

ارتباط پروتئین‌های β -catenin و GSK3 β با رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان طبیعی و تخمدان پلی‌کیستیک القا شده با تستوسترون پروپیونات در رت

ندا جروقی (M.Sc.)، قمرتاج حسین (Ph.D.)، فرناز جان نثاری لادانی (M.Sc.)

- گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: مسیر سیگنال‌دهی Wnt نقش مهمی در فولیکولوژنز تخمدان جوانان ایفا می‌کند. ولی نقش آن در رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. نظر به اهمیت آپوپتوز در هموستاز و عملکرد بیولوژیک تخمدان، در این مطالعه به بررسی دخالت سیگنال‌دهی Wnt/ β catenin در توقف رشد فولیکولی و آپوپتوز در مدل PCO موش بزرگ آزمایشگاهی (رت) پرداخته شده است.

روش بررسی: القا PCO در رت‌های ماده نابالغ توسط تزریق روزانه تستوسترون پروپیونات (TP) حل شده در روغن کنجد به مدت یک و یا چهار هفته انجام و به گروه کنترل در طی این مدت حلال تزریق شد. آزمایشها در ۳ سری مستقل طراحی شدند. در هر سری هشت رت برای هر دوره زمانی (یک و چهار هفته) مورد بررسی قرار گرفت که به دو گروه چهار تایی تیمار شده و کنترل تقسیم شدند. پس از اتمام دوره تیمار، تخمدانها تثبیت و برش‌های پارافینی پیاپی جهت آنالیز ایمونوهیستوشیمی پروتئین‌های GSK3 β ، β -catenin و pGSK3 β ^{Ser9} آماده گردید. بررسی بیان Sfrp4 به عنوان یکی از آنتاگونیست‌های مسیر Wnt signaling با روش وسترن بلات انجام شد. بررسی آپوپتوز با روش TUNEL و سپس شمارش فولیکول‌های آپوپتوتیک در هر گروه انجام شد. داده‌های بررسی کمی آپوپتوز با استفاده از Mann-Whitney U-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اختلاف آماری در سطح $p < 0.05$ معنی‌داری در نظر گرفته شده و میانه نیز محاسبه و ذکر گردید.

نتایج: در بررسی هیستولوژی تخمدان رت‌های تیمار شده فولیکول‌های کیستیک، عدم وجود جسم زرد و تخمک‌گذاری مشاهده گردید. بیان GSK3 β در فولیکول‌های آپوپتوتیک گروه PCO و کنترل مشاهده و هم مکانی بین β -catenin هسته‌ای با pGSK3 β ^{Ser9} در رت‌های تیمار یک هفته‌ای و گروه کنترل دیده شد. بررسی به روش TUNEL نشانگر افزایش معنی‌دار ($p < 0.01$) میزان آپوپتوز در تمامی دستجات فولیکول‌های تخمدان رت‌های تیمار دراز مدت (چهار هفته) نسبت به تیمار یک هفته بود. در تیمار دراز مدت با TP، افزایش آپوپتوز و بیان بالای GSK3 β در سلول‌های گرانولوزا همراه با افزایش ۵/۱ بار بیان Sfrp4 در مقایسه با کنترل مشاهده شد که می‌تواند دلیلی برای عدم حضور β -catenin هسته‌ای در این سلولها باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشانگر القا تخمدان پلی کیستیک در رت نابالغ با استفاده از TP است. علاوه بر این افزایش بیان Sfrp4 و GSK3 β در تیمار دراز مدت با TP وابسته به افزایش آپوپتوز بوده است. این نتایج می‌تواند نشانگر مهار مسیر Wnt signaling در رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان جوانان باشد.

کلید واژگان: آپوپتوزیس، تخمدان پلی کیستیک (PCO)، تستوسترون، β -catenin، GSK3 β ، Sfrp4، Wnt signaling.

مسئول مکاتبه: دکتر قمرتاج حسین، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، صندوق پستی:

۱۴۱۵۵-۶۴۵۵، تهران، ایران

پست الکترونیک: ghossein@khayam.ut.ac.ir

دریافت: ۸۷/۳/۲۵ پذیرش: ۸۷/۶/۱۶

زمینه و هدف

خانواده مولکول‌های Wnt گلیکوپروتئین‌های ترشحی و دارای چندین بخش غنی و حفاظت شده سیستئینی می‌باشند که در فرآیندهای متنوعی مثل القاءات جنینی، تعیین قطبیت سلولها و تعیین تخصصی شدن سرنوشت سلولها دخالت دارند. دریافت و ارسال سیگنال‌های Wnt در نتیجه اتصال پروتئین‌های Wnt به گیرنده‌های عرض‌غشایی خانواده fzd¹ به کمک اعضای خانواده پروتئینها وابسته به گیرنده LDL²، بنام LRP³ انجام می‌شود (۱). تاکنون ۱۹ نوع پروتئین Wnt و ۱۰ نوع گیرنده fzd شناخته شده است، این تنوع باعث پیچیدگی سیستم Wnt signaling شده، به طوری که آبشار درون سلولی Wnt signaling وابسته به ترکیب کمپلکس Wnt-fzd است (۱).

مسیر سیگنال‌دهی Wnt از طریق سه آبشار درون سلولی القا می‌شود که شامل ۱- مسیر اصلی^۴ Wnt/ β -catenin، ۲- مسیر Wnt/polarity و ۳- مسیر Wnt/ Ca^{2+} می‌باشند. در مسیر Wnt/ β -catenin اتصال Wnt به fzd موجب هیپرفسفریله شدن پروتئین سیتوپلاسمی به نام Dvl^۵ و منجر به مهار فعالیت سرین- ترئونین کیناز به نام گلیکوژن سنتاز کیناز ۳- بتا (GSK3- β) با فسفریله کردن آن در ناحیه Ser-9 می‌شود. این امر در نهایت منجر به آزادسازی و تثبیت β -catenin و در نتیجه افزایش آن در سیتوپلاسم سلول می‌شود. β -catenin وارد هسته شده و با اعضای (Tcf/Lef) از خانواده عوامل برداری هترودایمر می‌شود و بیان ژن‌های هدف از جمله cyclin-D1 و c-myc را تنظیم می‌کند. در حالیکه در غیاب مولکول‌های Wnt، GSK3- β از طریق مولکولی به نام Axin به

کمپلکس β -catenin و APC متصل می‌شود و با فسفریلاسیون β -catenin منجر به تخریب سریع آن توسط فرآیند Ubiquitination می‌شود (۱). کنترل فعالیت Wnt signaling نه تنها وابسته به نوع کمپلکس Wnt-fzd است، بلکه توسط آنتاگونیست‌هایش نیز تنظیم می‌گردد (۲). بزرگترین خانواده آنتاگونیست Wnt، خانواده Sfrps^۶ است که تاکنون پنج نوع آن (-2، -1، Sfrp1، 3، 4، 5) گزارش شده و چگونگی مکانیسم اثر این آنتاگونیستها تحت بررسی است. گزارشها حاکی از نقش آنتاگونیستی Sfrps به دلیل قابلیت اتصال آنها از یک طرف به مولکول‌های Wnt و از طرف دیگر به رسپتورهای fzd می‌باشد و بدین ترتیب از ایجاد کمپلکس Wnt-fzd جلوگیری به عمل می‌آورد (۳). به تازگی نقش آگونیستی نیز برای Sfrp1 گزارش شده است به طوری که نوع فعالیت آن بسته به میزان غلظت آن دارد؛ یعنی در غلظت پایین باعث پیشبرد Wnt/ β -catenin signaling و در غلظت بالا باعث مهار آن می‌شود (۴). بنابراین با توجه به انواع Wnt و رسپتورها و همچنین آنتاگونیست‌هایش چنین به نظر می‌رسد که فعالیت مسیر Wnt signaling در تخمدان تحت تأثیر هورمون‌های مختلف اثرات فیزیولوژیکی مختلفی را به همراه داشته باشد.

برهم کنش آبشارهای سیگنال‌دهی هورمون‌های پبیدی و استروئیدی، برای رشد فولیکولی، تخمک‌گذاری و تشکیل جسم زرد حیاتی است. از جمله مهم‌ترین مسیرهای سیگنال‌دهی که در تکوین راه‌های تناسلی ماده و در اعمال طبیعی تخمدان نقش دارد مسیر سیگنال‌دهی Wnt است (۵). به تازگی نقش فعال Wnt signaling در فرآیند فولیکولوژنز تخمدان جواندگان گزارش شده است. در این مطالعات افزایش بیان Wnt-4 و رسپتورهای fz-1 و fz-4 در سلول‌های گرانولوزا و تکا قبل از تخمک‌گذاری گزارش شده است (۶). از طرفی بیان بالای یک آنتاگونیست Wnt بنام Sfrp-4 در جسم

- 1- Frizzled
- 2- Low Density Lipoprotein
- 3- Low Density Lipoprotein Related Receptor Protein
- 4- Canonical
- 5- Dishevelled
- 6- Secreted frizzled- related protein

مکان سیتوپلاسمی و یا هسته ای β -catenin در سلول منوط به مهار فعالیت β -GSK3 با فسفریله شدن Ser-9 گزارش شده است (۱). لذا با استفاده از روش‌های ایمنوهیستوشیمیایی بیان و مکان سلولی β -GSK3^{Ser9}، β -catenin و GSK3 β مورد ارزیابی قرار گرفت و وابستگی این پروتئینها با فرآیند آپوتوز در تخمدان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

تیمار حیوانات: رت‌های ماده نابالغ از نژاد Wistar با وزن ۵۰g-۴۰g از حیوانخانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند. رت‌ها در قفس‌های جداگانه در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در محدوده حرارتی $22 \pm 2^\circ\text{C}$ و دسترسی به مقادیر دلخواه آب و غذا نگهداری شدند.

موشها در سه سری مستقل تیمار شدند. تیمار و مطالعه در هر سری در دو گروه چهارتایی تیمار و کنترل انجام شد که در نهایت شامل دوازده نمونه تیمار (۱ هفته/۴ هفته) و دوازده نمونه کنترل (۱ هفته/۴ هفته) بود. گروه تیمار روزانه با تزریق زیرجلدی تستوسترون پروپیونات (TP) حل شده در روغن کنجد به میزان ۱mg به ازای هر ۱۰۰g وزن بدن به مدت یک یا چهار هفته تیمار شدند (۱۲)، در مقابل به گروه کنترل در طی این مدت روغن کنجد تزریق شد. در پایان تیمار، حیوانات هر گروه کشته و یک تخمدان برای مطالعات هیستولوژی، آنالیزهای ایمنوهیستوشیمی و آپوتوزیس مورد استفاده قرار گرفت و تخمدان دیگر بلافاصله در ازت مایع منجمد شده و در دمای -70°C به منظور ارزیابی و سترن بلات نگهداری شد.

آنالیز هیستولوژی: پس از تثبیت نمونه‌های بافتی در پارافرمالدهید ۴٪ حل شده در بافر فسفات (PBS) به مدت ۱۶-۱۴ ساعت، نمونه‌ها توسط محلول‌های الکل با درجات صعودی ۲۰٪ تا ۱۰۰٪ در هر کدام برای مدت

زرد مشاهده شده است که به نظر می‌رسد در عملکرد بیولوژیک جسم زرد و همچنین در تحلیل آن به واسطه رویدادهای آپوتوتیک دخالت دارد (۷).

سندرم تخمدان پلی کیستیک (PCOS) یکی از اختلالات هورمونی زنان در سنین باروری است که ۵ تا ۱۰٪ آنان را در این سنین شامل می‌شود. علائم این سندرم شامل پرمویی و آکنه که به دلیل تولید زیاد آندروژن است و نیز اختلالات قاعدگی، عدم تخمک‌گذاری و ناباروری می‌باشد (۸). در PCOS، توقف رشد فولیکولها و در نتیجه تجمع فولیکول‌های کوچک، وجود فولیکول‌های کیستیک و افزایش حجم استرومای تخمدان مشاهده می‌شود. این سندرم در دراز مدت موجب اختلالات متابولیکی مانند دیابت نوع II، افزایش چربی خون، افزایش فشار خون و عارضه‌های قلبی-عروقی می‌شود (۹).

یافته‌های حاصل از ارزیابی انبوه بیان ژنها^۱ در زنان مبتلا به PCOS نشانگر اختلال سیگنال‌دهی Wnt در این بیماران است (۱۰). Wood و همکاران (۱۰) افزایش بیان DKK1^2 و Sfrp4 ، دو مولکول آنتاگونیست Wnt و کاهش بیان Wnt5A را در سلول‌های تکا ایزوله شده زنان PCOS را نشان داده‌اند. ولیکن نقش مسیر سیگنال‌دهی Wnt/β -catenin در رویدادهای آپوتوتیک تخمدان کاملاً ناشناخته و تاکنون گزارشی مبنی بر نقش اجزا Wnt signaling و ارتباط آنها با توقف رشد فولیکولها و آپوتوزیس در PCOS ارائه نشده است. لذا در این مطالعه با ایجاد مدل PCOS در رت ابتدا تغییرات مورفولوژیکی ایجاد شده نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. در مرحله دوم، با توجه به وابستگی Sfrp4 با رویدادهای آپوتوتیک (۱۱) و گزارش حاکی از افزایش بیان ژن آن در زنان PCOS (۱۰) آنالیز و سترن بلات Sfrp4 در مدل PCOS رت مورد بررسی قرار گرفت.

1- Polycystic Ovary Syndrome
2- Microarray Gene Profiling
3- Dickkopf 1

از کیت Vectastain ABCComplex و نشانگر دی آمینوبنزیدین (DAB)، (Vector Laboratories, UK)، با ایجاد رسوب قهوه‌ای انجام گرفت. سپس آنالیز برشها با میکروسکوپ نوری (Axiophot Zeiss, Germany) انجام شد.

ارزیابی TUNEL: بازیابی آنتی‌ژنی و بلوکه کردن مکان‌های اتصال غیراختصاصی به شرح بالا انجام شد. سپس برشها با مخلوط واکنش TUNEL (Roche, Germany) حاوی آنزیم Tdt و نوکلئوتیدهای نشاندار شده با فلورسئین به مدت ۲ ساعت در دمای 37°C در اتاق تاریک و مرطوب انکوبه شدند. در کنترل منفی، برشها با مخلوط واکنش TUNEL در غیاب آنزیم Tdt انکوبه شدند. پس از شستشو در PBS، برشها در مجاورت ۴٪ BSA-PBS به مدت نیم ساعت مجاور و سپس با آنتی‌بادی ضد فلورسئین کونژوگه با HRP^۲ به مدت ۳۰ دقیقه در 37°C انکوبه شدند. آشکارسازی با استفاده از نشانگر DAB انجام شد، سپس برشها با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند.

ارزیابی وسترن بلات: در این آنالیز سه تخمدان در هر گروه در یک لوله قرار داده و توسط محلول لیز بافت (pH=7.2، ۲۰۰mM Tris-HCl، ۱۵۰mM، گلیسرول ۱۰٪، NP-40 ۱٪، سدیم فلوراید ۱۰۰mM، سدیم اورتوانادات ۸mM، EDTA ۸mM، PMSF ۱mM) به خوبی هموژن شد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰g در دمای 4°C سانتریفیوژ و محلول شفاف فوقانی جهت آنالیز وسترن بلات استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها، از معرف برادفورد (کوماسی بلو ۱۰٪، ۵٪ اتانل ۹۵٪ و ۱۰٪ اسید فسفریک ۸۵٪) استفاده شد. نمونه‌ها در ژل

۴۵ دقیقه تا یک ساعت آگیری و سپس درالکل-زایلین (۵۰:۵۰) و زایلین (سه بار) شفاف‌سازی و با پارافین قالب‌گیری شدند. سپس نمونه‌ها با میکروتوم به قطر $7\mu\text{m}$ برش‌گیری و برشها بر روی لام‌های پوشیده شده با ژلاتین یا پلی‌ال لایزین ۱٪ (برای آنالیز ایمنوهیستوشیمی) قرار داده شدند. به منظور بررسی هیستولوژی، برشها پس از پارافین زدایی و آبدهی توسط محلول‌های الکل با درجات نزولی، با هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شده و با محلول اسید-الکل تمایز یافته سپس با اتوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز ایمنوهیستوشیمی: پس از پارافین زدایی و آبدهی برشها، برش‌های بافتی به منظور بازیابی آنتی‌ژنی، در بافر سیترات ۱۰mM با pH=۶ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای 90°C قرار گرفتند. حذف مکان‌های اتصال غیراختصاصی آنتی‌بادی اولیه با قرار دادن برشها در آلبوین سرم گاوی (سیگما) ۴٪ در PBS برای یک ساعت در دمای معمولی اتاق انجام شد. سپس برشها با آنتی‌بادی پلی‌کلونال بر ضد pGSK3 β^{Ser9} (۱:۳۰۰) (Santa Cruz, USA)، آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش ضد Total GSK3 β (۱:۳۰۰) (Santa Cruz, USA) و یا آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش ضد β -catenin (۱:۳۵۰) (اهدایی از طرف دکتر عرب نجفی، دانشگاه تهران) رقیق شده در ۴٪ BSA-PBS به مدت ۲۴ ساعت در 4°C در اتاق مرطوب و در کنترل منفی، برشها فقط با محلول ۴٪ BSA-PBS انکوبه شدند. پس از شستشو در PBS مهار فعالیت پراکسیداز سلولی با قرار دادن لامها در محلول هیدروژن پراکسیداز ۳٪/۰ در متانول به مدت ده دقیقه انجام شد. سپس لامها شسته و با آنتی‌بادی ثانویه برای β -catenin و آنتی‌بادی ثانویه برای pGSK3 β^{Ser9} ، GSK3 β همگی با رقت ۱:۳۰۰ به مدت یک ساعت در دمای معمولی اتاق در اتاق مرطوب انکوبه شدند. آشکارسازی با استفاده

1- Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
2- Horseradish peroxidase
3- Phenyl Methyl Sulfofluoride

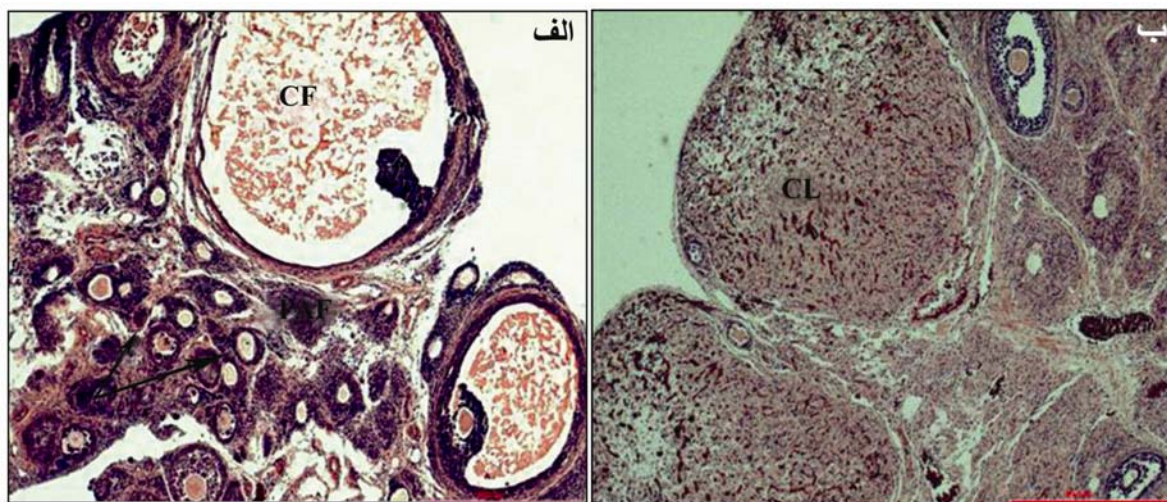
پروتئین نمونه‌ها در هر چاهک، غشاء با محلول 20mM Glycine (pH=2) به اضافه ۱٪ SDS استریپ شد و سپس با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش ضد بتا اکتینین (۱:۵۰۰) (Biovision, USA) انکوبه و آشکارسازی باندها به شرح بالا انجام شد. بررسی کمی میزان Sfrp4 با استفاده از دستگاه دانیسیتومتری (Kodak, England) و نرم افزار TotalLab صورت گرفت.

آنالیز آماری: برای آنالیز TUNEL و شمارش فولیکول‌های آپوپتوتیک آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و بکارگیری Mann-Whitney U-test انجام شد. $p \leq 0.05$ به عنوان اختلاف معنی‌دار محاسبه و میانه نیز محاسبه و گزارش شد.

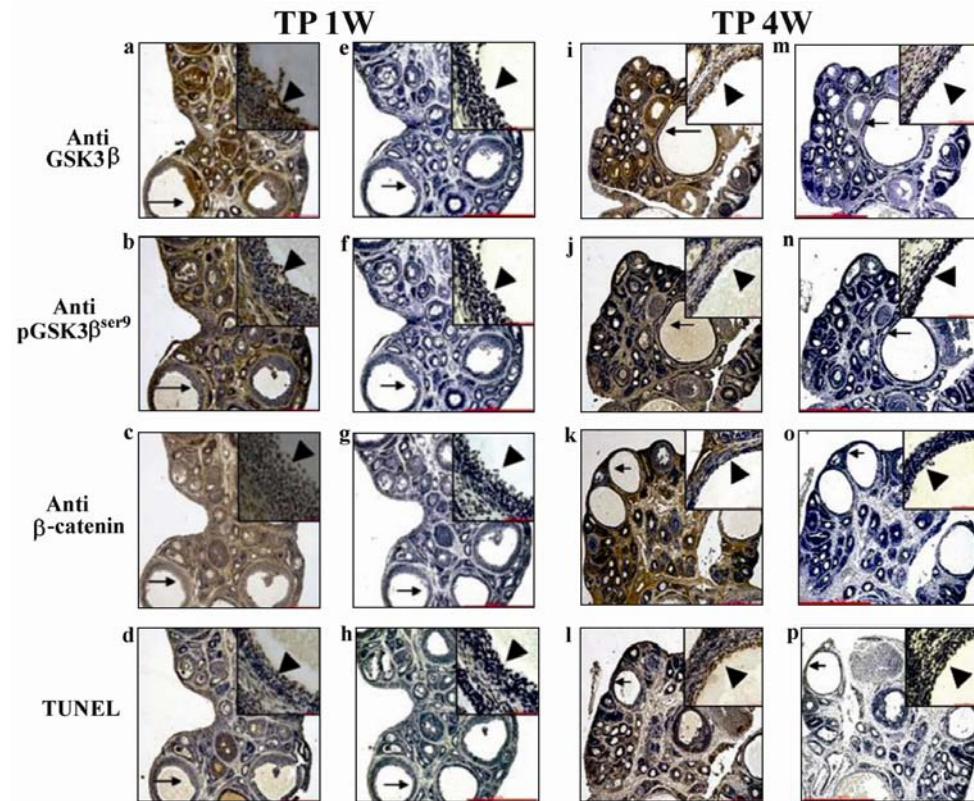
نتایج

آنالیز هیستولوژیک: در تخمدان‌های تیمار ۱ هفته و چهار هفته با TP، ویژگی‌های PCO مانند فولیکول‌های بزرگ کیستیک، تعداد زیادی فولیکول کوچک پری‌آنترال، افزایش حجم استروما و عدم تخمک‌گذاری مشاهده شد (شکل ۱-الف). در گروه کنترل مربوط به تیمار یک هفته، تخمدانها فاقد کیست و در رت بالغ (گروه کنترل تیمار چهار هفته) تخمدانها مملو از جسم زرد بودند که نشان‌دهنده تخمک‌گذاری طبیعی در این

SDS-PAGE ۱۰٪ الکتروفورز شدند. جهت بررسی صحت الکتروفورز و مشاهده باندهای پروتئین، رنگ‌آمیزی ژل توسط محلول روی-ایمیدازول (Imidazol 0.2 M+ ZnCl₂ 0.3M) به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت و سپس جهت رنگ بری به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ترانسفر (۰/۳٪ Tris-base + ۱/۴۴٪ glycine + ۱۰٪ متانول) شستشو داده شد. پروتئین‌های روی ژل توسط تانک ترانسفر مرطوب (BioRad, USA) به مدت ۹۰ دقیقه (۱۰۰ ولت) بر روی غشا PVDF منتقل شدند. پس از ترانسفر جهت اطمینان از انتقال پروتئینها غشا با رنگ قرمز پونسو (قرمز پونسو ۴٪، اسید استیک ۸٪) رنگ و بعد از مشاهده باندها، غشا با آب مقطر شستشو و یک ساعت در دمای اتاق با محلول Top block ۲/۵٪ (Jura, Switzerland) در PBS قرار داده شد. سپس با آنتی‌بادی پلی‌کلونال خرگوش ضد Sfrp4 (۱:۱۰۰۰) (اهدائی پروفیسور Friis از دانشگاه برن، سوئیس) در دمای ۴ °C به مدت یک شبانه روز انکوبه شد. پس از شستشوی غشا با PBS آنتی‌بادی ثانویه (۱:۳۰۰۰۰) کونژوگه با HRP (USACell Signaling,) به مدت یک ساعت بر روی غشا قرار گرفت و جهت ظهور باندها از محلول ECL (Millipore, USA) استفاده شد. به منظور اطمینان از یکسان بودن میزان



شکل ۱- آنالیز هیستولوژیک تخمدان رت‌های تیمار شده با TP در مقایسه با کنترل: برش‌های تخمدانی رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین و ائوزین (الف) تخمدان حیوانات تیمار شده با TP حاوی فولیکولهای کیستیک بزرگ و تعداد زیادی فولیکولهای پری آنترال کوچک (فلشها) است. (ب) تخمدان گروه کنترل رت بالغ مملو از جسم زرد می‌باشد. Bar=50 μm PAF: Preantral Follicle CF: Cystic Follicles; CL: Corpus Luteum.

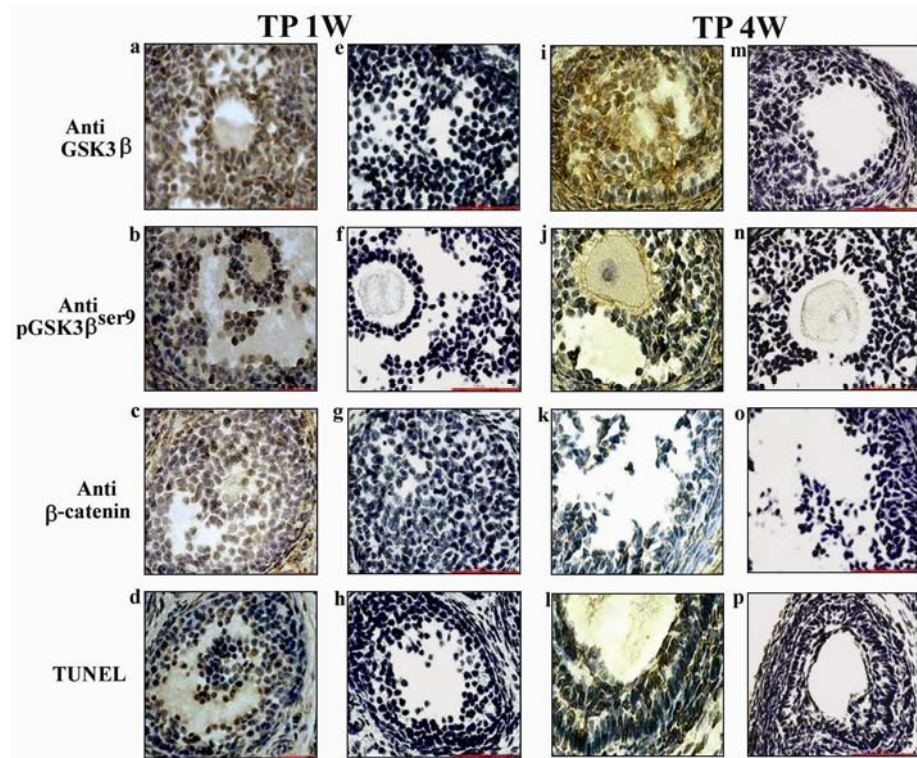


شکل ۲- ایمونولوکالیزاسیون β -catenin و $\text{pGSK3}\beta^{\text{Ser9}}$ و $\text{GSK3}\beta$ در تخمدانهای تیمار شده با آپوپتوز در رت PCO: برشهای متوالی تخمدان موش‌های تیمار شده با TP برای یک هفته (ستون اول) و چهار هفته (ستون دوم) با آنتی‌بادی‌های قید شده مورد بررسی قرار گرفتند. فلشها سلول‌های گرانولوزای رو به آنتروم در کیست‌ها را که در بزرگنمایی داخلی هر عکس نشان داده شده‌اند، نشان می‌دهند. کنترل منفی برای $\text{GSK3}\beta$ ، $\text{pGSK3}\beta^{\text{Ser9}}$ و β -catenin در ستون دوم و چهارم به ترتیب نشان داده شده است. $\text{Bar} = 50 \mu\text{m}$ و بزرگ‌نمایی‌های داخلی $\text{Bar} = 0.8 \mu\text{m}$

گروه است (شکل ۱-ب).
ارتباط آنها با آپوپتوز: تاکنون شواهدی برای دخالت $\text{GSK3}\beta$ در فرآیند آپوپتوز تخمدانی گزارش نشده و نظر به اهمیت آپوپتوز فیزیولوژیک در هموستاز تخمدان، نقش $\text{GSK3}\beta$ در این روند مورد بررسی قرار گرفت که در تخمدان تیمار یک هفته‌ای با TP، پروتئین $\text{GSK3}\beta$ در تمام مقاطع فولیکولی و استروما در سیتوپلاسم و یا هسته بیان گردید؛ ولی شدت بیان آن در فولیکول‌های کوچک (نخستین، اولیه و پیش آنترال کوچک) کمتر از فولیکول‌های پیش آنترال بزرگ و آنترال بود (شکل ۲a). سلول‌های گرانولوزا رو به حفره آنتروم بیان $\text{GSK3}\beta$ هسته‌ای و یا سیتوپلاسمی را نشان می‌دهند (شکل ۲a و بزرگنمایی داخل آن)، که کاملاً هم مکان با آپوپتوز رخ داده در این سلول‌ها می‌باشد

(شکل ۲d و بزرگنمایی داخل آن). در تخمدان تیمار چهار هفته‌ای با TP، بیان $\text{GSK3}\beta$ در تمام بخش‌های تخمدان قوی‌تر از تیمار یک هفته‌ای بود، و بیان آن در فولیکول‌های اولیه و نخستین نیز دیده می‌شد (شکل ۲i و بزرگنمایی داخل آن). بیان قویتر $\text{GSK3}\beta$ در تیمار چهار هفته‌ای نسبت به تیمار یک هفته‌ای با افزایش معنی‌دار درصد آپوپتوز (۱۰۰٪ در مقابل ۳۸٪) ($p < 0.001$) همراه بود (میانگین تیمار چهار هفته‌ای ۱ و تیمار یک هفته‌ای ۰/۲۵ محاسبه شد؛ شکل ۲d در مقایسه با ۲i). شکل ۳a و ۳i به ترتیب بیان قوی $\text{GSK3}\beta$ را در یک فولیکول پری آنترال آپوپتوتیک (شکل ۳d و ۳i) در تیمار یک هفته و چهار هفته با TP را نشان می‌دهند. این مشاهدات نشان داد که تیمار طولانی مدت با تستوسترون باعث افزایش معنی‌دار آپوپتوز نسبت به تیمار یک هفته ($p < 0.001$) همراه با افزایش

گروه است (شکل ۱-ب).
ارتباط آنها با آپوپتوز: تاکنون شواهدی برای دخالت $\text{GSK3}\beta$ در فرآیند آپوپتوز تخمدانی گزارش نشده و نظر به اهمیت آپوپتوز فیزیولوژیک در هموستاز تخمدان، نقش $\text{GSK3}\beta$ در این روند مورد بررسی قرار گرفت که در تخمدان تیمار یک هفته‌ای با TP، پروتئین $\text{GSK3}\beta$ در تمام مقاطع فولیکولی و استروما در سیتوپلاسم و یا هسته بیان گردید؛ ولی شدت بیان آن در فولیکول‌های کوچک (نخستین، اولیه و پیش آنترال کوچک) کمتر از فولیکول‌های پیش آنترال بزرگ و آنترال بود (شکل ۲a). سلول‌های گرانولوزا رو به حفره آنتروم بیان $\text{GSK3}\beta$ هسته‌ای و یا سیتوپلاسمی را نشان می‌دهند (شکل ۲a و بزرگنمایی داخل آن)، که کاملاً هم مکان با آپوپتوز رخ داده در این سلول‌ها می‌باشد



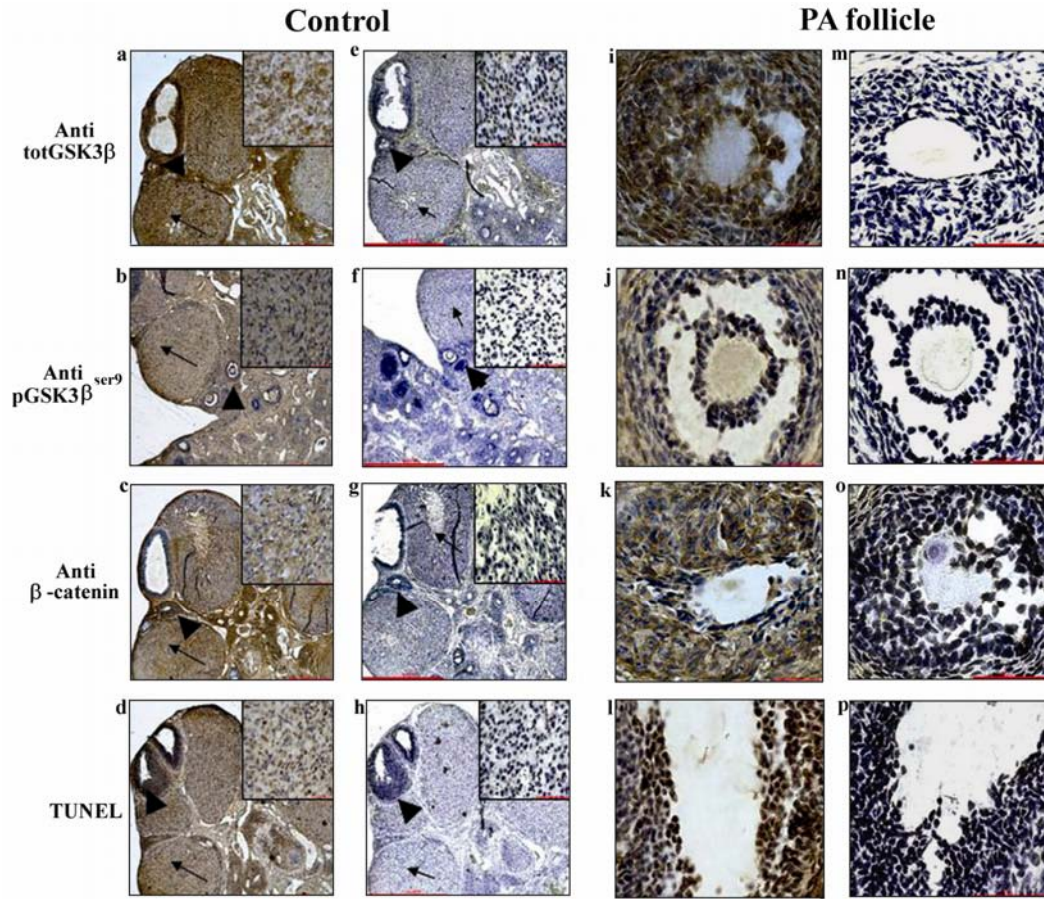
شکل ۳- آنالیز ایمنوهیستوشیمیکی β -catenin، pGSK3 β ^{Ser9}، GSK3 β در فولیکول پری آنترال آپوتوتیک رت PCO: برشهای پیایی تخمدان بیمار یک هفته (ستون اول) و چهار هفته (ستون سوم). کنترل منفی برای β -catenin؛ TUNEL در ستون دوم و چهارم به ترتیب نشان داده شده است. Bar=0.8 μ m

بیان β -catenin می‌شود.

مشاهده افزایش بیان β -catenin می‌تواند همراه با افزایش فرم فسفریله آن نیز باشد. از آنجایی که فرم فسفریله β -catenin یعنی فرم غیر فعال آن، نقش بسزایی در برآورداندازی مسیر Wnt/ β -catenin و یا برآورداندازی فعالیت Fas/Fas ligand در مسیر آپوپتوز خارجی ایفا می‌کند (۱۳)، بنابراین جایابی آن در برشهای پیایی دنبال شد. در بیمار یک هفته‌ای هم مکانی بین β -catenin و pGSK3 β ^{Ser9} در سلول‌های گرانوزا آپوتوتیک رو به حفره (بزرگنمایی داخل شکل‌های ۲a و ۲b) و نیز در فولیکول پری آنترال آپوتوتیک دیده شد (شکل ۳b و ۳a). در حالیکه در بیمار دراز مدت با TP رنگ‌آمیزی بسیار ضعیف pGSK3 β ^{Ser9} در بعضی از سلول‌های آپوتوتیک دیده می‌شود (شکل ۲i و ۲j) بر مبنای این مشاهدات به نظر می‌رسد که مهار β -catenin در بیمار طولانی مدت با تستوسترون کاهش می‌یابد.

در گروه کنترل نیز بیان β -catenin در فولیکول‌های آنترال، جسم زرد، استروما (شکل ۴a) و پیش آنترال بزرگ (شکل ۴i) دیده شد و مانند تخمدان موش‌های بیمار شده، pGSK3 β ^{Ser9} به میزان کمتری نسبت به β -catenin در سیتوپلاسم سلول‌های لوتئال بزرگ و سلول‌های آندوتلیال دیده شد (شکل ۴b و ۴j). هم مکانی β -catenin در سلول‌های آپوتوتیک در شکل ۴d و ۴i نشان داده شده است. آنالیز TUNEL تخمدان رت نابالغ (کنترل بیمار یک هفته‌ای) در مقایسه با رت بالغ (کنترل بیمار چهار هفته‌ای) نشانگر درصد بالای آپوپتوز در رت بالغ (۳۲٪) نسبت به کنترل رت نابالغ (۱۰٪) بوده (میانگین کنترل رت بالغ ۰/۴۸ و رت نابالغ ۰/۹ محاسبه شد) که این نتیجه کاملاً منطبق با افزایش بیان β -catenin در تخمدان رت‌های بالغ در مقایسه با تخمدان رت‌های نابالغ بود.

β -catenin به همراه E-cadherin در چسبندگی سلولی



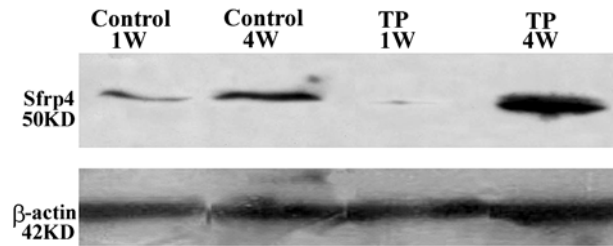
شکل ۴- آنالیز ایمنوهیستوشیمی GSK3 β , pGSK3 β ^{ser9}, β -catenin و آنالیز TUNEL در تخمدان کنترل: در برشهای متوالی تخمدان رتهای بالغ ستون اول دید کلی تخمدان با بزرگنمایی کوچک، فلشها جسم زرد و نوک فلشها یک فولیکول پری آنترال را در هر عکس نشان می‌دهند. ستون سوم رنگ‌آمیزی فولیکولهای پیش آنترال (PA) را نشان می‌دهد. عکسهای ضمیمه بزرگنمایی بالا را از مکان مشخص شده با فلش را نشان می‌دهند. کنترل منفی برای GSK3 β ؛ pGSK3 β ^{ser9} و β -catenin. TUNEL در ستون دوم و چهارم به ترتیب نشان داده شده است. Bar=50 μ m و بزرگنمایی‌های داخلی PA: Preantral Bar=0.8 μ m

مدت با تستوسترون باعث مهار و یا اختلال این مسیر شده است. ارزیابی انبوه بیان ژنها در سلول‌های تکا زنان PCO نشان‌دهنده افزایش بیان Sfrp4 بوده است (۱۰). در بررسی ایمنوهیستوشیمی انجام شده در آزمایشگاه، ما بیان افزایش یافته Sfrp4 را در تیمار دراز مدت در سطح سلول‌های گرانولوزا، تکا و استروما مشاهده کردیم (نتایج نشان داده نشده‌اند) بنابراین نتایج بدست آمده در این مطالعه، در ادامه این طرح بررسی کمی بیان Sfrp4 در تخمدان کنترل و PCO و ارتباطش با β -catenin و GSK3 β انجام شد.

بررسی بیان Sfrp4 در تخمدان کنترل و PCO: ارزیابی وسترن بلات Sfrp4 و بررسی کمی آن نشانگر ۲/۷ بار

نقش دارد. بنابراین همانطور که انتظار می‌رفت در تخمدان‌های موش‌های تیمار شده و کنترل نیز رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی قوی دیده شد، ولیکن بیان سیتوپلاسمی و هسته‌ای β -catenin فقط در سلول‌های آپوتوتیک دیده می‌شود (شکل ۲ و ۳ ردیف سوم). نکته جالب توجه کاهش شدت رنگ‌آمیزی β -catenin همانند pGSK3 β ^{ser9} در فولیکول‌های آپوتوتیک تیمار چهار هفته‌ای نسبت به یک هفته‌ای می‌باشد (شکل ۲c در مقایسه با ۲k و شکل ۲c در مقایسه با ۲k). براساس نتایج حاصل فسفریلاسیون GSK3 β می‌تواند به دنبال فعال شدن مسیر Wnt/ β catenin باشد که به نظر می‌رسد تیمار دراز

پروتئین tau در میکروتوبولها، β -catenin درگیر در مسیر Wnt signaling، عوامل رونویسی و پروتئین‌های دخیل در چرخه سلولی نیز از جمله سوبستراهای این کیناز شناخته شده‌اند (۱۳، ۱۴). مطالعات متعدد نقش GSK3 β را به عنوان عامل پیش برنده آپوپتوز در نوروها گزارش کرده‌اند (۱۵، ۱۶). این مطالعات نقش مستقیم GSK3 β در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز به واسطه فعال کردن پروتئین Bax و Caspase-3 را نشان داده‌اند (۱۷-۱۶). از طرفی دیگر افزایش فرم فسفریله آن در به راه اندازی مسیر خارجی آپوپتوز (Fas-FasL) به واسطه کاهش بیان فاکتور بقا NF kappa-B گزارش شده است (۱۸). دخالت GSK3 β در آپوپتوز با فعال کردن و افزایش ثبات P53 نیز گزارش شده است (۱۸). در این راستا لوکالیزاسیون هسته‌ای P53 در سلول‌های آپوپتوتیک تخمدان نشان داده شده است (۱۹) و در مطالعه حاضر نیز لوکالیزاسیون هسته‌ای GSK3 β مشاهده شد؛ بنابراین GSK3 β می‌تواند با اتصال به P53 نقش مهمی را در پیشبرد آپوپتوز در تخمدان ایفا کند. تاکنون تنها یک مطالعه در مورد نقش GSK3 β در رشد تخمک و فرآیندهای آپوپتوتیک وابسته به آن در هیدر^۱ گزارش شده است (۲۰) که نشانگر وابستگی افزایش بیان HyGSK3 (مشابه GSK3 β در پستانداران) با رویدادهای آپوپتوتیک در سلول‌های احاطه کننده تخمک بوده است. براساس نتایج مطالعه حاضر چنین به نظر می‌رسد که GSK3 β در تخمدان یک نقش حفاظت شده را در پیشبرد آپوپتوز ایفا می‌کند. از طرف دیگر فعالیت مسیر سیگنال‌دهی Protein kinase B/ Akt تحت تأثیر FSH نقش مهمی را در بقای سلول و جلوگیری از آپوپتوز دارد (۲۱). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر افزایش درصد آپوپتوز در مدل PCO همراه با رنگ‌آمیزی بسیار ضعیف pGSK3 β ^{Ser9} در تیمار دراز مدت با TP می‌تواند



شکل ۵- آنالیز وسترن بلات Sfrp4 در تخمدان PCO و کنترل: عصاره تخمدان رتها با آنتی‌بادی ضد Sfrp4 با روش وسترن بلات بررسی شد. از آنتی‌بادی ضد β -actin به عنوان استاندارد داخلی استفاده گردید.

افزایش میزان آن در تخمدان کنترل رت بالغ نسبت به کنترل رت نابالغ بود (شکل ۵). تیمار دراز مدت تستوسترون باعث افزایش ۵/۱ برابر بیان Sfrp4 در تخمدان رت‌های تیمار چهار هفته‌ای نسبت به میزان آن در کنترل یک هفته‌ای بوده است (شکل ۵). میزان افزایش Sfrp4 در تیمار دراز مدت نسبت به کنترل رت بالغ ۵/۱ می‌باشد. در حالیکه میزان Sfrp4 در تخمدان تیمار یک هفته‌ای نسبت به کنترل نابالغ کاهش ۰/۰۶ بار را نشان می‌دهد (شکل ۵).

بحث

تنظیم دقیق وقوع رویدادهای آپوپتوتیک در تکوین و هموستازی تخمدان بسیار حائز اهمیت است. تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر اختلال مسیر سیگنال دهی Wnt در توقف رشد فولیکولی و یا آپوپتوز، در مدل رت PCO القا شده با TP گزارش نشده است. بنابراین مطالعه حاضر به بررسی تأثیر تستوسترون روی بیان Sfrp4، GSK3 β و مکان درون سلولی β -catenin پرداخته است.

نتایج این مطالعه نشانگر همراهی GSK3 β و β -catenin در رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان رت است. در مطالعه حاضر افزایش بیان هسته‌ای و یا سیتوپلاسمی GSK3 β در فولیکول‌های آپوپتوتیک تخمدان طبیعی و PCO مشاهده شد. GSK3 β به عنوان یک سرین/ترئونین کیناز با سوبستراهای متعدد که اولین سوبسترای مشخص شده آن گلیکوژن سنتاز است؛ ولیکن امروزه

به دلیل مهار سیگنال‌دهی Akt باشد. گزارش جدید Constantinou و همکاران (۲۲) می‌تواند تاییدی برای این فرضیه باشد. آنها نشان داده‌اند که بیان بالای Sfrp4 در سلول‌های اپی‌تلیال پستان باعث مهار فسفریلاسیون Akt می‌شود. با توجه به مطالعات انجام شده و نتایج حاضر در این مطالعه بررسی دقیق فعالیت پروتئین‌های دخیل در مسیر خارجی و یا داخلی آپوپتوز و یا پروتئین‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی و ارتباط آنها با GSK3 β امکان درک بهتر نقش GSK3 β را در رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان را فراهم می‌کند. همچنین استفاده از پروتئین Sfrp4 امکان درک مکانیسم اثر Sfrp4 روی مسیرهای سیگنال‌دهی مهمی مانند Wnt و Akt را در تخمدان می‌دهد.

تاکنون اطلاعات واضحی راجع به اثر تستوسترون بر روی فسفریلاسیون و تغییر بیان کینازهای درون سلولی و یا اثرش بر روی بیان فاکتورهای رونویسی در تخمدان گزارش نشده است. وجود گیرنده آندروژنها در سلول‌های گرانولوزا، استروما و اوسیت‌چوندگان گزارش شده است (۲۳، ۲۴). Tetsuka و همکاران بیان بالای رسپتور آندروژن را در کومولوس و سلول‌های گرانولوزا، رو به آنتروم را نسبت به سلول‌های گرانولوزای دیواره‌ای گزارش کرده‌اند (۲۳). نقش آندروژن، در رشد فولیکولها و افزایش تعداد فولیکول‌های کوچک به خصوص فولیکول‌های پیش آنترال قبلاً گزارش شده است (۲۵) و در مدل PCO رت نیز شاهد افزایش تعداد فولیکول‌های پیش آنترال بوده‌ایم. از طرف دیگر در چوندگان آندروژنها باعث افزایش آپوپتوز نیز می‌شود (۲۶). در نتایج حاضر نیز افزایش میزان آپوپتوز در رت‌های تیمار شده با TP در سلول‌های گرانولوزای رو به آنتروم، استروما و کومولوس که دارای رسپتور آندروژن هستند نسبت به کنترل مشاهده شد.

β -catenin به عنوان جزئی از کمپلکس پروتئین

E-cadherin در چسبندگی بین سلولی گزارش شده است اما نقش مهمی را نیز در Wnt signaling ایفا می‌کند. Parakh و همکاران نقش مهم β -catenin را در مسیر سیگنال‌دهی FSH و القا آروماتاز را گزارش کرده‌اند. این مطالعه نشان داده است که فعالیت آروماتاز نیاز به اتصال β -catenin به ناحیه آغازگر ژن آروماتاز دارد (۲۷). گرچه Hsieh و همکاران تفاوتی در میزان β -catenin آزاد در سیتوپلاسم در موش بالغ نسبت به موش نابالغ مشاهده نکرده‌اند (۶). از طرف دیگر ثبات و تجمع هسته‌ای β -catenin در تومورزایی وابسته به افزایش فعالیت بعضی از مولکول‌های Wnt، ضروری گزارش شده است (۲۸). مطالعات معدودی نیز نقش پیش برنده آپوپتوز را برای β -catenin نشان داده‌اند (۳۰-۲۹). چنانچه در تخمدان افزایش β -catenin آزاد را مرتبط با آپوپتوز گزارش کرده‌اند (۳۱).

در سلول‌های اپی‌تلیال سطح تخمدان افزایش بیان E-cadherin و در نتیجه کاهش میزان سیتوپلاسمیک و هسته‌ای β -catenin را مرتبط با ترانسفورماسیون و ایجاد تومور اپی‌تلیوم سطح تخمدان گزارش کرده‌اند (۳۱). در سرطان تخمدان نیز با وجود افزایش بیان β -catenin آنرا در هسته سلول مشاهده نکرده‌اند و فقط به دور سلولها دیده شده است (۳۲). براساس گزارشها و نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر که نشانگر لوکالیزاسیون سیتوپلاسمی و یا هسته‌ای β -catenin در سلول‌های آپوپتوتیک در تخمدان رت‌های کنترل و تیمار یک هفته‌ای با TP می‌باشند، به نظر می‌رسد که افزایش سطوح β -catenin آزاد در سلول‌های گرانولوزا می‌تواند نقش مهمی را در پیشبرد آپوپتوز ایفا کند.

تاکنون پنج نوع Sfrps به عنوان آنتاگونیست Wnt signaling شناخته شده است (۳۳) که در میان آنها افزایش بیان Sfrp4 وابسته به رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان گزارش شده است (۳۳) ولیکن نقش غیر آپوپتوتیک و وابسته به لوتئینیزاسیون نیز برای آن

GSK3 β و β -catenin در رویدادهای آپوپتوتیک تخمدان می‌باشد. افزایش بیان GSK3 β کاملاً وابسته به آپوپتوز بوده درحالیکه به نظر می‌رسد ارتباط بین میزان β -catenin آزاد در سلول و آپوپتوز بستگی به میزان بیان Sfrp4 دارد. با توجه به اهمیت روز افزون درک بهتر مسیرهای دخیل در سیگنال‌دهی درون تخمدانی و اهمیت آن در روند فولیکولوژن بررسی مسیر و نقش دقیق Wnt signaling و همچنین ارتباطش با دیگر مسیرهای مهم سیگنال‌دهی مانند TGF β -signaling، Akt، Hedgehog می‌تواند کمک به‌سزایی برای درک بهتر مکانیسم مولکولی توقف رشد فولیکولها در سندرم PCO، عارضه از کار افتادگی زودرس تخمدان (POF) و یا در سندرم عدم تخمک‌گذاری فولیکول لوتئینه (LUF) باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از سرکار خانم دکتر حوری سپهری و جناب آقای دکتر بهمن زینلی از گروه فیزیولوژی جانوری دانشگاه تهران برای حمایت و تشویق بی دریغ در انجام این طرح، سرکارخانم فاطمه رضایی برای کمک در تیمار حیوانات، سرکار خانم لادن دلفی کارشناس آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری و Dr. A. de Agostini از دانشگاه ژنو سوییس برای کمکها و حمایت بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌نمایند. منابع مالی اجرای این طرح به شماره‌های ۶/۰۴/۲۶۸۳۰۸ و ۱/۰۱/۲۶۸۳۰۸ توسط دانشگاه تهران تامین گردیده است.

گزارش شده است (۷). آنالیز ایمنوهیستوشیمی انجام شده در مطالعه حاضر نیز افزایش معنی‌دار بیان Sfrp4 وابسته به آپوپتوز در تیمار دراز مدت با TP نسبت به تیمار یک هفته‌ای و کنترل را نشان داده است (این نتایج در این مطالعه نشان داده نشده‌اند). به همین دلیل محققین مطالعه حاضر انتظار داشتند که کاهش لوکالیزاسیون سیتوپلاسمیک و یا هسته‌ای β -catenin همچنین کاهش pGSK3 β ^{Ser9} در تیمار دراز مدت با TP در ارتباط با اختلال Wnt signaling در PCO باشد. بررسی کمی میزان بیان Sfrp4 و افزایش بیان آن در تیمار دراز مدت با TP نسبت به کنترل و تیمار یک هفته‌ای می‌تواند نشانگر مهار Wnt signaling در تیمار طولانی مدت باشد. از طرفی دیگر در ارزیابی وسترن بلات کاهش بیان Sfrp4 در تیمار یک هفته‌ای نسبت به کنترل آن قابل تامل و ملاحظه می‌باشد. در همین راستا Uren و همکاران (۴) نشان داده‌اند که بیان کم Sfrp1 نقش آگونیست Wnt signaling و افزایش β -catenin هسته‌ای را به دنبال دارد؛ در حالیکه افزایش میزان بیان Sfrp1 باعث مهار Wnt signaling و کاهش چشمگیر میزان β -catenin آزاد می‌شود. بر پایه این گزارش شاید Sfrp4 نیز در تخمدان بسته به میزان بیان آن بتواند نقش دوگانه‌ای را در تنظیم Wnt signaling بازی کند و همین دلیلی برای کاهش میزان β -catenin آزاد در تیمار دراز مدت باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر اولین گزارش دخالت مستقیم

References

- 1- Miller JR, The Wnts. Genome Biol. 2001;3(1):review.
- 2- Kawano K, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci. 2003;116:2627-34.

1- Premature ovarian failure

2- Luteinized Unruptured Follicle Syndrome

- 3- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Rios JL. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci.* 2008;121:737-46.
- 4- Uren AU, Reichsman F, Anest V, Taylor WG, Muraiso K, Bottaro DP, et al. Secreted Frizzled-related Protein-1 binds directly to wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2000;275:4374-82.
- 5- Richards SJ, Russel LD, Ochsner S. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002; 57:195-220.
- 6- Hsieh M, Mulders SM, Friis RR, Dharmarajan AM, Richards JS. Expression and localization of secreted frizzled-related protein-4 in rodent ovary. *Endocrinology.* 2003;144:4597-606.
- 7- Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology.* 2002;143:898-908.
- 8- Abbott DH, Dumesic DA, Franks S. Developmental origin of polycystic ovary syndrome- a hypothesis. *J Endocrinol.* 2002;174:1-5.
- 9- Ehrmann DA. Polycystic Ovary Syndrome. *N Engl J Med.* 2005;352:1223-36.
- 10- Wood RJ, Ho C, Nelson-Degrave V, McAlister J, Straus J. The molecular signature of Polycystic Ovary Syndrome theca cells defined by gene profiling. *J Reprod Immunol.* 2004;63:51-60.
- 11- Lacher MD, Siegenthaler A, Ger RJA, Yan XI, Hett S, Xuan L, et al. Role of DDC-4/sFRP-4, a secreted Frizzled-related protein, at the onset of apoptosis in mammary involution. *Cell Death Differ.* 2003;10:528-38.
- 12- Beloosesky R, Gold B, Almog Sasson R, Dantes A, Land-bracha A, Hirsh L, et al. Induction of polycystic ovary by testosterone in immature female rats: Modulation of apoptosis and attenuation of glucose/insulin ratio. *Int J Mol Med.* 2004;14:207-15.
- 13- Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci.* 2003;116:1175-86.
- 14- Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001;65:391-426.
- 15- Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiol.* 2006; 79:173-89.
- 16- Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z. Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J Neurosci.* 2000;20: 2567-74.
- 17- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, et al. Glycogen synthase kinase-3 β phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2004;24:9993-10002.
- 18- Watcharasit P, Bijur GN, Song L, Zhu J, Chen X, Jope RS. Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) binds to and promotes the actions of P53. *J Biol Chem.* 2003;278:48872-9.
- 19- Tilly KL, Banerjee S, Banerjee PP, Tilly JL. Expression of the P53 and Wilms' tumor suppressor genes in the rat ovary: Gonadotropin repression in vivo and immunohistochemical localization of nuclear P53 protein to apoptotic granulosa cells of atretic follicles. *Endocrinology.* 1995;136:1394-402.
- 20- Rentzsch F, Hobmayer B, Holstein TW. Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in Hydra gametogenesis. *Dev Biol.* 2005;278:1-12.
- 21- Zeleznik Anthony J, Saxena D, Little-Ihrig L. Protein kinase B is obligatory for follicle-stimulating hormone-induced granulosa cell differentiation. *Endocrinology.* 2008;144:3985-94.
- 22- Constantinou T, Baumann F, Lacher MD, Saurer S, Friis R, Dharmarajan A. SFRP-4 abrogates Wnt-3a-induced β -catenin and Akt/PKB signalling and reverses a Wnt-3a-imposed inhibition of in vitro mammary differentiation. *J Mol Signaling.* 2008;3:1-14.
- 23- Tetsuka M, Whitelaw PF, Bremner WJ, Millar MR, Smyth CD, Hillier SG. Developmental regulation of androgen receptor in rat ovary. *J Endocrinol.* 1995; 145:535-43.
- 24- Szoltys M, Slomczynska M. Changes in distribution of androgen receptor during maturation of rat ovarian follicles. *Exp. Clin Endocrinol Diabetes* 2000;108:228-34.
- 25- Steckler T, Wang J, Bartol FF, Roy SK, Padmanabhan V. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology.* 2005;148:3185-93.
- 26- Billing H, Furutua I, Hsueh AJW. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 1993;133:2204-12.
- 27- Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ, et al. Follicle-stimulating hormone_cAMP regulation of aromatase gene expression requires β -catenin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:12435-40.
- 28- Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev.* 1999;9:15-21.
- 29- Kim K, Pang KM, Evans M, Hay ED. Overexpression of β -catenin induces apoptosis independent of its trans-activation function with LEF-1 or the involvement of

- major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell*. 2000;11:3509-23.
- 30- Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. β -catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2003;14:2844-60.
- 31- Pon YL, Wong AST. Gonadotropin and its role in the β -catenin/T-cell factor signaling pathway *Expert Rev. Endocrinol Metab*. 2007;2:375-85.
- 32- Rask KN, Brannstrom M. Wnt signaling pathway in ovarian epithelial tumors: increased expression of β -catenin and GSK3 β . *J Cancer*. 2003;89:1298-304.
- 33- Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2003;116:2627-34.