers MM., 2005 Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 63 872–889.
- Montgomery GW., Zhao ZZ., Marsh AJ., Mayne R., Treloar SA., James M., Martin NG., Boomsma DI. & Duffy DL., 2004 A deletion mutation in GDF9 in sisters with spontaneous DZ twins. *Twin Res*, 7:548–555.
- Motttershead DG. & Watson AJ., Oocyte peptides as paracrine tools for ovarian stimulation and oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*, 15:789–94.
- Nalbandov AV., 1970 Oogenesis. In: Biggers JD, Schuetz AW, editors. *Symposium on oogenesis*. Baltimore, MD: Johns Hopkins School of Hygiene and Public Health, University Park Press, pp 513–522.

Nilsson EE. & Skinner MK., 2003 Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology of Reproduction*, 69 1265–1272.

Nilsson EE. & Skinner MK., 2002 Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biology of Reproduction*, 67 1018–1024.

Nishimori K. & Matzuk MM., 1996 Transgenic mice in the analysis of reproductive development and function. *Reviews of Reproduction*, 1 203–212.

Orisaka M., Jiang JY., Orisaka S., Kotsuji F. & Tsang BK., 2009 Growth differentiation factor 9 promotes rat preantral follicle growth by up-regulating follicular androgen biosynthesis. *Endocrinology*, 150:2740–2748.

Orisaka M., Orisaka S., Jiang JY., Craig J., Wang Y., Kotsuji F. & Tsang BK., 2006 Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. *Mol Endocrinol*, 20:2456–2468.

Otsuka F., McTavish K., & Shimasaki S., 2011 Integral Role of GDF-9 and BMP-15 in Ovarian Function, *Molecular Reproduction & Development*, 78:9–21

Otsuka F., Moore RK. & Shimasaki S., 2001a Biological function and cellular mechanism of bone morphogenetic protein-6 in the ovary. *Journal of Biological Chemistry*, 276 32889–32895.

Otsuka F., Moore RK., Iemura S., Ueno N. & Shimasaki S., 2001b Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289 961–966.

Otsuka F., Yao Z., Lee T., Yamamoto S., Erickson GF. & Shimasaki S., 2000 Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 275 39523–39528.

Palmer JS., Zhao ZZ., Hoekstra C., Hayward NK., Webb PM., Whiteman DC., Martin NG., Boomsma DI., Duffy DL. & Montgomery GW., 2006 Novel variants in growth differentiation factor 9 in mothers of dizygotic twins. *J Clin Endocrinol Metab*, 91:4713– 4716.

Parrott JA. & Skinner MK., 2000 Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular and Reproductive Development*, 55 55–64.

Revelli A., delle Piane L., Casano S., Molinari E., Massbri M. & Rinaudo P., 2009 Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod Biol Endocrinol*, 4:7–40.

Shi FT., Cheung AP., Klausen C., Huang HF. & Leung PC., 2010 Growth differentiation factor 9 reverses activin A suppression of steroidogenic acute regulatory protein

expression and progesterone production in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 95:E172–E180.

Shi FT., Cheung AP., Huang HF. & Leung PC., 2009a Effects of endogenous growth differentiation factor 9 on activin A-induced inhibin B production in human granulosa-lutein cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 94:5108–5116.

Shi FT., Cheung AP. & Leung PC., 2009b Growth differentiation factor 9 enhances activin a-induced inhibin B production in human granulosa cells. *Endocrinology*, 150:3540–3546.

Shimasaki S., Moore RK., Otsuka F. & Erickson GF., 2004 The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25 72–101.

Shimasaki S., Zachow RJ., Li D., Kim H., Iemura S., Ueno N., Sampath K., Chang RJ. & Erickson GF., 1999 A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS*, 96 7282–7287.

Snieder H., MacGregor AJ. & Spector TD., 1998 Genes control the cessation of a woman's reproductive life: a twin study of hysterectomy and age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 83:1875–1880

Solloway MJ., Dudley AT., Bikoff EK., Lyons KM., Hogan BL. & Robertson EJ., 1998 Mice lacking Bmp6 function. *Developmental Genetics*, 22 321–339.

Souza CJ., Campbell BK., McNeilly AS. & Baird DT., 2002 Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction*, 123 363–369.

Spicer LJ., Aad PY., Allen DT., Mazerbourg S., Payne AH. & Hsueh AJ., 2008 Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biol Reprod*, 78:243–53.

Spicer LJ., Aad PY., Allen DT., Mazerbourg S. & Hsueh AJ., 2006 Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol*, 189:329–39.

Sproul K., Jones M., Mathur R., Azziz R. & Goodarzia M., 2010 Association study of four key folliculogenesis genes in polycystic ovary syndrome Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism

Sugiura K., Pendola FL. & Eppig JJ., 2005 Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: Energy metabolism. *Dev Biol*, 279:20–30.

- Takebayashi K., Takakura K., Wang H., Kimura F., Kasahara K. & Noda Y., 2000 Mutation analysis of the growth differentiation factor-9 and -9B genes in patients with premature ovarian failure and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 74:976–9.
- te Velde ER. & Pearson PL., 2002 The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update*, 8:141–154
- te Velde ER., Dorland M. & Broekmans FJ., 1998 Age at menopause as a marker of reproductive ageing. *Maturitas*, 30:119–125
- Teixeira Filho FL., Baracat EC., Lee TH., Suh CS., Matsui M., Chang RJ., et al., 2002 Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:1337–44.
- ten Dijke P., Franzén P., Yamashita H., Ichijo H., Heldin C-H. & Miyazono K., 1994 Serine/threonine kinase receptors. *Prog Growth Factors*, 5:55–72
- Tiotiu D., Alvaro Mercadal B., Imbert R., Verbist J., Demeestere I., De Leener A., Englert Y., Vassart G., Costagliola S. & Delbaere A., 2010 Variants of the BMP15 gene in a cohort of patients with premature ovarian failure. *Hum Reprod*, 25:1581–1587
- Treloar SA., Do KA. & Martin NG., 1998 Genetic influences on the age at menopause. *Lancet*, 352:1084–1085
- van Asselt KM., Kok HS., van der Schouw YT., Peeters PH., Pearson PL. & Grobbee DE., 2006 Role of genetic analyses in cardiology. Part II: heritability estimation for gene searching in multifactorial diseases. *Circulation*, 113:1136–1139
- Vitt UA., Hayashi M., Klein C. & Hsueh AJ., 2000a Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biology of Reproduction*, 62 370–377.
- Vitt UA., McGee EA., Hayashi M. & Hsueh AJ., 2000b In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, 141 3814–3820
- Voorhuis M., Broekmans F., Fauser B, Onland-Moret C., & van der Schouw Y., 2011 Genes Involved in Initial Follicle Recruitment May Be Associated with Age at Menopause. *Clin Endocrinol Metab*, 96(3):E473–E479
- Wakefield LM., Smith DM., Broz S., Jackson M., Levinson AD. & Sporn MB., 1989 Recombinant TGF- β 1 is synthesized as a two-component latent complex that shares some structural features with the native platelet latent TGF- β 1 complex. *Growth Factors*, 1:203–218
- Wang J. & Roy SK., 2004 Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, 70(3): p. 577-85.

Watson AJ., 2007 Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci*, 85:E1–3.

Wei L., Liang X., Fang C. & Zhang M., 2011 Abnormal expression of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in stimulated oocytes during maturation from women with polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 0015-0282

Wu YT., Tang L., Cai J., Lu XE., Xu J., Zhu XM., et al., 2007 High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development. *Hum Reprod*, 22:1526–31

Xiao S., Robertson DM. & Findlay JK., 1992 Effects of activin and folliclestimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 131 1009–1016.

Yamamoto N., Christenson LK., McAllister JM. & Strauss JF., 2002 Growth differentiation factor-9 inhibits 3050-adenosine monophosphate–stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 87:2849–56

Yan C., Wang P., DeMayo J., DeMayo FJ., Elvin JA., Carino C., Prasad SV., Skinner SS., Dunbar BS., Dube JL., Celeste AJ. & Matzuk MM., 2001 Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, 15 854–866.

Yeo CX., Gilchrist RB., Thompson JG. & Lane M., 2008 Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. *Hum Reprod*, 1:67–73.

Zhao SY., Qiao J., Chen YJ., Liu P., Li J. & Yan J., 2010 Expression of growth differentiation factor-9 and bone morphogenetic protein- 15 in oocytes and cumulus granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 94:261–267.

Zhao H., Qin Y., Kovanci E., Simpson JL., Chen ZJ. & Rajkovic A., 2007 Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 88:1474–1476.

