



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

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ

ΣΤΕΡΟΕΙΔΩΝ ΟΡΜΟΝΩΝ: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ BMP 7 ΚΑΙ 15

ΔΗΜΗΤΡΑ Α. ΙΩΑΝΝΙΔΟΥ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ

Σεπτέμβριος 2012

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

ΙΩΑΝΝΗΣ ΜΕΣΣΗΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΝΤΑΦΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πρόλογος	5
1. Εισαγωγή	6
1.1 Στεροειδογένεση	6
1.2 Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες	10
1.2.1 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 15 (BMP-15)	12
1.2.2 Αρνητικός μηχανισμός ανάδρασης μεταξύ της BMP-15 και του Kit-Ligand των κοκκωδών κυττάρων	13
1.2.3 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 7 (BMP-7)	15
Ερευνητικός σκοπός	16
2. Υλικά και Μέθοδοι	17
2.1 Ομάδα πειραμάτων	17
2.2 Κοκκώδη κύτταρα	17
2.3 Διαδικασία απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων	17
2.4 Υπολογισμός αριθμού κυττάρων	18
2.5 Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων	19
2.6 Αναλυτική διαδικασία	19
3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων	21

4. Αποτελέσματα	21
4.1 Παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες καλλιέργειας	21
4.2 Παραγωγή προγεστερόνης στις 48 ώρες καλλιέργειας	24
4.3 Παραγωγή προγεστερόνης στις 72 ώρες καλλιέργειας	27
4.4 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 24 ώρες καλλιέργειας	30
4.5 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες καλλιέργειας	33
4.6 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 72 ώρες καλλιέργειας	36
5. Συζήτηση	39
6. Περίληψη	41
7. Βιβλιογραφία	44

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια διεξαγωγής του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών στη Βιολογία της Αναπαραγωγής, στη Μαιευτική και Γυναικολογική κλινική του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2011-2012. Επιβλέπων της εργασίας αυτής ήταν ο Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιωάννης Ε. Μεσσήνης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή Ιωάννη Μεσσήνη για την ευκαιρία που μου παρείχε να διεξάγω τη συγκεκριμένη εργασία καθώς και για τη συνεχή καθοδήγησή του.

Ευχαριστίες ακόμη οφείλω στη Βιοχημικό και υποψήφια διδάκτορα Ερμιόνη Πράπα, καθώς και στις Βιολόγους και υποψήφιες διδάκτορες Ελένη Κατσιάνη και Εβελίνα Κορώνα, για τον χρόνο που μου διέθεσαν, τις πολύτιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους καθώς και για τη φιλική τους διάθεση. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την συμφοιτήτριά μου Ευαγγελία Σπυριδάκη για την άριστη συνεργασία.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΤΕΡΟΕΙΔΟΓΕΝΕΣΗ

Η φυσιολογική ανάπτυξη των ωοθυλακίων ελέγχεται από γοναδοτροφίνες καθώς και από αυτοκρινικούς και παρακρινικούς παράγοντες των ωοθηκών. Οι παρακρινικοί αυτοί παράγοντες περιλαμβάνουν μέλη της υπερ-οικογένειας του αυξητικού παράγοντα TGF-β, όπως τον παράγοντα GDF-9 και αρκετές οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMP -3, BMP-4, BMP-6, BMP-7 και BMP-15) οι οποίες εκκρίνονται από τα ωοκύτταρα, τα κοκκώδη κύτταρα ή τα κύτταρα θήκης.

Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι οι BMPs ότι παίζουν ρόλο- κλειδί στη γυναικεία γονιμότητα στα θηλαστικά, ρυθμίζοντας τη στεροειδογένεση και μιτογένεση στα κοκκώδη κύτταρα.

Με τον όρο στεροειδογένεση εννοούμε τη διαδικασία εκείνη που περιλαμβάνει τις αντιδράσεις παραγωγής στεροειδών ορμονών, δηλαδή ανδρογόνων, προγεστερόνης, οιστρογόνων, κορτιζόνης και αλδοστερόνης. Η χοληστερόλη με 27 άτομα άνθρακος (χολεστάνες) αποτελεί την πρόδρομη ουσία από την οποία προέρχονται οι στεροειδείς ορμόνες και προκύπτει από το οξικό οξύ, μέσω διαδοχικών βιοχημικών βημάτων.

Ειδικότερα η LDL χοληστερόλη εισέρχεται στο κύτταρο μέσω ειδικών θυλάκων και συσσωρεύεται στα λυσοσώματα, όπου υπό την επίδραση μιας λιπάσης απελευθερώνεται ελεύθερη χοληστερόλη για περαιτέρω μεταβολισμό σε στεροειδείς ουσίες. Στη διαδικασία αυτή συμμετέχει η πρωτεΐνη STAR η οποία είναι σημαντική για την στεροειδογένεση, αφού φαίνεται ότι συμβάλλει στη μεταφορά της χοληστερόλης από την έξω στην έσω επιφάνεια των μιτοχονδρίων.

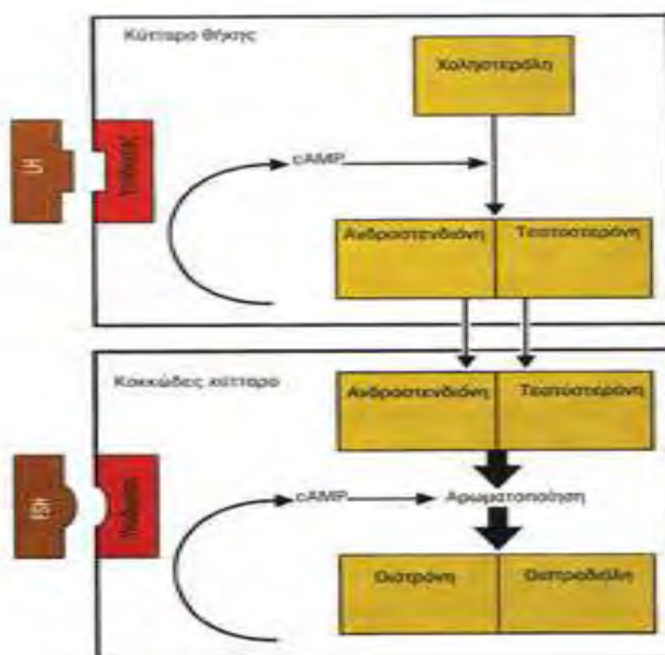
Οι αδένες στους οποίους επιτελείται η στεροειδογένεση είναι οι ωοθήκες (ωοθυλάκιο, ωχρό σωματίο), οι όρχεις, τα επινεφρίδια και ο πλακούντας. Συγκεκριμένα, στο ωοθυλάκιο παράγονται κατά κύριο λόγο οιστρογόνα με την μορφή της οιστρονής και της οιστραδιόλης, στο ωχρό σωματίο προγεστερόνη, στους όρχεις ανδρογόνα, στα επινεφρίδια κορτιζόνη και αλδοστερόνη και τέλος στον πλακούντα οιστριόλη και προγεστερόνη.

Τα επίπεδα και η έκκρισή τους επηρεάζονται από το στάδιο του εμμηνορρυσιακού κύκλου και συσχετίζονται με την ωοθυλακική ή την ωχρινική φάση του κύκλου. Ο τρόπος παραγωγής των στεροειδών ενζύμων που συμμετέχουν στην βιοχημική οδό σύνθεσης των στεροειδών ορμονών έχει εκτενώς προσδιοριστεί από πολλές μελέτες σε καλλιέργειες απομονωμένων κυττάρων, από ωοθυλάκια (McAllister et al., 1990;

Foldesi et al., 1998) καθώς και σε ακέραια ωοθυλάκια που προέρχονται από διαφορετικά στάδια του εμμηνορυσιακού κύκλου (Doody et al., 1990).

Η γοναδοτροφίνη FSH που παράγεται από τα γοναδοτρόπα κύτταρα της υπόφυσης, δρα στα κοκκώδη κύτταρα του ωοθυλακίου, τα οποία με την σειρά τους αρωματοποιούν τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα και έτσι το περιβάλλον του ωοθυλακίου οιστρογονοποιείται. Κατά την περίοδο ανάπτυξης των ωοθυλακίων, υποδοχείς FSH υπάρχουν μόνο στα κοκκώδη κύτταρα, ενώ υποδοχείς της LH μόνο στα κύτταρα της θήκης. Από την στιγμή όμως, που το ωοθυλάκιο θα επιλεγεί υπό την επίδραση της FSH, οι υποδοχείς της LH εμφανίζονται και στα κοκκώδη κύτταρα, με αποτέλεσμα η LH να είναι σε θέση να διεγείρει τη στεροειδογένεση απευθείας στα κοκκώδη κύτταρα μέσω της αρωματάσης.

Αυτή η συνεργασία των κυττάρων της θήκης και των κοκκωδών κυττάρων στην παραγωγή οιστρογόνων είναι γνωστή ως «θεωρία των δύο κυττάρων – δύο γοναδοτροπινών» (Εικ. 1).



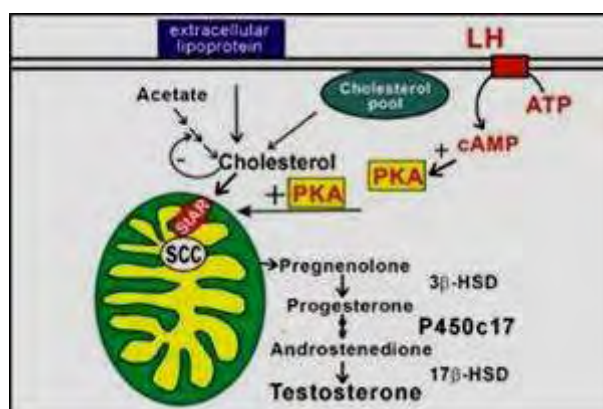
hercules.oulu.fi

Εικ. 1 Θεωρία των δύο κυττάρων – δύο γοναδοτροπινών

Η στεροειδογένεση στην ωοθήκη περιλαμβάνει τη μετατροπή της χοληστερόλης σε πρεγνενολόνη υπό τη επίδραση του ενζύμου P450_{scc}. Από την πρεγνενολόνη σχηματίζονται μέσω δύο διαφορετικών οδών τα ανδρογόνα και συγκεκριμένα η ανδροστενδιόνη. Η τελευταία μετατρέπεται κατά ένα μέρος σε τεστοστερόνη και κατά ένα μέρος αρωματοποιείται σε οιστρόνη.

Η στεροειδογένεση περιλαμβάνει τις αντιδράσεις παραγωγής του κυριότερου ανδρογόνου, δηλαδή, της τεστοστερόνης.

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιοσύνθεση της τεστοστερόνης είναι η μεταφορά της χοληστερόλης στη εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όπου είναι η θέση του πρώτου ενζύμου που καταλύει την αντίδραση μετατροπής της χοληστερόλης σε τεστοστερόνη. Η μεταφορά της χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια επιτυγχάνεται με τη σύνδεση της υποφυσιακής ορμόνης LH με ειδικούς υποδοχείς υψηλής συγγένειας στα κύτταρα Leydig, στεροειδογόνα κύτταρα των όρχεων. Η ορμόνη LH εκκρίνεται από την εμβρυϊκή υπόφυση. Αξίζει να σημειωθεί ότι αρχικά η ρύθμιση της στεροειδογένεσης γίνεται από την χοριονική γοναδοτροφίνη (hCG) και από τη 13^η εβδομάδα από την LH. Στη συνέχεια με την πρόσδεσή της ενεργοποιείται η αδεν-κυκλάση που ως απάντηση στο ερέθισμα προκαλεί αύξηση του ενδοκυττάριου c-AMP. Στη μεταφορά της χοληστερόλης συμμετέχουν και στοιχεία του κυτταροσκελετού όπως η μεταφορική πρωτεΐνη-2 της στερόλης (Εικ. 2).



Panacea.med.uoa.gr

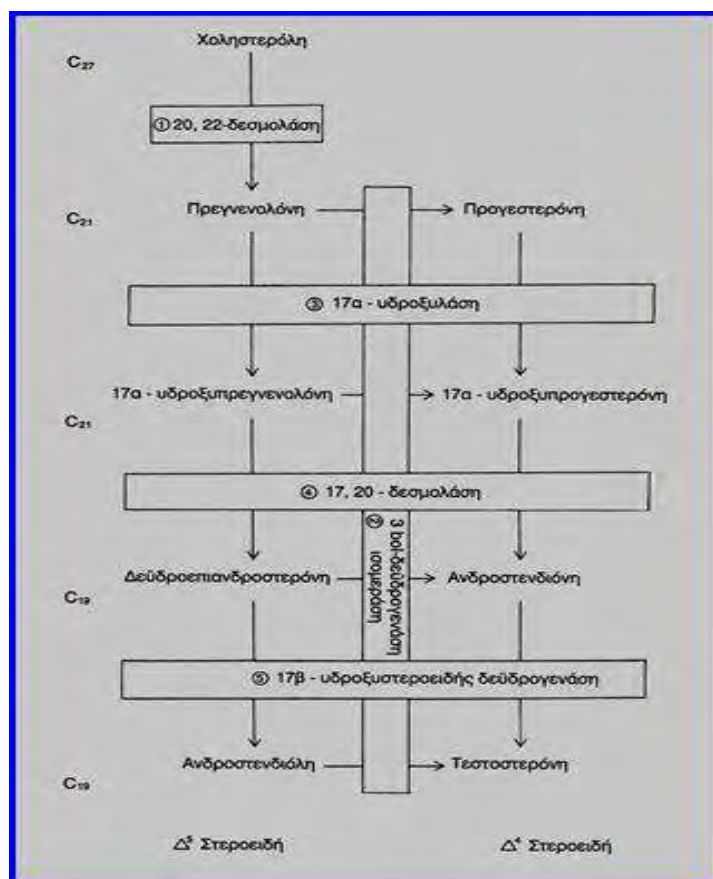
Εικ. 2 Μεταφορά χοληστερόλης στα μιτοχόνδρια

Η πρώτη αντίδραση που επιτελείται είναι η μετατροπή της c27 χοληστερόλης σε c21 πρεγνενολόνη, η οποία καταλύεται από το ένζυμο P450_{scc}. Στη συνέχεια η πρεγνενολόνη μετατρέπεται είτε σε 17ύδροξυ-πρεγνενολόνη με τη βοήθεια του ενζύμου P450_{c17}, είτε σε προγεστερόνη με την δράση του ενζύμου 3βHSD. Έπειτα η 17OH-πρεγνενολόνη σχηματίζει την δευδροεπιανδροστερόνη (DHEA) με την δράση του ενζύμου P450_{c17}, ενώ η προγεστερόνη δίνει την 17OH-προγεστερόνη που καταλύεται από το ίδιο ένζυμο, όπως και η επόμενη αντίδραση που είναι η μετατροπή της 17OH-προγεστερόνης σε ανδροστενδιόνη που είναι πρόδρομος της τεστοστερόνης. Σε ανδροστενδιόνη μπορεί να μετατραπεί απευθείας και η δευδροεπιανδροστερόνη με την βοήθεια του ενζύμου 3βHSD. Η δευδροεπιανδροστερόνη μετατρέπεται σε ανδροστενδιόλη, μια αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο 17βHSD.

Επίσης η ανδροστενδιόνη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη με το ίδιο ένζυμο, ενώ και η ανδροστενδιόλη μετατρέπεται σε τεστοστερόνη με τη δράση του 3βHSD. Ακολουθεί μετατροπή της τεστοστερόνης σε διυδροτεστοστερόνη με τη βοήθεια του ενζύμου 5α-αναγωγή. Τέλος, οι αντιδράσεις αρωματοποίησης της ανδροστενδιόνης σε οιστρόνη και της τεστοστερόνης σε οιστραδιόλη, καταλύονται από το ένζυμο P450_{arom}. Αξίζει να σημειωθεί ότι η διυδροτεστοστερόνη είναι υπεύθυνη για την αρρενοποίηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων και συνεπώς έλλειψη της 5α-αναγωγής οδηγεί σε ψευδοερμαφροδιτισμό.

Τέλος, μπορεί να επιτευχθεί απευθείας μετατροπή της οιστρόνης σε οιστραδιόλη, η μοναδική αντιστρεπτή αντίδραση, με την βοήθεια του ενζύμου 17βHSD.

Στην όλη διαδικασία βιοσύνθεσης της τεστοστερόνης λαμβάνουν μέρος τα εξής ένζυμα: P450_{scc}, P450_{c17}, P450_{arom}, 17βHSD και 5α-αναγωγή (Εικ. 3).



Panacea.med.uoa.gr

Εικ. 3 Διαδικασία στεροειδογένεσης- αντιδράσεις παραγωγής τεστοστερόνης.

1.2 ΟΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

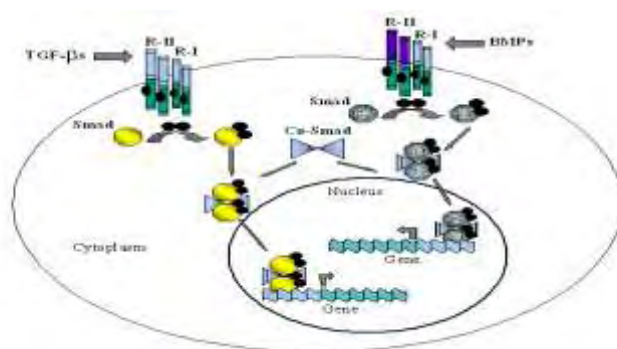
Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (bone morphogenetic proteins) αποτελούν μία ομάδα γλυκοπρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια του αυξητικού παράγοντα TGF- β με τον οποίο παρουσιάζουν δομική και λειτουργική συγγένεια. Παρουσιάζουν πλειοτροπική δράση και συμμετέχουν σε διάφορες βιολογικές διεργασίες της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των ιστών. Συγκεκριμένα, συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, στην κυτταρική επιβίωση καθώς και στην απόπτωση επιθηλιακών, μεσεγχυματικών, αιμοποιητικών και νευρικών κυττάρων.

Οι BMPs ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την BMP-2 και την BMP-4, η δεύτερη την BMP-5, την BMP-6 και την BMP-7 και η τρίτη την BMP-3 και την BMP-8.

Οι δράσεις των BMPs επιτελούνται μέσω σύνδεσης με ειδικούς υποδοχείς και διέγερσης ενδοκυττάρων οδών (Smads) που μεταβιβάζουν τα εξωκυττάρια σήματα στον πυρήνα. Αναλυτικότερα, οι BMPs συνδέονται με δύο υψηλής συγγένειας υποδοχείς σερίνης/θρεονίνης, τους BMPRI και BMPRII. Ακολουθεί φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση του κυτταροπλασματικού υποδοχέα των Smads με συνέπεια την ενεργοποίηση των R-Smads (Smad-1, -5 ή -8) και τη δημιουργία ετερομερών συμπλόκων με το Smad-4 το οποίο μεταφέρει το «σήμα» από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα, όπου κάτω από την επίδραση μεταγραφικών παραγόντων, ενεργοποιείται η μεταγραφή ειδικών γονιδίων-στόχων (Εικ. 4). Απουσία του υποδοχέα BMPRII, οι BMPs μπορούν να συνδεθούν στον υποδοχέα BMPRI. Επιπλέον, η BMP-7 μπορεί να στείλει σηματοδοτικό σήμα μέσω υποδοχέων ακτιβίνης, τύπου I και II.

Η δράση των BMPs μπορεί να ανασταλεί με τη χρήση ειδικών ανταγωνιστών των υποδοχέων τους (π.χ. γκρεμλίνη) και με αναστολή της σηματοδότησης των BMPs μέσω διέγερσης των ανασταλτικών Smads -6, -7 ή μέσω σύνδεσης των Smads με ενδοκυττάρια πρωτεΐνες.

Οι BMPs (1-15) συμμετέχουν στην ανάπτυξη του σκελετού, του γαστρεντερικού συστήματος, των οφθαλμών και των νεφρών.



Εικ. 4 Σηματοδοτικά μονοπάτια του TGF-β και του BMP.(Modified from Miyazono)

1.2.1 ΟΣΤΙΚΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 15 (BMP-15)

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 15 είναι μία πρωτεΐνη που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το BMP 15 γονίδιο. Η BMP-15 είναι μέλος της υπερ-οικογένειας του αυξητικού παράγοντα TGF- β και αποτελεί ένα παρακρινές σηματοδοτικό μόριο. Χρησιμοποιώντας Northern blot ανάλυση, αποδείχτηκε ότι η BMP -15 εκφράζεται αποκλειστικά στις ωοθήκες.

Πιστεύεται ότι η BMP-15 προωθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωρίμανση των ωοκυττάρων, αλλά περιορίζει τη μετάβασή τους στην προωθυλακιορρηκτική περίοδο, ενώ αναστέλλει την έκφραση των υποδοχέων της FSH και αποτρέπει την πρόωρη ωχρινοποίηση (Moore and Shimasaki, 2005). Πρόσφατα στοιχεία έδειξαν πως η BMP-15 παίζει «ρόλο-κλειδί» στην ωοθυλακιογένεση, στην ωορρηξία καθώς και στις λειτουργίες του ωχρού σωματίου. Είναι λοιπόν, απαραίτητη για την φυσιολογική ωοθυλακιογένεση και την γυναικεία γονιμότητα.

Τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ποντίκια η BMP-15 κωδικοποιείται από δύο εξώνια τα οποία διαχωρίζονται από ένα εσώνιο. Ανάλυση με Southern blot έδειξε ότι το γονίδιο BMP 15 τόσο στον άνθρωπο, όσο και στον ποντικό έχουν παρόμοια αλληλουχία μεταξύ τους. Ανάλυση αλληλουχίας DNA, αποκάλυψε υψηλά συντηρημένη δομή γονιδίων. Και τα δύο γονίδια εδράζονται στο X χρωμόσωμα. Συνεπώς, είναι ομόλογα.

Έρευνες στις οποίες χρησιμοποιήθηκε real-time PCR και Quantitative-PCR, έδειξαν ότι η έκφραση της BMP-15 διατηρείται υψηλή κατά την ωοθυλακική ωρίμανση, ενώ μετά την ωορρηξία παρατηρείται σταδιακή πτώση των επιπέδων της.

Έχει φανεί ισχυρή ανασταλτική επίδραση της BMP-15 στην παραγωγή της επαγόμενης από την FSH και LH προγεστερόνης, στα κοκκώδη κύτταρα της χήνας και του ποντικού. Αυτή η ανασταλτική επίδραση σχετίζεται με μείωση των επιπέδων της STAR πρωτεΐνης.

Σε μελέτες καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων από ποντίκια, φάνηκε πως η παραγωγή οιστραδιόλης δεν επηρεάζεται από την BMP-15. Ωστόσο, συνδυασμένη δράση της BMP-15 με την FSH ή την LH μειώνει την παραγωγή προγεστερόνης καθώς και τα επίπεδα της STAR πρωτεΐνης. Έχει φανεί ότι δεν επηρεάζει την έκφραση του P450 κυτοχρώματος και του 3 β -HSD, αλλά πιθανόν επιδρά στην ενεργοποίησή τους.

Τόσο στον άνθρωπο, όσο και στα ποντίκια οι επιδράσεις της BMP-15 στα κοκκώδη κύτταρα, αφορούν ενεργοποίηση διαφόρων σηματοδοτικών μονοπατιών όπως: Smad 1/5/8 και της MARK κινάσης.

Πρόσφατα έχουν αναφερθεί δύο « λειτουργίες-κλειδιά» της BMP-15: 1) αναστολή της επαγόμενης από την FSH, κυτταρικής διαφοροποίησης των κοκκωδών κυττάρων, μέσω αναστολής έκφρασης των υποδοχέων της FSH στα κοκκώδη και 2) διέγερση πολλαπλασιασμού των κοκκωδών. Συγκεκριμένα, μελέτες στα κοκκώδη κύτταρα των τρωκτικών δείχνανε ότι η BMP-15 αναστέλλει την, μετά από διέγερση της FSH, παραγωγή στεροειδών ορμονών, μέσω αναστολής έκφρασης των υποδοχέων, των γοναδοτροφινών.

Μελέτες στα θηλυκά πρόβατα έδειξαν ότι τα ετερόζυγα για σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο BMP-15, παρουσιάζουν αυξημένη γονιμότητα λόγω αύξησης του ποσοστού ωορρηξίας, ενώ τα ομόζυγα είναι υπογόνιμα λόγω παρεμπόδισης της ωοθυλακιογένεσης, αποτρέποντας τα ωοθυλάκια να υπερβούν το πρωτογενές στάδιο. Σε αντίθεση με τα θηλυκά πρόβατα, στα ομόζυγα ποντίκια παρατηρείται μειωμένη γονιμότητα η οποία δεν οφείλεται στην παρεμπόδιση ανάπτυξης των ωοθυλακίων, αλλά σε ελαττωματική ωορρηξία και πρόωμη εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Μείωση της βιοδραστικότητας της BMP-15 στα ετερόζυγα, μεταλλαγμένα, θηλυκά πρόβατα έχει ως αποτέλεσμα αύξηση της ευαισθησίας των κοκκωδών κυττάρων στην FSH. Το γεγονός αυτό επιτρέπει να συλλέγονται και να αναπτύσσονται περισσότερα ωοθυλάκια ως το προωοθυλακιωρρηκτικό στάδιο. Έχει φανεί ότι οι μεταλλάξεις που παρεμβαίνουν με πρωτεόλυση του ώριμου τμήματος της προ-πρωτεΐνης BMP-15, έχουν ως αποτέλεσμα δραματική μείωση της έκκρισης, της ώριμης BMP-15. Ωστόσο, οι επιδράσεις των μεταλλάξεων της BMP-15 στην έκκριση της ώριμης πρωτεΐνης BMP-15, αποκαλύφθηκαν μόνο όταν το μεταλλαγμένο BMP-15 γονίδιο, εκφράζεται παράλληλα με τον παράγοντα GDF-9.

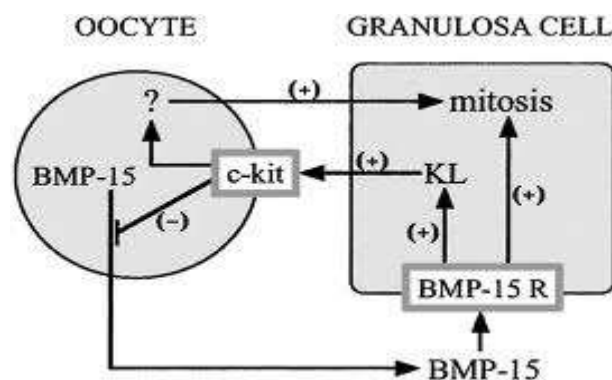
1.2.2 ΑΡΝΗΤΙΚΟΣ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΑΝΑΔΡΑΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΗΣ BMP-15 ΚΑΙ ΤΟΥ KIT-LIGAND ΤΩΝ ΚΟΚΚΩΔΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Έχει παρατηρηθεί ένα σύστημα ανάδρασης μεταξύ ωοκυττάρων και κοκκωδών κυττάρων, το οποίο περιλαμβάνει την οστική μορφογενετική πρωτεΐνη BMP-15 και έναν παράγοντα παράγωγο των κοκκωδών κυττάρων, τον Kit-ligand (KL). Και οι δύο αυτοί παράγοντες είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της γυναικείας αναπαραγωγής.

Σε συγκαλλιέργεια που χρησιμοποιήθηκε μεταξύ ωοκυττάρων και κοκκωδών κυττάρων ποντικού, βρέθηκε ότι η BMP-15 διεγείρει την έκφραση του KL στα κοκκώδη κύτταρα, ενώ το KL αναστέλλει την έκφραση του BMP-15 στα ωοκύτταρα. Κατά συνέπεια, πρόκειται για έναν αρνητικό μηχανισμό ανάδρασης. (Εικ. 5)

Επειδή ο υποδοχέας του KL (c-kit) εκφράζεται στα ωοκύτταρα και όχι στα κοκκώδη κύτταρα, τα ωοκύτταρα πρέπει να μεσολαβούν στην επαγόμενη από το KL, μίτωση των κοκκωδών κυττάρων. Επιπλέον, η παρεμπόδιση σηματοδότησης του c-kit στα ωοκύτταρα, χρησιμοποιώντας αντισώματα εξουδετέρωσης του c-kit, καταστέλλει σημαντικά την επαγόμενη από την BMP-15, μίτωση των κοκκωδών κυττάρων δείχνοντας ότι τα ωοκύτταρα ίσως παίζουν κάποιο ρόλο στις αποκρίσεις των κοκκωδών κυττάρων στην BMP-15. Αντιθέτως, τα αντισώματα c-kit δεν έχουν καμία επίδραση στις μιτωτικές δραστηριότητες της BMP-7.

Ωστόσο, τόσο η BMP-15, όσο και η BMP-7 παρουσιάζουν υψηλότερη μιτωτική δραστηριότητα στα κοκκώδη κύτταρα, παρουσία των ωοκυττάρων. Μεγαλύτερη όμως εξάρτηση από τα ωοκύτταρα παρουσιάζει η BMP-7.



Εικ. 5 Προτεινόμενη αλληλεπίδραση του BMP-15 και του KL στην ρύθμιση της μίτωσης των κοκκωδών κυττάρων.

1.2.3 ΟΣΤΙΚΗ ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ 7 (BMP-7)

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 7 είναι μέλος της υπερ-οικογένειας του αυξητικού παράγοντα TGF- β και αποτελεί ένα παρακρινές σηματοδοτικό μόριο. Η BMP-7 είναι μία πρωτεΐνη που στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το BMP 7 γονίδιο και εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα θήκης.

Η BMP-7 η οποία αρχικά απομονώθηκε από τα οστά, όπου παρουσιάζει οστεογενετική δραστηριότητα, είναι η πιο σημαντική οστική μορφογενετική πρωτεΐνη για την φυσιολογική διαμόρφωση του νεφρικού ιστού. Συγκεκριμένα, είναι ένας παράγοντας επαγωγής της δημιουργίας οστών, ο οποίος περιορίζει την διαδικασία μεταμόρφωσης των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, με συνέπεια την συσσώρευση των μυοινοβλαστών, κυττάρων που συμβάλλουν στην εμφάνιση ίνωσης.

Έχει φανεί ότι η BMP-7 μειώνει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων, αλλά αυξάνει τον αριθμό των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων, καθώς και αυτών του άντρου.

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η BMP-7 αυξάνει την επαγόμενη από την FSH, παραγωγή οιστραδιόλης στα κοκκώδη κύτταρα, η οποία ενισχύεται επιπλέον υπό την παρουσία ωοκυττάρων, ενώ αναστέλλει την σύνθεση προγεστερόνης. Ακόμη, έχει παρατηρηθεί ότι η BMP-7 αυξάνει τα επαγόμενα από την FSH, επίπεδα έκφρασης mRNA της P450arom στα κοκκώδη κύτταρα, ενώ σημειώνεται ακόμα μεγαλύτερη έκφραση υπό την παρουσία ωοκυττάρων.

Όταν η BMP-7 προστίθεται μόνη της στην καλλιέργεια, δεν έχει καμία επίδραση στο φωσφορυλιωτικό μονοπάτι ERK1/2. Ωστόσο, όταν προστίθεται μαζί με FSH, η BMP-7 καταργεί το επαγόμενο από την FSH, φωσφορυλιωτικό μονοπάτι ERK1/2. Η αναστολή του φωσφορυλιωτικού μονοπατιού ERK1/2 οδηγεί σε αύξηση της παραγόμενης οιστραδιόλης και μείωση της προγεστερόνης. Αντίθετα, η ενεργοποίηση του μονοπατιού ERK1/2 οδηγεί σε αναστολή σύνθεσης της οιστραδιόλης.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η BMP-7 επάγει το σηματοδοτικό μονοπάτι Smad1/5/8. Η φωσφορυλίωση του παραπάνω μονοπατιού ενισχύεται από την παρουσία της FSH και των ωοκυττάρων. Επιπλέον, η BMP-7 καταστέλλει σημαντικά τα επαγόμενα από την FSH, επίπεδα mRNA της STAR πρωτεΐνης στα κοκκώδη κύτταρα, ανεξαρτήτως παρουσίας ή όχι των ωοκυττάρων.

Μελέτες καλλιέργειας κοκκωδών κυττάρων από ποντίκια, έδειξαν ότι η BMP-7 αναστέλλει την επαγόμενη από την FSH, παραγωγή του cAMP. Αυτήν η ανασταλτική επίδραση γίνεται παράλληλα με την μείωση παραγωγής προγεστερόνης.

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανίχνευση της επίδρασης της BMP-15 και της BMP-7 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, τα οποία προέρχονται από ωοθήκες γυναικών που υποβάλλονται σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Οι προαναφερόμενες μελέτες, ωστόσο, αφορούν αποκλειστικά και μόνο πειραματόζωα καθώς η εφαρμογή τους στον άνθρωπο δεν έχει διερευνηθεί.

Το ουσιώδες λοιπόν ερώτημα είναι εάν αυτές οι δύο ορμόνες είναι σημαντικές για την ωρίμανση και τη βελτίωση της ποιότητας των ανθρώπινων ωοθυλακίων. Η απάντηση σε αυτό το ερώτημα θα απαιτήσει περαιτέρω πειραματικές προσεγγίσεις, οι οποίες ενδεχομένως να βοηθήσουν στην καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών της φυσιολογικής ωρίμανσης των ανθρώπινων ωοθυλακίων.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ομάδα πειραμάτων

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της επίδρασης της BMP-15 (bone morphogenetic protein 15) σε συγκέντρωση (100 ng/ml), της BMP-7 (bone morphogenetic protein 7) σε συγκέντρωση (100 ng/ml) καθώς και της FSH (follicle-stimulating hormone) σε συγκέντρωση (10 ng/ml) στην παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα.

2.2 Κοκκώδη κύτταρα

Χρησιμοποιήθηκαν ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα, τα οποία ελήφθησαν από γυναίκες που υποβλήθηκαν σε θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης (IVF) με βάση το πρωτόκολλο της πολλαπλής ωοθυλακικής διέγερσης με ανασυνδυασμένη FSH σε συνδυασμό με GnRH αγωνιστές. Για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγήθηκε hCG, 36 ώρες πριν την ωοληψία. Η αναρρόφηση του ωοθυλακικού υγρού και του ωαρίου πραγματοποιήθηκε διακολπικά με λεπτή βελόνα, με την βοήθεια του υπερηχογράφου.

Μετά την απομάκρυνση του ωαρίου, ακολουθεί η απομόνωση των κοκκωδών κυττάρων. Η συλλογή των κοκκωδών κυττάρων γίνεται με την μέθοδο της καθίζησης, ενώ πριν χρησιμοποιηθούν υποβάλλονται σε κατεργασία απομάκρυνσης του αίματος και λοιπών στοιχείων του ωοθυλακικού υγρού (Hillier et al., 1991).

Η όλη διαδικασία πραγματοποιείται σε άσηπτες συνθήκες.

2.3 Διαδικασία απομόνωσης κοκκωδών κυττάρων

1) Το ωοθυλακικό υγρό που περιέχει τα κοκκώδη κύτταρα, διαμοιράζεται ανά 6 ml σε πλαστικά σωληνάρια (Falcon) των 15 ml και αραιώνεται με ισότονο διάλυμα άλατος PBS (Phosphate Buffered Saline) σε αναλογία 3 προς 10, με σκοπό την έκπλυση των κυττάρων. Για την καλύτερη συγκράτηση των κυττάρων, προστίθεται στο PBS 1 mg/ml FBS (Fetal Bovine Serum).

2) Το μίγμα αναδεύεται καλά και έπειτα αφήνεται σε ηρεμία προκειμένου τα κύτταρα να καθιζάνουν στον πυθμένα του σωληναρίου, δημιουργώντας έτσι ένα ίζημα.

- 3) Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκείμενου στρώματος, στο οποίο πιθανόν περιέχονται υπολείμματα αίματος και διάφορες προσμίξεις. Κατόπιν, προστίθεται PBS με σκοπό τον καθαρισμό του μίγματος.
- 4) Τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται πέντε φορές.
- 5) Μετά από τη τελευταία έκπλυση των κυττάρων, προστίθεται PBS και ακολουθεί φυγοκέντρηση 10 λεπτών, στις 800 στροφές/λεπτό με σκοπό την απομάκρυνση τυχόν άλλων προσμίξεων, οι οποίες δεν απομακρύνθηκαν μέσω καθίζησης.
- 6) Μετά την φυγοκέντρηση, αφαιρείται το υπερκείμενο από το falcon και εν συνεχεία το ίζημα των κοκκωδών κυττάρων αραιώνεται σε τελικό όγκο 1 ml, με καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο, στο οποίο περιέχεται Serum.
- 7) Τέλος, ακολουθεί καταμέτρηση των κοκκωδών κυττάρων.

2.4 Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Τα κοκκώδη κύτταρα καταμετρούνται για τον καθορισμό του συνολικού τους αριθμού, καθώς και για την εκτίμηση του ποσοστού βιωσιμότητάς τους. Για τη μέτρηση των κυττάρων χρησιμοποιείται αντικειμενοφόρος πλάκα Newbauer και χρωστική αποκλεισμού νεκρών κυττάρων, trypan blue. Η χρωστική αυτή έχει την ιδιότητα να διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και να χρωματίζει μπλε τα κύτταρα που είναι νεκρά. Τα ζωντανά ωστόσο, κύτταρα παραμένουν άχρωμα γιατί η χρωστική δεν μπορεί να εισέλθει σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα:

- Λαμβάνονται 20 μl από το falcon στο οποίο αραιώνονται τα κοκκώδη κύτταρα, σε 1 ml καλλιεργητικού θρεπτικού μέσου με Serum και τοποθετούνται σε erpendorf.
- Στο ίδιο erpendorf προστίθενται 20 μl χρωστική, trypan blue.
- Τέλος, από το erpendorf λαμβάνονται 20 μl και τοποθετούνται στην αντικειμενοφόρο πλάκα Newbauer. Ακολουθεί παρατήρηση στο οπτικό μικροσκόπιο.

Ο αριθμός των κυττάρων καταμετρείται σε τέσσερα χαρακτηριστικά πεδία της πλάκας Newbauer και υπολογίζεται ο μέσος όρος ως εξής:

Μέσος όρος ζωντανών κυττάρων: $(A+B+\Gamma+\Delta) / 4$

όπου Α, Β, Γ, Δ: ο αριθμός των ζώντων κυττάρων που μετρήθηκαν στα 4 πεδία της πλάκας Newbauer.

Κάτω από το μικροσκόπιο αντίθετης φάσης, τα κοκκώδη κύτταρα παρατηρούνται ως πιο φωτεινά και μεγάλα, σε σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια τα οποία έχουν την τάση να δημιουργούν συσσωματώματα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καταμέτρηση των κυττάρων θα πρέπει να συντελείται εντός σύντομου χρονικού διαστήματος, διότι οι εκτενείς διακυμάνσεις στο pH μειώνουν την βιωσιμότητα των κυττάρων.

Τέλος, ο αριθμός των τρυβλίων στα οποία θα τοποθετηθούν τα κοκκώδη κύτταρα για καλλιέργεια, υπολογίζεται ως εξής: Συγκέντρωση ζώντων κυττάρων / 50000, διότι σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται 50000 κύτταρα.

2.5 Καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων

Για την καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο των Hillier et al. (1991). Ακολούθησε η συλλογή του υπερκείμενου καλλιεργητικού υλικού ανά 24 ώρες για την ανίχνευση της επίδρασης της BMP-15, BMP-7 καθώς και της FSH. Συνολικά, η καλλιέργεια διαρκούσε 72 ώρες, όπου γίνονταν έλεγχος παραγωγής 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα, υπο την επίδραση των παραπάνω ορμονών.

Το καλλιεργητικό υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την καλλιέργεια, είναι το 199 Wearle's salts με Hepes (Biochrom AG). Σε αυτό προστέθηκε 5% L-Glutamine (Biochrom AG), 1% Penicillin/Streptomycin (5000/ml, Biochrom AG) και 0,1% Fetal Bovine Serum (Sigma). Η προσθήκη FBS βοηθά στην επικόλληση των κυττάρων, στην πλάκα της καλλιέργειας. Για τον ίδιο λόγο στο διάλυμα PBS προσθέτονταν FBS σε ίδια αναλογία, όταν τα κύτταρα επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια.

2.6 Αναλυτική διαδικασία

1) Την ημέρα της ωοληψίας, τα κύτταρα συγκεντρώνονται μετά από την διαδικασία απομόνωσής τους που περιγράφηκε πιο πάνω και επαναδιαλύονται σε θρεπτικό

υλικό, ώστε να έχουμε συγκέντρωση 50000 κύτταρα/ τρυβλίο και εν συνεχεία διαμοιράζονται κατάλληλα στις 24 θέσεις του τρυβλίου.

2) Ακολουθεί επώαση των κοκκωδών κυττάρων για 24 ώρες στον κλίβανο, σε θερμοκρασία 37°C, με 5% CO₂ και 100% υγρασία.

3) Μετά την παρέλευση των 24 ωρών αφαιρείται το υπερκείμενο και ακολουθεί η προσθήκη ορμονών. Συγκεκριμένα, σε κάθε ml καλλιεργητικού υλικού χωρίς Serum, προστίθεται Ανδροστενδιόνη A4 (0,1 μl/ ml θεραπευτικού υλικού) ως υπόστρωμα αρωματοποίησης.

Έπειτα, προστίθενται οι ορμόνες BMP-15 (100ng/ml), BMP-7 (100ng/ml) και FSH (10ng/ml) σε διάφορους μεταξύ τους συνδυασμούς.

4) Στις επόμενες 24, 48 και 72 ώρες ακολουθεί συλλογή του υπερκείμενου καλλιεργητικού υλικού με σκοπό την μελέτη της επίδρασης των παραπάνω ορμονών, στην παραγωγή 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης, από τα κοκκώδη κύτταρα. Το υπερκείμενο καλλιεργητικό υλικό διατηρείται στους -70°C, μέχρι την εξέτασή του για την παραγωγή στεροειδών ορμονών, με ELISA (Axysm System, Abbot Laboratories USA).

Πίνακας 1: Συνδυασμοί των ορμονών BMP-7, BMP-15 και FSH.

24 ώρες	Control (A4)	FSH +A4	BMP-7 +A4	BMP-15 +A4	BMP-7 +A4 +FSH	BMP-15 +A4 +FSH
48 ώρες	Control (A4)	FSH +A4	BMP-7 +A4	BMP-15 +A4	BMP-7 +A4 +FSH	BMP-15 +A4 +FSH
72 ώρες	Control (A4)	FSH +A4	BMP-7 +A4	BMP-15 +A4	BMP-7 +A4 +FSH	BMP-15 +A4 +FSH

3. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του πειράματος, για τη μελέτη των διαφορετικών επιδράσεων της BMP-15 και της BMP-7 καθώς και για τη σύγκριση των μεταξύ τους αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η πολυπαραγοντική δοκιμασία one-way ANOVA.

Έγιναν πολλαπλές συγκρίσεις κατά Bonferroni ώστε να μελετηθεί η μεταβολή στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων και πιο συγκεκριμένα η έκκριση της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Η μελέτη έγινε στις καλλιέργειες των 24, 48 και 72 ωρών. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση της BMP-15, μεμονωμένη αλλά και σε συνδυασμό με FSH καθώς και η επίδραση της BMP-7 αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control στις 24, 48 και 72 ώρες.

Οι αναλύσεις έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=5\%$ και στο στατιστικό πρόγραμμα SPSS 17.0.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Παραγωγή προγεστερόνης στις 24 ώρες καλλιέργειας

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 352.6 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 31 ng/ml, η μέγιστη τιμή 1265 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 437 ng/ml.

Στη συνέχεια, με τη δοκιμασία one – way ANOVA και την ανάλυση κατά Bonferroni μελετήθηκαν οι επιδράσεις της BMP- 15 καθώς και της BMP-7 στην έκκριση προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα σε σύγκριση με το control και παρατηρήθηκε ένα υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών.

A) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-15 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

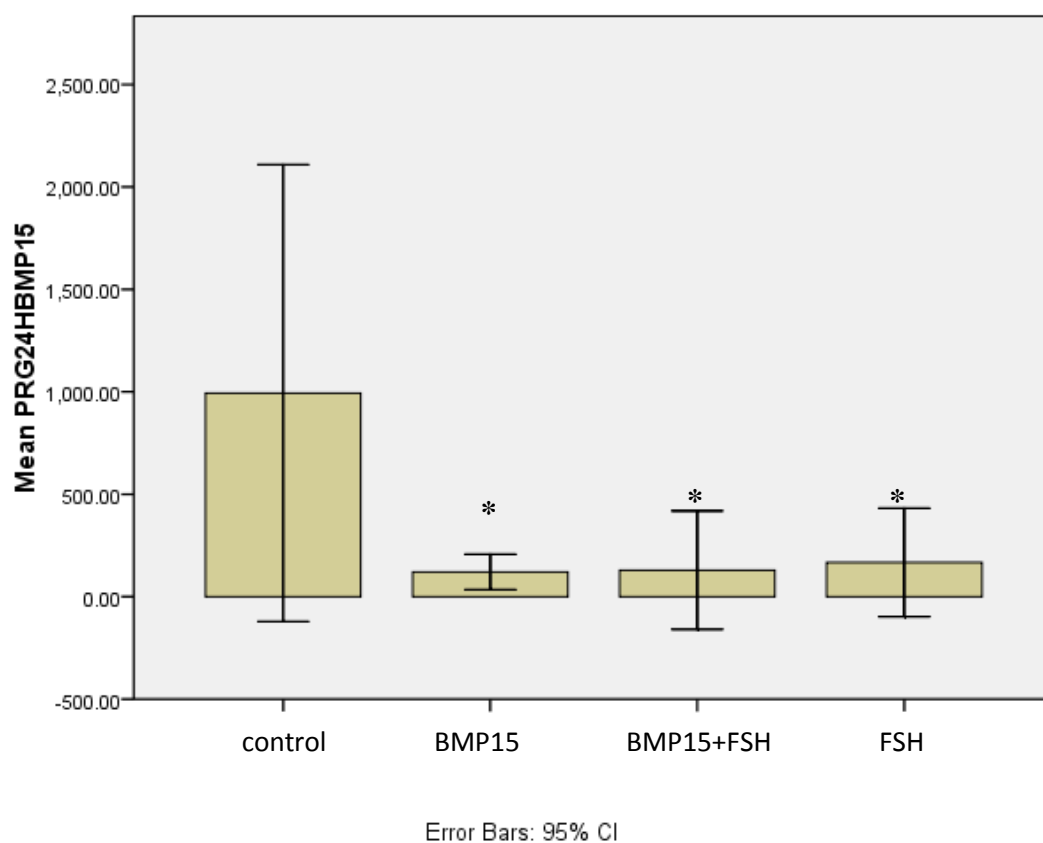
Bonferroni – Progesterone 24h

(I)	(J)
-----	-----

group	group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP15	873.00000*	194.74375	.012
	BMP15 +FSH	863.96667*	194.74375	.013
	FSH	826.40000*	194.74375	.017

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Σχήμα 1: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 24 ώρες με BMP-15.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης με την BMP-15, BMP-15+FSH και FSH εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

Β) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

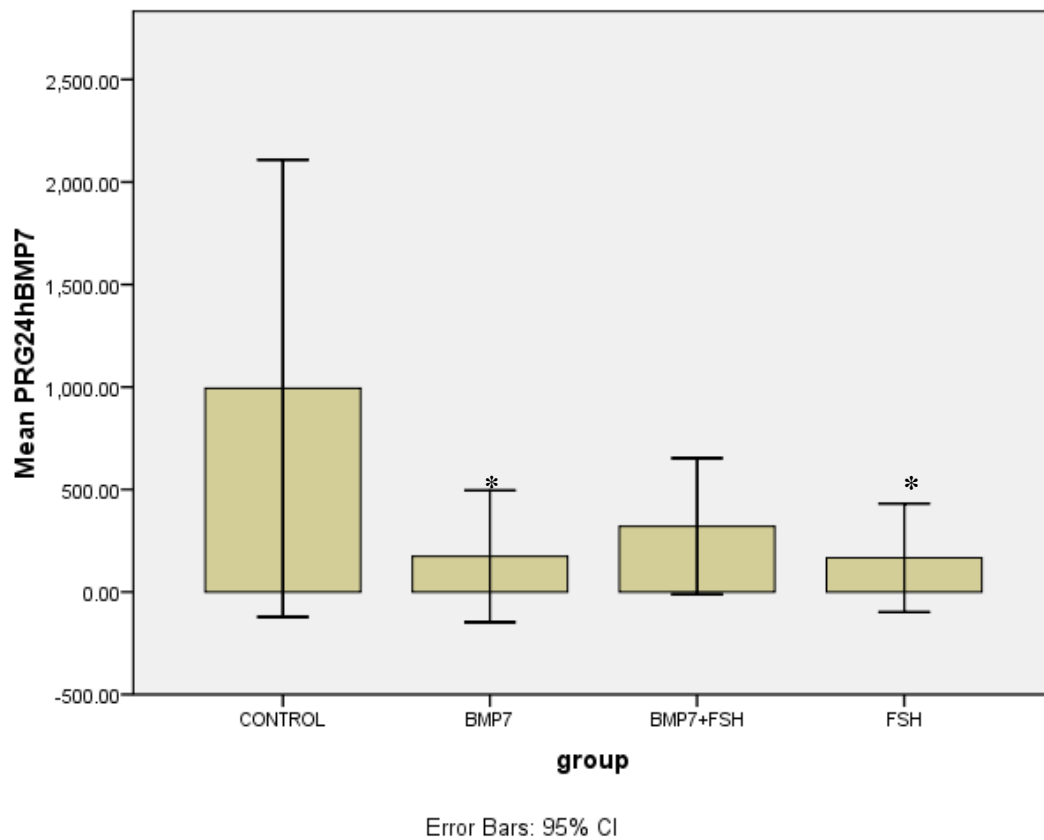
Bonferroni – Progesterone 24h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP7	819.46667 [*]	203.06185	.023
	BMP7+ FSH	672.60000	203.06185	.064
	FSH	826.40000 [*]	203.06185	.022

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 413.8 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 95.4 ng/ml, η μέγιστη τιμή 1265 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 413.8 ng/ml.

Σχήμα 2: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 24 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης με την BMP-7 και την FSH εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

4.2 Παραγωγή προγεστερόνης στις 48 ώρες καλλιέργειας

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 298.8 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 29.8 ng/ml, η μέγιστη τιμή 619 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 206.3ng/ml.

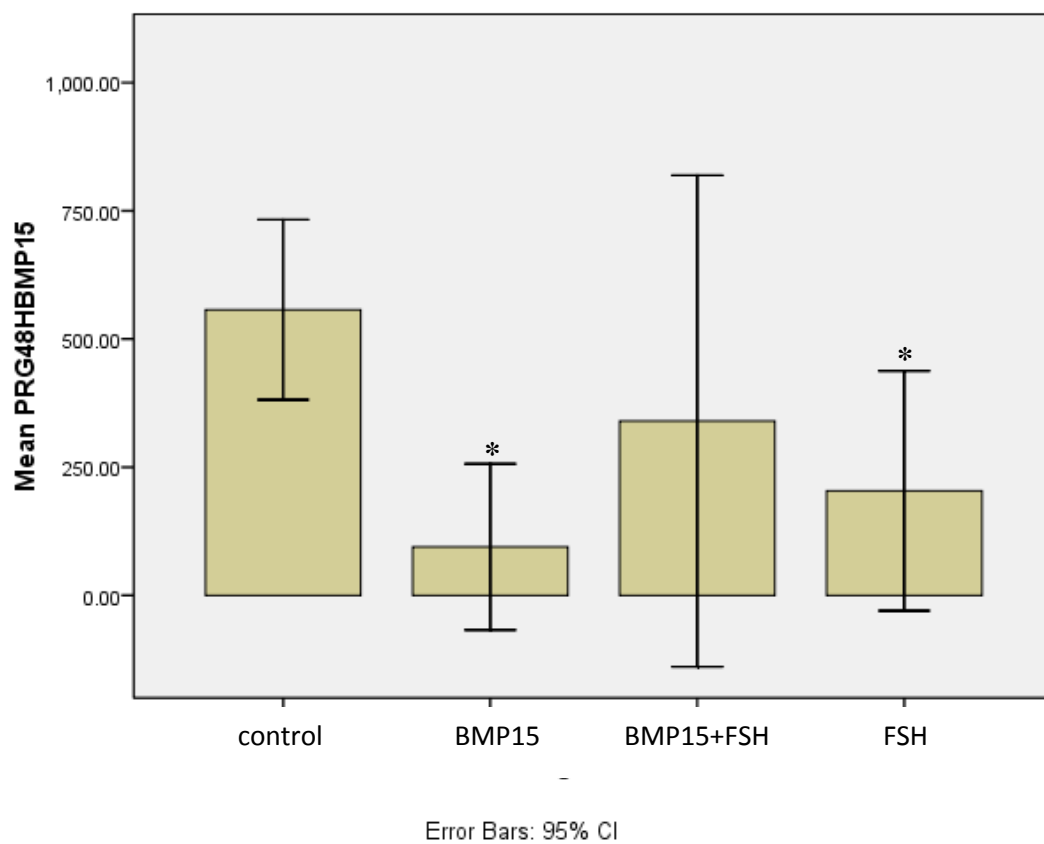
A) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-15 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

Bonferroni – Progesterone 48h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP15	462.53333*	96.02637	.008
	BMP15 +FSH	217.00000	96.02637	.322
	FSH	353.06667*	96.02637	.037

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Σχήμα 3: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 48 ώρες με BMP-15.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης με την BMP-15 και την FSH εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

B) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

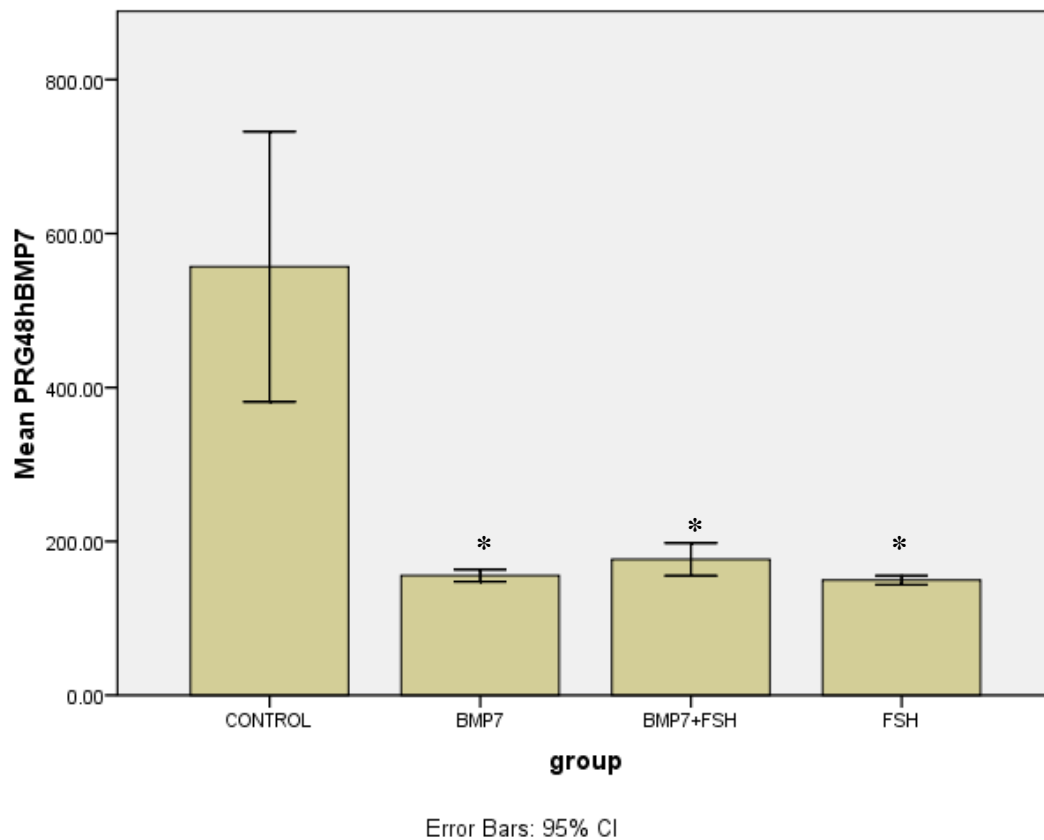
Bonferroni –Progesterone 48h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	BMP7	401.40000*	29.11865	.000
	BMP7+ FSH	380.40000*	29.11865	.000
	FSH	407.46667*	29.11865	.000

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 259.6 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 147.2 ng/ml, η μέγιστη τιμή 619 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 182.1 ng/ml.

Σχήμα 4: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 48 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης με την BMP-7, BMP-7+FSH και την FSH εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

4.3 Παραγωγή προγεστερόνης στις 72 ώρες καλλιέργειας με BMP-15

Για την καλλιέργεια των 72 ωρών έγιναν 12 μετρήσεις με μέσο όρο τιμών 258.4 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 38 ng/ml, η μέγιστη τιμή 1216 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 322.3 ng/ml.

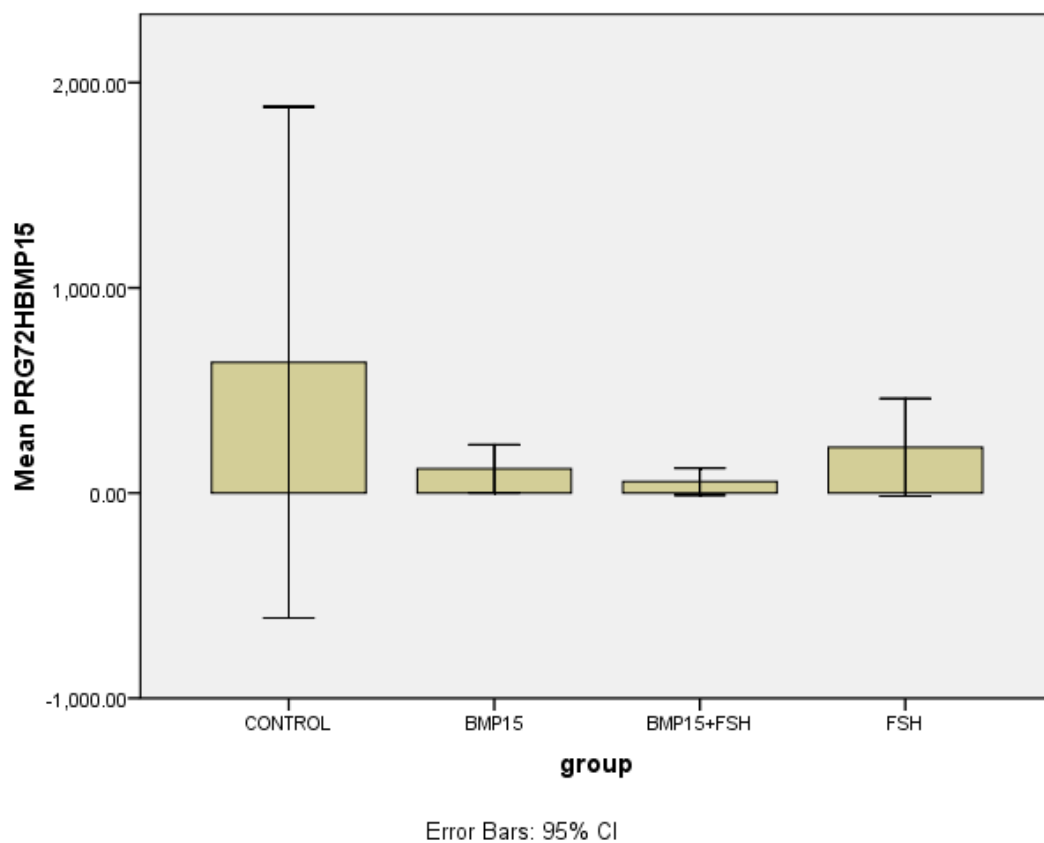
Α) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-15 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

Bonferroni – Progesterone 72h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP15	518.93333	209.54739	.230
	BMP15 +FSH	581.20000	209.54739	.145
	FSH	414.33333	209.54739	.500

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Σχήμα 5: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 72 ώρες με BMP-15.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

Β) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση προγεστερόνης.

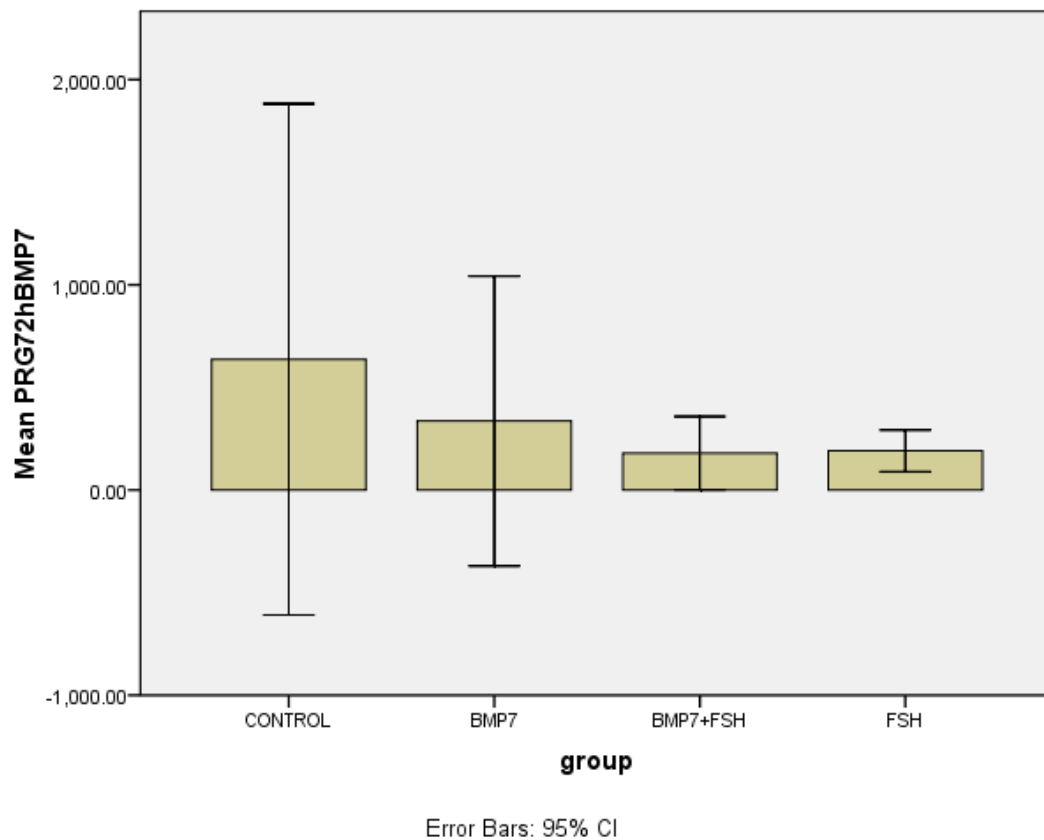
Bonferroni –Progesterone 72h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP7	300.60000	237.71011	1.000
	BMP7+ FSH	457.40000	237.71011	.543
	FSH	445.80000	237.71011	.586

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 336.1 ng/ml, η ελάχιστη τιμή 108.8 ng/ml, η μέγιστη τιμή 1216 ng/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 314.2 ng/ml.

Σχήμα 6: Διακύμανση της έκκρισης προγεστερόνης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 72 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η μείωση της παραγωγής της προγεστερόνης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

4.4 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 24 ώρες καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια των 24 ωρών έγιναν 12 μετρήσεις με μέσο όρο τιμών 1185 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 271.1 pg/ml, η μέγιστη τιμή 4322 pg/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 1464.4 pg/ml.

A) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-15 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση οιστραδιόλης.

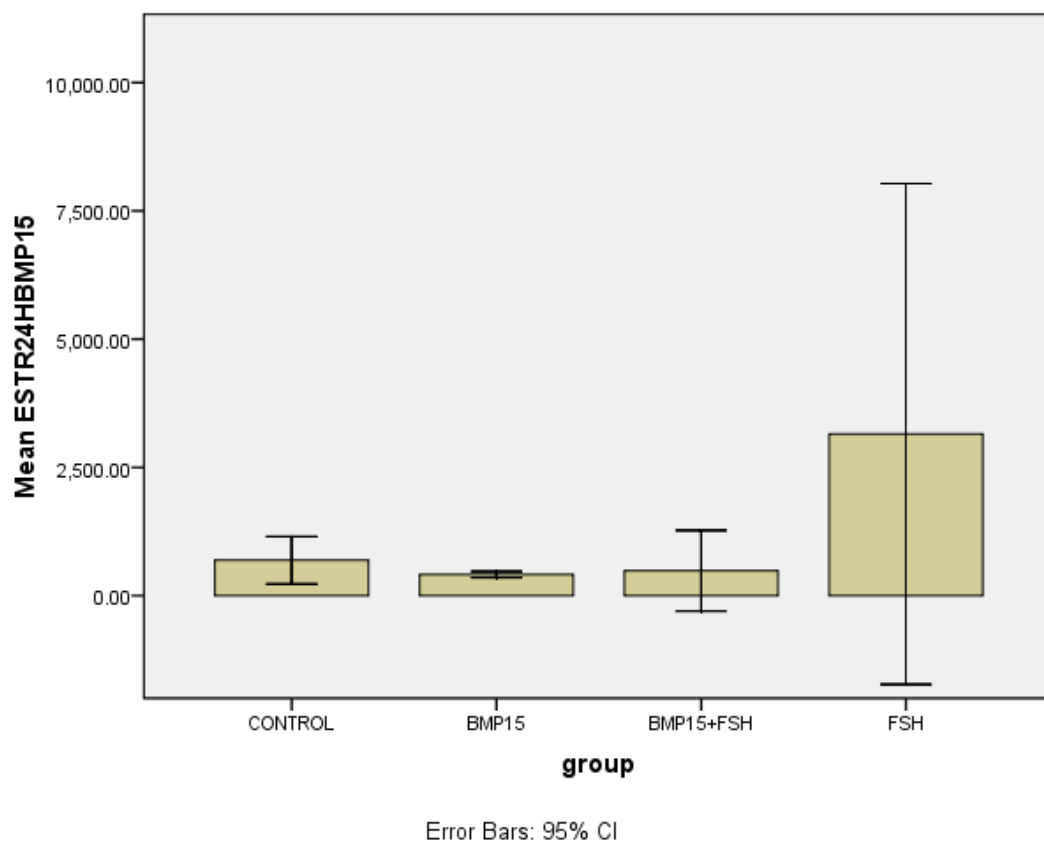
Bonferroni – Estradiol 24h

(I)	(J)
-----	-----

group	group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP15	278.76667	816.02755	1.000
	BMP15 +FSH	207.13333	816.02755	1.000
	FSH	-2460.46667	816.02755	.100

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Σχήμα 7: Διακύμανση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 24 ώρες με BMP-15.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

B) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση οιστραδιόλης.

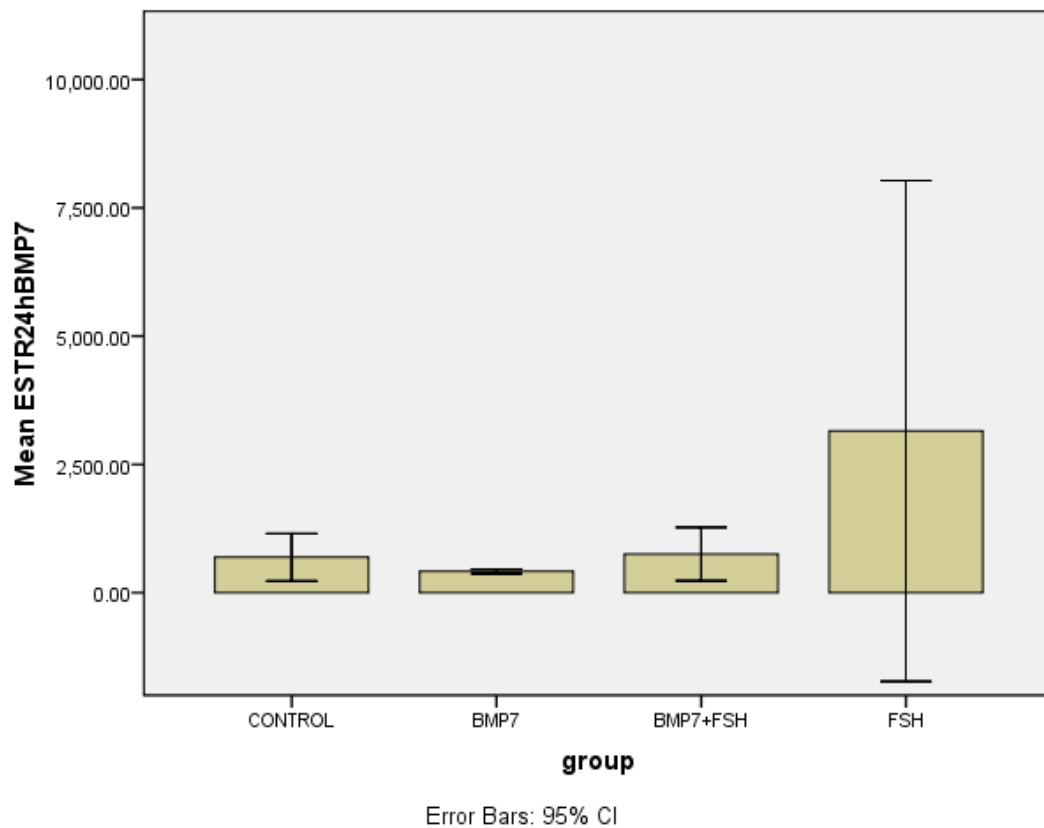
Bonferroni – Estradiol 24h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP7	276.30000	810.19389	1.000
	BMP7+ FSH	-61.20000	810.19389	1.000
	FSH	-2460.46667	810.19389	.097

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 1252.8 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 396.2 pg/ml, η μέγιστη τιμή 4322 pg/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 1430.1 pg/ml.

Σχήμα 8 : Διακύμανση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 24 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

4.5 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 48 ώρες καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια των 24 ωρών έγιναν 12 μετρήσεις με μέσο όρο τιμών 2197.3 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 439.4 pg/ml, η μέγιστη τιμή 5608 pg/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 1391.1 pg/ml.

A) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-15 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση οιστραδιόλης.

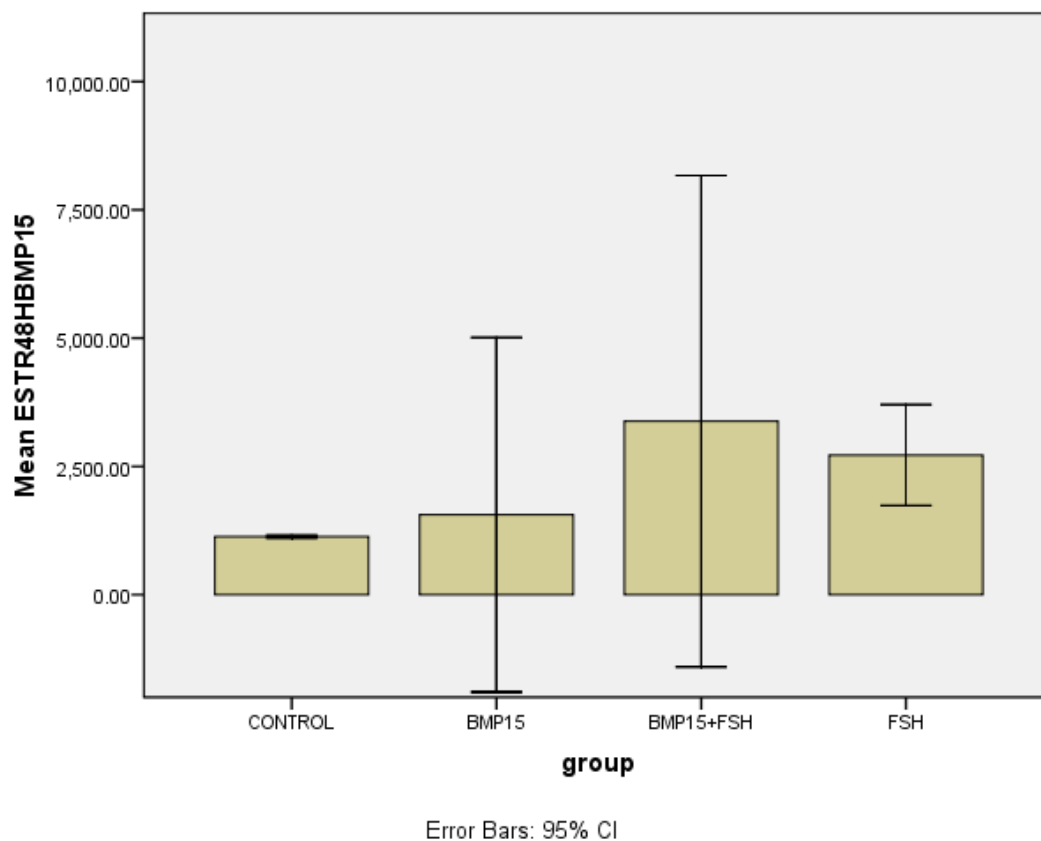
Bonferroni – Estradiol 48h

(I)	(J)
-----	-----

group	group	Mean Difference (I-J)	Std. Error
control	BMP15	-425.80000	983.91413
	BMP15 +FSH	-2251.00000	983.91413
	FSH	-1588.73333	983.91413

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Σχήμα 9: Διακύμανση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 48 ώρες με BMP-15.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

B) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση οιστραδιόλης.

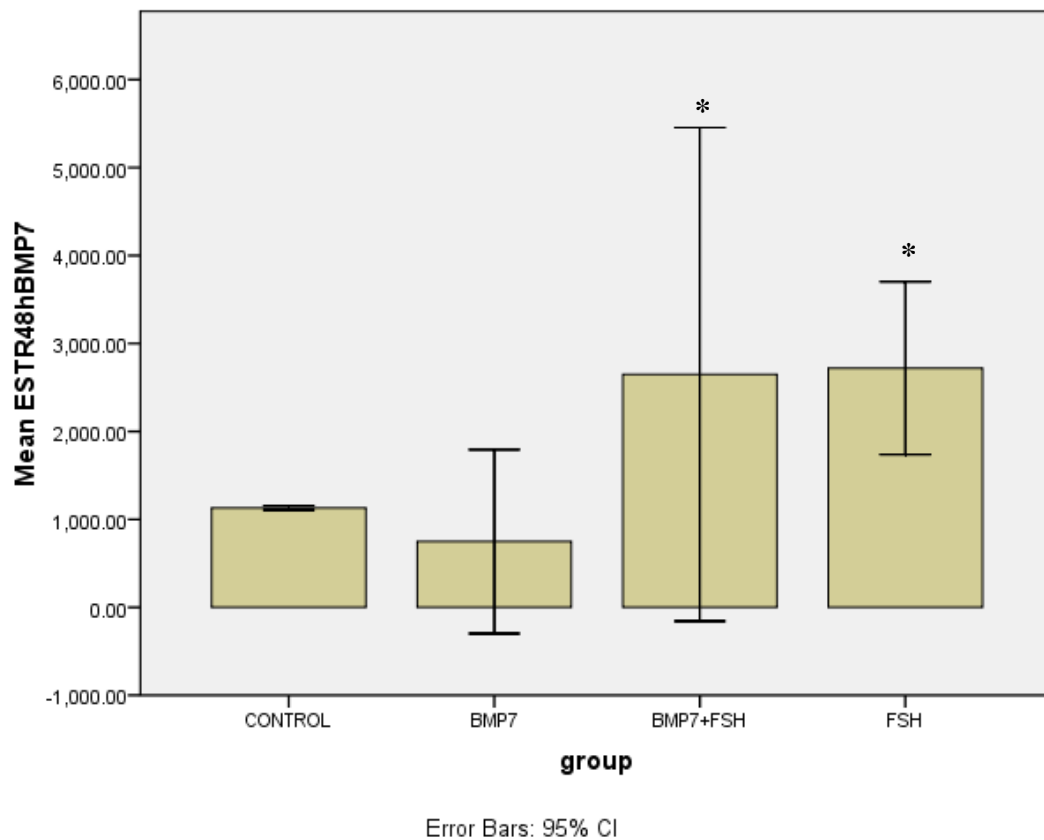
Bonferroni – Estradiol 48h

(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
control	BMP7	383.06667	517.82333	1.000
	BMP7+ FSH	-1517.66667	517.82333	.114
	FSH	-1588.73333	517.82333	.092

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 1811.8 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 261.9 pg/ml, η μέγιστη τιμή 3388 pg/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 1069.3 pg/ml.

Σχήμα 10: Διακύμανση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 48 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης της BMP7 εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν της BMP-7+FSH καθώς και με την FSH μεμονωμένα ($p < 0.05$).

4.6 Παραγωγή οιστραδιόλης στις 72 ώρες καλλιέργειας με BMP-7

Α) Έλεγχος της επίδρασης της BMP-7 σε συγκέντρωση 100 ng/ml σε σύγκριση με το control στην έκκριση οιστραδιόλης.

Bonferroni – Estradiol 72h

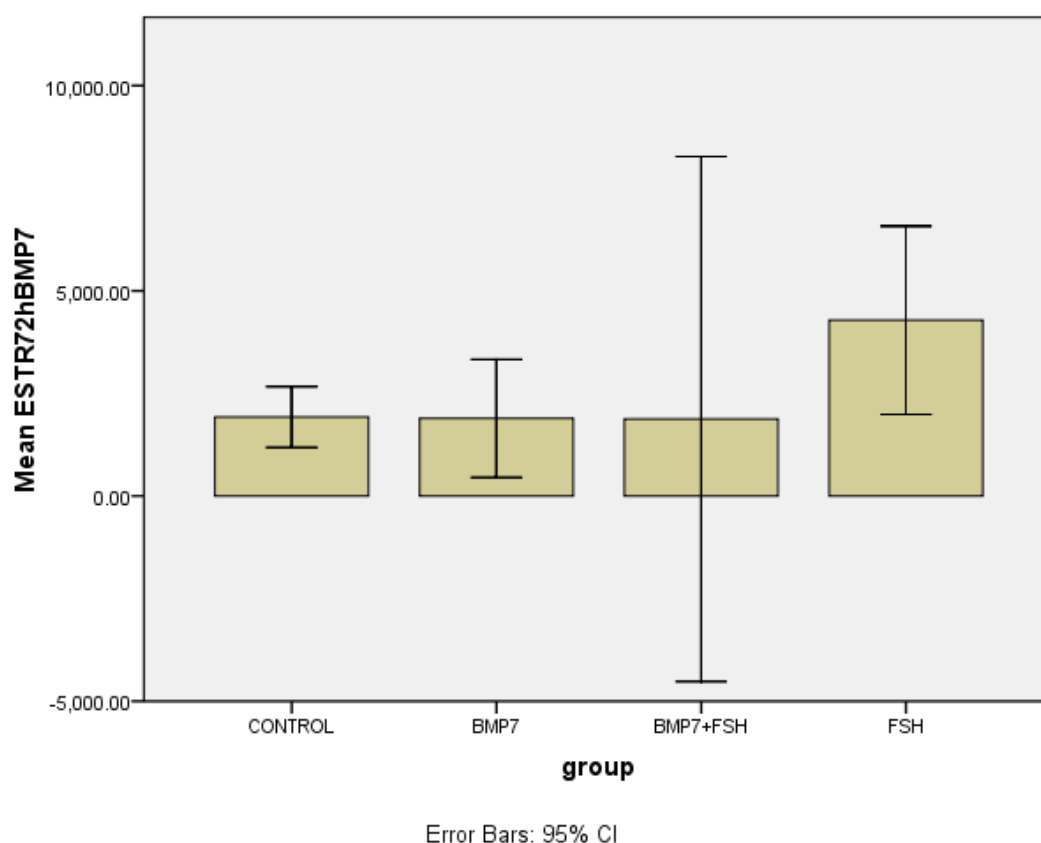
(I) group	(J) group			
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.

control	BMP7	35.13333	1147.55603	1.000
	BMP7+	48.80000	1147.55603	1.000
	FSH			
	FSH	-2357.53333	1147.55603	.444

*Ανάλυση με στάθμη σημαντικότητας 5%.

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 12 μετρήσεις όπου ο μέσος όρος των τιμών ήταν 2495.5 pg/ml, η ελάχιστη τιμή 385 pg/ml, η μέγιστη τιμή 4903 pg/ml και η σταθερή τυπική απόκλιση 1612.7 pg/ml.

Σχήμα 11: Διακύμανση της έκκρισης οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 72 ώρες με BMP-7.



Από τις παραπάνω αναλύσεις φαίνεται ότι η παραγωγή της οιστραδιόλης των ορμονών δεν εμφανίζει στατιστικά σημαντική διαφορά με αυτήν του control ($p < 0.05$).

*Οι τιμές που αφορούν την έκκριση οιστραδιόλης από τα κοκκώδη κύτταρα στις 72 ώρες καλλιέργειας με BMP-15 δεν χρησιμοποιήθηκαν διότι ήταν ακραίες.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν την επίδραση της BMP-15 και της BMP-7 στη στεροειδογένεση καλλιεργούμενων ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων. Ο τρόπος επίδρασής τους αποδείχθηκε παρόμοιος στην κάθε περίπτωση.

Σύμφωνα με προηγούμενα πειραματικά δεδομένα τα οποία αφορούν στην οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 15 (BMP-15) σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων τόσο από αρουραίο, όσο και από κοτόπουλο φαίνεται να επηρεάζει την παραγωγή κυρίως της προγεστερόνης και όχι τόσο της οιστραδιόλης, από μόνη της. Ωστόσο, η παρουσία της FSH δεν φάνηκε να επηρεάζει επιπλέον την παραγωγή των δύο στεροειδών ορμονών.

Συμπερασματικά, λοιπόν, προκύπτει ότι η BMP-15 αναστέλλει τη δράση της FSH, όταν οι δύο αυτές ορμόνες χορηγούνται μαζί.

Στην παρούσα μελέτη η παραγωγή της προγεστερόνης στις 24 και 48 ώρες φάνηκε να ελαττώνεται με τη στατιστική διαφορά να είναι σημαντική μεταξύ του control και των ορμονών BMP-15 και FSH. Μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης παρατηρήθηκε και στις 72 ώρες καλλιέργειας χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε αύξηση της οιστραδιόλης στις 24 και 48 ώρες καλλιέργειας χωρίς όμως να εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του control και των ορμονών.

Από την ήδη γνωστή βιβλιογραφία για την οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 7 (BMP-7) σε μελέτες που έχουν γίνει κυρίως σε θηλαστικά, όπως στον αρουραίο έχει φανεί ότι ασκεί επίδραση στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων.

Συγκεκριμένα, στη μελέτη των Tomoko Miyoshi et al. (2007) η παραγωγή της προγεστερόνης φαίνεται να αναστέλλεται παράλληλα με την αναστολή της επαγόμενης από την FSH, παραγωγής του Camp. Αντίθετα, η παραγωγή οιστραδιόλης στα κοκκώδη κύτταρα αυξάνεται και μάλιστα ενισχύεται επιπλέον υπό την παρουσία ωοκυττάρων.

Επιπλέον, η παρουσία της FSH σε συνδυασμό με την BMP-7 δεν φάνηκε να επηρεάζει την παραγωγή της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης. Προκύπτει, λοιπόν, ότι η BMP-7 αναστέλλει τη δράση της FSH.

Στην παρούσα ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ευδιάκριτα ότι η BMP-7 μειώνει την παραγωγή της προγεστερόνης στις 24, 48 και 72 ώρες καλλιέργειας.

Ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στις 24 και στις 48 ώρες μεταξύ του control και των ορμονών.

Όσον αφορά στην οιστραδιόλη, η BMP-7 δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την παραγωγή της στις 24, 48 και 72 ώρες αντίστοιχα, σε σύγκριση με το control. Ωστόσο, στατιστικά σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στις 48 ώρες καλλιέργειας όταν η BMP-7 χορηγήθηκε μαζί με την FSH. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι η BMP-7 μπλοκάρει τη δράση της FSH στην έκκριση της οιστραδιόλης.

Συμπερασματικά, από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι οι ορμόνες BMP-15 και BMP-7 πιθανώς εμπλέκονται στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων. Αυτό φαίνεται να συνηγορεί με τις πειραματικές μελέτες πολλών ερευνητών που αναφέρθηκαν στο εισαγωγικό μέρος της εργασίας, για την εμπλοκή των παραγόντων αυτών στην γυναικεία γονιμότητα.

Συγκεκριμένα, τόσο για την BMP-15, όσο και για την BMP-7 φάνηκε ότι η επίδρασή τους ήταν στατιστικά σημαντική σε σχέση με το control σε ότι αφορά την προγεστερόνη. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη επίδραση στην παραγωγή της οιστραδιόλης. Επιπλέον, φάνηκε ότι η BMP-15 καθώς και η BMP-7 αναστέλλουν τη δράση της FSH στην έκκριση της οιστραδιόλης, αλλά και της προγεστερόνης.

Είναι απαραίτητο να επισημανθεί ότι στη συγκεκριμένη μελέτη ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός οπότε και μη ενδεικτικός για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος.

Τέλος, είναι σαφές ότι χρειάζονται να γίνουν επιπλέον έρευνες και πειραματικές προσεγγίσεις στον άνθρωπο για να πιστοποιηθεί η δράση της BMP-15 και της BMP-7 στην αναπαραγωγή και στην στεροειδογένεση.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες αποτελούν μία ομάδα γλυκοπρωτεϊνών που ανήκουν στην οικογένεια του αυξητικού παράγοντα TGF- β και ταξινομούνται σε τρεις ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει την BMP-2 και την BMP-4, η δεύτερη την BMP-5, την BMP-6 και την BMP-7 και η τρίτη την BMP-3 και την BMP-8.

Η BMP-15 εκφράζεται αποκλειστικά στις ωοθήκες και έχει δείξει ότι προωθεί την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την ωρίμανση των ωοκυττάρων, αλλά περιορίζει τη μετάβασή τους στην προωθυλακιορρηκτική περίοδο, ενώ αναστέλλει την έκφραση των υποδοχέων της FSH και αποτρέπει την πρόωρη ωχρινοποίηση.

Η BMP-7 εκφράζεται αποκλειστικά στα κύτταρα θήκης και έχει φανεί ότι μειώνει τον αριθμό των αρχέγονων ωοθυλακίων, αλλά αυξάνει τον αριθμό των πρωτογενών και δευτερογενών ωοθυλακίων.

Είναι πιθανόν οι ορμόνες αυτές να παίζουν κάποιο ρόλο στην αναπαραγωγική λειτουργία και στη γονιμότητα. Για τον λόγο αυτό, η εργασία αυτή είχε σκοπό τη μελέτη της επίδρασης της BMP-15 και της BMP-7 στην παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης από καλλιέργειες ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων, σε 24, 48 και 72 ώρες, που προέρχονται από ωοθήκες γυναικών που υποβάλλονται σε πρόγραμμα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Υλικά και Μέθοδοι: Με ενζυμομετρική μέθοδο Elisa προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκκρισης της οιστραδιόλης (pg/ml) και της προγεστερόνης (ng/ml) στο υπερκείμενο καλλιιεργειών ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων.

Αποτελέσματα: Διαπιστώθηκε ότι η έκκριση της προγεστερόνης στις 24 και 48 ώρες από τα κοκκώδη κύτταρα ελαττώθηκε με την προσθήκη της BMP-15 (100ng/ml) στο καλλιιεργητικό υλικό, με τη στατιστική διαφορά να είναι σημαντική μεταξύ του control και των ορμονών BMP-15 και FSH. Μειωμένη παραγωγή προγεστερόνης παρατηρήθηκε και στις 72 ώρες καλλιιεργειας χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά. Από την άλλη μεριά, παρατηρήθηκε αύξηση της οιστραδιόλης στις 24 και 48 ώρες καλλιιεργειας χωρίς όμως να εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του control και των ορμονών.

Σε ότι αφορά στην BMP-7, παρατηρήθηκε ότι η έκκριση της προγεστερόνης στις 24, 48 και 72 ώρες από τα κοκκώδη κύτταρα ελαττώθηκε με την προσθήκη της BMP-7 (100ng/ml) στο καλλιιεργητικό υλικό, με τη στατιστική διαφορά να είναι σημαντική

στις 24 και 48 ώρες καλλιέργειας, μεταξύ του control και των ορμονών BMP-7, BMP-7+FSH και FSH.

Επιπλέον, φάνηκε ότι η BMP-15 καθώς και η BMP-7 αναστέλλουν τη δράση της FSH στην έκκριση της οιστραδιόλης, αλλά και της προγεστερόνης.

Συμπεράσματα: Από την παρούσα μελέτη προκύπτει ότι οι ορμόνες BMP-15 και BMP-7 πιθανώς εμπλέκονται στη στεροειδογένεση των κοκκωδών κυττάρων και συνεπώς στη φυσιολογία των ωοθηκών.

6. SUMMARY

Introduction: Bone morphogenetic proteins constitute a group of glycoproteins which belong to the transforming growth factor-beta superfamily and are classified in three groups: The first group includes BMP-2 and BMP-4, the second group BMP-5, BMP-6 and BMP-7 and the third BMP-3 and BMP-8.

BMP-15 is expressed exclusively in the oocyte and it has been shown that promotes early follicle growth whereas inhibits the expression of FSH receptors and prevents premature luteinization.

BMP-7 is expressed exclusively in theca cells and it has been shown to reduce the number of primordial follicles and increase the number of primary and secondary follicles.

It is likely that these hormones play a role in reproduction and fertility. The aim of this study was to investigate the effect of BMP-15 and BMP-7 in the secretion of estradiol and progesterone from cultures of luteinized granulosa cells.

Materials and Methods: Granulosa cells were obtained from women undergoing in vitro fertilization treatment in 24, 48 and 72 hours of culture.

With Enzyme Immunoassay (Elisa) the levels of estradiol (pg/ml) and progesterone (ng/ml) were determined in cultures of luteinized granulosa cells.

Results: The secretion of progesterone, at 24 and 48 hours of culture, was decreased with the addition of BMP-15 (100 ng/ml) in the culture media with statistical significant difference between the control and the hormones BMP-15 and FSH. The secretion of progesterone was decreased at 72 hours of culture too, but the difference from the control was not significant. On the other side, the secretion of estradiol was increased at 24 and 48 hours of culture but there was no significant difference from the control.

Regarding BMP-7, the secretion of progesterone at 24, 48 and 72 hours of culture was decreased with the addition of BMP-7 (100 ng/ml) in the culture media with statistical significant difference, at 24 and 48 hours of culture, between the control and the hormones BMP-7, BMP-7+FSH and FSH. Moreover, BMP-15 and BMP-7 blocked the effect of FSH in the secretion of progesterone and estradiol.

Conclusion: From the present study we can conclude for a first time that BMP-15 and BMP-7 are probably involved in the steroidogenesis of granulosa cells.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adashi E.Y. (1998) The IGF family and folliculogenesis. *J. Reprod. Immunol.* 39, 13-19
- Adashi E.Y. and Hsueh A.J. (1982) Estrogens augment the stimulation of ovarian aromatase activity by follicle-stimulating hormone in cultured rat granulosa cells. *J. Biol. Chem.* 257, 6077-83
- Adashi EY. Intraovarian peptides. Stimulators and inhibitors of follicular growth and differentiation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21:1–17.
- Amsterdam A, Tajima K, Frajese V, Seger R 2003 Analysis of signal transduction stimulated by gonadotropins in granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 202:77–80
- Balemans W and Van Hul W 2002 Extracellular regulation of BMP in signaling vertebrates: a cocktail of modulators. *Developmental Biology* 250 231-250.
- Billig H., Futura I. and Hsueh A.J. (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* 133, 2204-12
- Bondestam J, Kaivo-oja N, Kallio J, Groome N, Hyden-Granskog C, Fujii M, Moustakas A, Jalanko A, ten Dijke P, Ritvos O 2002 Engagement of activin and bone morphogenetic protein signaling pathway Smad proteins in the induction of inhibin B production in ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 195:79–88
- Byskov AG, Yding Andersen C, Hossaini A, Guoliang X. Cumulus cells of oocyte cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH., *Mol Reprod Dev.*,46(3):296-305 Mar (1997)
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ and Webb R 1995 Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 49 335-350.

- Chand AL, Ponnampalam AP, Harris SE, Winship IM, Shelling AN. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. *Fertility and sterility* 2006;86(4):1009–1012. [PubMed: 17027369]
- Di Pasquale E, Rossetti R, Marozzi A, et al. Identification of new variants of human BMP15 gene in a large cohort of women with premature ovarian failure. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2006;91(5):1976–1979. [PubMed: 16464940]
- Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. *Human genetics* 2006;119(4):408–415. [PubMed: 16508750]
- Donahue RP, Stern S. Follicular cell support of oocyte maturation: production of pyruvate in vitro. *J Reprod Fertil* 1968;17(2):395–398. [PubMed: 5723787]
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 1998; 12:1809–1817.
- Dudley AT, Lyons KM, Robertson EJ 1995 A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev* 9:2795–2807
- Eppig JJ 2001 Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 122:829–838
- Eppig, JJ.; Viveiros, MM.; Marin Bivens, C.; De La Fuente, R. Regulation of Mammalian Oocyte Maturation. In: Leung, PCK.; Adashi, EY., editors. *The Ovary*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press; 2004. p. 113-129.
- Erickson G.F. and Shimasaki S. (2000) The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 193-8

Erickson G.F. and Shimasaki S. (2001) The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil. Steril.* 76, 943-9

Fabre S, Pierre A, Mulsant P, Bodin L, Di Pasquale E, Pesrani L, Monget P and Monniaux D 2006 Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. *Reproductive Biology and Endocrinology* 420.

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- β superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 191:35–43

Fumio Otsuka, Shin Yamamoto, Gregory F. Erickson, and Shunichi Shimasaki Bone Morphogenetic Protein-15 Inhibits Follicle-stimulating Hormone (FSH) Action by Suppressing FSH Receptor Expression. *From the Department of Reproductive Medicine, University of California, San Diego, La Jolla, California 92093-063*

Fumio Otsuka and Shunichi Shimasaki A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: Its role in regulating granulosa cell mitosis. Department of Reproductive Medicine, School of Medicine, University of California at San Diego, La Jolla, CA 92093-0633

Galloway, S.M. et al. (2002) Bmp15 mutations and ovarian function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 191, 15–18

Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS, McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW et al. 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, Ritter LJ, Armstrong DG. Mouse oocyte mitogenic activity is developmentally coordinated throughout folliculogenesis and meiotic maturation. *Developmental biology* 2001;240:289–298. [PubMed: 11784064]

Glister C, Richards SL & Knight PG 2005 Bone morphogenetic proteins (BMP) -4, -6, and -7 potently suppress basal and luteinizing hormone-induced

androgen production by bovine theca interna cells in primary culture: could ovarian hyperandrogenic dysfunction be caused by a defect in thecal BMP signaling? *Endocrinology* 146 1883–1892.

Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R & Galloway SM 2004 Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction* 70 900–909.

Hashimoto O, Moore RK & Shimasaki S 2005 Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *PNAS* 102 5426–5431.

Huang ES & Nalbandov AV 1979 Steroidogenesis of chicken granulosa and theca cells: in vitro incubation system. *Biology of reproduction* 20 442–453.

Hussein TS, Froiland DA, Amato F, Thompson JG, Gilchrist RB. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of cell science* 2005;118(Pt 22):5257–5268. [PubMed: 16263764]

Ioannis E. Messinis and Tempeton A. A. (1990b) The importance of follicle-stimulating hormone increase for folliculogenesis. *Hum. Reprod.* 5, 153-6.

Ioannis E. Messinis Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No5 pp. 557-571, 2006
Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Thessaly, Medical School, 22 Papakiriazi Street, 41222 Larissa, Greece

Jennifer L. Dube, Pei Wang, Julia Elvin, Karen M. Lyons, Anthony J. Celeste, and Martin M. Matzuk The Bone Morphogenetic Protein15 Gene Is X-Linked and Expressed in Oocytes. Department of Tissue Growth and Repair (J.L.D., A.J.C.) Genetics Institute, Inc. Cambridge, Massachusetts 02140 Departments of Orthopaedic Surgery and Biological Chemistry (K.M.L.) University of California Los Angeles School of Medicine Los Angeles, California 90095 Departments of Pathology (P.W., J.E.,

M.M.M.), Cell Biology (M.M.M.), and Molecular and Human Genetics (J.E., M.M.M.) Baylor College of Medicine Houston, Texas 77030

Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR & McNatty KP 2004 Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Animal Reproduction Science* 82–83 447–460.

Juengel JL, Hudson NL, Heath DA, et al. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol Reprod* 2002;67(6):1777–1789. [PubMed: 12444053]

Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ & McNatty KP 2006 The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction* 131 501–513.

Julia A. Elvin a,b, Changning Yan a, Martin M. Matzuk Oocyte-expressed TGF- β superfamily members in female fertility. a *Department of Pathology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA* b *Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA* c *Department of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030, USA*

Kawabata M, Imamura T, Miyazono K 1998 Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:49–61

Knight PG & Glister C 2003 Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal Reproduction Science* 78 165–183.

Knight PG & Glister C 2006 TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 32, 191–206

Lee W, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S 2001 The effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 65:994–999

Liao, W.X. et al. (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. *J. Biol. Chem.* 278, 3713–3719

Marrone BL & Hertelendy F 1983 Steroid metabolism by avian ovarian cells during follicular maturation. *Biology of reproduction* 29 953–962.

Massague', J., Hata, A., Liu, F., 1997. TGF- β signalling through the Smad pathway. *Trends Cell Biol* 7, 187–192.

McMahon HE, Hashimoto O, Mellon PL, Shimasaki S. Oocyte-specific over-expression of mouse BMP-15 leads to accelerated folliculogenesis and an early onset of acyclicity in transgenic mice. *Endocrinology*. 2008

McNatty, K.P. et al. (2003) Oocyte-derived growth factors and ovulation rate in sheep. *Reproduction Suppl.* 61, 339–351

McNatty KP, Juengel JL, Reader KL, Lun S, Myllymaa S, Lawrence SB, Western A, Meerasahib MF, Mottershead DG, Groome NP et al. 2005 Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. *Reproduction* 129 473–480.

McNatty K.P., Makris A., DeGrazia C., Osathanondh R. and Ryan K.J. (1979c) The production of progesterone, androgens and estrogens by granulosa cells, theca tissue and stromal tissue from human ovaries in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49, 687–99

Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, Takeda M, Inagaki K, Kano Y, Otani H, Mimura Y, Ogura T, Makino H 2006 Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod* 74:1073–1082

Moore RK, Otsuka F & Shimasaki S 2003 Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological*

Chemistry 278 304–310.

Onagbesan OM, Bruggeman V, Van As P, Tona K, Williams J & Decuypere E
2003 BMPs and BMPRs in chicken ovary and effects of BMP-4 and -7 on
granulosa cell proliferation and progesterone production in vitro. *American
Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 285 E973–E983.

Otsuka F, Moore RK, Wang X, et al. Essential role of the oocyte in estrogen
amplification of folliclestimulating hormone signaling in granulosa cells.
Endocrinology 2005;146(8):3362–3367. [PubMed: 15878960]

Otsuka, F. et al. (2000) Bone morphogenetic protein-15: Identification
of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* 275, 39523–39528

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 4938–4941.

Otsuka F, Yamamoto S, Erickson GF & Shimasaki S 2001 Bone
morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating Hormone (FSH)
action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry*
276 11387–11392.

R. Kelly Moore, Fumio Otsuka, and Shunichi Shimasaki Molecular Basis of Bone
Morphogenetic Protein-15 Signaling in Granulosa Cells. *From the Department of
Reproductive Medicine, University of California San Diego, School of Medicine,
La Jolla, California 92093-0633*

R. Kelly Moore, Gregory F. Erickson and Shunichi Shimasaki Are BMP-15 and
GDF-9 primary determinants of ovulation quota in mammals? Department of
Reproductive Medicine, University of California San Diego, School of Medicine, La
Jolla, California 92093-0633, USA

Reilly C.M., Cannady W.E., Mahesh V.B., Stopper V.S., De Sevilla L.M. and Mills
T.M. (1996) Duration of estrogen exposure prior to follicle-stimulating hormone

stimulation is critical to granulosa cell growth and differentiation in rats. *Biol. Reprod.* 54, 1336-42

S Elis, J Dupont, I Couty, L Persani, M Govoroun, E Blesbois, F Battelier and P Monget. Expression and biological effects of bone morphogenetic protein-15 in the hen ovary. *Physiologie de la Reproduction et des Comportements*, UMR 6175 INRA-CNRS-Universite F Rabelais de Tours, Haras Nationaux, 37380 Nouzilly, France
Institute of Endocrine Sciences, University of Milan, 20122 Milan, Italy

Schuetz, A.W., Dubin, N.H., 1981. Progesterone and prostaglandin secretion by ovulated rat cumulus cell–oocyte complexes. *Endocrinology* 108, 457–463.

Shimasaki, S. et al. (2003) The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction Suppl.* 61, 323–337

Shimasaki, S. et al. (2004) The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.* 25, 72–101

Tomoko Miyoshi, Fumio Otsuka, Kenichi Inagaki, Hiroyuki Otani, Masaya Takeda, Jiro Suzuki, Junko Goto, Toshio Ogura, and Hirofumi Makino Differential Regulation of Steroidogenesis by Bone Morphogenetic Proteins in Granulosa Cells: Involvement of Extracellularly Regulated Kinase Signaling and Oocyte Actions in Follicle Stimulating Hormone-Induced Estrogen Production. *Department of Medicine and Clinical Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama City, 700-8558, Japan*

Sugiura K, Pendola FL, Eppig JJ. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism. *Developmental biology* 2005;279(1):20–30. [PubMed: 15708555]

Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, et al. Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development* 2007;134(14):2593–2603. [PubMed: 17553902]

- Tetsuka M. and Hillier S.G. (1996) Androgen receptor gene expression in rat granulosa cells: the role of follicle-stimulating hormone and steroid hormones. *Endocrinology* 137, 4392-7
- Tischkau SA & Bahr JM 1996 Avian germinal disc region secretes factors that stimulate proliferation and inhibit progesterone production by granulosa cells. *Biology of reproduction* 54 865–870.
- Tosca L, Crochet S, Ferre P, Foulfelle F, Tesseraud S & Dupont J 2006 AMP-activated protein kinase activation modulates progesterone secretion in granulosa cells from hen preovulatory follicles. *Journal of Endocrinology* 190 85–97.
- Tsafriri, A., Channing, C.P., 1975. An inhibitory influence of granulosa cells and follicular fluid upon oocyte meiosis in vitro. *Endocrinology* 96, 922–927.
- Ursula A. Vitt, Sabine Mazerbourg, Cynthia Klein, and Aaron J.W. Hsueh Bone Morphogenetic Protein Receptor Type II Is a Receptor for Growth Differentiation Factor-9. Division of Reproductive Biology, Department of Gynecology and Obstetrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California 94305-5317
- Vanderhyden, B.C., 1992. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biol. Reprod.* 46, 1196–1204
- Vanderhyden BC, Cohen JN, Morley P 1993 Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 133:423–426
- Vanderhyden, B.C., Tonary, A.M., 1995. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.* 53, 1243–1250.
- Vanderhyden BC 1996 Oocyte-secreted factors regulate granulosa cell steroidogenesis. *Zygote* 4:317–321

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

Yi SE, LaPolt PS, Yoon BS, Chen JY, Lu JK, Lyons KM. The type I BMP receptor *Bmpr1B* is essential for female reproductive function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:7994–7999.

Yoshino O, McMahon HE, Sharma S, Shimasaki S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(28):10678–10683. [PubMed: 16818886]

You-Qiang Su, Ph.D. [Associate Research Scientist]¹, Koji Sugiura, Ph.D. [Associate Research Scientist], and John J. Eppig, Ph.D. [Professor] Mouse Oocyte Control of Granulosa Cell Development and Function: Paracrine Regulation of Cumulus Cell Metabolism. The Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, ME 04609