ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Α΄ ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ Α. ΡΟΔΟΛΑΚΗΣ
ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Διπλωματική εργασία

Η συσχέτιση του γονιδίου FOXE1 με την εμφάνιση Πρόωρης Ωοθηκικής Ανεπάρκειας (ΠΩΑ)

Υποψήφιος: Καλαμπαλίκης Ανδρέας
Ειδικευόμενος Μαιευτικής Γυναικολογίας

Επιβλέπουσα: Μιχαλά Σταυρούλα
Επίκουρος Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ 2020

1

(σύμφωνα με απόφ. Συγκλήτου25ης -7 -2017 / Αρ. Κεντρικού Πρ: 1718001307)Αθήνα, ___________

ΥΠΟΔΕΙΓΜΑ (1)

Προς: **Βιβλιοθήκη Επιστημών Υγείας**

1.Βεβαίωση επιτυχούς διεκπεραίωσης μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας, από τοΠΜΣ <<Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική>>

Βεβαιώνεται ότι η εργασία του Καλαμπαλίκη Ανδρέα του Δημοσθένη, μεταπτυχιακούφοιτητή του ΠΜΣ <<Αναπαραγωγική-Αναγεννητική Ιατρική>> με αριθμό μητρώου 20171063και με τίτλο:«Η συσχέτιση του γονιδίου FOXE1 με την εμφάνιση Πρόωρης Ωοθηκικής Ανεπάρκειας (ΠΩΑ)» έχει εγκριθεί και βαθμολογηθεί.

Υπογραφή παρόντων μελών 3μελούς Εξεταστικής Επιτροπής
(Ονοματεπώνυμο, βαθμίδα, Τμήμα, Ίδρυμα)

1. Μιχαλά Λίνα,Επ, Καθηγήτρια,Ιατρικής,ΕΚΠΑ
2. Δρακάκης Πέτρος,Καθηγητής,Ιατρικής,ΕΠΚΑ
3. Μαυρογιάννη Δέσποινα,ΕΔΙΠ,ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (ΠΩΑ) ορίζεται ως η παύση της ωοθηκικής λειτουργίας πριν την ηλικία των 40 ετών και επηρεάζει περίπου το 1% του γυναικείου πληθυσμού. Τα αίτια της ΠΩΑ είναι πολλά και ποικίλα και περιλαμβάνουν χρωμοσωμικά αίτια, γενετικά αίτια, λοιμώξεις, ιατρογενή αίτια καθώς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της σχέσης του μήκους του τμήματος πολύ-αλανίνης (πολύ-Ala) των διαφόρων πολυμορφισμών του γονιδίου FOXE1 με την εμφάνιση ΠΩΑ.

Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκε περιφερικό αίμα από 28 γυναίκες με ΠΩΑ και από 30 υγιείς γυναίκες (ομάδα ελέγχου), έπειτα από γραπτή συγκατάθεσή τους. Από το υλικό αυτό έγινε απομόνωση του γενετικού υλικού και εν συνεχεία αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με στόχο την ενίσχυση του γονιδίου FOXE1. Έπειτα, έγινε αλληλούχιση του προϊόντος της PCR και καταγραφή των γονοτύπων των ασθενών και της ομάδας ελέγχου.

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 31,68 έτη και ο μέσος όρος ηλικίας κατά την εμφάνιση της ΠΩΑ ήταν 25,18 έτη. Οικογενειακό ιστορικό ΠΩΑ είχαν 9 γυναίκες (32,14%), ενώ 5 είχαν συνυπάρχουσες παθήσεις μη σχετιζόμενες με την εμφάνιση ΠΩΑ (17,86%). Ανιχνεύσαμε 5 πολυμορφισμούς του γονιδίου FOXE1, με 8, 12, 14, 16 και 17 κατάλοιπα αλανίνης. Εντοπίστηκαν επίσης 6 διαφορετικοί γονότυποι 14/14, 14/16, 16/16, 14/17, 8/16 και 12/14. Το αλλήλιο με τα 8 κατάλοιπα εμφανίστηκε μόνο στις ασθενείς, ενώ το αλλήλιο με τα 12 κατάλοιπα μόνο στις υγιείς. Ο πιο συχνός γονότυπος και στους δύο πληθυσμούς ήταν ο 14/16 (64,29% στις ασθενείς και 53,33% στις υγιείς). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου με τα 14 (p-value:0.491) και τα 16 (p-value:0.389) κατάλοιπα. Επίσης, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των διάφορων γονοτύπων στις δύο ομάδες (p-value:0.397).

Στην παρούσα μελέτη, ο αριθμός των καταλοίπων αλανίνης στο γονίδιο FOXE1 δε φάνηκε να συσχετίζεται με την εμφάνιση ΠΩΑ.

ABSTRACT

Premature Ovarian Insufficiency (POI) is defined as the cessation of ovarian function before the age of 40. It affects approximately 1% of the female population. The causes of POI are numerous and vary among women. They include chromosomal aberrations, genetic diseases, infections, iatrogenic causes, and environmental factors. The present study aimed to investigate the relationship between the length of the poly-alanine (poly-Ala) tract of the various polymorphisms of the FOXE1 gene and the occurrence of POI.

For this purpose, peripheral blood was collected from 28 women with POI and 30 healthy women (control group), after obtaining written consent. From the blood, we isolated the whole genome and then we performed polymerase chain reaction (PCR) to amplify our target, the FOXE1 gene. The PCR product was then sequenced and the genotypes of the patients and the control group were recorded.

The mean age of the patients was 31.68 years and the mean age at diagnosis of POI was 25.18 years. Out of 28 patients, 9 women (32.14%) had a family history of POI, while 5 had other pathologies not related to POI (17.86%). We detected 5 polymorphisms of the FOXE1 gene, with 8, 12, 14, 16, and 17 alanine residues. Six different genotypes 14/14, 14/16, 16/16, 14/17, 8/16, and 12/14 were identified. The allele with the 8 residues occurred only in the group of patients, while the allele with the 12 residues occurred only in the control group. The most common genotype in both populations was 14/16 (64.29% in patients and 53.33% in healthy people). No statistically significant difference was observed in the frequency of occurrence of the allele with 14 (p-value: 0.491) and 16 (p-value: 0.389) residues. We observed no statistically significant difference in the frequency of occurrence of the different genotypes among the two groups (p-value: 0.397).

In the present study, we found that the correlation between the number of alanine residues in the FOXE1 gene and the occurrence of POI was not statistically significant.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία ολοκληρώθηκε χάρις στην βοήθεια των σεβαστών καθηγητών και διακεκριμένων επιστημόνων της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η συμμετοχή τους ήταν καταλυτική σε όλα τα στάδια της εκπόνησης της. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως την καθηγήτριά μου, κα. Δέσποινα Μαυρογιάννη, η οποία μέσα από το ήθος της, την προθυμία της και την επιστημονική της κατάρτιση κατάφερε να με μυήσει στον ξεχωριστό κόσμο της βιολογίας και της έρευνας. Υπήρξε ο πιο αξιόλογος άνθρωπος που θα μπορούσε να με διδάξει στο χώρο των εργαστηρίων προσφέροντάς μου απλόχερα τις γνώσεις και τις εμπειρίες της, σεβόμενη τους προσωπικούς μου ρυθμούς και τις δικές μου ανάγκες.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και υπεύθυνο του εργαστηρίου της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», κ. Πέτρο Δρακάκη, που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την μεταπτυχιακή μου διατριβή αναθέτοντάς μου μια τόσο ενδιαφέρουσα εργασία πάνω στο διαχρονικό αλλά και τόσο σημαντικό κομμάτι της πρόωρης ωοθηκικής ανεπάρκειας.

Ευχαριστώ επίσης από καρδιάς την Επίκουρο Καθηγήτρια της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, κα. Λίνα Μιχαλά, για την καθοδήγησή της, την εποικοδομητική της κριτική αλλά και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε σε κάθε βήμα αυτής της μακράς πορείας. Μέσα από το ήθος της και τον χαρακτήρα της αποτελεί πηγή έμπνευσης για όλους τους νέους επιστήμονες.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Μονάδας της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα» για την διαθεσιμότητα και τη βοήθειά τους στην επίλυση των καθημερινών μου προβλημάτων κατά την εκτέλεση των πειραμάτων μου στο εργαστήριο.

Τέλος, επιθυμώ να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στη μητέρα μου, Δήμητρα, και την αδερφή μου, Τζίνα, για την αμέριστη συμπαράστασή τους και την απόλυτη εμπιστοσύνη τους καθ’ όλη τη διάρκεια της εκπαιδευτικής μου διαδρομής, της οποίας το επιστέγασμα αποτελεί η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.

Στον πατέρα μου,

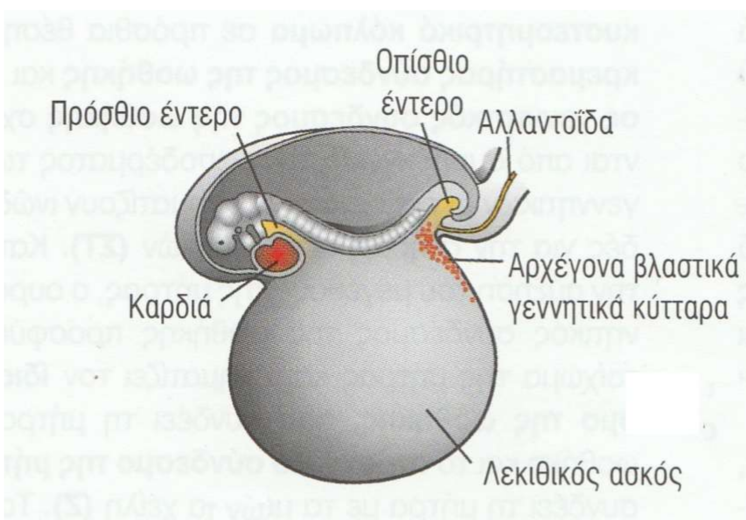
που έφυγε τόσο νωρίς.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

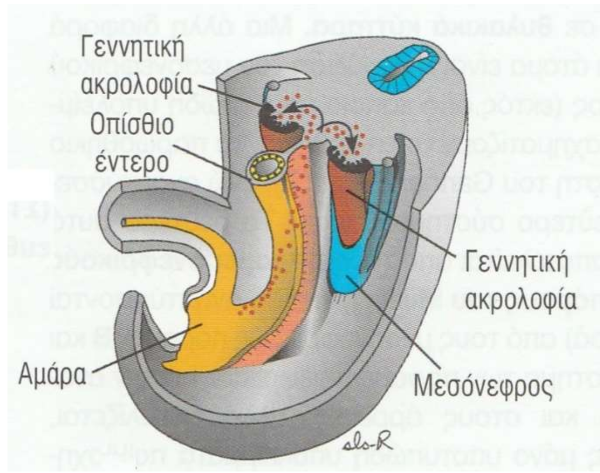
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στοιχεία εμβρυολογίας

Η ανάπτυξη των γονάδων αρχίζει την 4η εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Εμφανίζονται ως ένα ζεύγος ακρολοφιών στην διάμεσο μεσόδερμα, κατά μήκος της μεσοκοιλιακής επιφάνειας του μεσονεφρικού συστήματος. Οι δύο αυτές δομές αποτελούν την ουρογεννητική ακρολοφία. Στη συνέχεια, τα επιθηλιακά κύτταρα που περιβάλλουν την ουρογεννητική ακρολοφία πολλαπλασιάζονται και αρχίζουν να εισχωρούν στο υποκείμενο μεσόδερμα για τον σχηματισμό των αρχέγονων φυλετικών χορδών. Περίπου την ίδια χρονική περίοδο, στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού, κοντά στην αλλαντοΐδα, διαφοροποιούνται τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα με προέλευση από την επιβλάστη και στη συνέχεια μεταναστεύουν κατά μήκος του ραχιαίου μεσεντερίου του οπίσθιου εντέρου, κατευθυνόμενα προς τις γοναδικές καταβολές. Στις δομές αυτές φτάνουν την 5η εβδομάδα κύησης και στη συνέχεια εισχωρούν στο εσωτερικό τους την 6η εβδομάδα, όπου περιβάλλονται από τα επιθηλιακά κύτταρα των αρχέγονων φυλετικών χορδών.[1]



Εικόνα 1.1: Η θέση των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων στην αλλαντοΐδα, πριν την μετανάστευσή τους στις γοναδικές καταβολές.



Εικόνα 1.2: Τα αρχέγονα βλαστικά κύτταρα κατά τη μετανάστευσή τους στις γεννητικές ακρολοφίες.

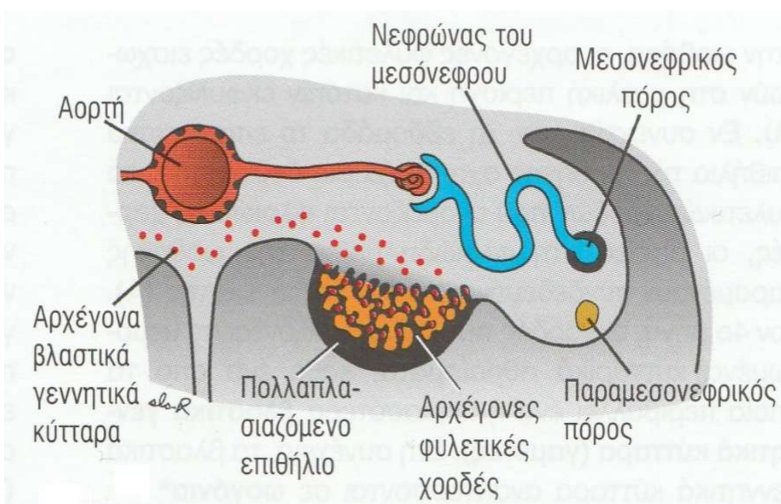
Τα γεννητικά κύτταρα και στα δύο φύλα κατάγονται από το ίδιο αρχέγονο κύτταρο, το βλαστικό γεννητικό κύτταρο (ΒΓΚ). Στα αρχικά εμβρυϊκά στάδια τα ΒΓΚ είναι λίγα, 30-40 στο έμβρυο των 24 ημερών. Εντοπίζονται στο ουραίο τμήμα του εμβρύου και από την αρχική τους θέση μεταναστεύουν προς τις γεννητικές ακρολοφίες. Αρχικά, η μετανάστευση πραγματοποιείται παθητικά ως συνέπεια της μετατόπισης των κυττάρων, που παρατηρείται στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Στη συνέχεια, οι γεννητικές ακρολοφίες παράγουν ουσίες, που προσελκύουν τα ΒΓΚ με χημειοτακτισμό.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ΒΓΚ κατά τη μετανάστευση είναι το ακανόνιστο σχήμα με κυτταροπλασματικές προσεκβολές και ψευδοπόδια και ο σφαιρικός πυρήνας με παρουσία 1-3 πυρηνίων. Το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο είναι άφθονο στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ υπάρχουν και πολλά ελεύθερα ριβοσώματα, που είναι υπεύθυνα για τη βασεοφιλία του κυτταροπλάσματος. Τα σφαιρικά μιτοχόνδρια έχουν πεταλιοειδείς ακρολοφίες και το σύστημα Golgi είναι μικρό.

Ένας ειδικός τύπος κυτταροπλασματικού εγκλείστου μοναδικός για τα βλαστικά γεννητικά κύτταρα είναι το «νέφος» από τη γαλλική λέξη “nuage”. Αποτελείται από ηλεκτρονικά πυκνές μάζες ινώδους και κοκκιώδους υλικού. Συχνά, παρατηρείται κοντά στα μιτοχόνδρια ή τον πυρήνα. Παρατηρείται αύξηση της ποσότητάς του κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, που είναι μάλιστα μεγαλύτερη στα ΒΓΚ του θήλεος.[2]

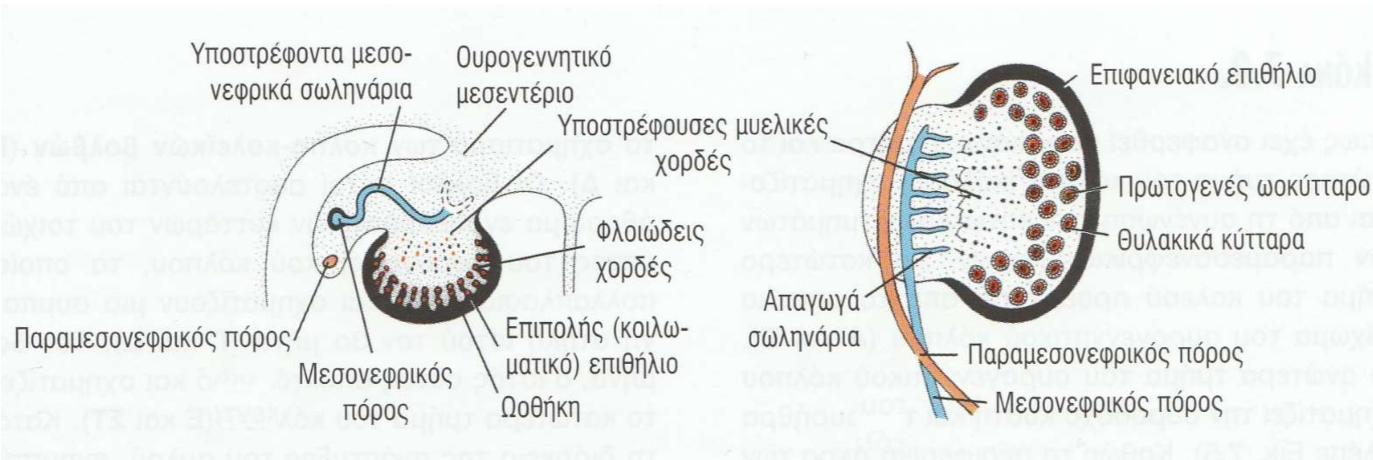
Η διαφοροποίηση της γονάδας σε όρχι ή ωοθήκη, εν συνεχεία, εξαρτάται από την παρουσία του Y χρωμοσώματος και συγκεκριμένα από το γονίδιο SRY (περιοχή φυλετικού καθορισμού του χρωμοσώματος Y), το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που ρυθμίζει την ανάπτυξη του όρχεος, και ως εκ τούτου, ονομάζεται ορχεοκαθοριστικός παράγοντας, υπό την παρουσία του οποίου πραγματοποιείται η άρρενος τύπου ανάπτυξη.

Ελλείψει του SRY στην αναπτυσσόμενη ωοθήκη, οι αρχέγονες φυλετικές χορδές εισχωρούν στην μυελική περιοχή και κατόπιν εκφυλίζονται. Έπειτα, στην $7^{η}$ εβδομάδα ανάπτυξης το επιφανειακό επιθήλιο της ωοθήκης σχηματίζει μία δεύτερη γενιά φυλετικών χορδών, που ονομάζονται φλοιώδεις χορδές και οι οποίες, στη φλοιώδη μοίρα της ωοθήκης, παραμένουν συνδεδεμένες με την επιφάνειά της. Τον $4^{ο}$ μήνα, οι χορδές αυτές διαχωρίζονται σε μεμονωμένα αθροίσματα κυττάρων, κάθε ένα από τα οποία περιβάλλει ένα ή περισσότερα βλαστικά γεννητικά κύτταρα (γαμέτες).[1]



Εικόνα 1.3: Οι αρχέγονες γεννητικές χορδές και η εγκατάσταση των αρχέγονων βλαστικών γεννητικών κυττάρων.

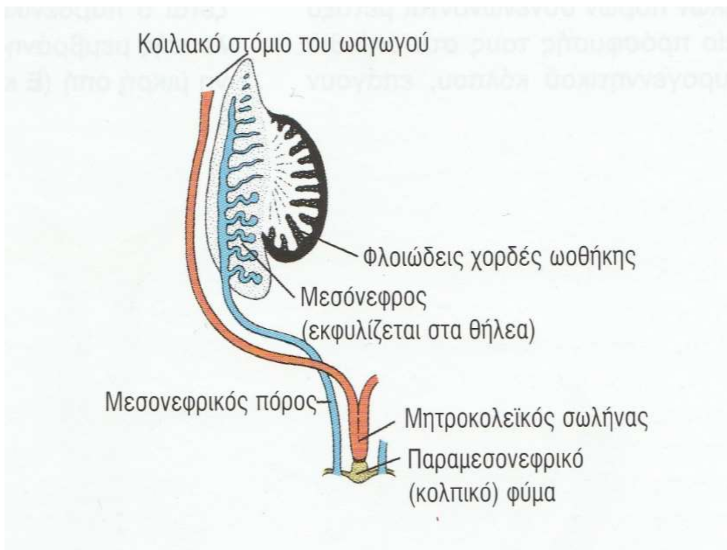
Μετά την εγκατάσταση στην ωοθηκική καταβολή, ένα μέρος από τα ΒΓΚ εκφυλίζεται. Αυτή είναι η πρώτη εκφυλιστική διεργασία που παρατηρείται στον πληθυσμό αυτό. Όσα απομένουν αποκτούν το σχήμα του ακίνητου κυττάρου και μετατρέπονται σε ωογόνια, ενώ τα επιθηλιακά κύτταρα που τα περιβάλλουν διαφοροποιούνται σε θυλακικά κύτταρα. Τα ωογόνια διαιρούνται με μίτωση με εξαιρετικά γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα τη θεαματική αύξηση του αριθμού τους. Τα θυγατρικά κύτταρα δεν αποχωρίζονται τελείως, αλλά διατηρούν μεσοκυττάριες συνδέσεις, έτσι ώστε να δημιουργούνται ομάδες ωογονίων που χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη επικοινωνία με λειτουργική και μορφολογική ομοιότητα των κυττάρων.[3]



Εικόνα 1.4: Η εκφύλιση των αρχέγονων γεννητικών χορδών και ο σχηματισμός των φλοιωδών χορδών.

Μετά τη φάση του έντονου πολλαπλασιασμού, η μιτωτική διαίρεση των ωογονίων σταματά. Με τη διακοπή των μιτωτικών διαιρέσεων, κλείνει οριστικά ο κύκλος πολλαπλασιασμού των γεννητικών κυττάρων στο θήλυ. Μετά την τελευταία μιτωτική διαίρεση και την ύστατη σύνθεση DNA, δεν παρατηρείται, όπως φυσιολογικά συνηθίζεται, κυτταρική διαίρεση. Αυτή η ιδιαίτερη σύνθεση DNA υποδηλώνει το τέλος των μιτωτικών διαιρέσεων και την έναρξη της μείωσης.[4]

Οι ωοθήκες αναπτύσσονται αρχικά οπισθοπεριτοναϊκά, κατά μήκος του οπίσθιου κοιλιακού τοιχώματος, στη συνέχεια όμως μεταναστεύουν ουραία λόγω της αύξησης των ουρογεννητικών ακρολοφιών. Καθώς αναπτύσσεται η ωοθήκη, σχηματίζεται ο ουραίος γεννητικός σύνδεσμος, ο οποίος αποτελείται από ινώδη ιστό και προέρχεται από το μεσόδερμα της ουρογεννητικής ακρολοφίας. Ο σύνδεσμος αυτός από το κατώτερο τμήμα της ωοθήκης προσφύεται στα γεννητικά ογκώματα, δηλαδή στα μεγάλα χείλη του αιδοίου. Μετά τον σχηματισμό της μήτρας, η πορεία του ουραίου γεννητικού συνδέσμου διακόπτεται λόγω της αύξησης της μήτρας και προσκολλάται στο τοίχωμα της. Το τμήμα του συνδέσμου από την ωοθήκη έως το κέρας της μήτρας σχηματίζει τον ίδιο σύνδεσμο της ωοθήκης. Επιπλέον, ο κεφαλικός σύνδεσμος της ωοθήκης, που θα αποτελέσει τον κρεμαστήρα σύνδεσμό της, σχηματίζεται από το μεσόδερμα της ουρογεννητικής ακρολοφίας και στηρίζει την ωοθήκη από τον ανώτερο πόλο της.[1]



Εικόνα 1.5: Η αναπτυσσόμενη ωοθήκη και ο μεσονεφρικός και παραμεσονεφρικός πόρος.

Εικόνα 1.6: Εκφύλιση του μεσονεφρικού πόρου και ανάπτυξη των γυναικείων γεννητικών δομών από τους παραμεσονεφρικούς πόρους.

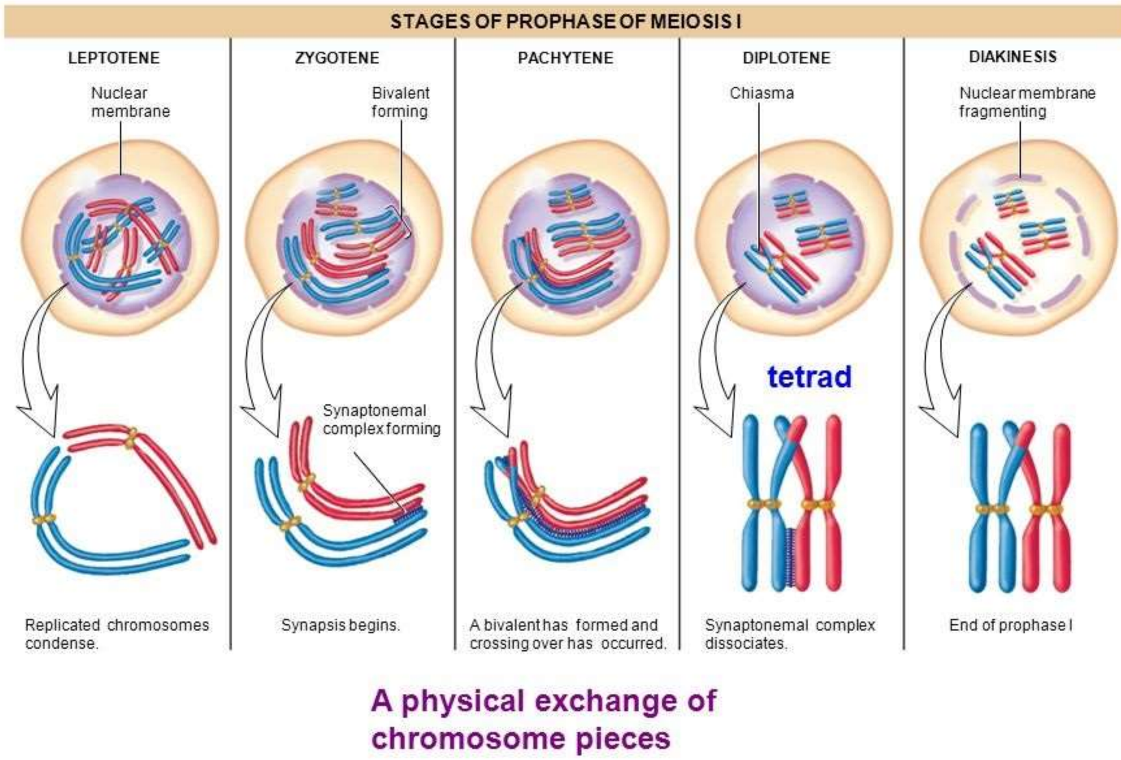
1.2. Ωογένεση

Αφού τα ωογόνια ολοκληρώσουν την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, περνούν σε μια φάση ηρεμίας, στην οποία παραμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε αυτό το στάδιο ονομάζονται ωοκύτταρα Ι (πρωτογενή ωοκύτταρα). Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης αρχίζει στο ανθρώπινο έμβρυο με καρυότυπο 46XX στο τέλος του πρώτου τριμήνου της κύησης και εφεξής όλο και περισσότερα ωογόνια μετατρέπονται σε ωοκύτταρα και αναγνωρίζονται στο στάδιο της λεπτοταινίας, ζυγοταινίας και παχυταινίας. Τον 2^{ο} μήνα κύησης μετρούνται περίπου 900.000 ωογόνια και τον 5^{ο} μήνα $7x10^{6}$ ωοκύτταρα Ι. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια σχηματίζονται στον άνθρωπο κατά το τέλος της εμβρυϊκής ζωής.

Το στάδιο της λεπτοταινίας αρχίζει μεταξύ της 10^{ης} και 11^{ης} εβδομάδας και ο μέγιστος αριθμός ωοκυττάρων σε αυτό μετράται μεταξύ 14^{ης} και 26^{ης} εβδομάδας. Το στάδιο της ζυγοταινίας αρχίζει και φθάνει σε αιχμή μία εβδομάδα αργότερα. Η σύναψη των ομολόγων χρωμοσωμάτων και ο σχηματισμός των συναπτονηματικών συμπλεγμάτων (στάδιο παχυταινίας) γίνεται μεταξύ της 14^{ης} και 23^{ης} εβδομάδας. Σε αυτό το στάδιο, παρατηρείται η μεγαλύτερη συχνότητα συναπτικών σφαλμάτων στα ωοκύτταρα του ανθρώπου, σε σχέση με άλλα είδη, και η μεγάλη αναλογία αποπτωτικών ωοκυττάρων στην εμβρυϊκή ωοθήκη αποδίδεται, εν μέρει, σε αυτές τις ανωμαλίες.

Συνεπώς, η ανάπτυξη του ωοκυττάρου, δηλαδή η μίτωση και η μείωση ρυθμίζονται χρονικά, έτσι ώστε κάθε στάδιο να αρχίζει σε ορισμένο χρόνο. Ωστόσο, επειδή την ίδια στιγμή στην ωοθήκη παρατηρούνται ωοκύτταρα σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, η χρονική αυτή ρύθμιση φαίνεται πως εξαρτάται από δύο παραμέτρους. Η πρώτη, η επαγωγική, οδηγεί στην έναρξη του επόμενου σταδίου, η δεύτερη, η επιλεκτική, επιλέγει τα ωοκύτταρα που είναι «ώριμα» για να περάσουν στο επόμενο στάδιο. Επειδή διαπιστώνεται μεγάλη χρονική επικάλυψη ανάμεσα στα διάφορα στάδια όπως επίσης και γειτνίαση ωοκυττάρων σε διαφορετικό στάδιο ωρίμανσης, φαίνεται πως άγνωστοι ενδοκυττάριοι μηχανισμοί ελέγχουν την ατομική πρόοδο της εξέλιξης κάθε ωοκυττάρου.[5]

Στη γέννηση, όλα τα πρωτογενή ωοκύτταρα έχουν συμπληρώσει την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Αντί να προχωρήσουν στη μετάφαση περνούν στο στάδιο της δικτυοταινίας, στάδιο ανάπαυσης μεταξύ της πρόφασης και της μετάφασης, στο οποίο η χρωματίνη εμφανίζεται ως δίκτυο από νημάτια. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεση μετά την ήβη.[6]



Εικόνα 1.7: Τα στάδια της πρόφασης της 1ης μειωτικής διαίρεσης. Από αριστερά προς τα δεξιά τα στάδια της λεπτοταινίας, ζυγοταινίας, παχυταινίας, διπλοταινίας και της διακίνησης.

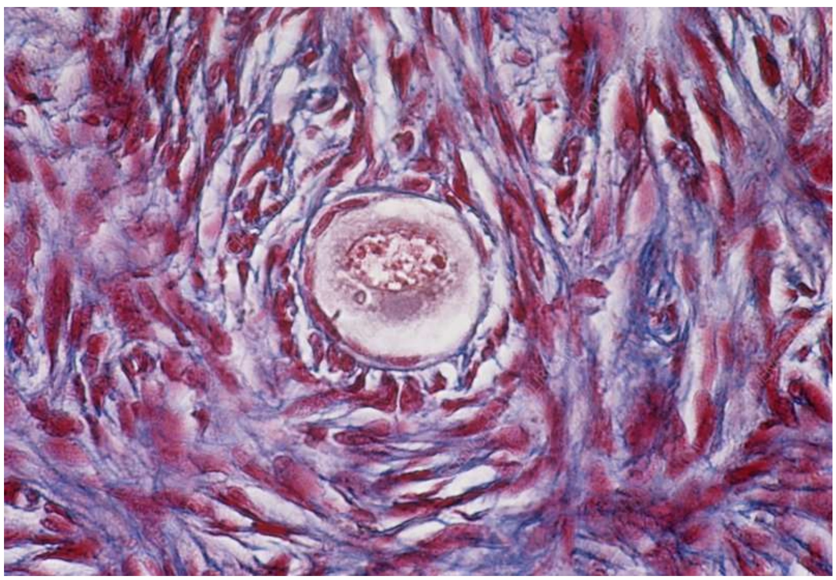
1.3. Η ανάπτυξη του ωοθυλακίου

1.3.1. Το αρχέγονο ωοθυλάκιο

Το ωοθυλάκιο είναι η βασική λειτουργική μονάδα της ωοθήκης και αποτελείται από τα σωματικά κύτταρα και το αναπτυσσόμενο ωοκύτταρο. Από την 11η-12η εμβρυϊκή εβδομάδα, τα πρωτογενή ωοκύτταρα που έχουν προέλθει από κοινό ωογόνιο κατανέμονται σε ομάδες, χωρίς να αναπτύσσουν ιδιαίτερη σχέση με τα σωματικά κύτταρα. Βαθμιαία, ορισμένα αποπίπτουν, και όσα επιβιώνουν περιβάλλονται από αποπλατυσμένα επιθηλιακά κύτταρα και σχηματίζουν τα αρχέγονα ωοθυλάκια. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια αποτελούνται από το ωοκύτταρο, περιβαλλόμενο από μια ατελή στιβάδα αποπλατυσμένων προ-κοκκωδών κυττάρων.

Κατανέμονται μεταξύ των κυττάρων του ωοθηκικού στρώματος και δεν περιβάλλονται από θήκη ούτε οργανωμένο μεσέγχυμα.

Τα θήλεα άτομα γεννιούνται με ένα απόθεμα αρχέγονων ωοθυλακίων, που περιέχουν πρωτογενή ωοκύτταρα στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης της $1^{ης}$ μειωτικής διαίρεσης (Μ1). Μετά την έναρξη της ωοθυλακιογένεσης, ορισμένα ωοθυλάκια θα ωριμάσουν και θα αποβάλουν το ωοκύτταρο τους κατά της ωοθυλακιορρηξία. Τα υπόλοιπα θα εκφυλιστούν με τη διαδικασία του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωσης) με τη διαδικασία της ατρησίας. Όταν εξαντληθεί το απόθεμα των αρχέγονων ωοθυλακίων, διακόπτεται ο ωοθηκικός κύκλος και επέρχεται η εμμηνόπαυση, συνήθως κατά την $5^{η}$ με $6^{η}$ δεκαετία της ζωής.

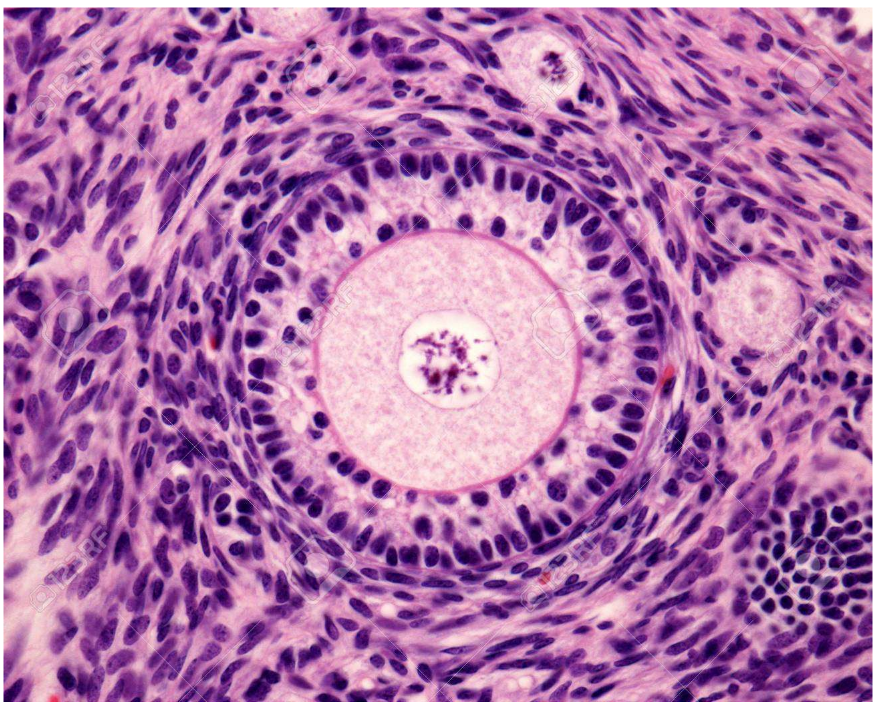


Εικόνα 1.8: Εικόνα αρχέγονου ωοθυλακίου. Παρατηρείται η ατελής στιβάδα των αποπλατυσμένων προ-κοκκωδών κυττάρων.

Στο αρχέγονο ωοθυλάκιο, γύρω από τα θυλακικά κύτταρα, αναγνωρίζεται η βασική μεμβράνη. Σε αυτό το στάδιο, η κυτταρική μεμβράνη του ωοκυττάρου βρίσκεται σε στενή επαφή με τη μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων και είναι σχετικά λεία. Το ωοκύτταρο έχει διάμετρο 30 μm περίπου, μεγάλο έκκεντρο πυρήνα με λεπτοκοκκιώδη χρωματίνη και ένα ή περισσότερα μεγάλα πυρήνια. Κοντά στον πυρήνα, εντοπίζεται ανεπτυγμένη συσκευή Golgi, που περιβάλλεται από αρκετά μιτοχόνδρια. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το κυτταρόπλασμα φαίνεται να περιέχει, εκτός από τα τυπικά οργανίδια, δακτυλιοειδή πετάλια και πολλά μικρά κυστίδια κοντά στη συσκευή Golgi ή διάσπαρτα στο κυτταρόπλασμα. Αρκετοί πόροι φαίνονται στην πυρηνική μεμβράνη.[5]

1.3.2. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο

Το πρωτογενές ωοκύτταρο που είναι ακόμα στο στάδιο της δικτυοταινίας αρχίζει να αυξάνει σε μέγεθος, ενώ τα επιθηλιακά θυλακικά κύτταρα αλλάζουν σχήμα και γίνονται κυβοειδή. Αρχικά, βρίσκονται σε επαφή με το ωοκύτταρο, αλλά καθώς αυξάνει το μέγεθος του τελευταίου, μια στιβάδα από βαθύχρωμο, οξύφιλο υλικό, η διαφανής ζώνη, εμφανίζεται ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα προσκείμενα θυλακικά κύτταρα. Η διαφανής ζώνη διακρίνεται για πρώτη φορά στο φωτομικροσκόπιο, όταν το ωοκύτταρο έχει διάμετρο 50-80 mm.



Εικόνα 1.9: Εικόνα πρωτογενούς ωοθυλακίου. Παρατηρούνται γύρω από το ωοθυλάκιο η διαφανής ζώνη και μια στιβάδα κυβοειδών θυλακικών κυττάρων.

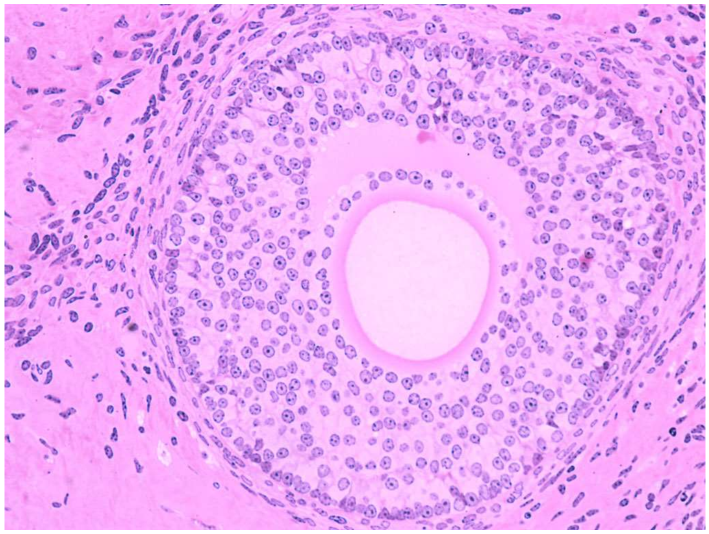
Κατά την αναπαραγωγική περίοδο, ομάδες ωοθυλακίων αρχίζουν να αναπτύσσονται και από αρχέγονα να μετατρέπονται σε πρωτογενή. Από τις πρώτες αλλαγές που παρατηρούνται, είναι η μετατροπή των αποπλατυσμένων θυλακικών κυττάρων σε κυβικά και το μέγεθος του ωοκυττάρου αυξάνεται. Τα διάμεσα κύτταρα του στρώματος, που περιβάλλουν τα θυλακικά κύτταρα, πολλαπλασιάζονται και ανταποκρίνονται σε παράγοντες, που εκκρίνονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Δημιουργείται έτσι μια επιθηλιομεσεγχυματική επικοινωνία μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων, με ανταλλαγή προϊόντων, που επηρεάζουν την ανάπτυξη των σωματικών αυτών κυττάρων και των ωοκυττάρων.

Δύο κύριοι τύποι σωματικών κυττάρων απαρτίζουν το ωοθυλάκιο: τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης. Και οι δύο τύποι αποτελούν θέση σύνθεσης και δράσης ορμονών, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση της θυλακιογένεσης. Στον πολλαπλασιασμό των δύο αυτών κυτταρικών τύπων οφείλεται, εν μέρει, η ανάπτυξη του ώριμου ωοθυλακίου.

Τα ωοκύτταρα των μικρών ωοθυλακίων θα πρέπει να διατηρούν την επαφή τους με τα κοκκώδη κύτταρα, προκειμένου να αυξηθούν, παρόλο που μπορούν να επιβιώσουν αρκετές ημέρες in vitro. Στα ωοθυλάκια, παρατηρείται ομόλογη σύζευξη, του τύπου των χασματικών συνάψεων (gap junctions), μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ο συντονισμός της ανάπτυξης αυτών, που προέρχονται από τον ίδιο πρόγονο, και ετερόλογη κυτταρική σύνδεση μεταξύ ωοκυττάρου και κοκκωδών κυττάρων. Στην τελευταία οι δίαυλοι των συνάψεων χαρακτηρίζονται από την κοννεξίνη 37, ενώ στην πρώτη από την κοννεξίνη 43.[5]

1.3.3. Το δευτερογενές ωοθυλάκιο

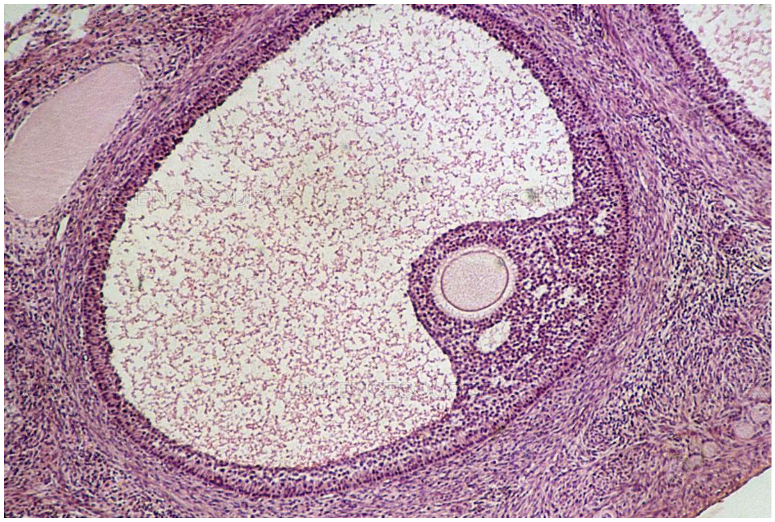
Όταν η στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων φτάσει σε πάχος των 6-12 κυτταρικών σειρών, εμφανίζονται ανάμεσα τους χώροι γεμάτοι με υγρό. Το υγρό αυτό, που είναι πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ, μετά τη συνένωση των μεμονωμένων χώρων σχηματίζει μια μηνοειδή κοιλότητα, το θυλακικό άντρο. Πλέον το ωοθυλάκιο ονομάζεται δευτερογενές ωοθυλάκιο ή ωοθυλάκιο με άντρο. Η αύξηση του ωοκυττάρου σταματά και η διάμετρός του είναι 125 μm. Το ωοθυλάκιο έχει διάμετρο 0,2 mm και σταδιακά με τη συγκέντρωση του υγρού μπορεί να φτάσει έως και τα 10 mm ή και περισσότερο. Το άντρο του ωοθυλακίου διευρύνεται και περιβάλλεται από την κοκκώδη στιβάδα, η οποία έχει ομοιόμορφο πάχος εκτός από την περιοχή του ωοφόρου λοφιδίου, όπου τα θυλακικά κύτταρα περιβάλλουν το ωοκύτταρο. Τα κύτταρα, που περιβάλλουν άμεσα το ωοκύτταρο, παραμένουν γύρω του κατά την ωοθυλακιορρηξία και αποτελούν τον ακτινωτό στέφανο.[5]



Εικόνα 1.10: Εικόνα δευτερογενούς ωοθυλακίου. Παρατηρούνται οι πολλαπλές σειρές των κοκκωδών κυττάρων και το θυλακικό άντρο.

1.3.4. Το ώριμο, τριτογενές ή κυστικό ωοθυλάκιο (de Graaf)

Το γραφιανό ωοθυλάκιο έχει διάμετρο 10 mm ή και περισσότερο, δημιουργεί προβολή στην ελεύθερη επιφάνεια της ωοθήκης και εκτείνεται σε όλο το πάχος του φλοιού αυτής. Καθώς πλησιάζει στο πλήρες μέγεθος του, η μιτωτική δραστηριότητα των κοκκωδών κυττάρων μειώνεται, το άντρο μεγαλώνει και η στιβάδα των κοκκωδών κυττάρων λεπταίνει. Στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων της έσω θήκης, παρατηρούνται λιποσταγονίδια και τα χαρακτηριστικά οργανίδια των κυττάρων, που εκκρίνουν στεροειδείς ορμόνες. Στην έξω θήκη, παρατηρείται ένα αγγειακό δίκτυο, που τροφοδοτεί τα τριχοειδή της έσω θήκης. Γύρω από τα αγγεία, υπάρχουν νευρικές ίνες, ενώ η νεύρωση των λείων μυϊκών κύτταρων της έσω θήκης είναι ανεξάρτητη.[5]



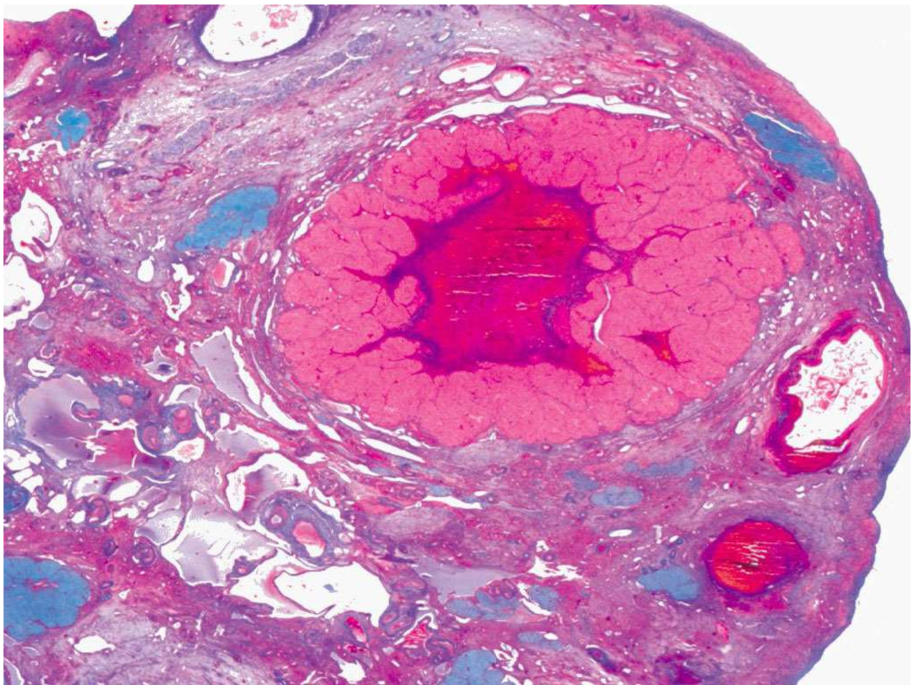
Εικόνα 1.11: Εικόνα γραφιανού ωοθυλακίου. Παρατηρείται το μεγάλο μέγεθος του θυλακικού άντρου σε σχέση με το ωοκύτταρο.

1.3.5. Ωοθυλακιορρηξία

Το πρωτογενές ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση, μόλις ωριμάσει το ωοθυλάκιο, και έτσι σχηματίζονται δύο θυγατρικά κύτταρα άνισου μεγέθους αλλά με 23 διπλά χρωμοσώματα. Το ένα κύτταρο, το δευτερογενές ωοκύτταρο, δέχεται όλο το κυτταρόπλασμα, ενώ το άλλο, που αποτελεί το πρώτο πολικό σωμάτιο, δεν έχει σχεδόν καθόλου κυτταρόπλασμα. Το πολικό σωμάτιο εντοπίζεται μεταξύ της διαφανούς ζώνης και της κυτταρικής μεμβράνης του ωοκυττάρου.

Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται λίγο πριν την ωοθυλακιορρηξία και πριν το ωοκύτταρο εισέλθει στη φάση ηρεμίας. Ο πυρήνας του δευτερογενούς ωοκυττάρου περνά στη δεύτερη φάση ωρίμανσης, χωρίς διπλασιασμό του DNA. Μόλις εμφανιστεί η άτρακτος στο δευτερογενές ωοκύτταρο, γίνεται η ωοθυλακιορρηξία και το ωοκύτταρο απελευθερώνεται από την ωοθήκη. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση θα ολοκληρωθεί μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου. Διαφορετικά το ωοκύτταρο θα εκφυλιστεί εντός 24 ωρών.

Κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας, το ωοθυλάκιο ανοίγει, το ωοκύτταρο ελευθερώνεται και η περιοχή αιμορραγεί και στη συνέχεια οργανώνεται: το υγρό του άντρου αδειάζει και τα τοιχώματα του θυλακίου συμπίπτουν, στην περιοχή εισέρχονται αγγεία της έσω θήκης, ενώ τα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας υπερτρέφονται, υπερπλάσσονται και εμφανίζουν έντονη συγκέντρωση λιπιδίων, καθώς μετατρέπονται σε ωχρινικά. Δημιουργείται κατ' αυτόν τον τρόπο το ωχρό σωμάτιο, το οποίο εκκρίνει προγεστερόνη και οιστρογόνα. Εφόσον δε γίνει γονιμοποίηση, μετά την παρέλευση 12 ημερών, το ωχρό εκφυλίζεται, διαφορετικά μετατρέπεται στο ωχρό σωμάτιο της κύησης.[5]



Εικόνα 1.12: Εικόνα ωχρού σωματίου.

1.3.6. Το επιλεγμένο ωοθυλάκιο

Η επιλογή των ωοθυλακίων, που θα αναπτυχθούν, πραγματοποιείται κατά την 7η-8η ημέρα του εμηνορρυσιακού κύκλου. Το ωοθυλάκιο, που φέρει τους περισσότερους υποδοχείς για την FSH, θα συνεχίσει να αναπτύσσεται παρά την πτώση των επιπέδων της FSH. Το θυλακικό υγρό του κυρίαρχου ωοθυλακίου περιέχει οιστρογόνα σε μεγαλύτερη συγκέντρωση. Πράγματι, η FSH επάγει τη σύνθεση της αρωματάσης, η οποία μετατρέπει τα ανδρογόνα σε οιστραδιόλη, η οποία με τη σειρά της ασκεί ανασταλτική δράση στην έκκριση της FSH. Επομένως η FSH είναι υπεύθυνη για την επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου.[6]

1.4. Η ατρησία του ωοθυλακίου

Σε κάθε ωοθηκικό κύκλο, ένας αριθμός ωοθυλακίων αρχίζει να αναπτύσσεται, ωστόσο μόνο ένα θα αποτελέσει το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, ενώ τα υπόλοιπα εκφυλίζονται και γίνονται ατρητικά. Η ατρησία είναι μια διαδικασία, η οποία αρχίζει ήδη από τον 5^{ο} μήνα της εμβρυϊκής ζωής και συνεχίζεται ακατάπαυστα μέχρι την εμμηνόπαυση. Πρόκειται για μια εκφυλιστική διεργασία, που μπορεί να παρατηρηθεί σε οποιοδήποτε στάδιο ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Στα πρώτα στάδια, αφορά τόσο το ωοκύτταρο όσο και τα θυλακικά κύτταρα, που το περιβάλλουν, ενώ μετά τον σχηματισμό του άντρου, η εκφύλιση αφορά μόνο το ωοκύτταρο. Η διαφανής ζώνη αρχίζει να εμφανίζει πτυχώσεις, νεόπλαστα αγγεία εισέρχονται στην περιοχή, η κοκκώδης στιβάδα διαλύεται και με τη βοήθεια των συστατικών, που περιέχονται στο υγρό του άντρου, τα μονοπύρηνα, που εξέρχονται του αίματος, μετατρέπονται σε φαγοκύτταρα με έντονη δραστηριότητα. Τα κύτταρα της έσω θήκης παραμένουν ως κύτταρα του διάμεσου ωοθηκικού ιστού, διατηρούν τα χαρακτηριστικά στεροειδογόνων κυττάρων και συνεχίζουν να απαντούν στην LH με αυξημένη παραγωγή ανδροστενεδιόνης. Στεροειδογόνα κύτταρα παρατηρούνται και στον διάμεσο ιστό της πύλης (hilus) της ωοθήκης. Τα λειτουργικά και δομικά χαρακτηριστικά τους είναι όμοια με τα κύτταρα Leydig, περιέχουν κρυστάλλους Reinke (υλικό, ανάλογο της λευκωματίνης, το οποίο πιθανώς να εξυπηρετεί σαν εφεδρικό απόθεμα θέσεων για τη σύνδεση των μορίων τεστοστερόνης), συνθέτουν και εκκρίνουν τεστοστερόνη. Κατ’ αυτόν τον τρόπο όγκοι κυττάρων από τον διάμεσο ιστό της πύλης της ωοθήκης, παράγουν υψηλά ποσά ανδρογόνων και προκαλούν αρρενοποίηση.[6]

1.5. Η απόπτωση στην ωοθήκη

1.5.1. Η απόπτωση των ωοκυττάρων στην εμβρυϊκή ωοθήκη

Τα πρωτογενή ωοκύτταρα που δημιουργούνται κατά τη μείωση I, είτε θα ολοκληρώσουν τη διαδικασία της ωρίμανσης κατά την αναπαραγωγική ηλικία, είτε θα εισέλθουν στη διαδικασία της απόπτωσης και θα εκφυλιστούν. Με την είσοδο στη μειωτική διαίρεση αρχίζει και το πρώτο κύμα της απόπτωσης. Η πιο έντονη αποπτωτική διαδικασία παρατηρείται μεταξύ της 14^{ης} και της 28^{ης} εβδομάδας κύησης. Στη συνέχεια, η διαδικασία αυτή επιβραδύνεται μέχρι τη γέννηση, οπότε και μετρούνται 1-2x10^6 ωοκύτταρα. Μέχρι την αναπαραγωγική ηλικία, ένα δεύτερο αποπτωτικό κύμα μειώνει περαιτέρω τα ωοκύτταρα σε 4x10^5, εκ των οποίων μόνο 400 θα ωριμάσουν πλήρως και θα απελευθερωθούν κατά την ωοθυλακιορρηξία.

Η απόπτωση στην εμβρυϊκή ωοθήκη έχει ως στόχο την απομάκρυνση των ωοκυττάρων με ανευπλοειδία, την απομάκρυνση ωοκυττάρων που είναι ελλειμματικά σε αυξητικούς παράγοντες και, τέλος, την καταστροφή ωοκυττάρων που προέρχονται από κοινό πρόγονο.[6,7]

Πολλά ωοκύτταρα εκφυλίζονται κατά το στάδιο της διπλοταινίας, εφόσον δεν περιβληθούν από θυλακικά κύτταρα.[8] Επίσης, η αναστολή της μειωτικής διαίρεσης φαίνεται να εξαρτάται από το θυλακικό περιβάλλον και τα θυλακικά κύτταρα παίζουν έναν σημαντικό ρόλο σε αυτό.[9] Τα γεννητικά κύτταρα, από την αρχική περίοδο ανάπτυξης (7^{η}-12^{η} εβδομάδα) μέχρι και τη γέννηση, διατηρούν την ικανότητά τους να μεταναστεύουν και να μετακινούνται προς το επιφανειακό επιθήλιο, στο οποίο ενσωματώνονται και εν συνεχεία αποβάλλονται.[10] Ανωμαλίες της μειωτικής σύναψης ενδεχομένως να ευθύνονται για την έντονη εκφύλιση. Το 1/3 των ωοκυττάρων παρουσιάζουν, στο στάδιο της παχυταινίας, εκφυλιστικές αλλοιώσεις ή συναπτικά σφάλματα, τα οποία οδηγούν σε κυτταρικό θάνατο, χωρίς ωστόσο να είναι σαφές αν οι αλλοιώσεις αυτές είναι το αποτέλεσμα ή το αίτιο της εκφύλισης.[11] Τέλος, λίγα ωοκύτταρα εκφυλίζονται στο στάδιο της μεσόφασης ή της μίτωσης. Κατά τη θυλακιογένεση, ο αριθμός των ωοκυττάρων που εκφυλίζονται αυξάνεται και αυτό συμβαίνει κυρίως στο στάδιο της διπλοταινίας.[12]

Στα άτομα με χρωμοσωμικές ανωμαλίες (τρισωμία 21 ή 18, σύνδρομο Turner), παρατηρείται ανεπαρκής ανάπτυξη της ωοθήκης. Σε θήλεα 45Χ0, τα ΒΓΚ μεταναστεύουν στη γοναδική ακρολοφία, όπου διαιρούνται με μίτωση. Ωστόσο, η μειωτική πρόφαση δεν ξεκινάει, με αποτέλεσμα την εκφύλιση των ωογονίων. Τα άτομα αυτά, κατά τη γέννηση, έχουν ελάχιστα ή καθόλου ωοθυλάκια.[6]

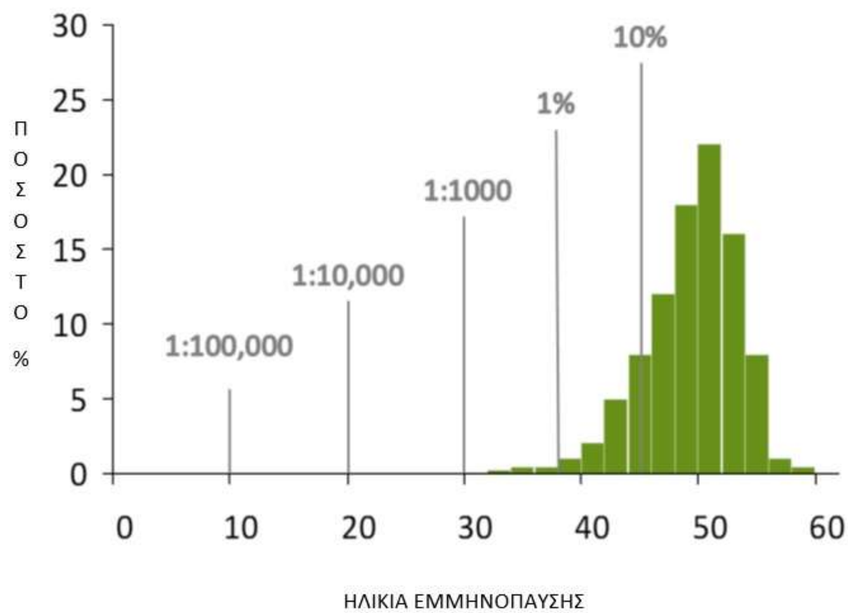
1.5.2. Η απόπτωση των ωοκυττάρων στην ώριμη ωοθήκη

Από τα ωοθυλάκια που περιέχονται σε μια ωοθήκη, μόνο ορισμένα θα ωριμάσουν και θα αποβάλλουν το ωοκύτταρό τους κατά τη διάρκεια της ωοθυλακιορρηξίας. Τα υπόλοιπα θα εκφυλιστούν και θα αποπίψουν μέσω της διαδικασίας του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου κατά την ατρησία. Σε έναν τυπικό ωοθηκικό κύκλο, περίπου 1000 αρχέγονα ωοθυλάκια αρχίζουν να αναπτύσσονται, ωστόσο εξ αυτών μόνο ένα ή δύο θα ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους και τα υπόλοιπα θα εκφυλιστούν και θα μετατραπούν σε ατρητικά. Αυτό συμβαίνει, γιατί τα αυξημένα επίπεδα των οιστρογόνων, από το κυρίαρχο ωοθυλάκιο, καταστέλλουν την παραγωγή της FSH, η οποία δεν επαρκεί για την ανάπτυξη των υπόλοιπων ωοθυλακίων. Πρόκειται και πάλι για μια διαδικασία απόπτωσης, στην οποία τα ωοκύτταρα εκφυλίζονται τελευταία, δεδομένου ότι τα κύτταρα, που βρίσκονται στο ωοφόρο λοφίδιο, εκφυλίζονται μετά από τα τοιχωματικά κοκκώδη κύτταρα.[6]

Η ατρησία και η απόπτωση ρυθμίζεται από την κωδικοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων και συμβαίνει, αφού το ωοθυλάκιο έχει περάσει τα αρχικά στάδια ωρίμανσης. Τα ωοθυλάκια, τα οποία δεν ωριμάζουν, υφίστανται ατρησία, στο στάδιο πριν ή αμέσως μετά την εμφάνιση του άντρου (1-5 mm σε διάμετρο), όταν δηλαδή η ωρίμανσή τους γίνεται εξαρτώμενη από την FSH. Αν σε αυτή τη φάση, χορηγηθεί εξωγενώς FSH, τότε το ωοθυλάκιο θα διαφύγει την ατρησία. Παράλληλα με τις γοναδοτροφίνες, υπάρχουν διάφοροι ορμονικοί αναστολείς της απόπτωσης, οι οποίοι εκδηλώνουν τη δράση τους μέσω του IGF-1 (ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1), του TGF-a (μετατρεπτικό αυξητικό παράγοντα α), του αυξητικού παράγοντα των κερατινοκυττάρων, του αυξητικού παράγοντα των ηπατοκυττάρων, της οιστραδιόλης, της προγεστερόνης, του αγγειοδραστικού εντερικού πεπτιδίου και του ενεργοποιητή της πρωτεϊνικής κινάσης. Κεφαλαιώδους σημασίας είναι και η διατήρηση των χασματικών συνδέσμων καθώς και των διαφόρων αλληλεπιδράσεων του εξωκυττάριου υλικού. Πολλοί ενδοκυττάριοι παράγοντες ρυθμίζουν τον κυτταρικό θάνατο όπως το bcl-2, το bax και η μακριά ισομορφή του bcl-x. Επίσης, το μετατρεπτικό ένζυμο των ιντερλευκινών και τα ανάλογα του και το p53 επάγουν επίσης την απόπτωση. Παρόλα αυτά, δε φαίνεται να είναι η απόπτωση που ρυθμίζει την γήρανση της ωοθήκης, αλλά η στρατολόγηση των ωοθυλακίων.[13]

1.6. Πρόωρη Ωοθηκική Ανεπάρκεια (ΠΩΑ)

Η ΠΩΑ ορίζεται ως η διακοπή της ωοθηκικής λειτουργίας, πριν την ηλικία των 40 ετών, και επηρεάζει περίπου το 1% του γυναικείου πληθυσμού. Προκειμένου να κατανοήσουμε την αιτιολογία της ΠΩΑ, πρέπει πρώτα να αναγνωρίσουμε τους παράγοντες που επηρεάζουν την γήρανση της ωοθήκης, η οποία αποτελεί και ένα από τα μεγαλύτερα αινίγματα της αναπαραγωγικής βιολογίας. Η λειτουργία της ωοθήκης εξαρτάται από τον συνολικό αριθμό των ωοκυττάρων, που περιέχονται στα αρχέγονα ωοθυλάκια. Ο τελικός αριθμός των ωοκυττάρων εξαρτάται από τρεις παράγοντες: α) τον μέγιστο αριθμό που επιτυγχάνεται μέσω μιτώσεων κατά την εμβρυϊκή ηλικία, β) τον χρόνο, κατά τον οποίο εισέρχονται στη μειωτική διαίρεση, εμποδίζοντας την περαιτέρω αύξησή τους και γ) τον ρυθμό ατρησίας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον αριθμό των μιτωτικών διαιρέσεων και τη μετάβαση από τη μίτωση στη μείωση είναι άγνωστοι.



Εικόνα 1.13: Ποσοστό εμφάνισης ΠΩΑ ανά ηλικία.

Ο αριθμός των αρχέγονων ωοθυλακίων στην εφηβεία είναι ανάλογος του τελικού βάρους του κάθε είδους, ενώ σχετίζεται και με τη διάρκεια ζωής του κάθε είδους. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια μειώνονται με την πάροδο της ηλικίας σε όλα τα είδη. Το μέγεθος του ωοθηκικού αποθέματος δεν εξαρτάται από τον αριθμό ωοθυλακιορρηξίας, αλλά από τον αριθμό των ωοκυττάρων που στρατολογούνται ημερησίως, ο οποίος μεταβάλλεται με την ηλικία. Η στρατολόγηση των αρχέγονων ωοθυλακίων συμβαίνει καθ’ όλη τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας και, αρχικά, είναι ανεξάρτητα από την FSH. Ο υποδοχέας της FSH εμφανίζεται αργότερα, στο στάδιο του πρωτογενούς ωοθυλακίου.

Ο αριθμός των ωοθυλακίων, που στρατολογούνται σε κάθε κύκλο, φαίνεται να αυξάνεται όσο μειώνεται ο απόλυτος αριθμός τους, γεγονός που εξηγεί την αύξηση του ρυθμού απόπτωσης με την ηλικία. Αυτή η αλλαγή στον ρυθμό εξάντλησης του ωοθηκικού αποθέματος φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με παράγοντες που επηρεάζουν την εκκίνηση ωρίμανσης, παρά την ατρησία. Από τη γέννηση μέχρι την εφηβεία, το 75% του ωοθηκικού αποθέματος χάνεται.

Η εμμηνόπαυση συμβαίνει όταν απομένουν στην ωοθήκη περίπου 1000 ωοθυλάκια. Μετεμμηνοπαυσιακά, κάποια ωοθυλάκια παραμένουν στην ωοθήκη, ωστόσο δεν ωριμάζουν ποτέ, πιθανώς επειδή τα υψηλά επίπεδα της FSH προκαλούν απευαισθητοποίηση μέσω μείωσης των υποδοχέων της. Ο ρυθμός απώλειας των ωοθυλακίων αυξάνεται με την ηλικία, ιδιαίτερα μετά την ηλικία των 37,5 ετών. Σε αντίθετη περίπτωση, η εμμηνόπαυση θα συνέβαινε στα 71 έτη. Ο λόγος, για τον οποίο συμβαίνει η εμμηνόπαυση, δεν είναι σαφής, αλλά πιθανώς να σχετίζεται με την επιμήκυνση του προσδόκιμου επιβίωσης. Ειδικά σήματα και συγκεκριμένες διεργασίες του κυτταρικού μεταβολισμού φαίνεται να ρυθμίζουν την στρατολόγηση των ωοθυλακίων, η οποία δεν μπορεί να ανακοπεί με καμία παρέμβαση. Η στρατολόγηση των ωοθυλακίων συμβαίνει τόσο κατά την κύηση, όσο και κατά τη λήψη αντισυλληπτικών δισκίων.

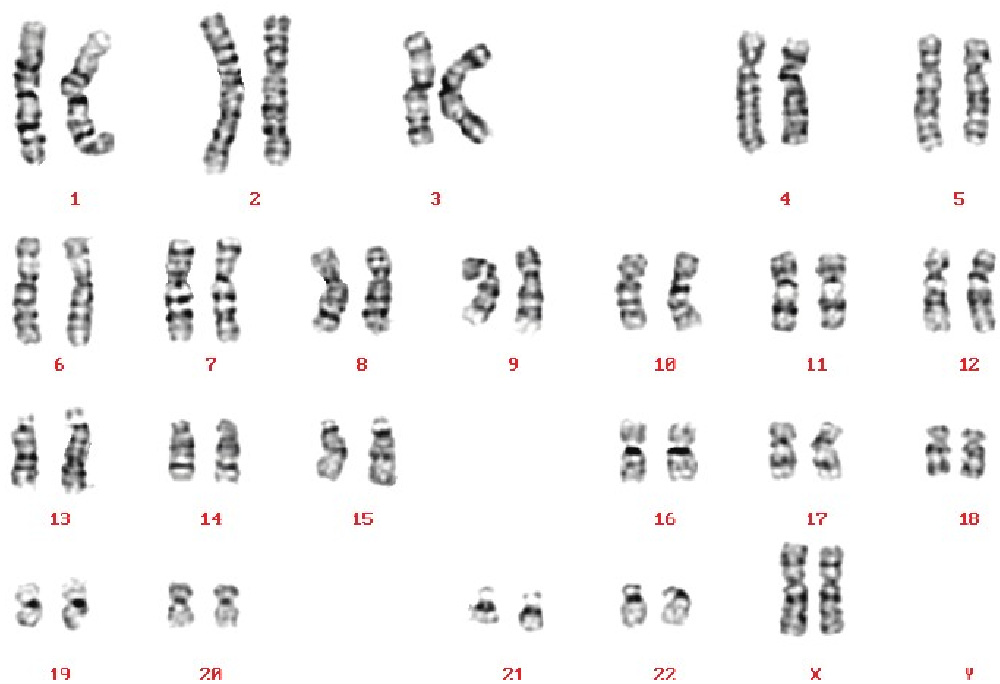
Ορισμένες γυναίκες, πριν την απόλυτη παύση της εμμήνου ρύσης, ίσως να εμφανίσουν ένα διάστημα αραιομηνόρροιας. Η FSH είναι συνήθως αυξημένη και κυμαίνεται ανάμεσα σε 15-20 IU/L. Αυτόματη κύηση είναι δυνατό να παρατηρηθεί σε αυτό διάστημα, ωστόσο η πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας είναι συνήθως ανεπιτυχής, διότι η ωοθήκη είναι ανθεκτική στην εξωγενή χορήγηση γοναδοτροφινών.[13]

Η Ευρωπαϊκή Εταιρεία Ανθρώπινης Αναπαραγωγής και Εμβρυολογίας (European Society of Human Reproduction and Embryology - ESHRE) προτείνει ότι η διάγνωση της ΠΩΑ θα πρέπει να τίθεται όταν μία γυναίκα έχει όλιγο/αμηνόρροια για τουλάχιστον 4 μήνες και η FSH είναι >25 IU/L, σε τουλάχιστον 2 μετρήσεις με διαφορά 4 εβδομάδων η μία από την άλλη.[14]

1.6.1. Αίτια

Χρωμοσωμικά αίτια

Έρευνες έχουν δείξει, ότι 10-12% των γυναικών, που διαγιγνώσκονται με ΠΩΑ, έχουν κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία, η συντριπτική πλειοψηφία των οποίων (94%) αφορούν στο χρωμόσωμα Χ (δομικές ή αριθμητικές ανωμαλίες). Το ποσοστό αυτό είναι μεγαλύτερο στις γυναίκες, οι οποίες εμφανίζουν πρωτοπαθή αμηνόρροια (21%), και μικρότερο σε αυτές με δευτεροπαθή αμηνόρροια (11%).[15,16] Καρυότυπος παρά ταύτα, θα πρέπει να διενεργείται σε όλες τις γυναίκες, ανεξαρτήτως ηλικίας. Επί παρουσίας Υ χρωμοσώματος, ο κίνδυνος νεοπλασίας της γονάδας είναι αυξημένος, επομένως σε αυτές τις γυναίκες συνιστάται γοναδεκτομή.[14]



Εικόνα 1.14: Καρυότυπος φυσιολογικού θήλεος (46XX).

Εύθραυστο Χ

Το σύνδρομο του εύθραυστου Χ είναι μια φυλοσύνδετη πάθηση, που προκαλείται από μετάλλαξη του γονιδίου FMR1. Πρόκειται για ένα γονίδιο με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες CGG. Σε υγιή άτομα ο αριθμός των επαναλήψεων είναι συνήθως <50.[13] Άνδρες με την πλήρη μετάλλαξη του γονιδίου (>200 επαναλήψεις) εμφανίζουν νοητική υστέρηση. Γυναίκες, φορείς της προμετάλλαξης του γονιδίου (55-200 επαναλήψεις), δεν πάσχουν από νοητική υστέρηση, βρίσκονται ωστόσο σε υψηλότερο κίνδυνο (13-26%) για εμφάνιση ΠΩΑ.[17] Γυναίκες, φορείς της πλήρης μετάλλαξης ή με ενδιάμεσο αριθμό επαναλήψεων (45-54), δεν διατρέχουν κίνδυνο για ΠΩΑ.[18] Σε γυναίκες του γενικού πληθυσμού με ΠΩΑ, προμετάλλαξη του FMR1 ανευρίσκεται σε ποσοστό 0,8-7,5%, ενώ η αντίστοιχη συχνότητα σε γυναίκες με θετικό οικογενειακό ιστορικό φτάνει έως και 13%.[17,19,20]

Γυναίκες με ΠΩΑ θα πρέπει να ελέγχονται για την ύπαρξη της συγκεκριμένης μετάλλαξης, τόσο για την ανεύρεση της αιτίας όσο και για τις προεκτάσεις, που μπορεί να έχει μία τέτοια διάγνωση, για την ίδια και την οικογένεια της, καθώς μέλη του συγγενικού περιβάλλοντος της ασθενούς μπορεί να είναι επίσης φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης, και άρα να βρίσκονται σε κίνδυνο να αποκτήσουν απογόνους με το σύνδρομο του εύθραυστου Χ ή απογόνους με κίνδυνο ανάπτυξης ΠΩΑ. Ένας επιπλέον λόγος είναι ο κίνδυνος, που εμφανίζουν οι φορείς της προμετάλλαξης του FMR1, για την ανάπτυξη του συνδρόμου τρόμου/αταξίας σχετιζόμενου με το εύθραυστο Χ (FXTAS). Το σύνδρομο αυτό αφορά σε μια νευρολογική πάθηση όψιμης εμφάνισης, η οποία επηρεάζει κυρίως τους άνδρες και προκαλεί αταξία βάδισης και τρόμο τελικού σκοπού.[21,22]

Αυτοσωματικές γενετικές διαταραχές

Ένας αριθμός γονιδίων έχει προταθεί ως αιτιολογικός παράγοντας εμφάνισης ΠΩΑ. Για κάποια από αυτά τα γονίδια, έχει αναγνωριστεί συγκεκριμένη μετάλλαξη, ενώ τα υπόλοιπα θεωρούνται υποψήφια για πρόκληση ΠΩΑ και χρειάζονται επιπλέον διερεύνηση.[23] Οι περισσότερες μελέτες για την ανεύρεση γονιδίων υπεύθυνων για την εμφάνιση ΠΩΑ περιλαμβάνουν συνήθως γονίδια, που εμπλέκονται στην ωοθυλακιογένεση ή την ωοθηκική λειτουργία γενικότερα. Γονίδια με επιβεβαιωμένες μεταλλάξεις, που οδηγούν σε ΠΩΑ, περιλαμβάνουν γονίδια σχετιζόμενα με τη δημιουργία των ωοθυλακίων (NOBOX, NR5A1, FIGLA και FOXL2), γονίδια αυξητικών παραγόντων εμπλεκόμενα στην ωοθυλακιογένεση (BMP15, GDF9 και ανασταλτίνη Α), γονίδια σχετιζόμενα με τη στεροειδογένεση (FSH, FSH-R, LH και LH-R) και γονίδια, των οποίων οι μεταλλάξεις εμφανίζονται σε συγκεκριμένα σύνδρομα τα οποία σχετίζονται με ΠΩΑ (BLM, WRN και RTS).[24–26]

Πρόσφατη μελέτη για την ανεύρεση πολυμορφισμών (SNPs) σχετιζόμενων με ΠΩΑ ανέδειξε 4 πολυμορφισμούς, που εμφανίζονται με στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη συχνότητα σε γυναίκες με ΠΩΑ και αφορούν τα γονίδια CRHR1, SLC25A13, MCM6 και MB21D1/C6ORF150.[27] Επίσης, οι μελέτες έχουν στραφεί και στην ανεύρεση τμημάτων DNA, που εμφανίζονται σε πολλά αντίγραφα (CNVs). Μέχρι στιγμής, έχουν ανευρεθεί περισσότερα από 70 τέτοια CNVs, ωστόσο επιπλέον έρευνα απαιτείται στο κομμάτι αυτό.

Όπως είναι σαφές, πολλές μεταλλάξεις έχουν ενοχοποιηθεί στην πρόκληση ΠΩΑ, ωστόσο τα μέχρι τώρα δεδομένα δεν υποστηρίζουν τον έλεγχο ρουτίνας των γυναικών με πρόωρη εμμηνόπαυση για την ύπαρξη αυτών των μεταλλάξεων, παρά μόνο αν υπάρχουν χαρακτηριστικά ατομικά ή οικογενειακά, που να υποδεικνύουν την ύπαρξη συγκεκριμένης μετάλλαξης.[14]

Αυτοάνοσα αίτια

Οι αυτοάνοσες διαταραχές είναι πιο συχνές σε γυναίκες με ΠΩΑ από ότι στον γενικό πληθυσμό και το αντίστροφο. Κατά πόσο η ΠΩΑ προκαλείται από κάποια αυτοάνοση νόσο ή είναι τυχαία η συσχέτιση μεταξύ τους δεν είναι σαφές.[14] Η πιο σημαντική κλινική συσχέτιση είναι αυτή με τη νόσο Addison στα πλαίσια του αυτοάνοσου πολυαδενικού συνδρόμου (APS). Η νόσος Addison και το APS τύπου 2 είναι γνωστό ότι προδιαθέτουν στην εμφάνιση ΠΩΑ, και για αυτό οι γυναίκες αυτές θα πρέπει να ελέγχονται και να λαμβάνουν συμβουλευτική για τη συγκεκριμένη πάθηση.[28]

Η ΠΩΑ πιθανώς να σχετίζεται και με άλλες τοπικές ή και γενικευμένες αυτοάνοσες διαταραχές όπως παθήσεις του θυρεοειδούς, υποπαραθυρεοειδισμό, υποφυσίτιδα, σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (ΣΔ1), συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (ΣΕΛ), σύνδρομο Sjogren, ρευματοειδή αρθρίτιδα (ΡΑ), λεύκη, γυροειδή αλωπεκία, κοιλιοκάκη, ιδιοπαθή φλεγμονώδη νόσο του εντέρου (ΙΦΝΕ), πρωτοπαθή χολική κίρρωση, σπειραματονεφρίτιδα, σκλήρυνση κατά πλάκα (ΣΚΠ) και μυασθένεια Gravis.[14]

Επί του παρόντος, μόνο η ανίχνευση αυτοαντισωμάτων εναντίον στεροειδογενετικών ενζύμων (SCA) μπορεί ασφαλώς να διαγνώσει την ύπαρξη ΠΩΑ, οφειλόμενη σε αυτοάνοσα αίτια.[14] Τα αντισώματα αυτά κατευθύνονται εναντίον αυτοαντιγόνων που εκφράζονται στον φλοιό των επινεφριδίων, την ωοθήκη, τον πλακούντα και τον όρχι. Μείζονα αυτοαντιγόνα αποτελούν το ένζυμο 17^{α}-δροξυλάση και το ένζυμο P450scc (side-chain cleavage).[29,30] Από ανοσοϊστοχημικές μεθόδους σε ωοθήκες γυναικών με αυτοάνοση ΠΩΑ, έχει φανεί ότι τα SCA ανευρίσκονται μόνο στα κύτταρα της θήκης του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου και όχι στα πρωτογενή ωοθυλάκια ή στα κοκκώδη κύτταρα των δευτερογενών ή τριτογενών ωοθυλακίων. SCA ανευρίσκονται σε 4-5% γυναικών με ΠΩΑ, σε 8% των γυναικών με αυτοάνοση νόσο Addison, 20% των γυναικών με επινεφριδιακή ανεπάρκεια ή APS-2 και σε 40-60% των γυναικών APS-1.

Ο δείκτης με τη μεγαλύτερη ευαισθησία για την ανίχνευση αυτοάνοσης ΠΩΑ είναι τα αντισώματα εναντίον του φλοιού των επινεφριδίων (ACA) και συγκεκριμένα τα αντισώματα εναντίον της 21-υδροξυλάσης (21OH-Ab). Επί παρουσίας των 21OH-Ab, SCA ή αντισώματα κατά της 17α-υδροξυλάσης (17α-OH-Ab) ή κατά του P450scc (P450scc-Ab) ανευρίσκονται σε κρυοστατικές τομές ωοθήκης σε ποσοστό 90%. Επί απουσίας των 21OH-Ab, το ποσοστό αυτό πέφτει σε λιγότερο από 0,5%.

Ο έλεγχος για 21OH-Ab κρίνεται σκόπιμος σε όλες τις γυναίκες με ΠΩΑ άγνωστης αιτιολογίας ή όταν υπάρχουν υπόνοιες για κάποια αυτοάνοση διαταραχή. Ασθενείς με ΠΩΑ και θετικά 21OH-Ab θα πρέπει να παραπέμπονται σε ενδοκρινολόγο για έλεγχο της επινεφριδιακής αιτιολογίας και αποκλεισμό της νόσου Addison.[14]

Θυρεοειδής

Επί απουσίας αυτοαντισωμάτων κατά των επινεφριδίων, η ΠΩΑ σχετίζεται πιο συχνά με αυτοάνοση διαταραχή του θυρεοειδούς (14-27%).[31,32] Ο Welt και συν. επεσήμανε τη συχνή συσχέτιση ανάμεσα στη νόσο του θυρεοειδούς και την ΠΩΑ και πρότεινε ότι θα πρέπει να γίνεται έλεγχος για αντισώματα κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO-Ab) σε όλες τις γυναίκες με ΠΩΑ. Επίσης, πρότεινε τη μέτρηση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) επί θετικών αντισωμάτων ετησίως και ανά 5 έτη επί αρνητικών.[33] Άλλη έρευνα επεσήμανε την πιο συχνή παρουσία TPO-Ab και θυρεοειδικής δυσλειτουργίας σε γυναίκες με ΠΩΑ από ότι στον γενικό πληθυσμό.[34]

Παρά το γεγονός, ότι ο υποθυρεοειδισμός δεν είναι απειλητικός για τη ζωή, μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις στην ποιότητα ζωής αλλά και αρνητικές επιπτώσεις σε μια μελλοντική κύηση. Επί του παρόντος η ανίχνευση TPO-Ab θεωρείται ο πιο ευαίσθητος δείκτης για τη διάγνωση αυτοάνοσης θυρεοειδίτιδας. Συνεπώς, σε όλες οι γυναίκες με ΠΩΑ άγνωστης αιτιολογίας συνιστάται ο έλεγχος για την παρουσία θετικών TPO-Ab. Εφόσον είναι θετικά, οι ασθενείς αυτοί θα πρέπει να υποβάλλονται σε ετήσια μέτρηση TSH.[14]

Σακχαρώδης Διαβήτης (ΣΔ)

Η μέτρηση γλυκόζης νηστείας, για την ανίχνευση σακχαρώδη διαβήτη, συστήνεται σε ασθενείς με ΠΩΑ, ενώ επί ενδείξεων θα πρέπει να διενεργείται και δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, δεδομένων των πολλών και καταστρεπτικών συνεπειών του ΣΔ.[32] Ωστόσο, εφόσον μόνο ο ΣΔ1 σχετίζεται με την ΠΩΑ και εφόσον αυτή η πάθηση συνήθως διαγιγνώσκεται στην παιδική ηλικία ή κατά την εφηβεία, πολλά χρόνια πριν την εμφάνιση ΠΩΑ, δεν υπάρχει ουσιαστική ένδειξη για συστηματικό έλεγχο αυτών των γυναικών για ΣΔ.[14]

Λοιμώδη αίτια

Κάποιες μελέτες αναφέρουν πιθανή συσχέτιση ΠΩΑ με ορισμένες ιογενείς λοιμώξεις, ωστόσο μόνο η παρωτίτιδα έχει επιβεβαιωθεί, δικαιολογώντας 3-7% των περιπτώσεων.[35] Επομένως, δε συνιστάται έλεγχος αυτών των γυναικών για λοιμώδεις παράγοντες.[14]

Ιατρογενή αίτια

Η ακτινοβολία, για τη θεραπεία κακοήθειας, σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΩΑ και η συσχέτιση εξαρτάται από το πεδίο ακτινοβόλησης, τη δόση και την ηλικία κατά τη διάρκεια της θεραπείας. Αντιστοίχως, η χημειοθεραπεία, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται αλκυλιωτικοί παράγοντες, είναι γοναδοτοξική και οδηγεί σε ΠΩΑ, ενώ η συσχέτιση με την εμφάνιση ΠΩΑ εξαρτάται τόσο από τη δόση όσο και από την ηλικία της ασθενούς.

Τέλος, η γοναδεκτομή και χειρουργεία για τη θεραπεία ενδομητριώματος ή ενδομητρίωσης σχετίζονται με την εμφάνιση ΠΩΑ λόγω μείωσης του ωοθηκικού αποθέματος.[14]

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

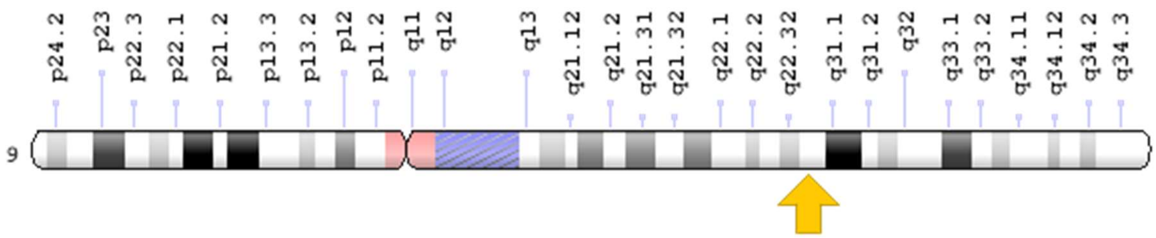
Ενώ δεν υπάρχει αιτιολογική συσχέτιση με το κάπνισμα και την εμφάνιση ΠΩΑ, ωστόσο οι γυναίκες που καπνίζουν φαίνεται να μπαίνουν στην εμμηνόπαυση πιο νωρίς σε σχέση με τις μη καπνίστριες. Για το λόγο αυτό, οι γυναίκες με προδιαθεσικούς παράγοντες για ΠΩΑ, θα πρέπει να παροτρύνονται να διακόψουν το κάπνισμα.[14]

Ιδιοπαθής ΠΩΑ

Παρά το γεγονός, ότι πολλοί αιτιολογικοί παράγοντες έχουν περιγραφεί για την εμφάνιση ΠΩΑ, σε έναν μεγάλο αριθμό γυναικών δεν ανευρίσκεται συγκεκριμένο αίτιο παρά τον ενδελεχή έλεγχο. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τίθεται η διάγνωση της ιδιοπαθούς ΠΩΑ. Το ακριβές ποσοστό αυτών των γυναικών δεν είναι γνωστό και διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό και τη δυνατότητα διενέργειας εξειδικευμένων ελέγχων, ενδεχομένως όμως να φτάνει και το 90%.[14] Στα περιστατικά ιδιοπαθούς ΠΩΑ, το αίτιο πιθανώς να είναι άγνωστες μέχρι στιγμής μεταλλάξεις, ιογενείς ή περιβαλλοντικοί παράγοντες.

1.7. Το γονίδιο FOXE1

Το γονίδιο FOXE1 (forkhead box E1) εδράζεται στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9 στη θέση 22 (9q22). Αποτελείται από ένα και μοναδικό εξόνιο, το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 367 αμινοξέων και μοριακού βάρους 42-kDa.[36] Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος ανήκει στην οικογένεια “forkhead”. Διαθέτει μια καλά διατηρημένη περιοχή 110 αμινοξέων, την περιοχή “forkhead”, της οποίας η δομή είναι γνωστή ως μοτίβο διπλής έλικας.[37] Επίσης, το γονίδιο διαθέτει και μία περιοχή με πολλαπλές επαναλήψεις μιας τρινουκλεοτιδικής αλληλουχίας, που κωδικοποιεί ένα κομμάτι πολύ-Αλαλανίνης (πολύ-Ala), χαρακτηριστικό που έχει παρατηρηθεί και σε άλλες πρωτεΐνες που λειτουργούν ως μεταγραφικοί καταστολείς.[38,39] Η πολύ-Ala περιοχή μπορεί να περιέχει από 11 έως 19 κατάλοιπα αλανίνης, ωστόσο τα αλλήλια με 14 και 16 κατάλοιπα είναι τα πιο συχνά ανευρισκόμενα. Πιθανώς, αλλαγές στον αριθμό των καταλοίπων αλανίνης να οδηγούν σε διαφορές στη λειτουργικότητα του FOXE1 ως μεταγραφικού παράγοντα.[40] Τέλος, διαθέτει δύο όμοιες αλληλουχίες (RRRKR)[1] και στα δύο άκρα της περιοχής "forkhead". Οι αλληλουχίες αυτές είναι σημαντικές για τη δράση της πρωτεΐνης εντός του πυρήνα.[38]



Εικόνα 1.15: Η θέση του FOXE1 στο μακρύ σκέλος του χρωμοσώματος 9.

Η έκφραση του mRNA του FOXE1 ανιχνεύεται διάφορους ιστούς, κυρίως στον θυρεοειδή. Η έκφραση του βρίσκεται υπό τον αυστηρό έλεγχο της TSH και της ινσουλίνης μέσω του υποδοχέα του IGF-1.[41] Μελέτες σε επίμυες έδειξε ότι εκφράζεται παροδικά στο αναπτυσσόμενο έμβρυο και συγκεκριμένα στο ενδόδερμα του προσθίου εντέρου, στην αρχική στοματική κοιλότητα, στις καταβολές του θυρεοειδούς και στον θύλακο του Rathke.[37] Μελέτες ανοσοϊστοχημείας σε ανθρώπινους ιστούς έδειξε, ότι η πρωτεΐνη εκφράζεται σε διάφορους όργανα και πιο συγκεκριμένα στον θύμο, στο επιθήλιο του στοματοφάρυγγα, του λάρυγγα και του οισοφάγου, στην επιδερμίδα, στους θυλάκους των τριχών, στον προεφηβικό όρχι και σε όλα τα στάδια ανάπτυξής του θυροειδούς.[39,42,43] Διαφορές στη μεθυλίωση του εκκινητή του FOXE1 ενδεχομένως να εξηγούν τον διαφορετικό βαθμό έκφρασης του παράγοντα στους διάφορους ιστούς.[44]

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του θυρεοειδούς, φαίνεται ότι λειτουργεί σαν κατασταλτικός παράγοντας έκφρασης των γονιδίων της θυρεοσφαιρίνης (Tg) και της TPO, με μεγάλη

[1] R=αργινίνη, K=λυσίνη

ειδικότητα, και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση του θυρεοειδούς.[37,45] Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι κατά την ορμονική διέγερση του θυρεοειδούς, με στόχο την κυτταρική διαφοροποίηση, ο FOXE1 συνδέεται στον εκκινητή του γονιδίου της TPO, πριν ακόμα από την ενεργοποίηση του γονιδίου. Αυτή η σύνδεση έχει ως αποτέλεσμα το ξεδίπλωμα της χρωματίνης στην περιοχή αυτή.[46] Στον ενήλικο οργανισμό, ο FOXE1 φαίνεται να λειτουργεί ως ενισχυτικός μεταγραφικός παράγοντας για την Tg και την TPO.[37] Η TSH διεγείρει την έκφραση του FOXE1, ο οποίος στη συνέχεια διεγείρει την έκφραση της TPO. Το NO (οξείδιο του αζώτου) αναστέλλει την από την TSH επαγόμενη έκφραση του FOXE1 και κατά συνέπεια της TPO.[47] Αναλόγως, η έκφραση του Foxe1 σε επίμυες, ως απάντηση στην TSH, καταστέλλεται από τον TGF-β.[48]

Ο FOXE1 ενισχύει την έκφραση διαφόρων γονιδίων, όπως τα RBP7, PIGPC1, TPM1, LTBP1, CPE, FLJ23091, SmLIM, GALNT1, ITGB1, ANXA5, TMSB10, SNCA, RNF29, RNASE6PL, COL1A1, COL11A1 και T1560.[49] Δύο ακόμα στόχοι του FOXE1 είναι και τα γονίδια MSX1 και TGF-β3, των οποίων την έκφραση ενισχύει. Τα δύο αυτά γονίδια παίζουν σημαντικούς ρόλους στην ανάπτυξη διαφόρων δομών του κρανίου και του προσώπου.[50]

Στον άνθρωπο, μεταλλάξεις του γονιδίου FOXE1 έχουν ως αποτέλεσμα το σύνδρομο Bamforth-Lazarus, μια αυτοσωματική υπολειπόμενη πάθηση, η οποία χαρακτηρίζεται από συγγενή υποθυρεοειδισμό, δυσγενεσία του θυρεοειδούς, λυκόστομα, ανώμαλη ανάπτυξη των τριχών, δισχιδή επιγλωττίδα, υπερτελορισμό και ατρησία της χοάνης.[50,51] Μεταλλάξεις στην περιοχή forkhead φαίνεται να οδηγούν στην εκδήλωση του συνδρόμου, ενώ αλλαγές το μήκος της πολύ-Ala περιοχής πιθανώς να οδηγούν σε προδιάθεση για δυσγενεσία του θυρεοειδούς.[39,52] Έχει προταθεί, ότι το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα πιθανώς να δρα προστατευτικά.[40,53] Ωστόσο, άλλη έρευνα, έδειξε ότι τα αλλήλια με ≥16 κατάλοιπα ήταν πιο συχνά σε ασθενείς με οικογενή ημιαγενεσία του θυρεοειδούς.[54] Επίσης, γενετικές παραλλαγές του FOXE1 έχουν συσχετιστεί με περιπτώσεις χειλεοσχιστίας, λυκοστόματος και λυκοστόματος/χειλεοσχιστίας.[55–58] Τέλος, ομόζυγη μετάλλαξη στον παράγοντα MYF-5, ο οποίος συνδέεται στον υποκινητή του FOXE1, οδηγεί σε μείωση της έκφρασης του στο επιθήλιο της υπερώας και οδηγεί σε μη συνδρομικό λυκόστομα.[36]

Τα επίπεδα έκφρασης του FOXE1 είναι χαμηλά στον υγιή θυρεοειδικό ιστό, αλλά μπορεί να αυξηθούν σε διάφορες παθήσεις του θυρεοειδούς, όπως στην πολυοζώδη βρογχοκήλη, τη νόσο του Graves, το θυλακιώδες αδένωμα, τον θυλακιώδη και τον θηλώδη καρκίνο.[59,60] Παρόλα αυτά, ενώ ο η έκφραση του FOXE1 είναι αυξημένη στα κύτταρα του θηλώδους καρκίνου, φαίνεται ότι ταυτόχρονα καταστέλλει την έκφραση του platelet-derived growth factor A (PDGFA), αποτρέποντας έτσι τον πολλαπλασιασμό και τη διηθητικότητα του όγκου.[61] Αντιθέτως, ο FOXE1 έχει βρεθεί ότι αλληλοεπιδρά άμεσα με τον εκκινητή του Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1), οδηγώντας σε αυξημένη διεισδυτικότητα και μετανάστευση του όγκου.[62] Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του FOXE1 συσχετίζονται θετικά με το επίπεδο διαφοροποίησης του όγκου, με τον αναπλαστικό καρκίνο του θυρεοειδή να εκδηλώνει τη μικρότερη έως και μηδενική έκφραση του παράγοντα.[62–64]

Έχει βρεθεί, ότι συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί του γονιδίου οδηγούν σε αυξημένη επιρρέπεια για καρκίνο του θυρεοειδή, πιθανώς μέσω αλλαγών στο επίπεδο έκφρασης ή/και λειουργικότητας.[65–69] Επίσης, ο αριθμός των καταλοίπων αλανίνης έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με την εμφάνιση θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς. Πιο συγκεκριμένα, το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα φαίνεται να σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση της πάθησης σε σχέση με το αλλήλιο με τα 14 κατάλοιπα, πιθανώς λόγω λειτουργικών αλλαγών στη δράση του παράγοντα.[66] Τέλος, έχει φανεί ότι τα αλλήλια με ≥16 κατάλοιπα σχετίζονται με μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου.[70] Φαίνεται από τα παραπάνω ότι ο ρόλος του FOXE1 στην καρκινογένεση του θυρεοειδούς είναι ασαφής, ωστόσο έχει βρεθεί ότι ο FOXE1 αλληλοεπιδρά με τον παράγοντα ELK1 (E26 transformation-specific like protein 1) και από κοινού ρυθμίζουν την έκφραση της TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), ενός ογκογονιδίου. Αυτός ενδεχομένως να είναι ένας από τους μηχανισμούς, με τους οποίους τα διαφορετικά αλλήλια του FOXE1 οδηγούν σε αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο του θυρεοειδή.[71]

Όμως το γονίδιο FOXE1 έχει συσχετιστεί και με άλλες κακοήθειες. Στον καρκίνο του παχέος εντέρου, η αυξημένη έκφραση του FOXE1 έχει βρεθεί ότι συσχετίζεται με καλύτερη πρόγνωση, πιθανώς μέσω καταστολής της εξοκινάσης 2.[72,73] Τέλος, ο FOXE1 αποτελεί στόχο της Zinc finger protein GLI2, η οποία ενισχύει την έκφραση του. Η GLI2 υπερεκφράζεται στον βασικοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος και το ίδιο συμβαίνει και με τον FOXE1.[74] Επίσης, έχει βρεθεί ότι το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα είναι πιο συχνό στο ακανθοκυτταρικό καρκίνο του δέρματος.[75] Επιπλέον, ο ίδιος τύπος καρκίνου σχετίζεται με υπερμεθυλίωση και μειωμένη έκφραση του FOXE1.[76] Στον ηπατοκυτταρικό καρκίνο, η υπερέκφραση του microRNA-422a σχετίζεται με μειωμένη έκφραση του FOXE1 και πιο αργή ανάπτυξη του όγκου. Πιθανώς, ο FOXE1 να ρυθμίζει έμμεσα την έκφραση του miR-422a.[77] Υπερμεθυλίωση του FOXE1 έχει παρατηρηθεί και σε καρκίνο του παγκρέατος.[78] Τέλος, ο FOXE1 επηρεάζει τη δράση του υποδοχέα των οιστρογόνων-α (Era) μεταβάλλοντας την ικανότητά του να συνδεθεί στο DNA. Τοιουτοτρόπως, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ορμονοεξαρτώμενων όγκων του μαστού.[79]

Όσον αφορά την ΠΩΑ, ο Watkins et al. ήταν ο πρώτος που μελέτησε τον αριθμό των καταλοίπων της αλανίνης σε ασθενείς με πρόωρη εμμηνόπαυση. Από τη μελέτη αυτή, φάνηκε ότι το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα είναι πιο συχνό σε ασθενείς με ΠΩΑ, ενώ το αλλήλιο με τα 14 κατάλοιπα ήταν λιγότερο συχνό στον ίδιο πληθυσμό. Για τα υπόλοιπα αλλήλια δε βρέθηκαν συσχετίσεις, πιθανώς λόγω της σπανιότητάς τους.[80] Σε μεταγενέστερη μελέτη το εύρημα αυτό επιβεβαιώθηκε, δείχνοντας ότι το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα ενδεχομένως να οδηγεί σε αυξημένη ευαισθησία για εμφάνιση ΠΩΑ.[81] Τέλος σε μικρότερο πληθυσμό ασθενών με ΠΩΑ, μελετήθηκαν οι ρόλοι των FOXE1 και BMP15 στην εμφάνιση της πάθησης. Βρέθηκε ότι τα αλλήλια του FOXE1 με 8, 12, 15 και 17 κατάλοιπα, συνολικά, ανιχνεύονταν με μεγαλύτερη συχνότητα σε ασθενείς με ΠΩΑ, ενώ σε 4 ασθενείς ανιχνεύθηκαν και πολυμορφισμοί του γονιδίου BMP15. Αντίθετα, στην ομάδα ελέγχου δεν ανιχνεύθηκαν πολυμορφισμοί του BMP15, συνιστώντας πιθανή διγονιδιακή κληρονομικότητα.[82]

1.8. Πολύ-Ala περιοχή

Μία από της παθήσεις που οδηγούν σε ΠΩΑ είναι η βλεφαροφίμωση (BPES). Η πάθηση αυτή οφείλεται σε μετάλλαξη του γονιδίου FOXL2, το οποίο επίσης κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα που ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων “forkhead” και διαδραματίζει πολλαπλούς ρόλους στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό. Αντιστοίχως με το FOXE1, διαθέτει μια καλά διατηρημένη περιοχή “forkhead” καθώς και μια περιοχή με επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα αλανίνης. Το πολύ-Ala κομμάτι περιέχει 14 κατάλοιπα αλανίνης και είναι καλά διατηρημένο ανάμεσα σε διάφορα είδη θηλαστικών.[83] Αύξηση των καταλοίπων αλανίνης ευθύνεται για το 25-30% των μεταλλάξεων του FOXL2 που οδηγούν στην εμφάνιση BPES τύπου II.[84] Τέτοιου είδους μεταλλάξεις έχουν ανιχνευθεί σε γυναίκες με σποραδική ΠΩΑ.[80,85]

Επαναλαμβανόμενα κατάλοιπα αλανίνης έχουν βρεθεί σε διάφορα γονίδια, ενώ ο αριθμός των καταλοίπων τείνει να είναι σταθερός. Ενώ ο ρόλος τους δεν είναι σαφής, πιθανώς να παρεμβάλλονται ανάμεσα σε λειτουργικά τμήματα του γονιδίου.[86] Αύξηση του μήκους της πολύ-Ala περιοχής έχει παρατηρηθεί σε διάφορα γονίδια, οδηγώντας σε αντίστοιχες παθήσεις. Τέτοια γονίδια-παθήσεις είναι τα ακόλουθα: ARX -φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση, HOXA13-σύνδρομο χεριών-ποδιών-γεννητικών οργάνων, HOXD13-συμπολυδακτυλία, PABP2-οφθαλμοφαρυγγική μυϊκή δυστροφία, PHOX2B-συγγενές σύνδρομο κεντρικού υποαερισμού, RUNX2-κλειδοκρανιακή δυσπλασία, SOX3-φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση με ανεπάρκεια αυξητικής ορμόνης και ZIC2-ολοπροσεγκεφαλία. Λιγότερα στοιχεία υπάρχουν για τις περιπτώσεις στις οποίες το πολύ-Ala κομμάτι βραχύνεται. Παραδείγματα τέτοιων γονιδίων αποτελούν τα RUNX2, ZNF358 και TGFβR1.[80]

Βάσει αυτών των δεδομένων, της συσχέτισης των καταλοίπων αλανίνης του γονιδίου FOXL2 και της εμφάνισης ΠΩΑ, και τις δύο μελέτες που συσχετίζουν τον αριθμό καταλοίπων αλανίνης του γονιδίου FOXE1 με την εμφάνιση ΠΩΑ, αποφασίσαμε να μελετήσουμε το συγκεκριμένο γονίδιο στον ελληνικό πληθυσμό.

```
 721 gagcgcggcg agacggcagc aggggccggg gtcccagggg aggccacggg ccgcggggcg
 781 ggcgggcggc gccgcaagcg ccccctgcag cgcgggaagc cgccctacag ctacatcgcg
 841 ctcatcgcca tggccatcgc gcacgcgccc gagcgccgcc tcacgctggg cggcatctac
 901 aagttcatca ccgagcgctt ccccttctac cgcgacaacc ccaaaaagtg gcagaacagc
 961 atccgccaca acctcacact caacgactgc ttcctcaaga tcccgcgcga ggccggccgc
1021 ccgggtaagg gcaactactg ggcgcttgac cccaacgcgg aggacatgtt cgagagcggc
1081 agcttcctgc gccgccgcaa gcgcttcaag cgctcggacc tctccaccta cccggcttac
1141 atgcacgacg cggcggctgc cgcagccgcc gccgccgccg ccgccgccgc cgccgccatc
1201 ttcccaggcg cggtgcccgc cgcgcgcccc ccctacccgg gcgccgtcta tgcaggctac
1261 gcgccgccgt cgctggccgc gccgcctcca gtctactacc ccgcggcgtc gcccggccct
1321 tgccgcgtct tcggcctggt tcctgagcgg ccgctcagcc cagagctggg gcccgcaccg
1381 tcggggcccg gcggctcttg cgcctttgcc tccgccggcg cccccgctac caccaccggc
1441 taccagcccg caggctgcac cggggcccgg ccggccaacc cctccgccta tgcggctgcc
1501 tacgcgggcc ccgacggcgc gtacccgcag ggcgccggca gtgcgatctt tgccgctgct
```

Εικόνα 1.16: Τυπική νουκλεοτιδική αλληλουχία του τμήματος πολλαπλών καταλοίπων αλανίνης. Εδώ απεικονίζεται ένα αλλήλιο με 16 κατάλοιπα.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του γονιδίου FOXE1 στην εμφάνιση ΠΩΑ στον ελληνικό πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, η έρευνα αυτή εστίασε στον αριθμό των καταλοίπων αλανίνης του γονιδίου FOXE1 και στο κατά πόσο αυτός σχετίζεται με την εμφάνιση ΠΩΑ. Στόχος ήταν η μελέτη του συγκεκριμένου γονιδίου τόσο σε γυναίκες με ΠΩΑ όσο και σε υγιείς γυναίκες και η σύγκριση των αποτελεσμάτων με στόχο να διαπιστώσουμε κατά πόσο υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1. Συλλογή δειγμάτων

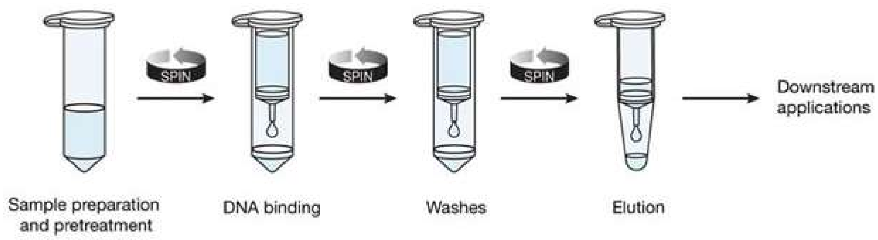
Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης, συλλέχθηκαν δείγματα περιφερικού αίματος από γυναίκες με ΠΩΑ και υγιείς γυναίκες. Οι ασθενείς αντιπροσωπεύουν γυναίκες με ΠΩΑ, χωρίς γνωστό αιτιολογικό παράγοντα, οι οποίες προσήλθαν στο Τμήμα Κλιμακτηρίου-Εμμηνόπαυσης της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, στο νοσοκομείο «Αλεξάνδρα». Στις γυναίκες αυτές είχε διενεργηθεί προηγουμένως ορμονικός έλεγχος, καρυότυπος, έλεγχος για παρουσία θετικών 21OH-Ab, καθώς και έλεγχος για την παρουσία προμετάλλαξης του γονιδίου FMR1. Η ομάδα ελέγχου αποτελείται από γυναίκες του γενικού πληθυσμού, οι οποίες είχαν τεκνοποιήσει τουλάχιστον μία φορά στο παρελθόν και δεν είχαν γνωστά προβλήματα υγείας. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής Κλινικής του ΕΚΠΑ.

3.2. Απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από ολικό αίμα (purification of genomic DNA from whole blood)

Το εμπορικώς διαθέσιμο σκεύασμα PureLink Genomic DNA Kits for purification of genomic DNA της invitrogen by life technologies επιτρέπει την γρήγορη και αποτελεσματική απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από κύτταρα και ιστούς θηλαστικών, φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα αίματος, βαμβακοφόρους στυλεούς και ιστούς μονιμοποιημένους με φορμαλίνη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (formalin-fixed paraffin-embedded tissues). Το απομονωμένο DNA έχει μέγεθος 20-50 kb και είναι κατάλληλο για να ενισχυθεί με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR). Το περιφερικό αίμα λαμβάνεται με απλή αιμοληψία περιφερικού αίματος (2-3 ml) και τοποθετείται σε σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό, συγκεκριμένα ηπαρίνη ή EDTA, για να αποφευχθεί η πήξη (φιαλίδιο γενικής αίματος). Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τη λύση των κυττάρων (cell lysis), την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών (protein precipitation) και την κατακρήμνιση του DNA (DNA precipitation).

Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης (Eppendorf tube του 1.5 ml) προστίθενται 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου περιφερικού αίματος μαζί με 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer, 20 μl πρωτεϊνάσης K και 20 μl RNάσης A. Το Genomic Lysis/ Binding Buffer προκαλεί την πλήρη διάρρηξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης, των ενδοκυτταρικών μεμβρανών και των οργανιδίων προκειμένου να απελευθερωθεί στο διάλυμα το DNA που ανευρίσκεται στον πυρήνα των λευκών αιμοσφαιρίων του περιφερικού αίματος. Η πρωτεΐνάση K αποικοδομεί τις πρωτεΐνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες που μπορούν να βλάψουν τα κεκαθαρμένα μόρια του DNA. Η ριβονουκλεάση A (RNάση A) είναι μια ενδοριβονουκλεάση που αποικοδομεί το μονόκλωνο RNA (single-stranded RNA), έχει συγκέντρωση 20 mg RNase A/mL σε 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA και προέρχεται από πάγκρεας βοός.

Το προϊόν της λύσης επωάζεται στο υδατόλουτρο στους 55ο C για 10 λεπτά, για να προωθηθεί η πέψη των πρωτεϊνών. Το γονιδιωματικό DNA βρίσκεται πακεταρισμένο σε σύμπλοκα DNA-πρωτεϊνών, που ονομάζονται πυρηνικά χρωμοσώματα και για να θεωρείται πετυχημένη η διαδικασία της απομόνωσης του γονιδιωματικού DNA, πρέπει να έχει αποδώσει ένα μόριο DNA απαλλαγμένο από πρωτεΐνες για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί με αξιοπιστία για PCR. Έπειτα, προσθέτουμε αιθανόλη για την κατακρήμνιση του DNA και μεταφέρουμε το ομογενοποιημένο διάλυμα σε μια περιστρεφόμενη στήλη, όπου μετά από φυγοκέντρηση το DNA, που έχει απελευθερωθεί στο διάλυμα, δεσμεύεται στην ειδική μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column, ενώ οι πρωτεΐνες και τα μεμβρανικά υπολείμματα, που περιέχονται στο διάλυμα, δεν συγκρατούνται στη μεμβράνη, αλλά εκλούονται στο σωλήνα συλλογής, ο οποίος απορρίπτεται. Ακολουθούν δύο διαδοχικές φυγοκεντρήσεις της περιστρεφόμενης στήλης με δύο ρυθμιστικά διαλύματα, ώστε να εξασφαλιστεί η απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων, που έχουν δεσμευθεί στη μεμβράνη, και για να βελτιστοποιηθεί με αυτόν τον τρόπο η καθαρότητα του DNA. Η συναπομόνωση πρωτεϊνών μειώνει την επιτυχία της PCR, γι΄αυτό είναι σημαντικό να ελαχιστοποιηθούν ή ακόμη καλύτερα να εξαλειφθούν τα στοιχεία εκτός του DNA που δεσμεύονται στη μεμβράνη της στήλης. Το κεκαθαρμένο DNA εκλούεται από τη μεμβράνη της περιστρεφόμενης στήλης PureLink Spin Column χρησιμοποιώντας διάλυμα έκπλυσης, elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA). Η στήλη απορρίπτεται και το σωληνάριο συλλογής, που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα αποθηκεύεται στους -20ο C, για να χρησιμοποιηθεί για ενίσχυση του DNA και ανίχνευση πολυμορφισμών σε γονίδια με PCR.



Εικόνα 3.1: Διήθηση του διαλύματος μέσα από ειδικές στήλες με στόχο την απομόνωση του κεκαθαρμένου DNA.

Το πρωτόκολλο (PureLink Genomic DNA Kits Manual, Life Technologies) που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από περιφερικό αίμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

1.	Προσθέτουμε 200 μl φρέσκου ή κατεψυγμένου αίματος σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης.
2.	Προσθέτουμε 20 μl πρωτεϊνάσης K.
3.	Προσθέτουμε 20 μl RNάσης A, αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) και επωάζουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
4.	Προσθέτουμε 200 μl PureLink Genomic Lysis/ Binding Buffer και αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex), για να αποκτήσουμε ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.
5.	Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 55ο C για 10 λεπτά, για να προωθήσουμε την πέψη των πρωτεϊνών.
6.	Προσθέτουμε 200 μl 96-100% αιθανόλη.
7.	Αναδεύουμε καλά με αυτόματο αναδευτήρα τύπου δίνης (Vortex) για 5 δευτερόλεπτα, για να παραχθεί ένα ομογενοποιημένο διάλυμα.

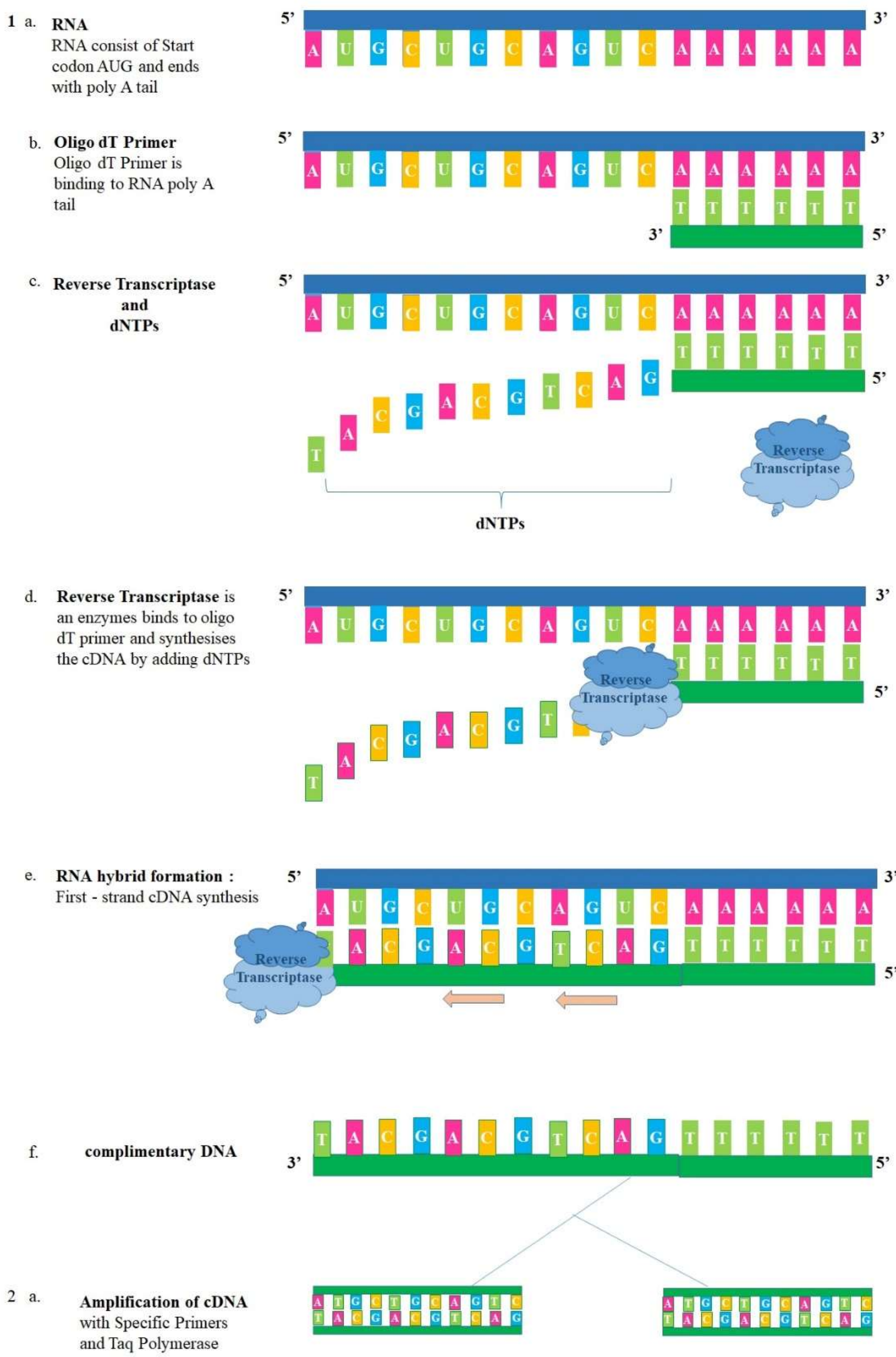
8.	Μεταφέρουμε το διάλυμα (~640 μl) στην περιστρεφόμενη στήλη PureLink Spin Column.
9.	Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
10.	Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
11.	Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 1 στη στήλη.
12.	Φυγοκεντρούμε τη στήλη σε 10.000 x g (12.500 rpm) για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
13.	Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής και τοποθετούμε τη στήλη σε ένα καθαρό σωλήνα συλλογής.
14.	Προσθέτουμε 500 μl Wash Buffer 2 στη στήλη.
15.	Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απορρίπτουμε το σωλήνα συλλογής.
16.	Τοποθετούμε τη στήλη σε έναν αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης του 1,5 ml.
17.	Προσθέτουμε 150 μl PureLink Elusion Buffer απευθείας στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης.
18.	Φυγοκεντρούμε τη στήλη στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.
19.	Απορρίπτουμε τη στήλη και πωματίζουμε το σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5 ml.
20.	Αποθηκεύουμε το σωλήνα φυγοκέντρησης του 1,5 ml που περιέχει το απομονωμένο DNA σε ρυθμιστικό διάλυμα στους -20o C.

3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία επαναστατική μέθοδος της βιοχημείας και της μοριακής βιολογίας, η οποία επιτρέπει την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA in vitro, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA. Η ταχύτητα, η ευκολία, η ευαισθησία, η ειδικότητα και η αυτοματοποίηση της μεθόδου έχει συμβάλλει σημαντικά στην εξέλιξη της μοριακής βιολογίας και στην ευρεία εφαρμογή της στην ιατρική έρευνα και τη διάγνωση ασθενειών. Ο επιστήμονας, που την επινόησε, Karry Mullis, τιμήθηκε με το βραβείο Νόμπελ το 1993. Η τεχνική του Mullis και των συνεργατών του ήταν αργή, δύσκολη και ανακριβής και το μεγαλύτερο μειονέκτημα ήταν ότι σε κάθε νέο κύκλο πολλαπλασιασμού ήταν απαραίτητη η εκ νέου προσθήκη DNA πολυμεράσης, καθώς με την άνοδο της θερμοκρασίας κατά την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA το ένζυμο αποδιατασσόταν, με αποτέλεσμα να χάνει τη λειτουργικότητά του. Η μέθοδος βελτιστοποιήθηκε χάρη στην απομόνωση της θερμοανθεκτικής Taq πολυμεράσης από το βακτήριο Thermus aquaticus, η οποία παραμένει αναλλοίωτη κατά την αποδιάταξη στους 95oC και έχει τη βέλτιστη δυνατότητα πολυμερισμού στους 72oC, κάτι το οποίο οδήγησε στην αυτοματοποίηση της μεθόδου.

Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο in vitro πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με λογαριθμική αύξηση. Βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων του DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία, να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να αντιγράφονται. Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA, που θέλουμε να ενισχυθεί. Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο in vitro πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA.

Με τη μέθοδο της PCR επιτυγχάνεται ο in vitro πολλαπλασιασμός συγκεκριμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών ενός DNA ή cDNA δείγματος με τη χρήση επαναλαμβανόμενων κύκλων κατευθυνόμενης σύνθεσης DNA. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μια μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA με λογαριθμική αύξηση. Βασίζεται στην ιδιότητα των αλυσίδων του DNA να αποχωρίζονται σε υψηλή θερμοκρασία και να επανενώνονται σε χαμηλότερη θερμοκρασία και να



Εικόνα 3.2: Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι η *in vitro* ενζυμική σύνθεση αντιγράφων ενός τμήματος DNA γνωστής αλληλουχίας βάσεων και περιλαμβάνει επαναλήψεις κύκλων αντιγραφής καθένας εκ των οποίων αποτελείται από τρία στάδια: (1) την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, DNA denaturation, στους 95^{o}C, (2) την αναδιάταξη των εκκινητών, primer annealing, στη θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών και (3) την επιμήκυνση των εκκινητών, primer extension, στους 72^{o}C.

αντιγράφονται. Η αντίδραση στηρίζεται στην επέκταση δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers), οι οποίοι υβριδίζονται με αλληλουχίες που βρίσκονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας - στόχου του DNA που επιθυμείται να ενισχυθεί.

Εικόνα 3.3: Ο αυτοματοποιημένος θερμικοκυκλοποιητής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης που χρησιμοποιήθηκε κατά την πειραματική διαδικασία.

Η PCR βασίζεται στη χρήση διαφορετικών θερμοκρασιών, για να πραγματοποιηθούν τα τρία βήματα της αποδιάταξης του DNA, του υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης των εκκινητών. Τα μείγματα της αντίδρασης προθερμαίνονται στους 95oC για 15 min, για να ενεργοποιηθεί η HotStarTaq DNA πολυμεράση (1ος κύκλος). Με τον τρόπο αυτόν, μειώνεται σημαντικά η δημιουργία μη ειδικών προϊόντων πολλαπλασιασμού (non specific amplification), εφόσον ελαχιστοποιείται η πιθανότητα επέκτασης των μη ειδικά συνδεδεμένων εκκινητών καθώς και των διμερών τους. Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται θερμαίνοντάς το στους 95^{o}C, για να διαχωριστούν οι συμπληρωματικές αλυσίδες. Έπειτα, η θερμοκρασία ελαττώνεται, για να επιτρέψει στους εκκινητές να υβριδοποιηθούν στις συμπληρωματικές αλληλουχίες των αλυσίδων του DNA. Αυτή η θερμοκρασία ποικίλει ανάλογα με τους εκκινητές.

Για να ενισχύσουμε το δείγμα του DNA, είναι απαραίτητο να επαναληφθεί ο κύκλος εναλλαγής θερμοκρασίας 25-40 φορές, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με μεγαλύτερη αποδοτικότητα, χρησιμοποιώντας έναν θερμοκυκλοποιητή (thermal cycler), ο οποίος είναι προγραμματισμένος να εναλλάσσει τη θερμοκρασία στιγμιαία και ικανός να διατηρεί τα δείγματα στην επιθυμητή θερμοκρασία για το ενδεδειγμένο χρονικό διάστημα που απαιτείται, για να ολοκληρωθεί η αντίδραση.

Για την εκτέλεση της αντίδρασης είναι απαραίτητα τα εξής αντιδραστήρια (reagents):

i. **το μόριο DNA που θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα αντιγραφής (template DNA)** για να ενισχυθεί και να πολλαπλασιαστεί μια συγκεκριμένη αλληλουχία βάσεων. Στην παρούσα εργασία, ως μήτρα DNA χρησιμοποιήθηκε το ολικό DNA, που απομονώθηκε από τα λευκοκύτταρα του περιφερικού αίματος. Η ποιότητα της μήτρας του DNA, που αντιπροσωπεύει την ακεραιότητα και την καθαρότητα του μορίου του DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, είναι καθοριστικός παράγοντας για την επιτυχία της αντίδρασης. Επιπλέον να σημειωθεί, ότι συνήθως απαιτείται ποσότητα DNA, που κυμαίνεται από 0,01 μg έως 1 μg.

ii. **ένα ζεύγος εκκινητών (primers), ένας νοηματικός εκκινητής (forward primer) και ένας αντινοηματικός εκκινητής (reverse primer)**, τα οποία υβριδίζονται στις 5΄ και 3΄ γειτονικές περιοχές του τμήματος DNA, που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, για να μπορέσει να προσδεθεί η DNA πολυμεράση και να πολυμερίσει. Οι εκκινητές αποτελούν συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μήκους 15-30 βάσεων (συνήθως 20 βάσεων), συμπληρωματικά ως προς τα 5΄ και 3΄ άκρα της διπλής έλικας του τμήματος DNA, που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος της PCR. Το περιεχόμενό τους σε ζεύγη βάσεων G/C, δηλαδή η περιεκτικότητά τους σε G/C, κυμαίνεται από 40% έως 60% με αντιπροσωπευτικότερο ποσοστό συνήθως το 50%. Οι εκκινητές δεν πρέπει να σχηματίζουν δευτεροταγείς δομές ή ετεροδιμερή λόγω συμπληρωματικότητας και η θερμοκρασία τήξης (melting temperature, Tm), στην οποία το 50% των εκκινητών θα υβριδοποιηθεί στη μήτρα πρέπει να είναι περίπου 50-72o C και τα Tm των δύο εκκινητών να μην διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερους από 5o C. Οι εκκινητές είναι δυνατόν να περιέχουν αλληλουχίες χρήσιμες για μετέπειτα πειραματικές ανάγκες, όπως θέσεις πέψης για περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Η τελική συγκέντρωση του κάθε εκκινητή στην αντίδραση είναι 20 μM (20 pmol/ μl).

iii. **η θερμοσταθερή Taq DNA πολυμεράση,** που απομονώθηκε για πρώτη φορά το 1976 από το θερμόφιλο βακτήριο Thermus aquaticus, είναι σταθερή στις υψηλές τιμές θερμοκρασίας. Η Taq DNA πολυμεράση είναι ένα εμπορικώς διαθέσιμο ένζυμο που απομονώνεται από βακτήρια Escherichia coli. Αυτό το ένζυμο έχει τη δραστικότητα της 5΄ → 3΄ πολυμεράσης και τη δραστικότητα της 5΄ → 3΄ εξωνουκλεάσης, αλλά στερείται την 3΄ → 5΄ εξωνουκλεολυτική δραστικότητα, με αποτέλεσμα να μην έχει επιδιορθωτική δράση (proofreading activity).

iv. **τα 5΄- τριφωσφορικά 2΄- δεοξυριβονουκλεοτίδια (2΄-deoxynucleotide 5΄-triphosphates, dNTPs, που περιλαμβάνουν την dATP, την dTTP, την dGTP, και την dCTP)**, που προσθέτει η DNA πολυμεράση, για να δημιουργήσει την πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια χρησιμοποιούνται σε τελική συγκέντρωση 200 μM το καθένα. Τα dNTPs σχηματίζουν σύμπλοκα με τα ιόντα Mg2+. Στην περίπτωση που μεταβληθεί η συγκέντρωσή τους, πρέπει να προσαρμόζεται και η συγκέντρωση του MgCl2.

v. **το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution)**, που διασφαλίζει τη μέγιστη δυνατή σταθερότητα και δραστικότητα της DNA πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) εξασφαλίζει τις ιδανικές συνθήκες pH και αλατότητας για τη δράση της πολυμεράσης. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer solution) της αντίδρασης περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20 oC), MgCl2 KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη.

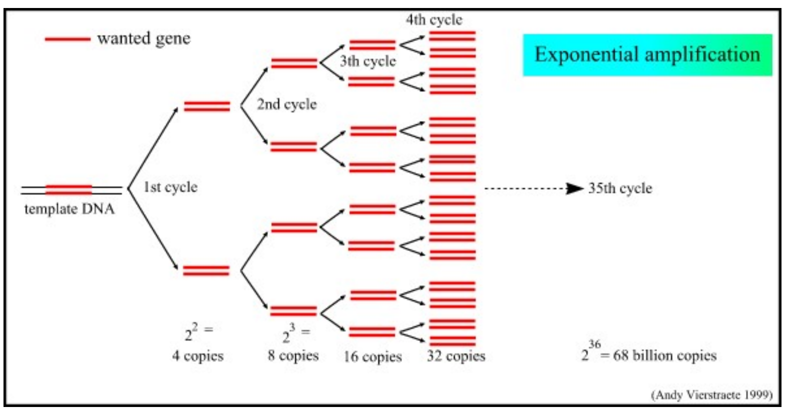
vi. **τα ιόντα μαγνησίου Mg^{2+} με τη μορφή χλωριούχου μαγνησίου $MgCl_2$**,που είναι απαραίτητα για τη δραστικότητα της DNA πολυμεράσης. Η συγκέντρωση του $MgCl_2$

προσδιορίζεται εμπειρικά και συνήθως κυμαίνεται από 1mM έως 5mM. Είναι συμπαράγοντας της θερμοσταθερής πολυμεράσης. Χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων μαγνησίου επηρεάζουν αρνητικά τη λειτουργία της, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις την πιστότητά της. Σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA αυξάνοντας την Tm και τελικά την ειδικότητα των εκκινητών. Σχηματίζει διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs, τα οποία αποτελούν το υπόστρωμα του ενζύμου. Η συγκέντρωση του χλωριούχου μαγνησίου μπορεί να κυμαίνεται από 0,5 mM έως 2,5 mM. Η παρουσία EDTA ή άλλων χηλικών παραγόντων που δεσμεύουν τα ιόντα μαγνησίου στο διάλυμα των εκκινητών ή στο DNA μπορεί να διαταράξει τη συγκέντρωση του μαγνησίου.

Εικόνα 3.4: Το Kit PCR που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη

Το διάλυμα της αντίδρασης τοποθετείται εντός του θερμοκυκλοποιητή ο οποίος διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι, για να επιτυγχάνεται ομοιογενής θερμοκρασία στο εσωτερικό του μηχανήματος και μετά τη λήξη του προγράμματος τα προϊόντα της αντίδρασης οπτικοποιούνται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης περιεκτικότητας 3%.

Στην παρούσα μελέτη, ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (oligonucleotide primers) έγινε με τη βοήθεια της διαδικτυακής εφαρμογής BLAST Basic Local Alignment Search Tool του NCBI National Centre for Biotechnology Information, η οποία επιτρέπει τόσο την αξιολόγηση μεμονωμένων υποψήφιων εκκινητών όσο και την αξιολόγηση συνδυασμού εκκινητών ως ζεύγη για αντιδράσεις PCR. Οι θερμοκρασίες αποδιάταξης των εκκινητών (melting temperature, Tm), από τις οποίες εξαρτάται ο προγραμματισμός μιας PCR, δεν πρέπει να διαφέρουν σημαντικά για τους δύο εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν. Ως θερμοκρασία αποδιάταξης ενός εκκινητή (melting temperature, Tm) ορίζεται η θερμοκρασία, στην οποία ένας εκκινητής αδυνατεί πλέον να σχηματίσει σταθερά δίκλωνα μόρια με την συμπληρωματική του αλληλουχία στόχο. Η θερμοκρασία τήξης Tm εξαρτάται από το μέγεθος του εκκινητή καθώς και από το ποσοστό του σε δεοξυριβονουκλεοτίδια γουανίνης G και κυτοσίνης C, τα οποία, συγκριτικά με αυτά της αδενίνης A ή της θυμίνης T, αυξάνουν την Tm. Κατά τον σχεδιασμό της αλληλουχίας των εκκινητών πρέπει να αποφεύγεται η παρουσία ανεπιθύμητων, θερμοδυναμικά ευνοϊκών δομών, που μειώνουν την απόδοση των εκκινητών στην αντίδραση π.χ. δομές φουρκέτας και ομοδιμερή ή ετεροδιμερή των εκκινητών καθώς και η παρουσία νουκλεοτιδικών επαναλήψεων, που μπορούν να οδηγήσουν σε ολίσθηση του εκκινητή πάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία στόχο και τελικά σε σφάλμα στο προϊόν της PCR.



Εικόνα 3.5: Η συγκέντρωση του δείγματος του DNA είναι αρχικά πολύ χαμηλή αλλά η συγκέντρωσή του αυξάνεται εκθετικά, καθώς η αντίδραση προχωράει και τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου γίνονται οι μήτρες του επόμενου κύκλου.

Για την ανίχνευση των πολυμορφισμών του FOXE1 χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος εκκινητών που παράγουν ένα τμήμα 249 ζευγών βάσεων (249-bp).

Primers	Orientation	Tm
GCG-GAG-GAC-ATG-TTC-GAG-A	S	59.49°C
CGC-GGG-GTA-GTA-GAC-TGG-AG	A	61.45°C

Το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση του γονιδίου του FOXE1 περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

i. Σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο φυγοκέντρησης του 0,5 mL προσθέτουμε 5 μl 10X PCR Buffer minus Mg2+, 0,5 μl 10 mM dNTP mixture, 0,5 μl Primer Sense mix, 0,5 μl Primer Antisense mix, 2 μl Template DNA, 0,2 μl Taq DNA polymerase, 16,3 μl απεσταγμένο νερό.
ii. Τοποθετούμε τα σωληνάρια στον θερμικό κυκλοποιητή, όπου επωάζουμε στους 95°C για 15 λεπτά.
iii. Εκτελούμε τα ακόλουθα βήματα για 29 κύκλους: 95°C για 1 λεπτό, 53°C για 1 λεπτό και 72°C για 1 λεπτό.
iv. Επωάζουμε τα σωληνάρια στους 72°C για 10 λεπτά και διατηρούμε την αντίδραση στους 4^{o}C.
v. Τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν στους -20ο C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Για να αξιολογήσουμε την επιτυχία της συμβατικής PCR, πρέπει να οπτικοποιήσουμε το αποτέλεσμα της, κάτι το οποίο επιτυγχάνεται με post-PCR analysis, όπως ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αγαρόζης, η οποία δίνει τη δυνατότητα για την ανίχνευση και την αδρή ποσοτικοποίηση της ενισχυμένης αλληλουχίας.

3.4. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης (Agarose gel electrophoresis)

Η ηλεκτροφόρηση DNA σε πηκτή αγαρόζης εφαρμόζεται σε όλες εκείνες τις περιπτώσεις, που απαιτείται διαχωρισμός και εντοπισμός ή και απομόνωση διακριτών τμημάτων DNA ενός δείγματος. Η μέθοδος βασίζεται στην αρχή, ότι η κινητικότητα των νουκλεϊνικών οξέων σε ηλεκτρικό πεδίο καθορίζεται από το μέγεθος και τη δομή τους. Η αγαρόζη είναι ένας φυτικός πολυσακχαρίτης, που απομονώνεται από κάποια είδη θαλάσσιων φυκών και έχει την ιδιότητα να ρευστοποιείται στους 100^{o}C και να στερεοποιείται στους 45oC, σχηματίζοντας ένα αδρανές πορώδες, ζελατινώδες πήκτωμα. Το μέγεθος των πόρων του υλικού αυτού εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης και καθορίζει το μέγεθος των μορίων του DNA που θα το διαπεράσουν. Πηκτώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (0,4% -1,2% w/v) χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων DNA, ενώ πηκτώματα με υψηλές συγκεντρώσεις αγαρόζης (έως 2,5% w/v) είναι καταλληλότερα για την ανάλυση μικρών μορίων DNA.

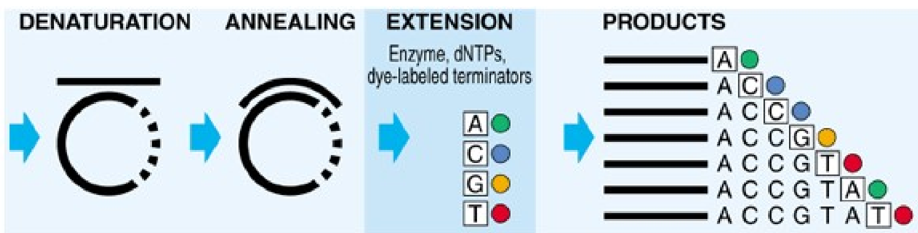
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας η ηλεκτροφόρηση νουκλεϊνικών οξέων εφαρμόζεται, για να ελεγχθεί το αποτέλεσμα της αντίδρασης PCR. Η πηκτή αγαρόζης, που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα, είχε περιεκτικότητα 3%, και σε αυτήν προστέθηκαν 5 μL βρωμιούχο αιθίδιο, συγκέντρωσης 5 mg/mL, το οποίο είναι μια φθορίζουσα χρωστική, που καθιστά ορατά τα μόρια DNA κάτω από το υπεριώδες φως.

Τα δείγματα τοποθετούνται στις ειδικές εσοχές της πηκτής και ηλεκτροφορούνται, εφαρμόζοντας ηλεκτρικό πεδίο τάσης 5 V/cm. Το DNA, ως αρνητικά φορτισμένο μόριο λόγω των φωσφορικών ομάδων που υπάρχουν στον φωσφοδιεστερικό σκελετό, όταν βρεθεί μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο, μετακινείται προς το θετικό ηλεκτρόδιο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με ταχύτητα, που εξαρτάται από το μέγεθος και τη δομή του. Η χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης μας επιτρέπει να παρακολουθούμε τη γενική πορεία της ηλεκτροφόρησης. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (ultraviolet, UV, radiation). Τα διάφορα τμήματα DNA εμφανίζονται ως φωτεινές ζώνες, ενώ ο μάρτυρας των DNA τμημάτων γνωστού μεγέθους επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους τους.

3.5. Προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των τμημάτων του DNA

Η τεχνική που ακολουθείται για την ανάγνωση της αλληλουχίας του DNA (DNA sequencing) βασίζεται στη μέθοδο του Sanger, όπου η μία αλυσίδα του DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα για τη σύνθεση της συμπληρωματικής αλυσίδας με τη χρήση κατάλληλου εκκινητή. Στο μίγμα της αντίδρασης εκτός από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) προστίθενται και τα διδεοξυανάλογά τους (τριφωσφορικά 2΄, 3΄ διδεοξυνουκλεοτίδια, dideoxynucleotide triphosphates, ddNTPs: ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP), στα οποία δεν υπάρχει το 3΄ υδροξυλικό άκρο (3΄- OH άκρο) και είναι σημασμένα με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες ουσίες, καθεμιά από τις οποίες εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου κάθε νεοσυντιθέμενης αλυσίδας.

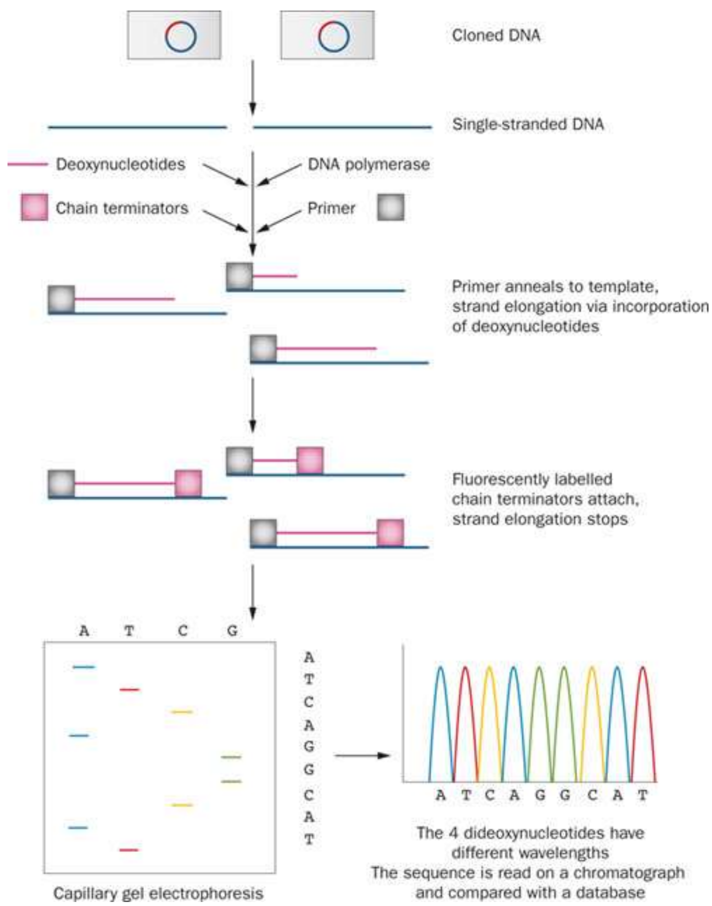
Η σύνθεση της αλυσίδας του DNA γίνεται με τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών. Στην περίπτωση, που κατά την επιμήκυνση του νεοσυντιθέμενου μορίου DNA η Taq πολυμεράση εισάγει ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο, τότε εξαιτίας της έλλειψης ελεύθερης 3΄ υδροξυλομάδας τερματίζεται πρόωρα η επιμήκυνσή του. Με τον τρόπο αυτό, σχηματίζονται μόρια DNA που διαφέρουν κατά ένα νουκλεοτίδιο, ενώ το τελευταίο νουκλεοτίδιο είναι επισημασμένο με μία από τις τέσσερις φθορίζουσες ουσίες. Γι΄ αυτό, η μέθοδος αλληλούχισης κατά Sanger ονομάζεται εναλλακτικά μέθοδος τερματισμού αλυσίδας (chain termination method).



Εικόνα 3.6: Όταν κατά τον πολυμερισμό της νουκλεοτιδικής αλυσίδας η DNA πολυμεράση αντί να προσθέσει ένα από τα συνηθισμένα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) προσθέτει ένα από τα διδεοξυανάλογά τους (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP), τότε η επιμήκυνση τερματίζεται, επειδή τα ddNTPs δεν φέρουν 3΄- OH άκρο και η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να σχηματίσει φωσφοδιεστερικό δεσμό με άλλο νουκλεοτίδιο. Κάθε ένα από τα τριφωσφορικά διδεοξυνουκλεοτίδια είναι σημασμένα με μια διαφορετική φθορίζουσα χρωστική (dye-labeled terminators).

Για την αντίδραση της ανάγνωσης της αλληλουχίας του DNA απαιτούνται 50 ng καθαρισμένου προϊόντος της PCR, τα οποία αναμειγνύονται με έτοιμο μίγμα αντίδρασης Big Dye Termination Ready Reaction Mix (RoRo Mix), version 3.1 (Applied Biosystems, USA), το οποίο περιέχει Taq πολυμεράση, dNTPs και ddNTPs. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 10μl, παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος αλληλούχισης (sequencing buffer: Tris-HCl 200 Mm, $MgCl2$ 10 mM, pH 9), με την προσθήκη του εκκινητή (primer), που έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε κυτοσίνη και γουανίνη. Η αντίδραση επιμήκυνσης των εκκινητών πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και γίνεται κατά τρόπο παρόμοιο με αυτό της PCR, δηλαδή χρησιμοποιούνται εναλλασσόμενα στάδια θερμικής αποδιάταξης στους 94ο C, υβριδισμού του εκκινητή στους 55ο C και επέκτασης ή διδεοξυτερματισμού στους 72ο C.

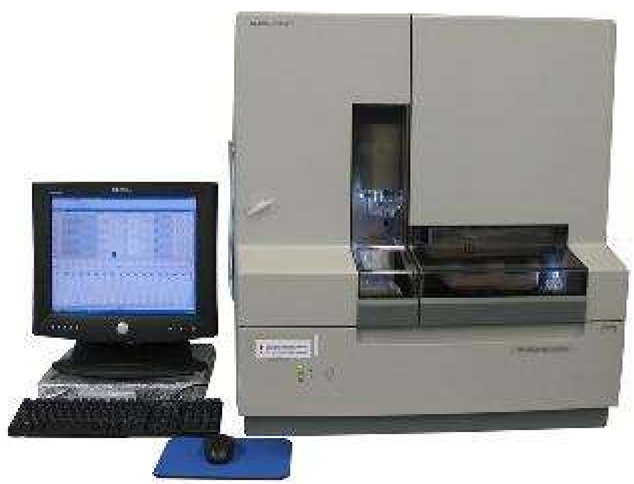
Στη συνέχεια, το προϊόν της παραπάνω αντίδρασης υπόκειται σε καθαρισμό με στήλη Sephadex G-50, με σκοπό την απομάκρυνση των σημασμένων διδεοξυνουκλεοτιδίων που δεν έχουν χρησιμοποιηθεί κατά την αντίδραση, καθώς και ολιγονουκλεοτιδίων μεγέθους έως και 20 ζεύγη βάσεων.



Εικόνα 3.7: Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας από την απομόνωση του νουκλεικού οξέος έως την αλληλούχιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με την ανάγνωση του χρωματογραφήματος που προκύπτει από την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα.

Τα σημασμένα τμήματα DNA που παράγονται τοποθετούνται στον αυτόματο αναλυτή (ABI Prism 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems), διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (POP-7 Polymer, Applied Biosystems) και ανιχνεύονται από διάταξη laser αισθητήρων και τα δεδομένα αποθηκεύονται για να αναλυθούν. Με την ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis), επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των μορίων DNA, που διαφέρουν σε μέγεθος ακόμα και κατά ένα νουκλεοτίδιο. Τα μόρια, κατά την έξοδό τους από το τριχοειδές, διέρχονται από δέσμη laser, ώστε να διεγερθούν οι φθορίζουσες ουσίες και το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού ανιχνεύεται από ειδική καταγραφική συσκευή (CCD camera). Κάθε φθορίζουσα ουσία εκπέμπει σε διαφορετικό μήκος κύματος κι έτσι είναι δυνατή η ταυτοποίηση του τελευταίου νουκλεοτιδίου του κάθε μορίου.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης και την επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα (Sequencing Analysis v 5.2), είναι δυνατή η ανάγνωση της αλληλουχίας των νουκλεοτιδίων. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε ηλεκτροφερογράφημα (electropherogram), μια αλληλουχία κορυφών (peaks) τεσσάρων διαφορετικών χρωμάτων, που αντιπροσωπεύουν τις τέσσερις βάσεις του DNA.



Εικόνα 3.8: Ο αυτόματος αναλυτής ABI Prism 3130 Genetic Analyzer της Applied Biosystems που χρησιμοποιήθηκε για την αλληλούχιση των προϊόντων της PCR.

3.6. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Στην παρούσα μελέτη, για τις ποσοτικές μεταβλητές, έγινε έλεγχος κανονικότητας με βάση το στατιστικό έλεγχο Kolmogorov – Smirnov, όπου η μηδενική υπόθεση είναι ότι η κατανομή της μεταβλητής είναι κανονική, έναντι της εναλλακτικής που είναι ότι η κατανομή της μεταβλητής δεν είναι κανονική. Για τις ποσοτικές μεταβλητές ως περιγραφικά στατιστικά μέτρα, στην περίπτωση που ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση. Στις περιπτώσεις που η κατανομή δεν ήταν κανονική, δόθηκαν η διάμεσος και το ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Για τις ποιοτικές μεταβλητές, ως περιγραφικά στατιστικά μέτρα, χρησιμοποιήθηκαν η απόλυτη συχνότητα (ν) και η σχετική συχνότητα (%).

Για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής σχέσης ανάμεσα σε δύο ποιοτικές μεταβλητές χρησιμοποιήθηκε το X^2 του Pearson. Η μηδενική υπόθεση του στατιστικού κριτηρίου αυτού είναι πως δεν υπάρχει καμία συσχέτιση ανάμεσα στις δύο μεταβλητές. Για την εφαρμογή του κριτηρίου αυτού θα πρέπει να ισχύουν οι εξής προϋποθέσεις: α) οι αναμενόμενες συχνότητες σε όλα τα κελιά να είναι μεγαλύτερες του 5, ή β) όλες οι αναμενόμενες τιμές να είναι μεγαλύτερες του 1 και το πολύ 20% από αυτές να είναι μικρότερες του 5. Στις κατηγορικές μεταβλητές, όπου κρίθηκε σκόπιμο, έγινε ομαδοποίηση των συναφών απαντήσεων, προκειμένου να πληρούνται οι υποθέσεις για την εφαρμογή του κριτηρίου X^2 του Pearson. Στις περιπτώσεις που υπήρχε παραβίαση των υποθέσεων χρησιμοποιήθηκε το Fisher exact test.

Για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής σχέσης ανάμεσα σε μια ποσοτική και μια ποιοτική μεταβλητή με δύο κατηγορίες, χρησιμοποιήθηκαν τα στατιστικά κριτήρια t-test και Mann-Whitney, ανάλογα με το αν η κατανομή της συνεχούς μεταβλητής ήταν κανονική καθώς και με το αν υπήρχε ισότητα διακυμάνσεων σε κάθε κατηγορία της ποιοτικής μεταβλητής. Η μηδενική υπόθεση των στατιστικών αυτών κριτηρίων είναι πως η μέση τιμή της συνεχούς μεταβλητής είναι ίση σε κάθε κατηγορία της ποιοτικής μεταβλητής.

Τέλος, στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά μοντέλα λογιστικής παλινδρόμησης, τα οποία είχαν ως έκβαση την ύπαρξη αλλήλιου (14 & 16). Υπολογίστηκαν οι σχετικοί λόγοι (ΣΛ) και τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης (95% ΔΕ).

Όλη η στατιστική ανάλυση έγινε σε επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας 5%, χρησιμοποιώντας το στατιστικό πακέτο STATA (έκδοση 13.1).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη μελέτη αυτή στρατολογήθηκαν 28 γυναίκες με ΠΩΑ και 30 υγιείς γυναίκες. Σε όλες τις γυναίκες με ΠΩΑ είχε πραγματοποιηθεί αρχικά καρυότυπος για αποκλεισμό χρωμοσωμικών ανωμαλιών, έλεγχος για προμετάλλαξη του FMR1 και έλεγχος για την ύπαρξη αντισωμάτων κατά των επινεφριδίων. Σε όλες τις ασθενείς ο έλεγχος ήταν αρνητικός. Επίσης, πριν τη λήψη αίματος, πραγματοποιήθηκε η λήψη ενός λεπτομερούς ιστορικού, προς αποκλεισμό ιατρογενών αιτιών για την εμφάνιση ΠΩΑ. Η ομάδα ελέγχου αποτελούνταν από γυναίκες, οι οποίες δεν είχαν κάποιο υποκείμενο νόσημα, δεν είχαν ιστορικό αποβολών ή προβλήματα γονιμότητας και επίσης είχαν τεκνοποιήσει τουλάχιστον 1 φορά. Τέλος, το ατομικό και οικογενειακό ιστορικό τους ήταν ελεύθερο.

Ο μέσος όρος ηλικίας των ασθενών ήταν 31,68 έτη και ο μέσος όρος ηλικίας κατά την εμφάνιση της ΠΩΑ ήταν 25,18 έτη, μέσο ύψος 1,64 μέτρα, μέσος βάρος 63,2 χιλιόγραμμα και μέση τιμή BMI 23,41. Από τις γυναίκες αυτές παρουσία οικογενειακού ιστορικού ΠΩΑ είχαν οι 9 (32,14%) και συνυπάρχουσες παθήσεις είχαν 5 γυναίκες (17,86%). Πιο συγκεκριμένα 1 είχε ιστορικό μελανώματος, 1 ουδετεροπενία, 1 ιστορικό συστροφής δεξιού εξαρτήματος και 1 κοιλιοκάκη. Επίσης στην ομάδα των ασθενών υπήρχε και μία γυναίκα με κοντό ανάστημα. Μέση τιμή FSH κατά τη διάγνωση ήταν 71,38 mIU/mL. Τα δεδομένα αυτά συνοψίζονται στον πίνακα 4.1.

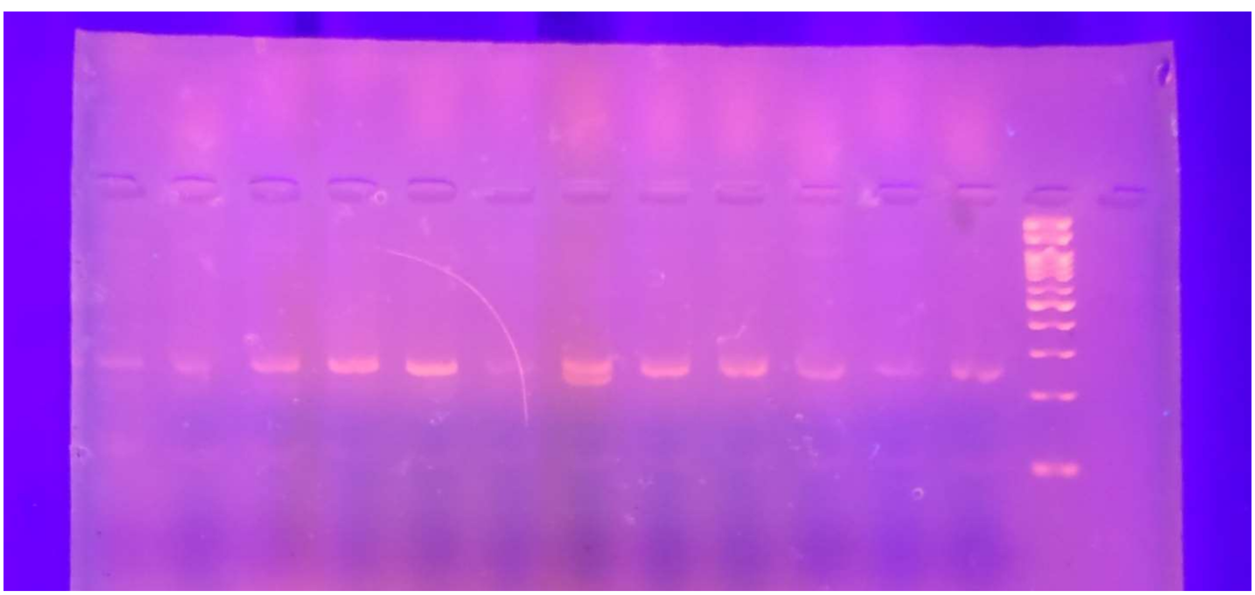
Μεταβλητή	**Μέση τιμή**	**S.D.**	**Min**	**0,25**	**Mdn**	**0,75**	**Max**
Ηλικία	31,68	12,86	15	20,5	28,5	40	62
Ηλικία εμμηναρχής	12,05	1,22	10	11	12	13	14
Ηλικία ΠΩΑ	25,18	10,23	12	14,5	25,5	36	39
Ύψος	1,64	0,06	1,45	1,62	1,66	1,67	1,76
Βάρος	63,2	10,69	37	57,35	62	68	85
BMI	23,41	3,74	16,87	20,81	22,94	24,96	33,2
FSH	71,38	40,39	17,8	42,49	66	85	154

Πίνακας 4.1: Οι τιμές ηλικία, ηλικία εμμηναρχής και ΠΩΑ, ύψος, βάρος, BMI και FSH των ασθενών. Στον πίνακα αναγράφονται οι μέσες τιμές, οι σταθερές αποκλίσεις (S.D.), οι ελάχιστες και οι μέγιστες τιμές και τα τεταρτημόρια 0,25, 0,5 και 0,75.

Στη δική μας μελέτη ανιχνεύσαμε 5 διαφορετικά αλλήλια: με 8, 12, 14, 16 και 17 κατάλοιπα αλανίνης. Εντοπίστηκαν επίσης 6 διαφορετικοί γονότυποι 14/14, 14/16, 16/16, 14/17, 8/16 και 12/14. Το αλλήλιο με τα 8 κατάλοιπα εμφανίστηκε μόνο στις ασθενείς, ενώ το αλλήλιο με τα 12 κατάλοιπα μόνο στις υγιείς. Ως εκ τούτου, ο γονότυπος 8/16 παρατηρήθηκε μόνο στις ασθενείς και ο γονότυπος 12/14 μόνο στις υγιείς γυναίκες. Ο πιο συχνός γονότυπος και στους δύο πληθυσμούς ήταν ο 14/16 (64,29% στις ασθενείς και 53,33% στις υγιείς). Το πιο σπάνιο αλλήλιο ήταν αυτό με τα 8 κατάλοιπα και ο πιο σπάνιος γονότυπος ήταν ο 8/16. (Πίνακας 4.2)

Γονότυπος	N	%	N	%
8/16	1	3,57	0	0,00
12/14	0	0,00	2	6,67
14/14	6	21,43	9	30,00
14/16	18	64,29	16	53,33
14/17	1	3,57	1	3,33
16/16	2	7,14	2	6,67
Σύνολο	**28**	**100,00**	**30**	**100,00**

Πίνακας 4.2: Οι διάφοροι γονότυποι που ανευρέθηκαν στις ασθενείς (μπλε χρώμα) και στις υγιείς (πράσινο χρώμα).



Εικόνα 4.1: Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της PCR σε πηκτή αγαρόζης.

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση για όλα τα παρατηρούμενα αλλήλια. Εκ των αποτελεσμάτων, προκύπτει ότι η συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου με τα 14 κατάλοιπα δε διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις δύο ομάδες (p-value:0.491). Το ίδιο ισχύει και για τη συχνότητα εμφάνισης του αλληλίου με τα 16 κατάλοιπα (p-value:0.389). Οι συχνότητες εμφάνισης των υπόλοιπων αλληλίων δε διαφέρουν σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στις δύο ομάδες. (Πίνακας 4.3)

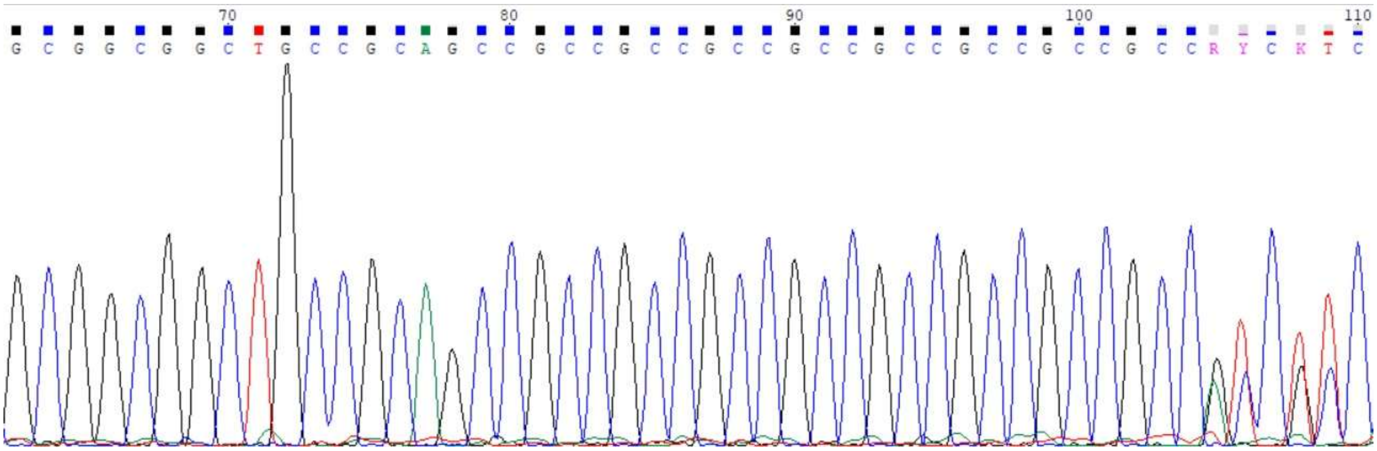
Τέλος, συγκρίθηκαν οι συχνότητες εμφάνισης των διαφόρων γονοτύπων. Από τη στατιστική ανάλυση βρέθηκε, ότι η συχνότητα εμφάνισης του γονότυπου 14/16 δε διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς (p-value:0.397). Επίσης, το ίδιο ισχύει και για τους γονοτύπους 14/14 και 16/16. (Πίνακας 4.4)

Πολυμορφισμός-14	**N**	**%**	**p-value**	**Test**	**N**	**%**
Ναι	31	55,36%	0,491	X^2	37	61,67%
Όχι	25	44,64%			23	38,33%
Σύνολο	**56**	**100,00%**			**60**	**100,00%**
Πολυμορφισμός-16	**N**	**%**	**p-value**	**Test**	**N**	**%**
Ναι	23	41,07%	0,389	X^2	20	33,33%
Όχι	33	58,93%			40	66,67%
Σύνολο	**56**	**100,00%**			**60**	**100,00%**

Πίνακας 4.3: Σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης των αλληλίων με 14 και με 16 κατάλοιπα στους δύο πληθυσμούς. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.

Γονότυπος	**N**	**%**	**p-value**	**Test**	**N**	**%**
14/16	18	64,29%	0,397	X^2	16	53,33%
14/14	6	21,43%	0,554	Fisher Exact	9	30%
16/16	2	7,14%	1	Fisher Exact	2	6,67%
Άλλος συνδυασμός	2	7,14%	1	Fisher Exact	3	10%
Σύνολο	**28**	**100,00%**			**30**	**100,00%**

Πίνακας 4.4: Σύγκριση της συχνότητας εμφάνισης του γονότυπου 14/16 στους δύο πληθυσμούς. Δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά.



Εικόνα 4.2: Αποτέλεσμα αλληλούχισης σε μια από τις ασθενείς με ΠΩΑ. Εμφανίζεται το πλήρες μήκος της πολύ-Ala περιοχής. Στη συγκεκριμένη περίπτωση παρατηρείται ετεροζυγωτία 14/16.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στη μελέτη του ρόλου του γονιδίου FOXE1 και συγκεκριμένα του πολύ-Ala τμήματος του γονιδίου στην εμφάνιση ΠΩΑ. Ο FOXE1 αποτελεί έναν μεταγραφικό παράγοντα με πολλαπλές λειτουργίες τόσο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, όσο και κατά την ενήλικο ζωή. Κατά την εμβρυϊκή περίοδο, εκφράζεται στον αναπτυσσόμενο θυρεοειδή, στην υπόφυση και στα βραγχιακά τόξα, ενώ κατά την ενήλικο ζωή εκφράζεται στον θυρεοειδή, στην επιδερμίδα, στους θυλάκους των τριχών και στον προεφηβικό όρχι, ενώ φαίνεται να σχετίζεται και με την εμφάνιση διαφόρων καρκίνων όπως του θυρεοειδή, του παχέος εντέρου, του δέρματος, του μαστού και του ήπατος.[37,39,42,43,68,72,74,77,79] Πιθανότατα όμως οι δράσεις του να μη σταματούν εκεί, καθώς από ότι φαίνεται αποτελεί μείζονα μεταγραφικό παράγοντα. Δεδομένης και της προηγούμενης βιβλιογραφίας, οι οποίες προτείνουν ότι διαφοροποιήσεις στο πολύ-Ala κομμάτι του γονιδίου σχετίζονται με την εμφάνιση ΠΩΑ, αποφασίσαμε να μελετήσουμε το ρόλο αυτού του γονιδίου και στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι αλλαγές στο πολύ-Ala κομμάτι έχουν παρατηρηθεί στο παρελθόν και σε άλλα γονίδια, οδηγώντας σε διάφορες παθήσεις. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση του γονιδίου FOXL2, το οποίο επίσης κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα της ομάδας “forkhead”. Έχει βρεθεί ότι επεκτάσεις του πολύ-Ala τμήματος στο συγκεκριμένο γονίδιο οδηγούν στην εμφάνιση BPES, ενώ έχουν ανιχνευθεί και σε περιπτώσεις σποραδικής ΠΩΑ.[83] Μεταβολές στο πολύ-Ala κομμάτι του FOXE1 έχουν βρεθεί σε περιπτώσεις δυσγενεσίας του θυρεοειδούς και πιθανώς τέτοιες παραλλαγές να οδηγούν σε προδιάθεση για τη συγκεκριμένη πάθηση.[39,52,54] Επίσης τέτοιου είδους αλλαγές πιθανώς να επηρεάζουν το επίπεδο έκφρασης ή λειτουργικότητας του FOXE1 και να οδηγούν σε αυξημένη προδιάθεση για την εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς.[65–69]

Στο γονίδιο FOXE1 το πολύ-Ala κομμάτι περιέχει 11-19 κατάλοιπα, εκ των οποίων τα αλλήλια με τα 14 και 16 κατάλοιπα είναι τα πιο συχνά και αντίστοιχα οι γονότυποι 14/14, 16/16 και 14/16 οι πιο συχνοί. Ενδιαφέρον είναι η διαφορά στη συχνότητα των γονοτύπων αυτών ανάμεσα στον ευρωπαϊκό και κινεζικό πληθυσμό. Βάσει της μελέτης των Watkins et al., ο γονότυπος 14/14 εμφανίζεται σε 27,2% των ασθενών με ΠΩΑ και σε 46,5% της ομάδας ελέγχου. Αντίθετα, στην έρευνα των Qin et al., η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου γονοτύπου ήταν 81,2% και 96,4% αντίστοιχα (P = 0.001). Αντίστοιχα, η συχνότητα του αλληλίου με τα 16 κατάλοιπα ήταν σημαντικά μικρότερη στον κινεζικό πληθυσμό, γεγονός που υποδεικνύει ότι υπάρχει ετερογένεια ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, πιθανώς λόγω γεωγραφικής απόστασης.[80,81] Και στις δύο μελέτες, ωστόσο, είχε βρεθεί ότι το αλλήλιο με τα 14 κατάλοιπα ήταν λιγότερο συχνό και το αλλήλιο με τα 16 κατάλοιπα πιο συχνό στις ασθενείς με ΠΩΑ σε στατιστικά σημαντικό βαθμό, υποδεικνύοντας τον πιθανό ρόλο του αλληλίου με τα 16 κατάλοιπα στην εμφάνιση της πάθησης.

Σε μελέτη που διενεργήθηκε στον ελληνικό πληθυσμό, είχε βρεθεί ότι τα αλλήλια με τα 14 και 16 κατάλοιπα ήταν πιο συχνά καθώς και οι αντίστοιχοι συνδυασμοί γονοτύπων. Ωστόσο, ίσως λόγω και του μικρού δείγματος δε βρέθηκε κάποιο αλλήλιο να διαφέρει σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ανάμεσα στην ομάδα ασθενών και στην ομάδα ελέγχου. Παρόλα αυτά, βρέθηκε ότι οι παραλλαγές του FOXE1 πιθανώς να σχετίζονται αιτιολογικά με την εμφάνιση ΠΩΑ.[82]

Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκε ότι τα αλλήλια με τα 14 και 16 κατάλοιπα είναι τα πιο συχνά εμφανιζόμενα τόσο στις ασθενείς όσο και στον υγιή πληθυσμό. Αντίστοιχα ο γονότυπος 14/16 ήταν ο πιο συχνός και στους δύο πληθυσμούς. Εν τούτοις, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην εμφάνιση κάποιου αλληλίου ή συγκεκριμένου γονοτύπου ανάμεσα στις δύο ομάδες, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες έρευνες. Ωστόσο, στη δική μας μελέτη το αλλήλιο με τα 8 κατάλοιπα εμφανίζεται μόνο στην ομάδα των ασθενών, υποδεικνύοντας πιθανή συσχέτιση του συγκεκριμένου γονοτύπου με την εμφάνιση της πάθησης.

Συνολικά, αν και η μη ύπαρξη στατιστικά σημαντικής συσχέτισης δημιουργεί προβληματισμό ως προς το κατά πόσο το συγκεκριμένο γονίδιο σχετίζεται αιτιολογικά με την ΠΩΑ, χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων. Ένας σημαντικός περιορισμός της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί το μικρό δείγμα ασθενών/ομάδας ελέγχου. Όταν ο πληθυσμός είναι μικρός, η ανεύρεση ή μη συσχέτισης εμπίπτει πάντοτε στην πιθανότητα στατιστικού σφάλματος. Ενδεχομένως, η συγκέντρωση ενός μεγαλύτερου δείγματος ασθενών να τροποποιούσε τα συγκεκριμένα αποτελέσματα. Σε κάθε περίπτωση, χρειάζονται επιπλέον μελέτες για τον καθορισμό της σχέσης του συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα με την εμφάνιση ΠΩΑ, αν αυτή πραγματικά υφίσταται.

Μελέτες, που να διερευνούν το κατά πόσο εκφράζεται ο συγκεκριμένος μεταγραφικός παράγοντας στην ανθρώπινη ωοθήκη, στην ενήλικο ζωή ή κατά την εμβρυϊκή περίοδο, δεν υπάρχουν. Μελέτες σε επίμυες, δεν υποδεικνύουν κάτι τέτοιο μέχρι στιγμής. Επίσης μελέτες, οι οποίες να μελετούν το κατά πόσο το γονίδιο εκφράζεται σε καλοήθεις ή κακοήθεις παθήσεις της ωοθήκης, επίσης δεν υπάρχουν. Μελλοντικά, ο σχεδιασμός και η πραγματοποίηση τέτοιων μελετών ενδεχομένως να ρίξει φως στο κατά πόσο και αν ο συγκεκριμένος παράγοντας εκφράζεται στον ανθρώπινο ωοθηκικό ιστό και ποιο ρόλο παίζει στις διάφορες διεργασίες που λαμβάνουν σε αυτή, όπως είναι η ωοθυλακιογένεση, η στεροειδογένεση και η ατρησία.

Συμπέρασμα

Το γονίδιο FOXE1 κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα, τον FOXE1, ο οποίος διαδραματίζει πολλαπλούς και σημαντικούς ρόλους τόσο κατά την εμβρυϊκή περίοδο όσο και κατά την ενήλικο ζωή. Έχει συσχετιστεί με διάφορες παθήσεις όπως το σύνδρομο Bamforth-Lazarus, το λυκόστομα, τη δυσγενεσία του θυρεοειδούς καθώς και διάφορες μορφές κακοήθειας. Επίσης, μεταβολές του τμήματος πολύ-Ala έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση ΠΩΑ. Στην παρούσα μελέτη, δεν ανευρέθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ανάμεσα στην συχνότητα συγκεκριμένων αλληλίων ή γονοτύπων και την εμφάνιση ΠΩΑ. Παρόλα αυτά, το μικρό δείγμα πληθυσμού που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη αυξάνει την πιθανότητα στατιστικού σφάλματος και συνεπώς χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων. Στο μέλλον, μεγαλύτερες έρευνες ή και έρευνες που θα διερευνούν την έκφραση του γονιδίου στην ανθρώπινη ωοθήκη ενδεχομένως να ρίξουν φως στο συγκεκριμένο ζήτημα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. 9th Ed. United States of America: Lippincot Williams & Wilkins; 2005.
2. Eddy EM. Fine structural observations on the form and distribution of nuage in germ cells of the rat. *Anat Rec*. 1974;178(4):731-757. doi:10.1002/ar.1091780406
3. Zamboni L, Gonndos B. Intercellular bridges and synchronization of germ cell differentiation during oogenesis in the rabbit. *J Cell Biol*. 1968;36(1):276-282. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19806707.
4. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428(6979):145-150. doi:10.1038/nature02316
5. Rabinovici J, Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev*. 1990;11(4):532-557. doi:10.1210/edrv-11-4-532
6. Αγγελοπούλου Ρ. *Εμβρυολογία*. 2η Έκδοση. Αθήνα; 2006.
7. Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*. 2015;142(15):2554-2563. doi:10.1242/dev.125211
8. Ohno S, Smith JB. Role of Fetal Follicular Cells in Meiosis of Mammalian Oöcytes. *Cytogenet Genome Res*. 1964;3(5):324-333. doi:10.1159/000129821
9. Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*. 1965;208(5008):349-351. doi:10.1038/208349a0
10. Motta PM, Makabe S. Development of the ovarian surface and associated germ cells in the human fetus: A correlated study by scanning and transmission electron microscopy. *Obstet Gynecol Surv*. 1983;38(9):566-570. doi:10.1097/00006254-198309000-00013
11. Speed RM. The possible role of meiotic pairing anomalies in the atresia of human fetal oocytes. *Hum Genet*. 1988;78(3):260-266. doi:10.1007/BF00291673
12. Kurilo LF. Oogenesis in antenatal development in man. *Hum Genet*. 1981;57(1). doi:10.1007/BF00271175
13. Balen A, Higham J. *Reproductive Endocrinology for the MRCOG and beyond, Second*

Edition. (Balen A, ed.). Cambridge: Cambridge University Press; 2014. doi:10.1017/CBO9781139696920

14. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod*. 2016;31(5):926-937. doi:10.1093/humrep/dew027
15. Kalantari H, Madani T, Zari Moradi S, et al. Cytogenetic analysis of 179 Iranian women with premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol*. 2013;29(6):588-591. doi:10.3109/09513590.2013.788625
16. Jiao X, Qin C, Li J, et al. Cytogenetic analysis of 531 Chinese women with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2012;27(7):2201-2207. doi:10.1093/humrep/des104
17. Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*. 2007;87(3):456-465. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.09.004
18. Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 2010;25(5):1335-1338. doi:10.1093/humrep/deq058
19. Murray A, Schoemaker MJ, Bennett CE, et al. Population-based estimates of the prevalence of FMR1 expansion mutations in women with early menopause and primary ovarian insufficiency. *Genet Med*. 2014;16(1):19-24. doi:10.1038/gim.2013.64
20. Conway GS, Payne NN, Webb J, Murray A, Jacobs PA. Fragile X premutation screening in women with premature ovarian failure. *Hum Reprod*. 1998;13(5):1184-1187. doi:10.1093/humrep/13.5.1184
21. Jacquemont S, Hagerman RJ, Hagerman PJ, Leehey MA. Fragile-X syndrome and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome: two faces of FMR1. *Lancet Neurol*. 2007;6(1):45-55. doi:10.1016/S1474-4422(06)70676-7
22. Hagerman R, Hagerman P. Advances in clinical and molecular understanding of the FMR1 premutation and fragile X-associated tremor/ataxia syndrome. *Lancet Neurol*. 2013;12(8):786-798. doi:10.1016/S1474-4422(13)70125-X
23. Qin Y, Vujovic S, Li G, et al. Ethnic specificity of variants of the ESR1, HK3, BRSK1 genes and the 8q22.3 locus: No association with premature ovarian failure (POF) in Serbian women. *Maturitas*. 2014;77(1):64-67. doi:10.1016/j.maturitas.2013.09.006

24. Simpson JL. Genetic and Phenotypic Heterogeneity in Ovarian Failure. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1135(1):146-154. doi:10.1196/annals.1429.019

25. Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int*. 2009;15(2):72-75. doi:10.1258/mi.2009.009020

26. Chapman C, Cree L, Shelling AN. The genetics of premature ovarian failure: Current perspectives. *Int J Womens Health*. 2015;7:799-810. doi:10.2147/IJWH.S64024

27. Perry JRB, Corre T, Esko T, et al. A genome-wide association study of early menopause and the combined impact of identified variants. *Hum Mol Genet*. 2013;22(7):1465-1472. doi:10.1093/hmg/dds551

28. Silva CA, Yamakami LYS, Aikawa NE, Araujo DB, Carvalho JF, Bonfá E. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):427-430. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.003

29. Chen S, Sawicka J, Betterle C, et al. Autoantibodies to steroidogenic enzymes in autoimmune polyglandular syndrome, Addison's disease, and premature ovarian failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(5):1871-1876. doi:10.1210/jcem.81.5.8626850

30. Falorni A, Laureti S, Candeloro P, et al. Steroid-cell autoantibodies are preferentially expressed in women with premature ovarian failure who have adrenal autoimmunity. *Fertil Steril*. 2002;78(2):270-279. doi:10.1016/S0015-0282(02)03205-3

31. Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA. Premature Ovarian Failure and Ovarian Autoimmunity*. *Endocr Rev*. 1997;18(1):107-134. doi:10.1210/edrv.18.1.0291

32. Kim T. Routine Endocrine Screening for Patients With Karyotypically Normal Spontaneous Premature Ovarian Failure. *Obstet Gynecol*. 1997;89(5):777-779. doi:10.1016/S0029-7844(97)00077-X

33. Welt CK. Autoimmune Oophoritis in the Adolescent. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1135(1):118-122. doi:10.1196/annals.1429.006

34. Goswami R, Marwaha RK, Goswami D, et al. Prevalence of Thyroid Autoimmunity in Sporadic Idiopathic Hypoparathyroidism in Comparison to Type 1 Diabetes and Premature Ovarian Failure. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4256-4259. doi:10.1210/jc.2006-1005

35. Kokcu A. Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecol Endocrinol*. 2010;26(8):555-562. doi:10.3109/09513590.2010.488773

36. Venza M, Visalli M, Venza I, et al. Altered binding of MYF-5 to FOXE1 promoter in non-syndromic and CHARGE-associated cleft palate. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(1):18-23. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00726.x

37. Zannini M, Avantaggiato V, Biffali E, et al. TTF-2 , a new forkhead protein , shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. 1997;16(11):3185-3197.

38. Romanelli MG, Tato' L, Lorenzi P, Morandi C. Nuclear localization domains in human thyroid transcription factor 2. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2003;1643(1-3):55-64. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.09.002

39. Castanet M, Polak M. Spectrum of human Foxe1/TTF-2 mutations. *Horm Res Paediatr*. 2010;73(6):423-429. doi:10.1159/000281438

40. Carré A, Castanet M, Sura-Trueba S, et al. Polymorphic length of FOXE1 alanine stretch: Evidence for genetic susceptibility to thyroid dysgenesis. *Hum Genet*. 2007;122(5):467-476. doi:10.1007/s00439-007-0420-5

41. Ortiz L, Zannini M, Lauro R Di, Santisteban P. Transcriptional Control of the Forkhead Thyroid Transcription Factor TTF-2 by Thyrotropin , Insulin , and Insulin-like Growth Factor I *. 1997;272(37):23334-23339.

42. Sequeira M, Al-Khafaji F, Park SM, et al. Production and Application of Polyclonal Antibody to Human Thyroid Transcription Factor 2 Reveals Thyroid Transcription Factor 2 Protein Expression in Adult Thyroid and Hair Follicles and Prepubertal Testis. *Thyroid*. 2003;13(10):927-932. doi:10.1089/105072503322511328

43. Trueba SS, Augé J, Mattei G, et al. PAX8, TITF1, and FOXE1 gene expression patterns during human development: New insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(1):455-462. doi:10.1210/jc.2004-1358

44. Abu-Khudir R, Magne F, Chanoine JP, Deal C, Van Vliet G, Deladoëy J. Role for tissue-dependent methylation differences in the expression of FOXE1 in nontumoral thyroid

glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):1-19. doi:10.1210/jc.2013-4414

45. Perrone L, Pasca di Magliano M, Zannini M, Di Lauro R. The thyroid transcription factor 2 (TTF-2) is a promoter-specific DNA-binding independent transcriptional repressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;275(1):203-208. doi:10.1006/bbrc.2000.3232
46. Cuesta I, Zaret KS, Santisteban P. The Forkhead Factor FoxE1 Binds to the Thyroperoxidase Promoter during Thyroid Cell Differentiation and Modifies Compacted Chromatin Structure. *Mol Cell Biol*. 2007;27(20):7302-7314. doi:10.1128/mcb.00758-07
47. Montesinos M del M, Nicola JP, Nazar M, et al. Nitric oxide-repressed Forkhead factor FoxE1 expression is involved in the inhibition of TSH-induced thyroid peroxidase levels. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;420:105-115. doi:10.1016/j.mce.2015.11.020
48. López-Márquez A, Fernández-Méndez C, Recacha P, Santisteban P. Regulation of Foxe1 by Thyrotropin and Transforming Growth Factor Beta Depends on the Interplay between Thyroid-Specific, CREB and SMAD Transcription Factors. *Thyroid*. 2019;29(5):714-725. doi:10.1089/thy.2018.0136
49. Hishinuma A, Ohmika N, Namatame T, Ieiri T. TTF-2 stimulates expression of 17 genes, including one novel thyroid-specific gene which might be involved in thyroid development. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;221(1-2):33-46. doi:10.1016/j.mce.2004.04.003
50. Venza I, Visalli M, Parrillo L, de Felice M, Teti D, Venza M. MSX1 and TGF-β3 are novel target genes functionally regulated by FOXE1. *Hum Mol Genet*. 2011;20(5):1016-1025. doi:10.1093/hmg/ddq547
51. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet*. 1998;19(4):399-401. doi:10.1038/1294
52. Carré A, Hamza RT, Kariyawasam D, et al. A novel FOXE1 mutation (R73S) in bamforth-lazarus syndrome causing increased thyroidal gene expression. *Thyroid*. 2014;24(4):649-654. doi:10.1089/thy.2013.0417
53. Pimentel CP, Cortinhas-Alves EA, De Oliveira EHC, Santana-Da-Silva LC. Does the Polymorphism in the Length of the Polyalanine Tract of FOXE1 Gene Influence the Risk of Thyroid Dysgenesis Occurrence? *J Thyroid Res*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/2793205

54. Szczepanek E, Ruchala M, Szaflarski W, et al. FOXE1 polyalanine tract length polymorphism in patients with thyroid hemiagenesis and subjects with normal thyroid. *Horm Res Paediatr*. 2011;75(5):329-334. doi:10.1159/000322874
55. Moreno LM, Mansilla MA, Bullard SA, et al. FOXE1 association with both isolated cleft lip with or without cleft palate, and isolated cleft palate. *Hum Mol Genet*. 2009;18(24):4879-4896. doi:10.1093/hmg/ddp444
56. Lammer EJ, Mohammed N, Iovannisci DM, Ma C, Lidral AC, Shaw GM. Genetic variation of FOXE1 and risk for orofacial clefts in a California population. *Am J Med Genet Part A*. 2016;170(11):2770-2776. doi:10.1002/ajmg.a.37871
57. Imani MM, Safaei M, Lopez-Jornet P, Sadeghi M. A systematic review and meta-analysis on protective role of forkhead box E1 (FOXE1) polymorphisms in susceptibility to non-syndromic cleft lip/palate. *Int Orthod*. 2019;17(3):437-445. doi:10.1016/j.ortho.2019.06.026
58. Xiao W lin, Jia K ning, Yu G, Zhao N. Association between forkhead box E1 polymorphisms and risk of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate: A meta-analysis. *Orthod Craniofacial Res*. 2020;23(2):151-159. doi:10.1111/ocr.12366
59. Sequeira MJ, Morgan JM, Fuhrer D, Wheeler MH, Jasani B, Ludgate M. Thyroid transcription factor-2 gene expression in benign and malignant thyroid lesions. *Thyroid*. 2001;11(11):995-1001. doi:10.1089/105072501753271662
60. Bychkov A, Saenko V, Nakashima M, et al. Patterns of FOXE1 expression in papillary thyroid carcinoma by immunohistochemistry. *Thyroid*. 2013;23(7):817-828. doi:10.1089/thy.2012.0466
61. Ding Z, Ke R, Zhang Y, Fan Y, Fan J. FOXE1 inhibits cell proliferation, migration and invasion of papillary thyroid cancer by regulating PDGFA. *Mol Cell Endocrinol*. 2019;493(600):110420. doi:10.1016/j.mce.2019.03.010
62. Morillo-Bernal J, Fernández LP, Santisteban P. FOXE1 regulates migration and invasion in thyroid cancer cells and targets ZEB1. *Endocr Relat Cancer*. 2020;27(3):137-151. doi:10.1530/ERC-19-0156
63. Zhang P, Zuo H, Nakamura Y, Nakamura M, Wakasa T, Kakudo K. Immunohistochemical

analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol Int*. 2006;56(5):240-245. doi:10.1111/j.1440-1827.2006.01959.x

64. Nonaka D, Tang Y, Chiriboga L, Rivera M, Ghossein R. Diagnostic utility of thyroid transcription factors Pax8 and TTF-2 (FoxE1) in thyroid epithelial neoplasms. *Mod Pathol*. 2008;21(2):192-200. doi:10.1038/modpathol.3801002

65. Landa I, Ruiz-Llorente S, Montero-Conde C, et al. The variant rs1867277 in FOXE1 gene confers thyroid cancer susceptibility through the recruitment of USF1/USF2 transcription factors. *PLoS Genet*. 2009;5(9):5-10. doi:10.1371/journal.pgen.1000637

66. Bullock M, Duncan EL, O'Neill C, et al. Association of FOXE1 polyalanine repeat region with papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):1814-1819. doi:10.1210/jc.2012-1456

67. Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, et al. Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations. *Nat Genet*. 2009;41(4):460-464. doi:10.1038/ng.339

68. Kang J, Deng XZ, Fan Y Ben, Wu B. Relationships of FOXE1 and ATM genetic polymorphisms with papillary thyroid carcinoma risk: A meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014;35(7):7085-7096. doi:10.1007/s13277-014-1865-5

69. Chen YH, Zhang YQ. Exploration of the association between FOXE1 gene polymorphism and differentiated thyroid cancer: A meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2018;19(1):1-10. doi:10.1186/s12881-018-0604-y

70. Raimundo J, Alvelos MI, Azevedo T, Martins T, Rodrigues FJ, Lemos MC. Association of FOXE1 polyalanine repeat region with thyroid cancer is dependent on tumour size. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2017;86(2):243-246. doi:10.1111/cen.13166

71. Bullock M, Lim G, Li C, et al. Thyroid transcription factor foxe1 interacts with ets factor elk1 to co-regulate tert. *Oncotarget*. 2016;7(52):85948-85962. doi:10.18632/oncotarget.13288

72. Sugimachi K, Matsumura T, Shimamura T, et al. Aberrant Methylation of FOXE1 Contributes to a Poor Prognosis for Patients with Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(12):3948-3955. doi:10.1245/s10434-016-5289-x

73. Dai W, Meng X, Mo S, et al. FOXE1 represses cell proliferation and Warburg effect by inhibiting HK2 in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):1-13. doi:10.1186/s12964-019-0502-8
74. Eichberger T, Regl G, Ikram MS, et al. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2, is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(5):1180-1187. doi:10.1111/j.0022-202X.2004.22505.x
75. Venza I, Visalli M, Tripodo B, Lentini M, Teti D, Venza M. Investigation into FOXE1 genetic variations in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2010;162(3):681-683. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09557.x
76. Venza I, Visalli M, Tripodo B, et al. FOXE1 is a target for aberrant methylation in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2010;162(5):1093-1097. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09560.x
77. Zhang J, Yang Y, Yang T, et al. Double-negative feedback loop between MicroRNA-422a and forkhead box (FOX)G1/Q1/E1 regulates hepatocellular carcinoma tumor growth and metastasis. *Hepatology*. 2015;61(2):561-573. doi:10.1002/hep.27491
78. Sato N, Fukushima N, Maitra A, et al. Discovery of novel targets for aberrant methylation in pancreatic carcinoma using high-throughput microarrays. *Cancer Res*. 2003;63(13):3735-3742.
79. Park E, Gong EY, Romanelli MG, Lee K. Suppression of estrogen receptor-alpha transactivation by thyroid transcription factor-2 in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;421(3):532-537. doi:10.1016/j.bbrc.2012.04.039
80. Watkins WJ, Harris SE, Craven MJ, et al. An investigation into FOXE1 polyalanine tract length in premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(3):145-149. doi:10.1093/molehr/gal017
81. Qin C rong, Yao J long, Zhu W jie, Wu W qing, Xie J sheng. FOXE1 polyalanine tract length screening by MLPA in idiopathic premature ovarian failure. *Reprod Biol Endocrinol*. 2011;9(1):158. doi:10.1186/1477-7827-9-158
82. Settas N., Michala L., Deligeoroglou E., Chrysis D., Pampanos A., Theochari E., Valla O., Sofocleous C., Kitsiou S., Fryssira H., Kanavakis E., Dacou-Voutetakis C., Chrousos G. VA.

Co-Existing Variants of FOXE1 and BMP15 Genes in Young Females with Primary Ovarian Insufficiency: Evidence of Digenic Inheritance. *ESPE Abstr*. 2015;54. doi:10.3252/pso.eu.54espe.2015

83. Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, et al. Evolution and expression of FOXL2 [1]. *J Med Genet*. 2002;39(12):916-921. doi:10.1136/jmg.39.12.916

84. De Baere E, Beysen D, Oley C, et al. FOXL2 and BPES: Mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet*. 2003;72(2):478-487. doi:10.1086/346118

85. Harris SE. Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod*. 2002;8(8):729-733. doi:10.1093/molehr/8.8.729

86. Karlin S, Burge C. Trinucleotide repeats and long homopeptides in genes and proteins associated with nervous system disease and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(4):1560-1565. doi:10.1073/pnas.93.4.1560