



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕ ΤΙΤΛΟ «ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ-
ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ RPLP0 ΤΟΥ
ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΠΟΝΤΙΚΙΟΥ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ
ΤΩΝ ΟΚΤΩ ΚΥΤΤΑΡΩΝ»**

**«STUDY OF THE CELL CYCLE GENE RPLP0 EXPRESSION IN
MICE EMBRYOS AT THE STAGE OF EIGHT CELLS»**



Λιόση Μαρία

30/3/2018

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **Λουτράδης Δημήτριος:** Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».
- **Δρακάκης Πέτρος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».
- **Ντόμαλη Αικατερίνη:** Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Αναστάσιο και Ελένη καθώς επίσης και τα αδέρφια μου Σπύρο και Πουλχερία, για τη στήριξή τους, οικονομική και ψυχολογική, καθώς επίσης και για την πίστη τους στις ικανότητές μου. Εκείνοι μου έδωσαν την υπομονή και τη δύναμη να φέρω εις πέρας το στόχο μου.

Δε θα μπορούσα να παραλείψω το συνάδελφό μου Ράμι Ραουάσντε, για την πολύτιμη βοήθειά του, καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Μαυρογιάννη Δέσποινα που ήταν παρούσα να λύσει κάθε απορία μου και να με καθοδηγήσει. Καθώς επίσης και τον κ. Θεοφανάκη Χαράλαμπο για την προθυμία του και τη βοήθειά του.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου απέναντι στον κ. Λουτράδη που με εμπιστεύτηκε και με επέλεξε να συμμετάσχω στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα της Αναπαραγωγικής - Αναγεννητικής Ιατρικής.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα θηλαστικά, ο σχηματισμός του ζυγωτού προκύπτει ύστερα από τη συνένωση του αρσενικού και του θηλυκού προπυρήνα στη λήκυθο της σάλπιγγας. Η διαδικασία αυτή θεωρείται επιτυχημένη μόνο όταν επιτευχθεί η εμφύτευση, στο ενδομήτριο του θηλυκού οργανισμού. Σε αυτή τη διαδρομή, το προέμβρυο υφίσταται πολλές δομικές αλλαγές. Αρχικά, το γονιμοποιημένο ωάριο διαιρείται σε 2, 4 και 8 κύτταρα, εν συνεχεία, συμπυκνώνεται συγκροτώντας το μορίδιο και τέλος, δημιουργεί μια κοιλότητα σχηματίζοντας τη βλαστοκύστη.

Κατά την τρίτη κυτταρική διαίρεση του ζυγωτού, περίπου 3 μέρες μετά τη γονιμοποίηση, προκύπτει το προέμβρυο των 8 κυττάρων, το οποίο χαρακτηρίζεται ως πολυδύναμο. Η σημαντικότητα της μελέτης του συγκεκριμένου εξελικτικού σταδίου έγκειται στο γεγονός ότι ο μητρικός αναπτυξιακός έλεγχος αντικαθίσταται πλέον από την ενεργοποίηση και την έκφραση των γονιδίων του νεοσυντιθέμενου εμβρύου.

Το γονίδιο του κυτταρικού κύκλου RPLP0 (ριβοσωμική πρωτεΐνη με πλευρική υπομονάδα στελέχους P0) κωδικοποιεί την 60S ριβοσωμική πρωτεΐνη P0 του ανθρώπου. Πρόκειται για μια φωσφοπρωτεΐνη που εδράζει στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 12. Αλληλεπιδρά με τις όξινες ριβοσωμικές πρωτεΐνες P1 και P2 για το σχηματισμό του πενταμερούς συμπλόκου που αποτελείται από τα διμερή των P1 και P2 και το μονομερές του P0.

Η πρωτεΐνη P0 είναι ομόλογη της προκαρυωτικής L10 του βακτηρίου E.coli και ανιχνεύεται στο κυτταρόπλασμα και στον πυρήνα, όχι όμως στον πυρινίσκο. Το γονίδιο RPLP0 είναι πολύ σημαντικό για την ορθή λειτουργία της πρωτεϊνοσύνθεσης.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, γίνεται σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου RPLP0 σε προέμβρυα ποντικίου στο στάδιο των

8 κυττάρων, καθώς επίσης και σε αποπτωτικά έμβρυα. Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι να επισημανθούν οι πιθανοί μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με μια φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη και κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί βιοδείκτες ώστε να προβλεφθεί η εξέλιξη του εμφυτευμένου εμβρύου. Ακόμα, σκοπός είναι να συσχετιστεί η έκφραση του γονιδίου RPLP0 με την ποιότητα των εμβρύων.

Συνολικά, ελήφθησαν 81 έμβρυα από θηλυκά ποντίκια, από τα οποία, τα 18 έμβρυα έφτασαν στο στάδιο των 8 κυττάρων και τα 63 έμβρυα τα απομονώσαμε νεκρά. Στη συνέχεια, απομονώθηκε το ολικό RNA από τα εμβρυικά κύτταρα, ακολούθησε η σύνθεση του cDNA και τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου RPLP0 με τη μέθοδο της Real Time PCR.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το γονίδιο RPLP0 εκφράζεται και στα αποπτωτικά έμβρυα και στα έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων, με τη διαφορά ότι η έκφραση στα έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων συμβαίνει σε λιγότερους κύκλους. Επομένως, έχουν μεγαλύτερη έκφραση.

Η κατανόηση αυτού του μηχανισμού και η προσπάθεια καθιέρωσης ενός εμβρυικού μεταγραφικού προφίλ στο αναπτυξιακό στάδιο των 8 κυττάρων με βάση την έκφραση ή μη συγκεκριμένων γονιδίων, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο μοριακό εργαλείο στην εξωσωματική γονιμοποίηση με σκοπό να προβλέψει την εξέλιξη του εμφυτευμένου εμβρύου.



ABSTRACT

In mammals, the formation of the zygote becomes apparent after the coalescence of the female and the male pronucleus in the ampulla of the fallopian tube and it is considered successful only when the implantation is achieved in the endometrium of the female. Throughout this track, pre-embryo undergoes many structural changes. Initially, the fertilized ovum is divided into 2, 4 and 8 cells, subsequently it is compacted by establishing the morula and finally it creates a cavity, forming the blastocyst.

During the third cell division of the zygote, approximately three days after the fertilization, the pre-embryo of 8 cells occurs, which is characterized as pluripotent. The significance of studying this particular embryonic stage is the fact that maternal developmental control is replaced by the activation and the expression of zygotic genes. In mouse, zygotic gene activation takes place at the 2-cell embryonic stage.

The cell cycle gene RPLP0 (ribosomal protein with a P0 subunit) encodes human 60s ribosomal protein P0. It is a phosphoprotein based on the large arm of chromosome 12. It interacts with the acidic ribosomal proteins P1 and P2 to form the pentameric complex consisting of the dimers of P1 and P2 and the monomer of P0.

The P0 protein is homologous to the Escherichia coli prokaryotic L10 and it is detected in the cytoplasm and nucleus, but not in the kernel. The RPLP0 gene is very important for the proper functioning of protein synthesis.

In this diploma thesis, the expression of the RPLP0 gene in mouse precursors in the 8 cell stage is compared with the expression of the RPLP0 gene in dead mice embryos. The purpose of this procedure is to identify the potential molecular and cellular mechanisms associated with a normal embryonic development and therefore to be used as

molecular biomarkers to predict the progression of the implanted embryo. Furthermore, the aim is to correlate the expression of the RPLP0 gene with the quality of the embryos.

Overall, 81 embryos were obtained from female mice, of which 18 embryos reached 8 cells and the 63 embryos were isolated from them. Subsequently, total RNA was isolated from the embryonic cells, followed by cDNA synthesis, and finally the study of RPLP0 gene expression by the Real Time PCR method.

According to the results, the RPLP0 gene is expressed both in dead embryos and embryos at the 8-cell stage. However, the gene expression in embryos at the 8-cells stage occurs in fewer cycles. Therefore, they have greater expression.

The comprehension of this mechanism and the establishment of an embryonic transcriptional profile at the 8-cell developmental stage, based on the expression or not of specific genes, could be a useful molecular tool in IVF to predict the progression of the implanted embryo.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

II. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

III. ΕΠΙΜΥΣ MUS MUSCULUS

IV. ΣΤΑΔΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ

V. ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

VI. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

- i. Κυτταρική διαίρεση
- ii. Προϋποθέσεις κυτταρικού κύκλου
- iii. Φάσεις κυτταρικού κύκλου

ΜΕΣΟΦΑΣΗ

ΜΙΤΩΣΗ

Πρόφαση

Προμετάφαση

Μετάφαση

Ανάφαση

Τελόφαση

Κυτταροκίνηση

ΜΕΙΩΣΗ

Μείωση I

Πρόφαση I

● Λεπτοταινία

● Ζυγοταινία

● Παχυταινία

● Διπλοταινία

● Διακίνηση

Μετάφαση I

Ανάφαση I

Τελόφαση I

Κυτταροκίνηση

Μείωση II

- iv. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη

VII. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΒΡΥΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

VIII. ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΟ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΩΝ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

IX. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

ΣΚΟΠΟΣ

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

I. G6PD GENE (Glucose – 6 – Phosphate Dehydrogenase)

II. RPLP0 GENE (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0)

III. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ MUS MUSCULUS

IV. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

V. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΑΔΙΟΥ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

VI. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΑΔΙΟΥ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

VII. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

VIII. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (RT-PCR)

 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

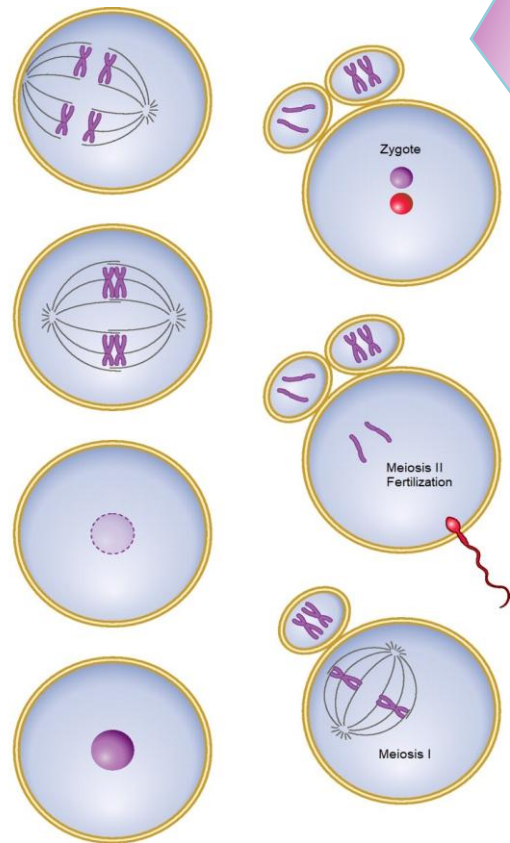
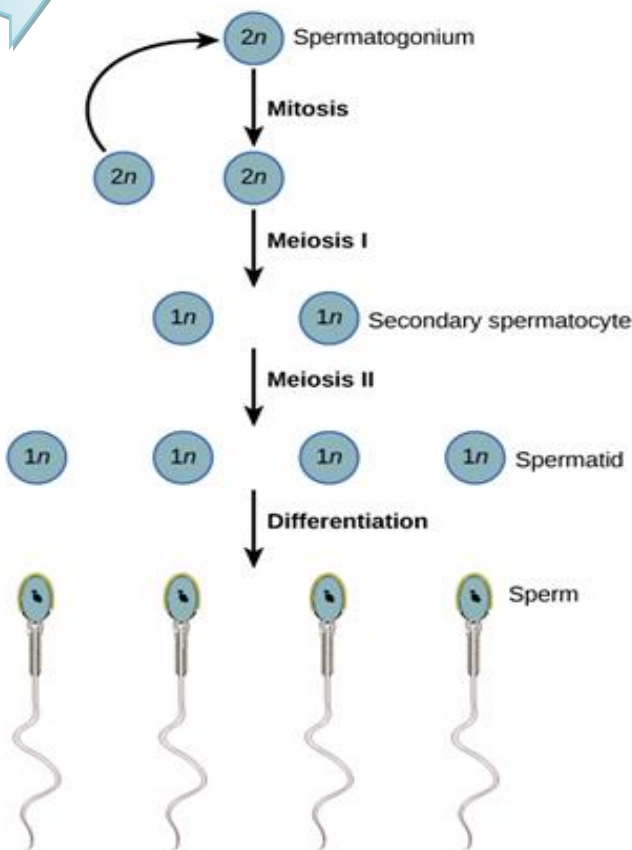
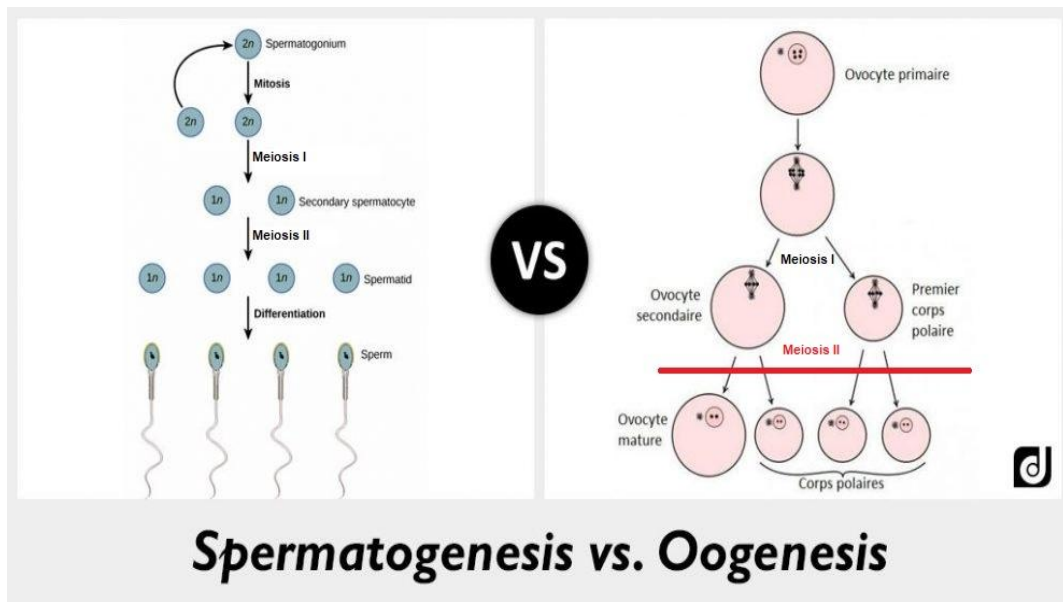
 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

I. ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η γαμετογένεση στον άνθρωπο αποτελεί μια διαφορετική διαδικασία για τα δύο φύλα όσον αφορά τη χρονική περίοδο κατά την οποία διαδραματίζεται. (ΕΙΚΟΝΑ 1)

Συγκεκριμένα, η ωογένεση στη γυναίκα αρχίζει κατά τη διάρκεια της εμβρυονικής φάσης. Τα ωογόνια, μεταξύ τρίτου και πέμπτου μήνα, μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα και εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση, την οποία δεν ολοκληρώνουν, παραμένοντας καθηλωμένα στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης μέχρι την έναρξη της ήβης και των ωοθυλακιωρρηκτικών κύκλων. Με την ωοθυλακιωρρηξία ολοκληρώνεται η πρώτη μειωτική διαίρεση και τα πρωτογενή ωοκύτταρα μετατρέπονται σε δευτερογενή, οπότε αρχίζει η δεύτερη μειωτική διαίρεση, η οποία δεν ολοκληρώνεται. Έτσι παραμένουν καθηλωμένα στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης μέχρι να πυροδοτηθεί ο μηχανισμός της γονιμοποίησης. (Αριστείδης Αντσακλής, 2008)

Η σπερματογένεση αντιθέτως, ξεκινά κατά την εφηβεία με παραγωγή σπερματοζωαρίων στα σπερματικά σωληνάρια των όρχεων και διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής του άρρενος ατόμου. (Αριστείδης Αντσακλής, 2008) Το σπερματοζώαριο υπόκειται σε μια διαδικασία κυτταροπλασματικής και μεμβρανικής λειτουργικής ωρίμανσης η οποία διεξάγεται κατά την πορεία του από τα σπερματικά σωληνάρια μέχρι τη λήκυθο του ωαγωγού, έτσι ώστε να προετοιμαστεί για τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου. Το τελικό στάδιο της ωρίμανσης ονομάζεται ενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου και επιτελείται εντός του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος.



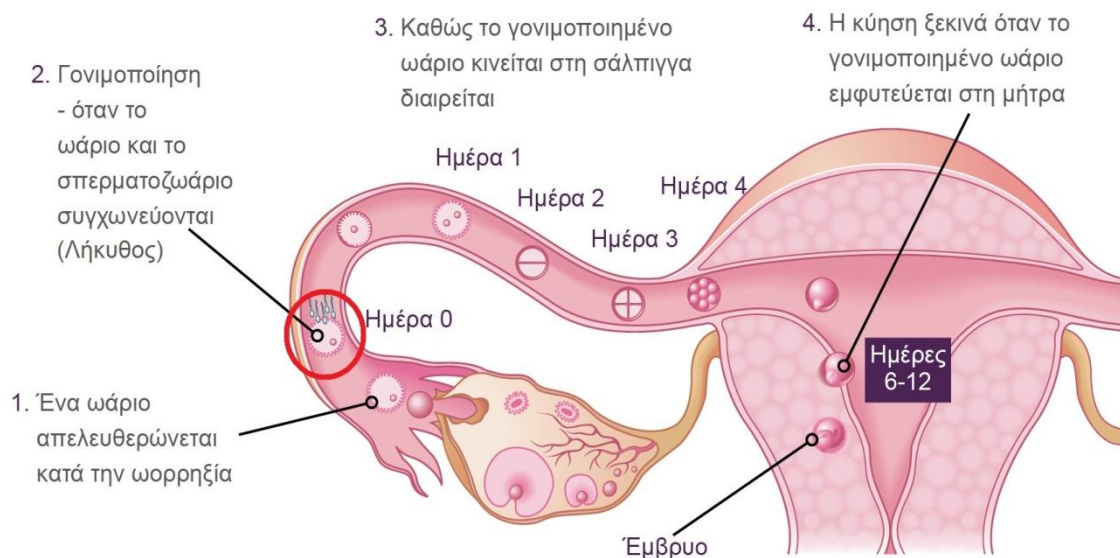
ΕΙΚΟΝΑ 1. Σπερματογένεση και Ωογένεση. Στη σπερματογένεση ολοκληρώνονται οι μειωτικές διαιρέσεις εξ' αρχής (αριστερή εικόνα). Αντιθέτως, στην ωογένεση το ωάριο μένει καθηλωμένο στη δεύτερη μειωτική διαίρεση την οποία και ολοκληρώνει με την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου (δεξιά εικόνα)

II. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Γονιμοποίηση ορίζεται η αλληλουχία μοριακών και κυτταρικών αντιδράσεων που αρχίζει όταν ένα σπερματοζωάριο έρχεται σε επαφή με το δευτερογενές ωκύτταρο και ολοκληρώνεται με την ανάμειξη των πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων στην μετάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του ζygώτη. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στη λήκυθο του ωαγωγού και επιτελείται εντός εικοσιτεσσάρων ωρών από την ωοθυλακιωρηξία. (ΕΙΚΟΝΑ 2)

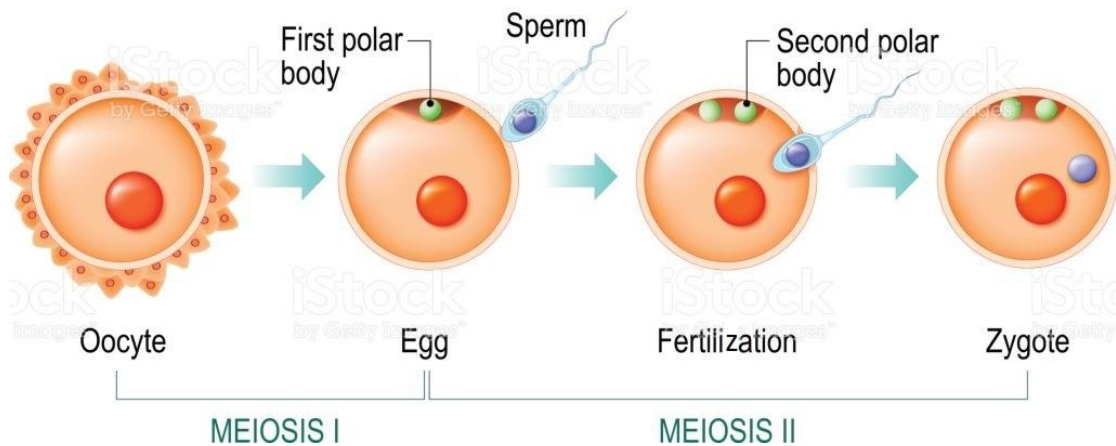
Συγκεκριμένα, η γονιμοποίηση πυροδοτείται με την είσοδο της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του δευτερογενούς ωκυττάρου. Έτσι, ολοκληρώνεται η δεύτερη μειωτική διαίρεση, παράγεται το δεύτερο πολικό σωματίο και με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ο ζygώτης. (ΕΙΚΟΝΑ 3)

Η διάρκεια ζωής ενός ωαρίου υπολογίζεται στις εικοσιτέσσερις ώρες, ενώ η γονιμοποιητική του ικανότητα μεταξύ δώδεκα και εικοσιτεσσάρων ωρών. Αντίστοιχα για το σπερματοζωάριο, η διάρκεια ζωής του ορίζεται έως πέντε ημέρες και η γονιμοποιητική του ικανότητα διαρκεί σαράντα οκτώ ώρες.



ΕΙΚΟΝΑ 2. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στη λήκυθο του ωαγωγού (Ημέρα 0)

ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ



ΕΙΚΟΝΑ 3. Η γονιμοποίηση πυροδοτείται με την είσοδο της κεφαλής του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του δευτερογενούς ωοκυττάρου. Έτσι, ολοκληρώνεται η δεύτερη μειωτική διαίρεση, παράγεται το δεύτερο πολικό σώμα και με τον τρόπο αυτό σχηματίζεται ο ζυγώτης

III. ΕΠΙΜΥΣ *MUS MUSCULUS*

Ο επίμυς, ή κοινώς το ποντίκι στελέχους *mus musculus* είναι ο οργανισμός μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία. Αποτελεί ένα κλασικό μοντέλο σπονδυλωτού οργανισμού που χρησιμοποιείται ευρέως για ερευνητικές μελέτες, καθώς θεωρείται πως αποτελεί πρότυπο οργανισμό.

Η χρήση του ως πειραματόζωο προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Το βασικό είναι οι σημαντικές ομοιότητες που παρουσιάζει με τον άνθρωπο, στην ανατομία, τη φυσιολογία, και τη γενετική. Το γονιδίωμα του ποντικιού εμφανίζει πολύ υψηλά ποσοστά ομολογίας συγκριτικά με το γονιδίωμα του ανθρώπου, καθιστώντας τη γενετική έρευνα πάνω σε ποντίκια εφαρμόσιμη σε ανθρώπινες νόσους. Επιπλέον, απαιτεί χαμηλό κόστος και είναι αποδοτικό

εργαλείο καθώς αναπαράγεται εύκολα (18-20 έμβρυα ανά γέννα) και γρήγορα (κάθε κύηση έχει διάρκεια 18-21 μέρες), έτσι είναι κατάλληλο για γρήγορες μελέτες και ανάπτυξη φαρμακευτικών θεραπειών. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι και η επιταχυσμένη διάρκεια ζωής του. Ένα έτος ζωής στον επίμυ ισούται με 30 χρόνια ζωής στον άνθρωπο. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα να διατηρούνται οι δαπάνες και ο απαιτούμενος χρόνος για να εκτελεστεί μια έρευνα διαχειρίσιμα.

Υπάρχουν πάνω από 450 διαφορετικά στελέχη επίμυων που χρησιμοποιούνται σήμερα για ερευνητικούς σκοπούς, τόσο αμιγή όσο και μη, που επιλέγονται για συγκεκριμένα χαρακτηριστικά τους, συχνά ιατρικού ενδιαφέροντος όπως παραδείγματος χάριν το μέγεθος του σώματος, τη παχυσαρκία, τη μυϊκή δύναμη. Στη συγκεκριμένη ερευνητική εργασία επιλέχθηκε στέλεχος *mus musculus*.

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΕΠΙΜΥ ΩΣ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟ

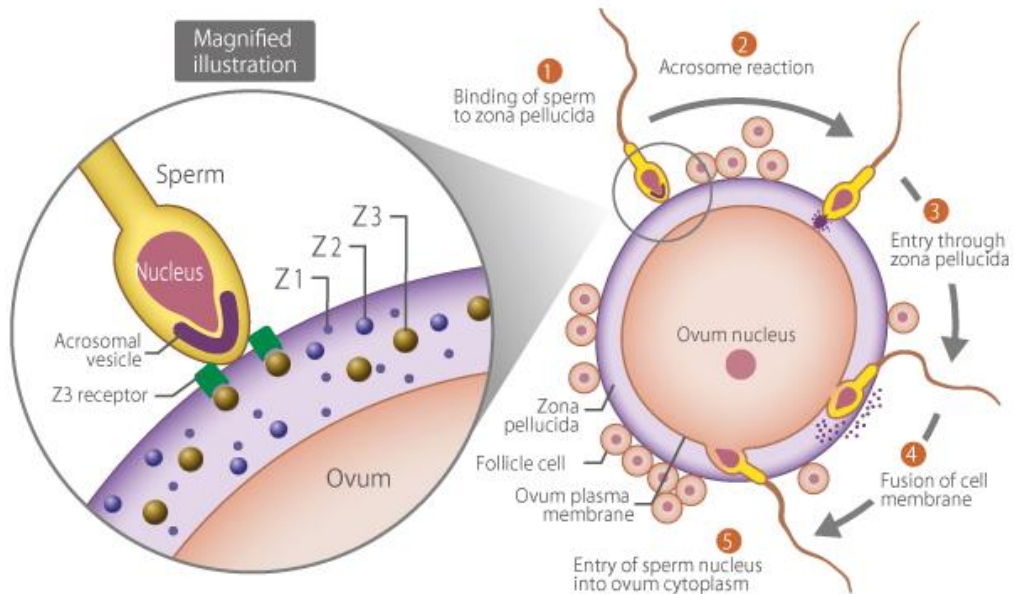
1. Κοινή ανατομία με τον άνθρωπο
 2. Κοινή φυσιολογία με τον άνθρωπο
 3. Κοινή γενετική με τον άνθρωπο (υψηλά ποσοστά ομολογίας γονιδιωμάτων τους)
 4. Χαμηλό κόστος
 5. Πολλοί απόγονοι (18-20 έμβρυα/γέννα)
 6. Μικρή διάρκεια κύησης (18-21 ημέρες)
 7. Επιταχυσμένη διάρκεια ζωής (1 έτος ζωής επίμυ = 30 έτη ζωής ανθρώπου)
 8. 450 στελέχη (επιλέγεται αυτό με τα κατάλληλα για κάθε έρευνα χαρακτηριστικά)
-

ΠΙΝΑΚΑΣ 1. Πλεονεκτήματα επίμυ ως οργανισμό μοντέλο

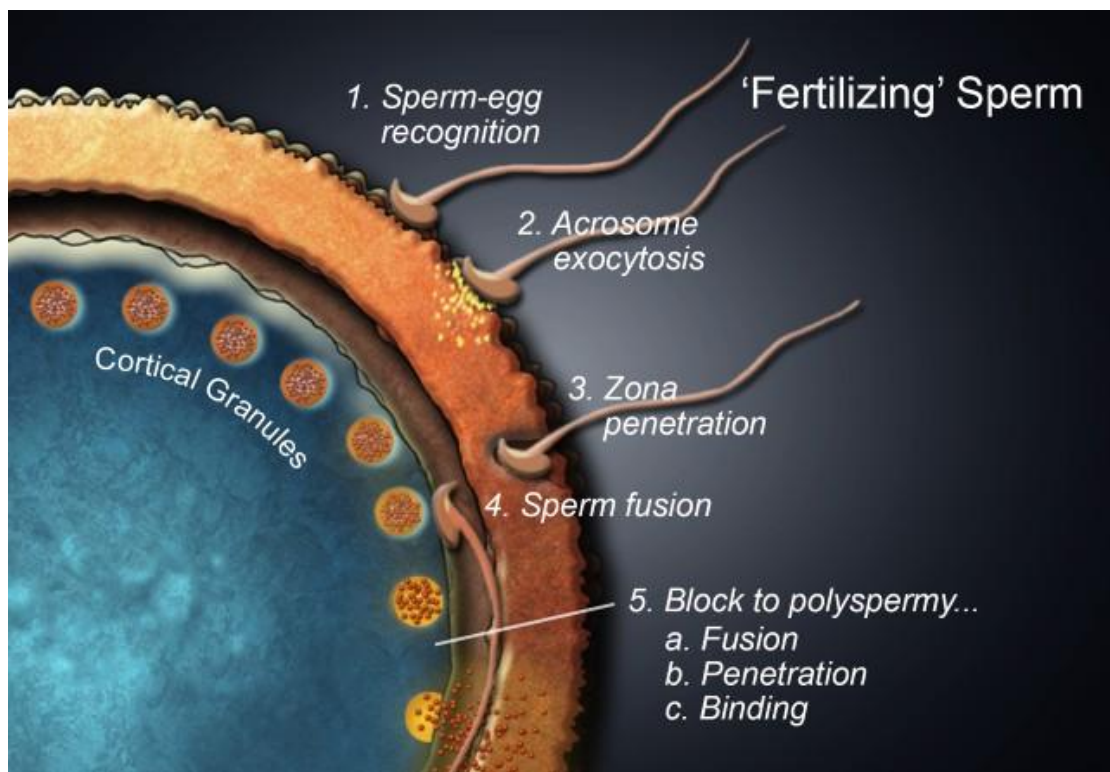
IV. ΣΤΑΔΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΜΥ

Η γονιμοποίηση του επίμυ είναι κοινή με του ανθρώπου. Τα στάδια που επιτελούνται είναι τα εξής: (EIKONEΣ 4, 5)

- Παραμονή του ώριμου απλοειδούς ωαρίου στην πρώτη μειωτική διαίρεση, στη λήκυθο του ωαγωγού (EIKONA 1)
- Διέλευση του σπερματοζωαρίου από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου με τη βοήθεια της υαλουρονιδάσης, η οποία διασπά τα κοκκώδη κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου (έναρξη ακροσωμικής αντίδρασης)
- Πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη
- Απελευθέρωση πεπτικών ενζύμων από το ακρόσωμα του σπερματοζωαρίου (ακροσίνη και εστεράση)
- Διάτρηση διαφανούς ζώνης
- ZP3 στη διαφανή ζώνη → ειδική είδους
- Είσοδος του σπερματοζωαρίου στον υποζωνιαίο χώρο (λήξη ακροσωμικής αντίδρασης)
- Σύνδεση με την επιφάνεια του ωοκυττάρου
- Σύντηξη μεμβρανών
- Είσοδος του σπερματοζωαρίου εντός του ωοκυττάρου
- Φλοιώδης αντίδραση → μόνο ένα σπερματοζωάριο (εξωκυττάρωση λυσοσωμικών ενζύμων από τα φλοιικά κοκκία → απομάκρυνση ολιγοσακχαριτών από τη ZP3 και διάσπαση της ZP2 → αποδιάταξη συμπλόκου ZP2-ZP3 → αλλαγή σύστασης της διαφανούς ζώνης → παρεμπόδιση πολυσπερμίας
- Ολοκλήρωση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (EIKONA 3)
- Μεταβολική ενεργοποίηση ωαρίου για την έναρξη της πρώιμης εμβρυικής ανάπτυξης
- Ένωση των δύο προπυρήνων στο κέντρο του ωαρίου
- Σχηματισμός διπλοειδή πυρήνα
- Σχηματισμός ζυγώτη → Έναρξη εμβρυογένεσης



ΕΙΚΟΝΑ 4. Στάδια γονιμοποίησης στον άνθρωπο

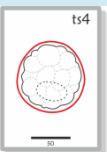


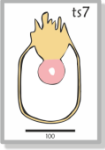
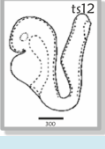
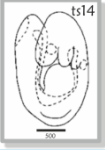
ΕΙΚΟΝΑ 5. Στάδια γονιμοποίησης στον επίμυ

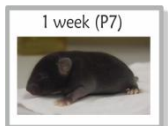
V. ΠΡΩΙΜΗ ΕΜΒΡΥΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Η προεμφυτευτική ανάπτυξη περιλαμβάνει τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, πριν το έμβρυο εμφυτευτεί στη μήτρα. Αρχίζει με τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο, και λαμβάνει χώρα καθώς το έμβρυο ταξιδεύει κατά μήκος της σάλπιγγας προς τη μήτρα. Αυτό το “ταξίδι” διαρκεί 4,5 ημέρες στον επίμυ.

Όσον αφορά τη σταδιοποίηση της ανάπτυξης του ποντικιού υπάρχουν διάφορα συστήματα για τον καθορισμό της. Το αρχικό και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το σύστημα Theiler, το οποίο χωρίζει την ανάπτυξη του ποντικιού σε 26 προγεννητικά και 2 μεταγεννητικά στάδια. Κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα αναπτυξιακά γεγονότα, τα οποία παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 2. Στην παρούσα μελέτη θα ασχοληθούμε με το στάδιο 3, δηλαδή το σχηματισμό των 8-κυττάρων.

Εικόνα	Στάδια Theiler	Εμβρυικός χρόνος (μέρες)	Αριθμός κυττάρων	Αναπτυξιακά γεγονότα
	1	0-0.5	1	Γονιμοποιημένο ωάριο
	2	1.5	2-4	Διαιρεμένο έμβρυο
	3	2-3	4-16	Μορίδιο
	4	3.5	16-40	Βλαστοκύστη, εμφανής εσωτερική κυτταρική μάζα

	5	4	Βλαστοκύστη απελευθερωμένη από τη διαφανή ζώνη
	6	4.5	Προσκόλληση βλαστοκύστης, το πρωτογενές ενδόδερμα καλύπτει την επιφάνεια του βλαστούκιου της εσωτερικής κυτταρικής μάζας
	7	5	Εμφύτευση και σχηματισμός του κυλίνδρου του εμβρύου
	8	6	Διαφοροποίηση του κυλίνδρου του εμβρύου
 	9-10	6.5-7.5	Σχηματισμός ραβδώσεων, ορατός εμβρυικός άξονας, αρχίζει η γαστριδίωση, αρχίζει ο σχηματισμός του αμνιακού υγρού
	11	7.5	Νευρική πλάκα, διαδικασία σχηματισμού του κεφαλιού, εγκόλπωση του πρόσθιου εντέρου
	12	8	Σχηματισμός σωμιτών, σχηματισμός καρδιάς
	13	8.5	Στροφή του εμβρύου
  	14- 16	9-10	Σχηματισμός του πρόσθιου και οπίσθιου νευρικού πόρου, κλείσιμο του νευρικού πόρου,

				σχηματισμός των πίσω άκρων και της ουράς	
		17- 18	10.5-11	Βαθιά εσοχή του φακού, κλείσιμο των κυστιδίων του φακού, οι σωμίτες του τραχήλου της μήτρας δεν είναι πλέον ορατοί	
		19- 20	11.5-12	Τα κυστίδια του φακού διαχωρίζονται πλήρως από την επιφάνεια του επιθηλίου, εμφάνιση σημαδιών των δακτύλων, καθορισμός της γλώσσας, σαφή κυστίδια εγκεφάλου	
			21- 23	13-15	Διαχωρισμός δακτύλων, εμφάνιση θυλάκων της τρίχας στην κεφαλική περιοχή, ανοικτά βλέφαρα
			24- 26	16-18	Αρχίζει να ζαρώνει το δέρμα και να σχηματίζεται το αφτί πάνω στον ακουστικό πόρο, τα βλέφαρα κλείνουν
		27- 28	19	Νεογέννητο ποντίκι, μεταγεννητική ανάπτυξη	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2. Στάδια ανάπτυξης κατά Theiler (*Richardson, et al., 2014*)

VI. ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ένα κύτταρο αναπαράγεται διεκπεραιώνοντας μια ιεραρχική ακολουθία γεγονότων, κατά τη διάρκεια των οποίων διπλασιάζει το περιεχόμενό του και

κατόπιν διαιρείται στα δύο. Αυτός ο κύκλος διπλασιασμού και διαίρεσης, γνωστός ως κυτταρικός κύκλος, είναι ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο αναπαράγονται όλα τα έμβια όντα. (Alberts, 2000). (ΕΙΚΟΝΑ 10)

Ο άνθρωπος ξεκινά τη ζωή του ως γονιμοποιημένο ωάριο –ζυγωτό-, ένα διπλοειδές κύτταρο από το οποίο με δεκάδες ή και εκατοντάδες μιτώσεις προέρχονται όλα τα κύτταρα του σώματος. (Thompson & Thompson, 2011).

Στους μονοκύτταρους οργανισμούς κάθε κυτταρική διαίρεση παράγει έναν εντελώς νέο οργανισμό, ενώ στους πολυκύτταρους οργανισμούς για να δημιουργηθεί ένας νέος οργανισμός από το μονοκύτταρο ωάριο απαιτούνται πολλοί κύκλοι κυτταρικών διαιρέσεων. Σε πολλούς πολυκύτταρους οργανισμούς, διαιρέσεις κυττάρων συμβαίνουν σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Ακόμα και στον ενήλικο, είναι απαραίτητο να αντικαθίστανται τα κύτταρα που πεθαίνουν. Για παράδειγμα στον ενήλικο άνθρωπο, ενώ μερικά κύτταρα όπως τα μυϊκά και τα νευρικά δε διαιρούνται καθόλου, πολλά άλλα κύτταρα διαιρούνται, αν και με πολύ διαφορετικό ρυθμό. (Alberts, 2000)

Η διάρκεια του κυτταρικού κύκλου ποικίλλει πολύ ανάλογα με το είδος του κυττάρου. Σε ιδανικές συνθήκες, ένας μονοκύτταρος σακχαρομύκητας μπορεί να διαιρείται κάθε 90-120 λεπτά. Από την άλλη πλευρά, τα ηπατοκύτταρα ενός θηλαστικού, κατά μέσο όρο διαιρούνται λιγότερο από μια φορά το χρόνο. (Ρωξάνη Αγγελοπούλου, 2004)

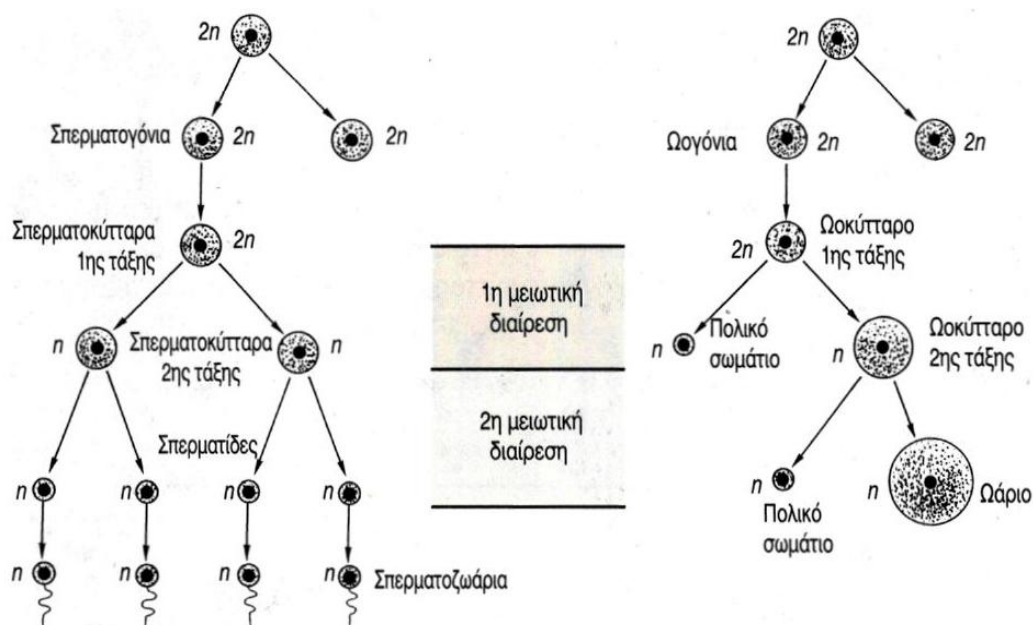
i. Κυτταρική διαίρεση

Υπάρχουν δύο είδη κυτταρικής διαίρεσης:

- 1) Μίτωση
- 2) Μείωση

Η μίτωση αποτελεί τον τρόπο διαίρεσης των σωματικών κυττάρων και μέσω αυτής επιτυγχάνεται η αύξηση του σώματος, η διαφοροποίηση και η αναγέννηση των ιστών. Η μιτωτική διαίρεση οδηγεί στη δημιουργία δύο θυγατρικών κυττάρων, καθένα από τα οποία διαθέτει τα ίδια χρωμοσώματα και γονίδια με το προγονικό κύτταρο. Σε μια σωματική κυτταρική σειρά, μπορούν να συμβούν δεκάδες ή ακόμα και εκατοντάδες διαδοχικές μιτώσεις.

Αντίθετα, με τη διαδικασία της μείωσης διαιρούνται μόνο τα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Κατά τη μείωση παράγονται τα αναπαραγωγικά κύτταρα, οι γαμέτες. Κάθε ένα, διαθέτει 23 χρωμοσώματα, ένα από κάθε ζεύγος ομόλογων αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και επιπλέον, ένα φυλετικό χρωμόσωμα. Οι θηλυκοί γαμέτες διαθέτουν ένα X, ενώ οι αρσενικοί γαμέτες διαθέτουν είτε ένα X, είτε ένα Y φυλετικό χρωμόσωμα. Έτσι, σε αντίθεση με τα σωματικά κύτταρα που έχουν διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων ($2n$, 46 χρωμοσώματα στον άνθρωπο), οι γαμέτες έχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων (n , 23 χρωμοσώματα στον άνθρωπο). (Thompson & Thompson, 2011). (ΕΙΚΟΝΑ 6)



ΕΙΚΟΝΑ 6. Μειωτικές διαιρέσεις

ii. Προϋποθέσεις κυτταρικού κύκλου

Κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, θα πρέπει να πληρούνται οι εξής προϋποθέσεις:

- 1) Η ύπαρξη επαρκούς RNA.
- 2) Ο έλεγχος του νεοσυντιθέμενου DNA.
- 3) Ο εφάπαξ αναδιπλασιασμός του γενετικού υλικού σε κάθε κυτταρικό κύκλο.

- 4) Η οργάνωση λειτουργικής μιτωτικής συσκευής.
- 5) Η συμπύκνωση και ο σωστός διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων μεταξύ των δυο θυγατρικών κυττάρων.

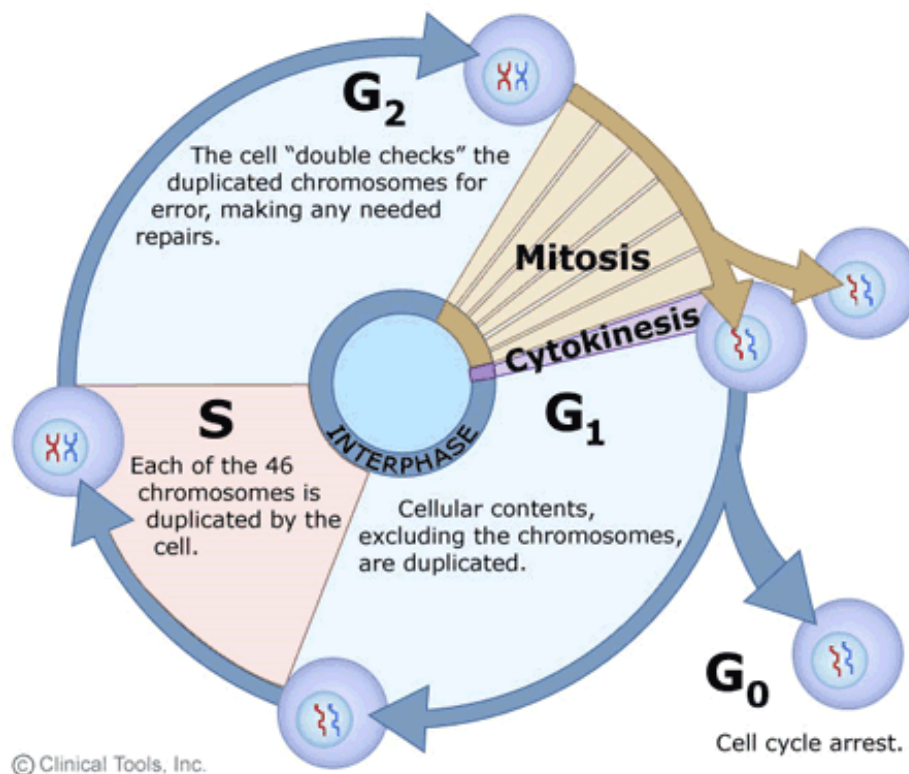
(Αριστείδης Αντσακλής, 2008)

iii. Φάσεις κυτταρικού κύκλου

Ο κυτταρικός κύκλος των ευκαρυωτικών κυττάρων διαιρείται στις εξής τέσσερις φάσεις: (ΕΙΚΟΝΑ 7)

- 1) Φάση G₁ (gap1): Αύξηση κυττάρου
- 2) Φάση S (synthesis, σύνθεση): Αντιγραφή DNA πυρήνα
- 3) Φάση G₂ (gap2): Αύξηση κυττάρου
- 4) Φάση M (mitosis): Διαίρεση κυττάρου

} ΜΕΣΟΦΑΣΗ
ΜΙΤΩΣΗ



ΕΙΚΟΝΑ 7. Φάσεις κυτταρικού κύκλου. Μίτωση και Μεσόφαση (G₀, G₁, S, G₂)

ΜΕΣΟΦΑΣΗ

Το χρονικό διάστημα μεταξύ δύο μιτώσεων ονομάζεται μεσόφαση (interphase) και αποτελεί την κατάσταση στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα κατά το μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της ζωής τους. Οι φάσεις G₁, S, G₂ αποτελούν τη μεσόφαση, κατά τη διάρκεια της οποίας το κύτταρο αυξάνει σε μέγεθος. Στη φάση αυτή, το DNA των χρωμοσωμάτων αντιγράφεται και το κεντροσωμάτιο διπλασιάζεται.

Κατά τη διάρκεια της φάσης S, το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του, απαραίτητη προϋπόθεση για να συμβεί η κυτταρική διαίρεση. Η φάση S πλαισιώνεται από δύο φάσεις κατά τις οποίες το κύτταρο συνεχίζει να αυξάνεται. Έτσι, κάθε χρωμόσωμα διπλασιάζεται και μετατρέπεται στο διμερές χρωμόσωμα που αποτελείται από τις δύο αδελφές χρωματίδες, κάθε μία από τις οποίες περιέχει ένα όμοιο αντίγραφο του αρχικού μορίου DNA.

Η φάση G₁ είναι το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης M και την αρχή της φάσης S, όπου κάθε κύτταρο διαθέτει ένα αντίγραφο του διπλοειδούς γονιδιώματος.

Η φάση G₂ αποτελεί το μεσοδιάστημα ανάμεσα στο τέλος της φάσης S και την αρχή της φάσης M, όπου κάθε χρωμόσωμα αρχίζει να συμπυκνώνεται ως ένα λεπτό και μακρύ νημάτιο. (Alberts, 2000)

Να σημειώσουμε, ότι συγκεκριμένοι τύποι κυττάρων, όπως είναι οι νευρώνες και τα ερυθροκύτταρα, δε διαιρούνται μετά την πλήρη διαφοροποίησή τους, αλλά παραμένουν μη διαιρούμενοι σε μια διακριτή φάση G₀. Άλλοι τύποι κυττάρων, όπως τα ηπατικά κύτταρα, μπορεί να εισέλθουν στη φάση G₀, αλλά σε περίπτωση καταστροφής του ιστού επανέρχονται στη φάση G₁ συνεχίζοντας τον κυτταρικό κύκλο. (Thompson & Thompson, 2011). (ΕΙΚΟΝΑ 7)

ΜΙΤΩΣΗ

Η διαίρεση ενός κυττάρου σε δύο θυγατρικά κύτταρα συμβαίνει κατά τη φάση M (Μίτωση) του κυτταρικού κύκλου. Κατά τη διάρκεια της μίτωσης εξασφαλίζεται ότι κάθε ένα από τα θυγατρικά κύτταρα θα δεχτεί το σύνολο της γενετικής πληροφορίας. Ο μηχανισμός αυτός, οδηγεί στην κατανομή μιας χρωματίδας από κάθε χρωμόσωμα σε κάθε ένα θυγατρικό κύτταρο (διαχωρισμός χρωμοσωμάτων). Η φάση M περιλαμβάνει τη διαίρεση του

πυρήνα (μίτωση) και τη διαίρεση του κυτταροπλάσματος (κυτταροκίνηση). Με το μηχανισμό αυτό, το περιεχόμενο σε χρωμοσώματα ενός απλοειδούς ή διπλοειδούς κυττάρου διατηρείται σταθερό κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κυτταρικών διαιρέσεων. Η μίτωση εξελίσσεται ως μια συνεχής ακολουθία γεγονότων. Ωστόσο, παραδοσιακά διαιρείται σε πέντε στάδια: (ΕΙΚΟΝΑ 8)

- | |
|---|
| 1) Πρόφαση: Τα αντιγραφόμενα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και η μιτωτική άτρακτος αρχίζει να συναρμολογείται έξω από τον πυρήνα |
| 2) Προμετάφαση: Το πυρηνικό περίβλημα θρυμματίζεται, οπότε οι μικροσωληνίσκοι της ατράκτου μπορούν να έρθουν σε επαφή με τα χρωμοσώματα και να προσδεθούν σε αυτά |
| 3) Μετάφαση: Η μιτωτική άτρακτος συγκεντρώνει όλα τα χρωμοσώματα στο κέντρο της (ισημερινός) |
| 4) Ανάφαση: Οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε αντιγραμμένου χρωμοσώματος διαχωρίζονται και συγχρόνως έλκονται από την άτρακτο στους δύο αντίθετους πόλους του κυττάρου |
| 5) Τελόφαση: Γύρω από την κάθε ομάδα των διαχωρισμένων χρωμοσωμάτων συναρμολογείται ένα πυρηνικό περίβλημα ώστε να σχηματιστούν δύο πυρήνες |

ΠΙΝΑΚΑΣ 3. Τα πέντε στάδια της Μίτωσης

(Alberts, 2000 και Thompson & Thompson, 2011)

Πρόφαση

Το στάδιο αυτό, με το οποίο ξεκινά η μίτωση, χαρακτηρίζεται από τη σταδιακή συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και την έναρξη του σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου. Κάθε χρωμόσωμα έχει αναδιπλασιαστεί κατά τη διάρκεια της προηγούμενης φάσης S και αποτελείται από δύο αδελφές χρωματίδες. (Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου)

Προμετάφαση

Η προμετάφαση αρχίζει απότομα με την αποδόμηση του πυρηνικού περιβλήματος. Τα χρωμοσώματα μπορεί πλέον να προσδεθούν στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου μέσω των κινητοχώρων τους και να μετακινηθούν. Τα χρωμοσώματα κατευθύνονται προς ένα σημείο που βρίσκεται στο μέσο της απόστασης μεταξύ των δύο πόλων της μιτωτικής ατράκτου (στοίχιση). Καθ' όλη τη διάρκεια του σταδίου αυτού τα χρωμοσώματα συνεχίζουν να συμπυκνώνονται.

Μετάφαση

Κατά τη μετάφαση τα χρωμοσώματα φτάνουν στο μέγιστο βαθμό της συμπύκνωσής τους και παρατάσσονται στον ισημερινό της ατράκτου, στο μέσον της απόστασης ανάμεσα στους πόλους της. Οι ζευγαρωμένοι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων πάνω σε κάθε χρωμόσωμα συνάπτονται στους αντίθετους πόλους της ατράκτου. Στο στάδιο αυτό, γίνεται η ανάλυση των χρωμοσωμάτων ενός διαιρούμενου κυττάρου του ανθρώπου.

Ανάφαση

Κατά την ανάφαση, οι ζευγαρωμένες χρωματίδες διαχωρίζονται συγχρονισμένα, έτσι ώστε να σχηματιστούν δύο θυγατρικά χρωμοσώματα. Κάθε χρωματίδα έλκεται αργά προς το σύστοιχο πόλο της ατράκτου. Οι μικροσωληνίσκοι των κινητοχώρων βραχύνονται και ταυτόχρονα οι πόλοι της ατράκτου απομακρύνονται ο ένας από τον άλλον. Οι δύο αυτές διεργασίες συμβάλλουν στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων στο κεντρομερές.

Τελόφαση

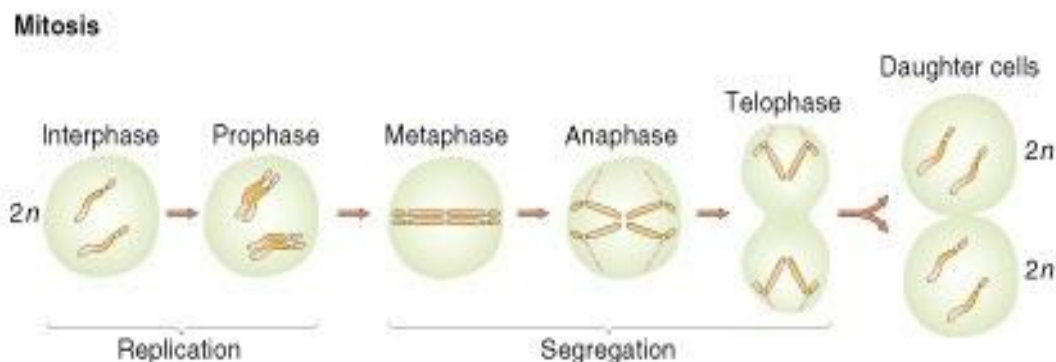
Στην τελόφαση ξεκινά η αποσυμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και ο επανασχηματισμός της πυρηνικής μεμβράνης. Συγκεκριμένα, οι δύο ομάδες των θυγατρικών χρωμοσωμάτων φτάνουν στους πόλους της ατράκτου γύρω από τις οποίες ανασυναρμολογείται ένα νέο πυρηνικό περίβλημα. Έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των δύο πυρήνων και σηματοδοτείται το τέλος της μίτωσης.

Κυτταροκίνηση

Η συναρμολόγηση του συσταλτικού δακτυλίου σηματοδοτεί την έναρξη της κυτταροκίνησης. Το κυτταρόπλασμα διαιρείται στα δύο από τον συσταλτικό δακτύλιο ακτίνης και μυοσίνης που περισφίγγει το κύτταρο για να δημιουργήσει δύο θυγατρικά κύτταρα, το καθένα με το δικό του πυρήνα.

(Alberts, 2000 και Thompson & Thompson, 2011).

Μετά την ολοκλήρωση της μιτωτικής διαίρεσης και υπό την πολύπλοκων μηχανισμών καθορίζεται το κατά πόσο το κύτταρο θα επαναδιαιρεθεί, θα διαφοροποιηθεί ή θα υποστεί απόπτωση (προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος). (Αριστείδης Αντσακλής, 2008)



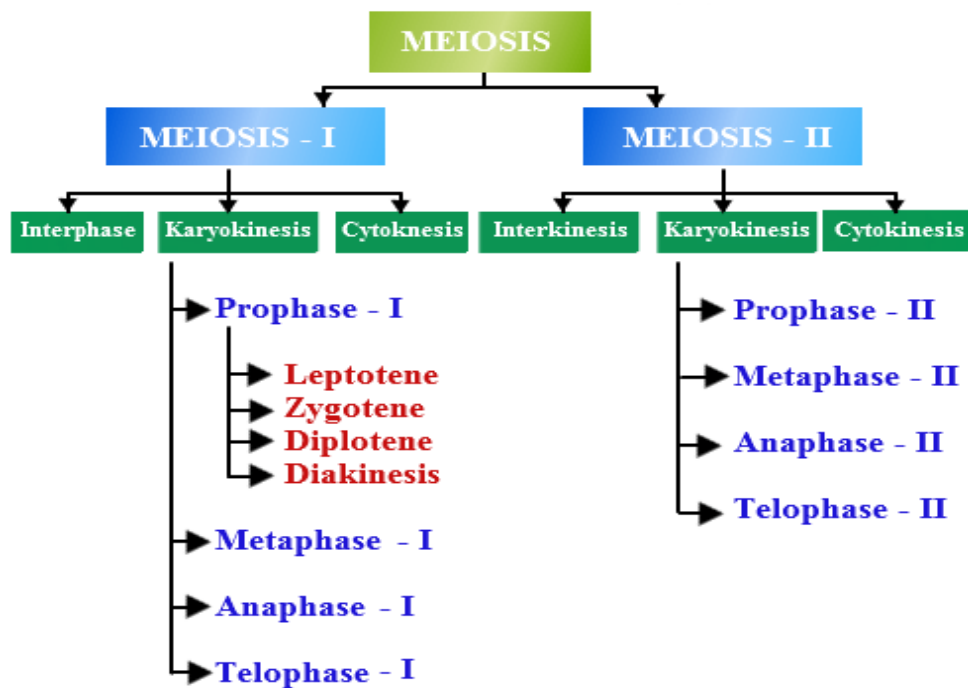
ΕΙΚΟΝΑ 8. Μίτωση

ΜΕΙΩΣΗ

Η μείωση, διαδικασία η οποία οδηγεί στην παραγωγή απλοειδών γαμετών από διπλοειδή κύτταρα, αποτελεί τον τύπο της κυτταρικής διαίρεσης που χαρακτηρίζει τα κύτταρα της γαμετικής σειράς. Η μείωση αποτελείται από ένα στάδιο διπλασιασμού του DNA ακολουθούμενο από δύο κύκλους χρωμοσωμικού διαχωρισμού και κυτταρικής διαίρεσης. Οι δύο διαδοχικές μειωτικές διαιρέσεις ονομάζονται μείωση I και μείωση II. Κατά τη διάρκεια της μείωσης I ο αριθμός των χρωμοσωμάτων ελαττώνεται στο μισό. Στη μείωση II που ακολουθεί, οι αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος διαχωρίζονται και η κάθε μια από αυτές μεταναστεύει σε ένα θυγατρικό

κύτταρο. Επομένως, προκύπτουν τέσσερα απλοειδή κύτταρα, κάθε ένα από τα οποία περιέχει 23 χρωμοσώματα.

Η μείωση στα θηλυκά άτομα συμβαίνει μόνο μια φορά, αρχίζει νωρίς κατά την εμβρυική ζωή και αφορά έναν περιορισμένο αριθμό κυττάρων. Αντίθετα, στα αρσενικά άτομα η μείωση λαμβάνει χώρα σε όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής τους και αφορά ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων που προέρχονται από έναν αρχικό διαιρούμενο κυτταρικό πληθυσμό.



ΠΙΝΑΚΑΣ 4. Οι δύο κατηγορίες της μείωσης και τα στάδιά τους

Μείωση I

Πρόφαση I

Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης αποτελείται από διάφορα στάδια, στη διάρκεια των οποίων τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και γίνονται ολοένα βραχύτερα και παχύτερα.

● Λεπτοταινία

Τα χρωμοσώματα, που έχουν ήδη διπλασιαστεί κατά την προηγούμενη φάση S, γίνονται ορατά ως λεπτά νημάτια που αρχίζουν να συμπυκνώνονται.

Οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος βρίσκονται τόσο κοντά που δε μπορούν να διακριθούν.

● Ζυγοταινία

Στο στάδιο αυτό, τα ομόλογα χρωμοσώματα αρχίζουν να στοιχίζονται καθ' όλο το μήκος τους. Αυτή η διαδικασία της σύζευξης των ομόλογων χρωμοσωμάτων είναι ακριβής, παραθέτοντας τις ομόλογες αλληλουχίες του DNA καθ' όλο το μήκος των χρωμοσωμάτων.

● Παχυταινία

Κατά το στάδιο αυτό, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται ακόμα περισσότερο, η σύναψη έχει ολοκληρωθεί και κάθε ζεύγος ομόλογων χρωμοσωμάτων εμφανίζεται ως διδύναμο (τέσσερις χρωματίδες). Κατά τη διάρκεια του σταδίου αυτού συμβαίνει ο μειωτικός επιχιασμός.

● Διπλοταινία

Μετά τον επιχιασμό, το συναπτονηματικό σύμπλεγμα αποσυναρμολογείται και αρχίζει ο διαχωρισμός των δύο μελών του κάθε διδύναμου χρωμοσώματος. Τελικά, τα δύο ομόλογα του κάθε διδύναμου χρωμοσώματος συγκρατούνται μεταξύ τους σε ορισμένα μόνο σημεία, τα χιάσματα, που υποδεικνύουν τις θέσεις του επιχιασμού.

● Διακίνηση

Στη διακίνηση, τα χρωμοσώματα αποκτούν τη μέγιστη συμπύκνωσή τους.

Μετάφαση I

Η μετάφαση I ξεκινάει από την αποσυναρμολόγηση της πυρηνικής μεμβράνης. Επιπλέον, σχηματίζεται η άτρακτος και τα ζεύγη των χρωμοσωμάτων παρατάσσονται στο ισημερινό επίπεδο του κυττάρου με τα κεντρομερή τους προσανατολισμένα προς τους αντίθετους πόλους.

Ανάφαση I

Τα δύο μέλη κάθε διδύναμου χρωμοσώματος αποχωρίζονται και τα αντίστοιχα κεντρομερή με τις συνδεδεμένες αδελφές χρωματίδες

μετακινούνται προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου. Έτσι, τα κύτταρα που προκύπτουν από τη μείωση I έχουν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Τα διδύναμα χρωμοσώματα διαχωρίζονται ανεξάρτητα μεταξύ τους, με αποτέλεσμα το αρχικό σύνολο των πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων να κατανέμεται σε τυχαίους συνδυασμούς.

Τελόφαση I

Κατά την τελόφαση, οι δύο απλοειδείς σειρές των χρωμοσωμάτων έχουν μεταναστεύσει στους δύο αντίθετους ρόλους του κυττάρου.

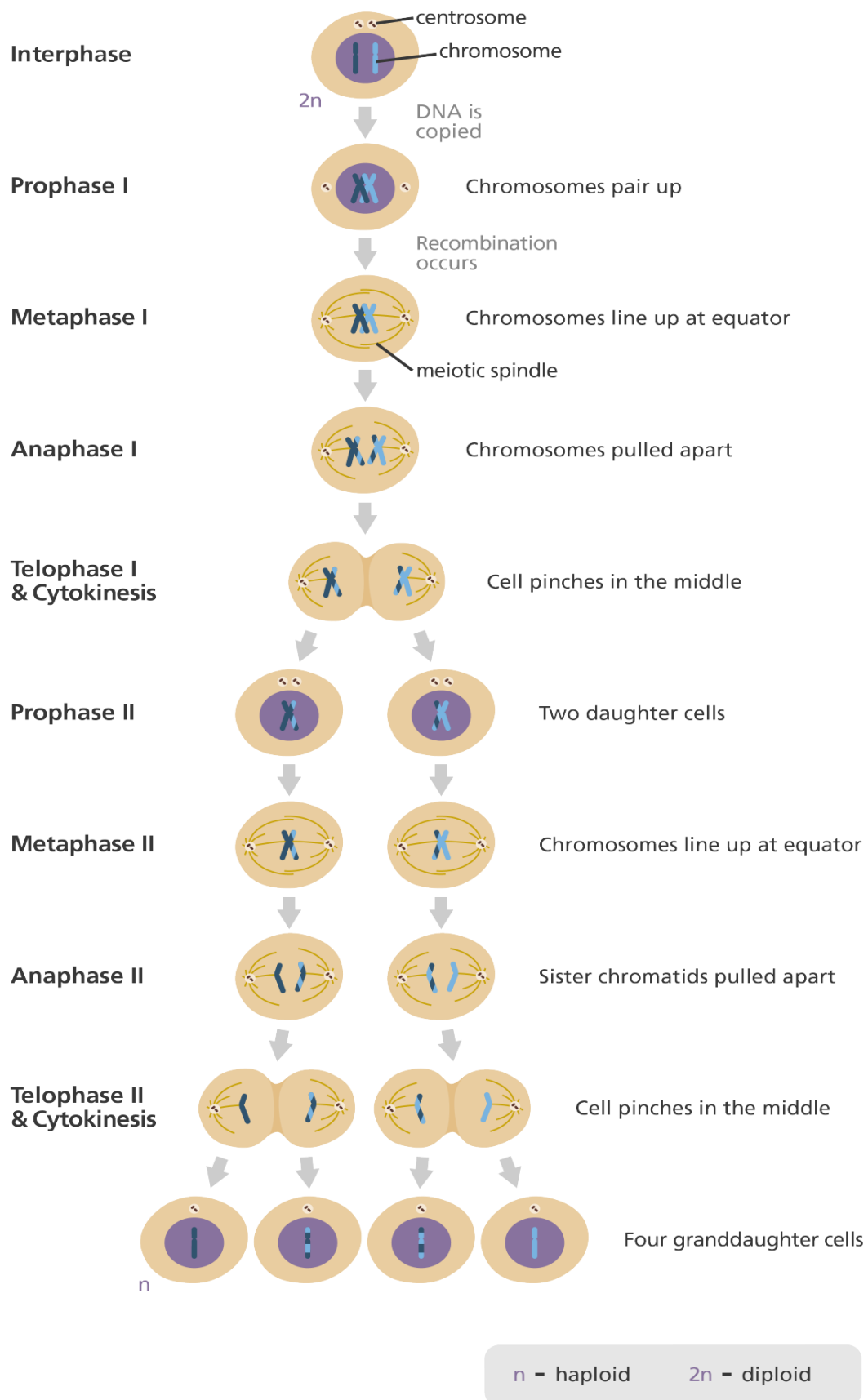
Κυτταροκίνηση

Στη φάση αυτή, το κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά κύτταρα και εισέρχεται στη φάση της μειωτικής μεσόφασης.

Η βασική διαφορά μεταξύ της μιτωτικής και μειωτικής μεσόφασης είναι ότι μεταξύ της πρώτης και της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης δεν παρεμβάλλεται φάση S.

Μείωση II

Η δεύτερη μειωτική διαίρεση μοιάζει με μια τυπική μίτωση, με τη διαφορά ότι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του κυττάρου που εισέρχεται στη μείωση II είναι απλοειδής. Το τελικό αποτέλεσμα είναι τα δύο θυγατρικά κύτταρα που έχουν προκύψει από τη μείωση I, να διαιρούνται προς σχηματισμό τεσσάρων απλοειδών κυττάρων, κάθε ένα από τα οποία περιέχει 23 χρωμοσώματα.



EIKONA 9. Μείωση I, Μείωση II

iv. Ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη

Παρόλο που το γενικό μοτίβο του κυτταρικού κύκλου είναι ιδιαίτερα συντηρημένο κατά την εξέλιξη, στην πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη φαίνεται να εμφανίζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις σε αρκετές παραμέτρους του κυτταρικού κύκλου και αυτό προκειμένου να προσαρμοστεί στα νέα αναπτυξιακά προγράμματα.

Οι δύο πρώτες διαιρέσεις διαρκούν περίπου 20 ώρες. Η αντιγραφή του DNA ξεκινά 4-10 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και διαρκεί 4-8 ώρες (*Artus & Cohen-Tannoudji, 2008*).

Πρώτα αντιγράφεται το γονιδίωμα του αρσενικού προ-πυρήνα και ακολουθεί του θηλυκού προ-πυρήνα. Αυτό συμβαίνει, διότι η υψηλά συγκεντρωμένη χρωματίνη του σπερματοζωαρίου υφίσταται μια αλληλουχία δομικών αλλαγών συμπεριλαμβανομένης και της αντικατάστασης των ειδικών σπερματικών πρωταμινών σε ιστόνες (*Ciemerych & Sicinski, 2005*).

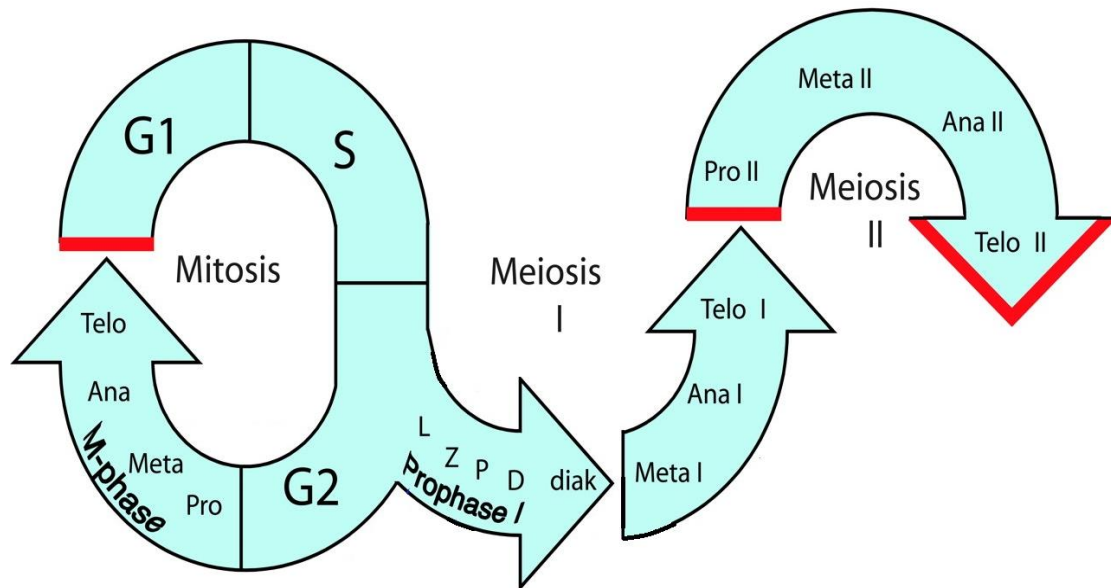
Η διάρκεια της πρώτης μίτωσης είναι διπλάσια από της δεύτερης, γεγονός το οποίο οφείλεται στην παροδική παύση της μετάφρασης που είναι ανεξάρτητη από τη συναρμολόγηση της μιτωτικής ατράκτου. Η διάρκεια της δεύτερης S φάσης διαρκεί περίπου 6 ώρες, ενώ οι G1 και G2 φάσεις είναι πολύ διαφορετικές μεταξύ τους καθώς η G1 είναι εξαιρετικά σύντομη (1-2 ώρες) και η G2 πολύ αργή (12-16 ώρες).

Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια αυτής της μακράς G2 φάσης στο ποντίκι. Οι επόμενες τέσσερις διαιρέσεις που συμβαίνουν μεταξύ του σταδίου των 4 κυττάρων έως το στάδιο των 16 κυττάρων έχουν παρόμοια διάρκεια (10-14 ώρες, G1: 1-2 ώρες, S: 7 ώρες, G2/M: 1-5 ώρες).

Κατά την πέμπτη αυλάκωση (μεταξύ 16 και 32 κυττάρων) σχηματίζονται δύο κυτταρικοί πληθυσμοί, τα πολωμένα εξωτερικά κύτταρα και τα μη πολικά εσωτερικά κύτταρα, τα οποία φαίνεται να διαφέρουν στις παραμέτρους των κυτταρικών τους κύκλων.

Όσο προχωράει η ανάπτυξη, τα εξωτερικά κύτταρα δίνουν αύξηση στο τροφεξώδερμα (πολικό και τοιχωματικό) ενώ τα εσωτερικά κύτταρα

συμβάλλουν στην δημιουργία της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, η οποία θα διαχωριστεί στο επίβλαστο και στο πρωτογενές ενδόδερμα. Τα κύτταρα του πολικού τροφεξωδέρματος διαιρούνται πιο δυναμικά σε σχέση με τα κύτταρα του τοιχωματικού στα οποία συνεχίζεται η αντιγραφή του DNA απουσία μίτωσης, με αποτέλεσμα το μετασχηματισμό τους σε γιγαντιαία πολυπλοειδή κύτταρα.



ΕΙΚΟΝΑ 10. Κυτταρικός κύκλος

VII. ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΜΒΡΥΙΚΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι η διαδικασία με την οποία ένα έμβρυο αρχίζει να μεταγράφει το νεοσυσταθέν γονιδίωμα του. Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι ένα από τα πρώτα κρίσιμα γεγονότα στη ζωή του νέου οργανισμού. Τόσο η χρονική στιγμή της ενεργοποίησης του γονιδιώματος όσο και η συστοιχία των γονιδίων που ενεργοποιούνται πρέπει να ελέγχονται σωστά (*Latham & Schultz, 2001*).

Αρχικά, το μητρικό γονιδίωμα ελέγχει όλες τις πτυχές της πρώιμης εμβρυικής ανάπτυξης, καθώς το γονιμοποιημένο έμβρυο βρίσκεται σε μία μεταγραφική ηρεμία στην αρχή της ανάπτυξης του. Τα mRNAs της μητέρας

και οι πρωτεΐνες που έχουν αποθηκευτεί και συσσωρευτεί στο ώριμο ωάριο κατά τη διάρκεια της ωογένεσης, καθοδηγούν τους πρώτους κυτταρικούς κύκλους και τη βασική βιοσυνθετική διαδικασία στο έμβρυο.

Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι απαραίτητη προκειμένου να συντεθούν νέες πρωτεΐνες και να προχωρήσει περαιτέρω η αυλάκωση. Ο χρόνος που απαιτείται ώστε τα έμβρυα να ξεφύγουν από το μητρικό έλεγχο και να ξεκινήσει η ενεργοποίηση του γονιδιώματός τους διαφέρει μεταξύ των ειδών. Στο ποντίκι, αυτή η μετάβαση ξεκινάει στο στάδιο των 2 κυττάρων (*Studart, 2010*), ενώ το ανθρώπινο γονιδίωμα ενεργοποιείται στο στάδιο που μεσολαβεί στην τρίτη κυτταρική διαίρεση, δηλαδή στα 4-8 κύτταρα (*Braude et al., 1988*).

Προκειμένου να γίνει η μετατόπιση από το μητρικό στο ζυγωτικό γονιδίωμα αρχικά ένα μεγάλο μέρος των μητρικών πρωτεϊνών και των mRNAs αποικοδομείται (περίπου το 90%) έως το στάδιο των 2-κυττάρων, αν και η μετάφραση των μητρικών mRNAs συνεχίζεται έως το στάδιο των 8-κυττάρων. (ΕΙΚΟΝΑ 11)

Έπειτα, λαμβάνει χώρα η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος με σταδιακό τρόπο η οποία ξεκινάει προς το τέλος του σταδίου του 1-κυττάρου και αποτελείται από τουλάχιστον τρεις αναγνωρίσιμες φάσεις. Τη μεταγραφή χωρίς μετάφραση που ξεκινά στο τέλος του σταδίου του 1-κυττάρου (φάση I), τη μεταγραφή σε συνδυασμό με τη μετάφραση που όμως δεν ξεκινάει μέχρι το αρχικό στάδιο των 2-κυττάρων (φάση II), και την ισχυρή μεταγραφή σε συνδυασμό με τη μετάφραση που δεν ξεκινάει πριν το όψιμο στάδιο των 2-κυττάρων (φάση III).

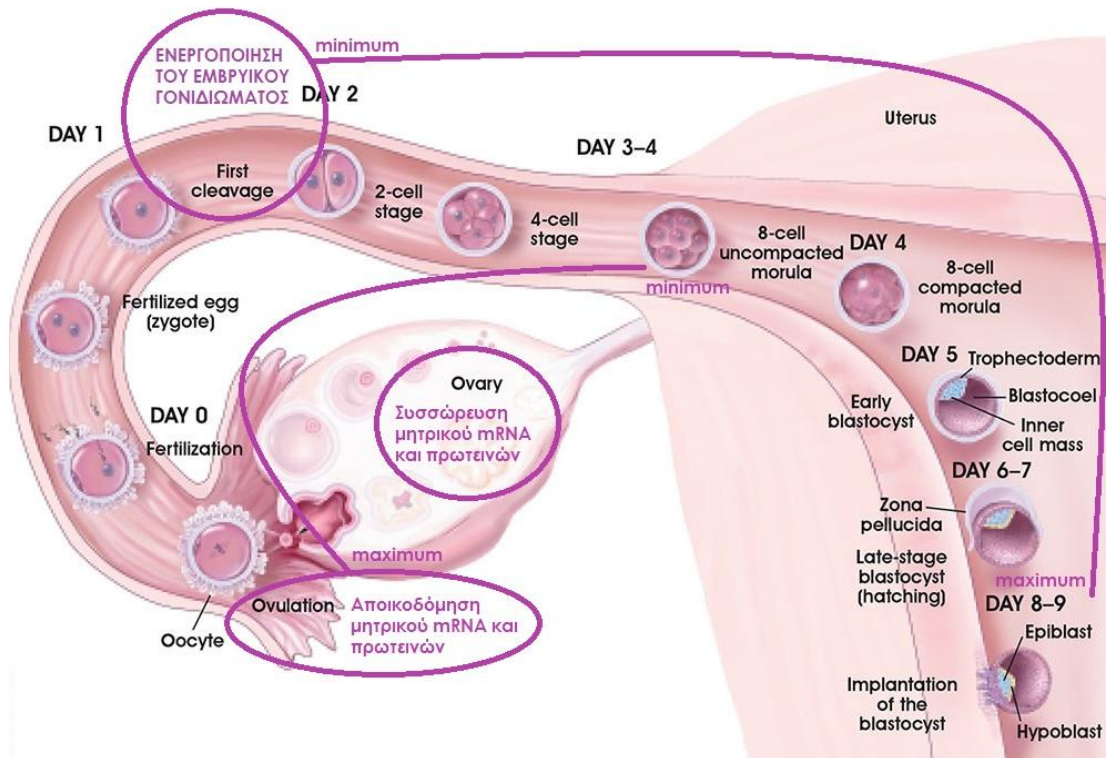
Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης του εμβρυικού γονιδιώματος λαμβάνουν χώρα μια σειρά πυρηνικών και κυτταροπλασματικών γεγονότων τα οποία εξασφαλίζουν ότι το μητρικό και πατρικό γονιδίωμα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν και να αναδιαρθρωθούν πριν ξεκινήσει η μεταγραφή. Η μη σωστή μεταγραφή ορισμένων γονιδίων κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου των πυρηνικών επαναπρογραμματισμών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παύση της περαιτέρω ανάπτυξης ή να έχει μακροπρόθεσμα αρνητικές συνέπειες για το έμβρυο. Ως εκ τούτου, ο ακριβής

έλεγχος κατά την ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι απαραίτητος για τη φυσιολογική εμβρυογένεση (Latham, 1999).

Η προεμφυτευτική ανάπτυξη λοιπόν, περιλαμβάνει δύο κύριες μεταβάσεις:

- Από τη μετάφαση II του ωοκυττάρου στο προέμβρυο των 4 κυττάρων.
- Από το προέμβρυο των 8 κυττάρων στη δημιουργία της βλαστοκύστης.

Η μελέτη του RPLP0 είναι σημαντική καθώς το γονίδιο αυτό εμπλέκεται στην μετάφραση του γενετικού υλικού.



ΕΙΚΟΝΑ 11. Μητρικό mRNA και πρωτεΐνες συσσωρεύονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ωαρίου. Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος ξεκινάει προς το τέλος του σταδίου του 1-κυττάρου. Τα έμβρυα αρχίζουν να γίνονται συμπαγή για να σχηματίσουν το μορίδιο και έπειτα τη βλαστοκύστη, η οποία θα εμφυτευτεί στο τοίχωμα της μήτρας.

VIII. ΠΡΟ-ΕΜΒΡΥΟ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΩΝ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Γενικά, τις 14 - 18 πρώτες ημέρες της εμβρυικής δημιουργίας δεν είναι εφικτός ο διαχωρισμός ανάμεσα στο έμβρυο και στους έξω-εμβρυικούς ιστούς του. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιείται ο όρος προ-έμβρυο ώστε να περιγράψει τον νεοσυντιθέμενο οργανισμό στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο. Ο όρος προ-έμβρυο χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις συστάσεις της Εθελοντικής Αρχής Αδειοδότησης για τα Ανθρώπινα Δικαιώματα στην Εξωσωματική Γονιμοποίηση και την Εμβρυολογία. (*Braun – Breton et al., 1986*)

Η γονιμοποίηση επαναπρογραμματίζει το ανθρώπινο ωάριο και σπερματοζωάριο από μη διαιρούμενα, πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα σε πολυδύναμα βλαστομερίδια. Η ιδιότητα των βλαστικών κυττάρων ως πολυδύναμα, διαρκεί για τρεις ή τέσσερις μιτωτικές διαιρέσεις, έως ότου το ζυγωτό να φτάσει στο στάδιο των 8 ή των 16 κυττάρων - μορίδιο.

Το χρονικό διάστημα παραμονής του στη σάλπιγγα, το προ-έμβρυο συνεχίζει τις κυτταρικές διαιρέσεις. Κάθε κύτταρο ή αλλιώς βλαστομερίδιο υπόκειται σε μια σειρά διαιρέσεων, κατά τη διάρκεια των οποίων το συνολικό μέγεθος του προ-εμβρύου παραμένει περίπου το ίδιο. Ως αποτέλεσμα, με κάθε πραγματοποιούμενη κυτταρική διαίρεση μειώνεται σταδιακά το μέγεθος του κάθε βλαστομεριδίου, επαναφέροντας στο φυσιολογικό την υψηλή αναλογία του κυτταροπλάσματος προς τον πυρήνα. Το προ-έμβρυο στο στάδιο των 8 κυττάρων προκύπτει κατά την τρίτη κυτταρική διαίρεση του ζυγωτού μετά τη γονιμοποίηση.

Είναι αξιοσημείωτο ότι κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος που το προ-έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο των 8 κυττάρων, εδραιώνονται μοναδικά πρότυπα γονιδιακής μεθυλίωσης, τα οποία καθορίζουν την επιγενετική ρύθμιση που διαιωνίζεται σε όλη την ενήλικη ζωή. (*Reik, W. & Walter J., 2001*)

Το ανθρώπινο βλαστομερίδιο στο στάδιο των 8 κυττάρων ανάπτυξης, είναι ένα μοναδικό και παντοδύναμο κύτταρο. Παρά τη θεμελιώδη σημασία που έχει για την ανθρώπινη αναπαραγωγή, ελάχιστα πράγματα είναι γνωστά

για τον κυτταρικό έλεγχο της έκφρασης των γονιδίων και του διπλασιασμού των χρωμοσωμάτων στο στάδιο αυτό. (Kiessling *et al.*, 2010)

Στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή, ο αριθμός των εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων *in vitro*, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για την επιλογή της τρίτης ή της πέμπτης ημέρας, ως ημέρας εμβρυομεταφοράς. (Racowsky *et al.*, 2000) (ΕΙΚΟΝΑ 12)



ΕΙΚΟΝΑ 12. Έμβρυο στο στάδιο των 8 κυττάρων

IX. ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

Άλλη μια κατηγορία κυττάρων που μας ενδιαφέρει, πέραν των εμβρύων στο στάδιο των οκτώ κυττάρων, είναι τα αποπτωτικά έμβρυα. Τα αποπτωτικά έμβρυα προκύπτουν, καθώς είναι δύσκολο σε *in vitro* συνθήκες να αναπτυχθεί ένας οργανισμός και να επιζήσει σε προχωρημένα στάδια ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, πολλά έμβρυα πεθαίνουν στο τριβλίο πριν καταφέρουν να φτάσουν στο στάδιο του μοριδίου.



ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπό της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η μελέτη της έκφρασης του RPLP0, γονιδίου του κυτταρικού κύκλου, σε έμβρυα επίμυ στο στάδιο των 8 κυττάρων και σε αποπτωτικά έμβρυα, καθώς και η σύγκριση της έκφρασης του γονιδίου μεταξύ αυτών των δύο κατηγοριών εμβρύων, έτσι ώστε να συσχετιστεί η έκφραση του γονιδίου RPLP0 με την ποιότητα των εμβρύων. Παράλληλα, να επισημανθούν οι πιθανοί μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με μια φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη και κατά συνέπεια να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί βιοδείκτες ώστε να προβλεφθεί η εξέλιξη του εμφυτευμένου εμβρύου.

Τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συνθήκες και πρωτόκολλα που να προσομοιάζουν απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον μέσα στη μήτρα. Για την αξιολόγηση της έκφρασης του γονιδίου αυτού, πραγματοποιήθηκε αρχικά συλλογή των εμβρύων του επίμυ και έπειτα κατάψυξη των αποπτωτικών εμβρύων καθώς και των εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων. Στη συνέχεια, αφού έγινε απομόνωση του mRNA και παρασκευή του cDNA, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) με σκοπό τον προσδιορισμό της έκφρασης του υπό μελέτη γονιδίου.



I. G6PD GENE (Glucose – 6 – Phosphate Dehydrogenase)

Η έκφραση των γονιδίων που θέλαμε να μελετήσουμε αναλύθηκε μαζί με ένα γονίδιο αναφοράς το οποίο γνωρίζουμε από τη βιβλιογραφία ότι εκφράζεται στον οργανισμό-μοντέλο που χρησιμοποιούμε, ώστε να ομαλοποιηθεί το ποσό του cDNA που χρησιμοποιεί η PCR ως υπόστρωμα και ως εκ τούτου να καταστεί δυνατός ο υπολογισμός της σχετικής συγκέντρωσης των επιθυμητών γονιδίων σε σχέση με το γονίδιο αναφοράς.

Το γονίδιο αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε ήταν το mG6PD. Το mG6PD είναι ένα housekeeping γονίδιο το οποίο απαιτείται για τη συντήρηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών. Επιπλέον, εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ποντικίου υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες.

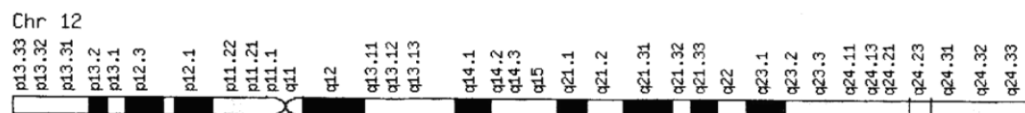
II. RPLP0 GENE (Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0)

Το γονίδιο RPLP0 (ριβοσωμική πρωτεΐνη με πλευρική υπομονάδα στελέχους P0) αποτελεί γονίδιο του κυτταρικού κύκλου και ρόλος του είναι να κωδικοποιεί την 60S ριβοσωμική πρωτεΐνη P0 του ανθρώπου. Τα ριβοσώματα καταλύουν τη σύνθεση πρωτεϊνών και αποτελούνται από μια μικρή υπομονάδα 40S και μια μεγάλη 60S υπομονάδα. Μαζί αυτές οι υπομονάδες αποτελούνται από 4 είδη RNA και περίπου 80 δομικά διακριτές πρωτεΐνες.

Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη που είναι ένα συστατικό της υπομονάδας 60S. Η πρωτεΐνη, η οποία είναι το λειτουργικό ισοδύναμο της ριβοσωματικής πρωτεΐνης E. coli L10, ανήκει στην οικογένεια L10P ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Πρόκειται για μια ουδέτερη φωσφοπρωτεΐνη που εδράζει στο μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 12 (ΕΙΚΟΝΑ 13). Η πρωτεΐνη P0 μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις P1 και P2 για να σχηματίσει ένα πενταμερικό σύμπλοκο που αποτελείται από διμερή P1 και P2 και ένα P0 μονομερές.

Παραλλαγές μεταγραφών που προέρχονται από εναλλακτικό μάτισμα υπάρχουν και κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη. Όπως είναι χαρακτηριστικό των γονιδίων που κωδικοποιούν ριβοσωμικές πρωτεΐνες, υπάρχουν πολλαπλά επεξεργασμένα ψευδογονίδια αυτού του γονιδίου διασκορπισμένα μέσα στο γονιδίωμα.

Οι P1 και P2 φέρουν δύο μοναδικές ιδιότητες. Καταρχάς, αποτελούν τις μόνες ριβοσωμικές πρωτεΐνες που βρίσκονται σε παραπάνω από ένα μετάγραφα και δεύτερον, είναι οι μόνες που δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με το ριβόσωμικό RNA, αλλά μέσω της πρωτεΐνης P0 (Wahl, Möller 2002). Έρευνες έδειξαν ότι η υποκυτταρική διανομή των ανθρώπινων P πρωτεϊνών δεν ακολουθεί την κλασική συμπεριφορά ριβοσωμικών πρωτεϊνών. Οι P1 και P2 δεν μεταφέρονται ενεργά στον πυρήνα αλλά παραμένουν στο κυτταρόπλασμα, ενώ η P0 ανιχνεύεται τόσο στο κυτταρόπλασμα όσο και στον πυρήνα, όχι όμως στον πυρινίσκο. Η διανομή της μπορεί να συσχετίζεται και με το πυρηνικό σωματίο. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν την πρώτη περίπτωση στην οποία οι r-πρωτεΐνες δε μεταφέρονται ενεργά μέσα στον πυρήνα, γεγονός που υπονοεί ότι τα συστατικά του μίσχου συγκεντρώνονται στο ριβόσωμα στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσής του, το οποίο λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα (Tchórzewski et al., 2003).



ΕΙΚΟΝΑ 13. Απεικόνιση του ανθρώπινου χρωμοσώματος 12 στο οποίο εδράζει το γονίδιο RPLP0. Το γονίδιο περιλαμβάνεται στο μακρύ βραχίονα του χρωμοσώματος.

Οι πρωτεΐνες P εμπλέκονται σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου χωρίς όμως να έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος τους. Πιθανών, αλληλεπιδρούν άμεσα με παράγοντες επιμήκυνσης κατά την πρωτεϊνοσύνθεση. Στη μετάφραση πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες αυτές αλλάζουν την ειδικότητα με την οποία το ριβόσωμα προσδένει διάφορα mRNAs. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις

ότι οι P πρωτεΐνες εμπλέκονται στη μεταγραφή και στην επιδιόρθωση του DNA και δρουν ως σημαντικά αντιγόνα στα αυτοάνοσα νοσήματα (Tchórzewski 2002). Πρόσφατες μελέτες έχουν συσχετίσει τις P πρωτεΐνες με γυναικολογικούς καρκίνους και πιο συγκεκριμένα με την έκφραση της p53 σε καρκίνους των ωοθηκών (Artero-Castro et al., 2010).

Οι αποφωσφορυλιωμένες μορφές των P1 και P2 δημιουργούν στο κυτταρόπλασμα μια μη συνηθισμένη δεξαμενή. Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, παρατηρείται μια ανταλλαγή P πρωτεϊνών ανάμεσα στις πρωτεΐνες της δεξαμενής και του ριβοσώματος. Ριβοσώματα γυρνά από τις όξινες πρωτεΐνες είναι βιώσιμα αλλά χρειάζονται τριπλάσιο χρόνο για να δομηθούν ορθά συγκριτικά με τα φυσιολογικά.

Οι P1, P2 είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του ριβοσώματος, και είναι ικανές να επηρεάσουν τη μετάφραση κάποιων συγκεκριμένων mRNA.

Η πρωτεΐνη P0 είναι ανάλογη της βακτηριακής ριβοσωμικής πρωτεΐνης L10, αλλά φέρει μία επιπλέον καρβοξυλική επικράτεια παρουσιάζοντας έτσι μια υψηλή ομολογία στην ακολουθία με τις P1 και P2. Στην επικράτεια αυτή, που ανέρχεται στα 100 αμινοξέα περιλαμβάνεται και το τελικό DDDMGFGLFD. (Ramacha et al., 1995).

Για να διαπιστωθεί η αναγκαιότητα της ύπαρξης της πρωτεΐνης P0 έγιναν πειράματα στα οποία προκλήθηκαν ελλείψεις της τελικής περιοχής της. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι χάνοντας την περιοχή των 100 αμινοξέων που είναι ομόλογη στις P1/P2, η 60S υπομονάδα καθίσταται μη λειτουργική και τα κύτταρα απόπτωνται. Το τμήμα της P0 με τα κατάλοιπα 230-290 είναι σημαντικό για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών P1 και P2 με το ριβόσωμα αλλά δεν είναι σημαντικό για την πρωτεϊνοσύνθεση, ενώ η περιοχή που περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 185-230 απαιτείται για την αλληλεπίδραση της P0 με το rRNA. (Santos et al., 1995)

Συνοψίζοντας, το γονίδιο RPLP0 είναι πολύ σημαντικό για την ορθή λειτουργία της πρωτεϊνοσύνθεσης. Έρευνες συνέκριναν την έκφραση του γονιδίου με τη χρήση microarrays στο προέμβρυο των 8 κυττάρων και σε κύτταρα HeLa και παρατήρησαν ότι το γονίδιο υπερεκφράζεται στην πρώτη περίπτωση. (Kiessling et al., 2009)

Τα χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (ΠΙΝΑΚΑΣ 5):

RPLP0

Οργανισμός: mus musculus

Εξώνια: 7

Primers στα εξώνια: 6-7

PRIMERS:

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTGGAGACTGAGTACACCTTC	Plus	22	878	899	59.77	54.55	5.00	2.00
Reverse primer	GTCGAAGAGACCGAATCCCAT	Minus	21	1072	1052	59.59	52.38	4.00	2.00
Product length	195								

Products on intended target

>NM_007475.5 Mus musculus ribosomal protein, large, P0 (Rplp0), mRNA

product length = 195

Forward primer 1 GTGGAGACTGAGTACACCTTC 22
Template 878 899

Reverse primer 1 GTCGAAGAGACCGAATCCCAT 21
Template 1072 1052

BLAST:

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value
☐	Mus musculus ribosomal protein, large, P0 (Rplp0), mRNA	1249	1249	100%	0.0

PROBES:

CGAGTCCTGGCCTTGTCTGTGGA-FL

CGGATTACACCTTCCCACTTGCTG-640

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: Τα χαρακτηριστικά των primers και των probes

Οι probes που χρησιμοποιήσαμε ανήκουν στην κατηγορία των hybridization probes. Συγκεκριμένα, αναφερόμαστε σε τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια από τα οποία τα δύο είναι εκκινητές και τα δύο ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο προϊόν της

αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις. Επιπλέον, ο πρώτος ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δότης ενέργειας. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, οι δύο ανιχνευτές προσδένονται στο προϊόν, με αποτέλεσμα τη γειτνίαση των δύο φθορίζοντων μορίων και τη μεταξύ τους μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού. Η μεταφορά ενέργειας από τη μια χρωστική (δότης) στην άλλη (δέκτης) οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος από του δότη. Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού γενετικού υλικού που παράγεται κατά την αντίδραση.

Πειραματικές Μέθοδοι

Οι πειραματικές μέθοδοι που διεξάχθηκαν είναι:

- I. Η γονιμοποίηση 20 επίμυων στελέχους *mus musculus*.
- II. Η συλλογή των εμβρύων των επίμυων.
- III. Η απομόνωσή των αποπτωτικών εμβρύων και αυτών που έφτασαν στο στάδιο των 8 κυττάρων.
- IV. Η μέθοδος απομόνωσης του ολικού mRNA των αποπτωτικών εμβρύων και αυτών που έφτασαν στο στάδιο των 8 κυττάρων.
- V. Η δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης από το mRNA των αποπτωτικών εμβρύων και αυτών που έφτασαν στο στάδιο των 8 κυττάρων.
- VI. Τέλος, η μέθοδος RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) για τον προσδιορισμό της έκφρασης του γονιδίου RPLP0.

III. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ MUS MUSCULUS

Αρχή της Μεθόδου

Η επίτευξη της γονιμοποίησης των επίμυων αποτελεί την αρχική διαδικασία και καθοριστική για την έναρξη της μελέτης μας.

Αρχικά, απαραίτητη είναι η διέγερση των ωοθηκών των ποντικών με σκοπό την πολλαπλή ανάπτυξη και ωρίμανση των ωοθυλακίων τους. Αυτό είναι σημαντικό, έτσι ώστε μετά το ζευγάρωμα των θηληκών με τους αρσενικούς επίμυες, να επιτευχθεί μαζική παραγωγή εμβρύων.

Υλικά

- Θηλυκά και αρσενικά ποντίκια στελέχους *mus musculus*.
- PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Chemical Co), η γοναδοτροπίνη είναι μια ορμόνη προερχόμενη από έγκυες φοράδες για την ανάπτυξη ωοθυλακίων. Χρησιμοποιείται μαζί με το προγεσταγόνο για να προκαλέσει ωορρηξία στα ζώα πριν από την επαφή με το σπέρμα.
- HCG (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma Chemical Co), η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη συμβάλλει στη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων και την παραγωγή στεροειδών από τις γονάδες.

Πειραματική Διαδικασία

Παραλάβαμε 20 θηλυκά ποντίκια στελέχους *mus musculus* 3-4 εβδομάδων από το ινστιτούτο Pasteur. Ξεκινήσαμε την πρόκληση ωοθυλακιωρρηξίας με τη χορήγηση 100μL PMSG. Έπειτα από 48 ώρες τους χορηγήσαμε 100μL HCG και τα βάλαμε να ζευγαρώσουν με 20 αρσενικά ποντίκια (ιδίου στελέχους και ηλικίας 9 εβδομάδων), σε ζευγάρια ξεχωριστά, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Θεωρητικά, η γονιμοποίηση επιτεύχθηκε.

IV. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

Αρχή της Μεθόδου

Σκοπός της συλλογής των εμβρύων των επίμυων είναι η ανάπτυξή τους σε συνθήκες *in vitro*, έτσι ώστε να παρακολουθήσουμε την πορεία της διαίρεσης των κυττάρων και να καταφέρουμε να απομονώσουμε τα έμβρυα.

Υλικά

- DPBS pH 7,3 (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1x, Gibco), χρησιμοποιήθηκε στο καλλιεργητικό μας υλικό ως θρεπτικό μέσο. Αποτελεί ένα αλατούχο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη ρύθμιση φωσφορικών, καθώς περιέχει φωσφορικά και ιόντα καλίου, σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου. Η ευρεία χρήση του είναι για το ξέπλυμα ύστερα από αφαίρεση παλιού θρεπτικού υλικού κατά τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας (split). Η οσμωτικότητα και οι συγκεντρώσεις ιόντων των διαλυμάτων ταιριάζουν με εκείνες του ανθρώπινου σώματος. (*Goutzourelas N et al., 2015*)
- BSA (Bovine Serum Albumin, παράγοντας V, Sigma-Aldrich) αλβουμίνη βόειου ορού χρησιμοποιήθηκε στο καλλιεργητικό μας υλικό ως θρεπτικό μέσο. Είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία προέρχεται από βοοειδή.
- Υαλουρονιδάση για την επίτευξη του καθαρισμού των εμβρύων, απομονώνοντάς τα από τα κοκκώδη κύτταρα.
- Ham's καλλιεργητικό μέσο (Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine, Gibco), ειδικό διάλυμα για την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς περιέχει ψευδάργυρο, υποξανθίνη και θυμιδίνη.
- Διάλυμα wash/collection, DPBS:BSA σε αναλογία 9:1 για την ενίσχυση της δράσης του DPBS.
- Διάλυμα καλλιέργειας Ham's:BSA σε αναλογία 9:1, χρησιμοποιεί το ρυθμιστικό σύστημα του διττανθρακικού νατρίου με σκοπό να διατηρήσει ένα σταθερό pH, απαιτεί αναγκαστικά ένα περιβάλλον με 5–10 % CO₂, το οποίο και εξασφαλίζεται από στις συνθήκες του κλιβάνου (*Behr et al., 1990*).

Πειραματική Διαδικασία

Μετά το πέρας 24 ωρών από τη διαδικασία γονιμοποίησης των επίμυων, τα θυσιάσαμε μέσω αυχενικής μετατόπισης και σε ασηπτικές συνθήκες απομονώσαμε τις σάλπιγγες τους. (ΕΙΚΟΝΑ 14)

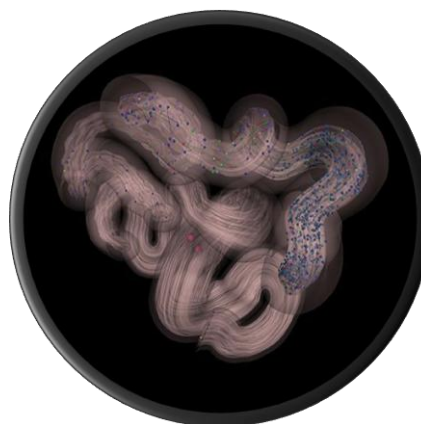


ΕΙΚΟΝΑ 14. Αφαίρεση σάλπιγγας από γονιμοποιημένο ποντίκι.

Οι τελευταίες τοποθετούνται σε πιάτο καλλιέργειας petri 60x15mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) (ΕΙΚΟΝΑ 15), με μέσο καλλιέργειας που αποτελείται από DPBS με 10% BSA σε αναλογία 9:1. Έχουν χαρακτηριστική μορφή σπειράματος και είναι διατεταγμένες καθώς εμπεριέχουν τα γονιμοποιημένα ωάρια (ΕΙΚΟΝΑ 16). Υπό συνεχή στερεοσκοπική παρατήρηση και με την ταυτόχρονη χρήση λαβίδας (με την οποία συγκρατείται η σάλπιγγα) και υποδερμικής βελόνας (με την οποία τεμαχίζεται μηχανικά), πραγματοποιείται διάνοιξη των σαλπίγγων και απομακρύνονται όλα τα έμβρυα.



EIKONA 15. Τρυβλίο petri 60x15mm.



EIKONA 16. Μορφή ωαγωγού.

Στο κεντρικό πηγάδι του πιάτου καλλιέργειας προστίθενται 10 μL υαλουρονιδάσης, προκειμένου να επιτευχθεί ο καθαρισμός και η απομόνωση των γονιμοποιημένων ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν. Τα γονιμοποιημένα ωάρια επώάζονται για 30 δευτερόλεπτα στην υαλουδονιδάση και αναρροφούνται με γυάλινη πιπέτα, απαλλαγμένα από τα κοκκώδη. Αρχικά, τοποθετούνται στην περιφέρεια του πιάτου καλλιέργειας και έπειτα αναρροφούνται και τοποθετούνται στο κεντρικό πηγάδι καινούργιου πιάτου καλλιέργειας που περιέχει μέσο απομόνωσης (DBPS: BSA, 9:1). Η διαδικασία των πλύσεων επαναλαμβάνεται 2-3 φορές έως ότου τα γονιμοποιημένα ωάρια απαλλαχθούν πλήρως από τα κοκκώδη κύτταρα στην περιφέρεια τους. (EIKONA 17)

Τέλος, τα έμβρυα τοποθετούνται ανά ομάδες των 10 εμβρύων στο κεντρικό πηγάδι του πιάτου καλλιέργειας, το οποίο περιέχει 1mL καλλιεργητικού μέσου Ham's και BSA σε αναλογία 9:1. Στην περιφέρεια του πιάτου τοποθετούνται 4 mL καλλιεργητικού μέσου. Τα έμβρυα τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με ρυθμισμένες συνθήκες: 37 °C, 5% CO_2 και 95% υγρασία.



ΕΙΚΟΝΑ 17. Έμβρυα με κοκκώδη κύτταρα

V. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΑΔΙΟΥ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Αρχή της Μεθόδου

Σκοπός της απομόνωσης των εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων καθώς και των αποπτωτικών εμβρύων είναι η περεταίρω σύγκριση της έκφρασης του επιθυμητού γονιδίου μεταξύ των δύο τύπων εμβρύων.

Υλικά

- RNA later με σκοπό να σταματήσει την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου. Πέρα από τη σταθεροποίηση, προστατεύει το απομονωμένο mRNA για την κατάψυξη που ακολουθεί στους -80°C . (Mutter et al., 2004)

Πειραματική Διαδικασία

Μετά τη μεταφορά των γονιμοποιημένων ωάριων στα τρυβλία με το καλλιεργητικό υλικό ανάπτυξης και την τοποθέτησή τους στον κλίβανο, γίνονται επαναλαμβανόμενοι στερεοσκοπικοί έλεγχοι ανά τακτά χρονικά διαστήματα.



ΕΙΚΟΝΑ 18.

Απομόνωση των εμβρύων ανά 10 σε σωληνάρια eppendorf του 1.5mL.

Έπειτα από 72 ώρες, καταφέραμε να απομονώσουμε 18 έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων και 63 αποπτωτικά έμβρυα. Τα φυλλάξαμε ανά 10 σε σωληνάρια eppendorf του 1.5mL με την προσθήκη 20 μL RNA later. Η αποθήκευσή τους πραγματοποιήθηκε στους -80°C μέχρι τη χρήση τους. (ΕΙΚΟΝΑ 18).

VI. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΑΔΙΟΥ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Αρχή της Μεθόδου

Η απομόνωση του RNA των εμβρύων είναι μια διαδικασία καθαρισμού του RNA από τα καλλιεργούμενα έμβρυά μας.

Για την απομόνωση του mRNA από τα έμβρυα χρησιμοποιείται το ειδικό RNeasy Plus Micro kit της εταιρείας Qiagen (Valencia, CA) όπου και ακολουθείται το πρωτόκολλο της εταιρείας που εμπεριέχεται σε αυτό. Το συγκεκριμένο kit είναι κατάλληλο για απομόνωση mRNA από μικρό αριθμό κυττάρων, ιδανικό επομένως για το συγκεκριμένο πείραμα και τον μικρό τελικό αριθμό εμβρύων που διαθέτετε.

Υλικά

- RA1 (Lysis Buffer) για τη διάλυση των κυτταρικών δομών και την ομογενοποίηση των κυττάρων.
- TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine) αποτελεί ένα αποδιατακτικό διάλυμα. Είναι ένας αναγωγικός παράγοντας που χρησιμοποιείται για τη λύση και την ομογενοποίηση των κυττάρων.
- Carrier RNA working solution για τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή ακόμη και μικρής ποσότητας RNA.
- Μωβ στήλη (NucleoSpin® Filter – violet ring) σκοπός της είναι να συγκρατεί το DNA.
- 70% EtOH (αιθανόλη 70%) για τη ρύθμιση των συνθηκών προσκόλλησης του RNA και την κατακρήμνισή του.
- Μπλε στήλη (NucleoSpin® RNA XS Column - light blue ring) σκοπός της είναι να συγκρατεί το RNA.
- MDB (Membrane Desalting Buffer) για αφαλάτωση, έτσι ώστε να απομακρυνθεί ό,τι δεν είναι RNA.

- RA3 (Wash Buffer) για την απομάκρυνση πιθανών υπολειμμάτων.
- dH₂O για να παρασύρει στο τελικό eppendorf το RNA.

Πειραματική Διαδικασία

- Παραλαβή του eppendorf των εμβρύων από τους -80°C.
- Προσθήκη 100μL RA1.
- Προσθήκη 2μL TCEP.
- Vortex 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα.
- Προσθήκη 5μL Carrier RNA.
- Vortex 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφορά όλης της ποσότητας σε μωβ στήλη.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
- Διατήρηση θήκης και προσθήκη 100μL 70% EtOH.
- Vortex 2 φορές για 5 δευτερόλεπτα.
- Μεταφορά όλης της ποσότητας σε μπλε στήλη.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
- Διατήρηση θήκης και προσθήκη 100μL MDB.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
- Κρατάμε τη στήλη και προσθέτουμε 400μL RA3.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
- Διατήρηση θήκης και προσθήκη 200μL RA3.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 2 λεπτά.
- Μεταφορά της στήλης σε eppendorf με καπάκι και προσθήκη 10μL dH₂O.
- Φυγοκέντρηση στα 11.000g για 1 λεπτό.
- Τέλος, απόρριψη της στήλης και διατήρηση του eppendorf, αποθήκευσή του στους -80°C.

VII. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ

Αρχή της Μεθόδου

Η δημιουργία cDNA είναι απαραίτητη για τη μελέτη ενός συγκεκριμένου γονιδίου. Με αυτή τη διαδικασία κατασκευάζουμε αντίγραφα DNA των mRNA των εμβρύων τα οποία ονομάζονται συμπληρωματικά DNA ή cDNA. Μέσω της αντίστροφης μεταγραφής δημιουργείται μια cDNA βιβλιοθήκη. Η σύνθεσή της αντανακλά το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στον κυτταρικό πληθυσμό από τον οποίον απομονώθηκε το mRNA. Έτσι, οι cDNA βιβλιοθήκες είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να συγκριθούν τα επίπεδα της έκφρασης κάθε γονιδίου. *(Peter J. Russell, 2009)*

Αρχικά, ένα μικρό ολιγονουκλεοτίδιο συμπληρωματικό με την πολύ(A) ουρά του 3' άκρου mRNA υβριδίζεται με το RNA και δρα ως εκκινητής για την αντίστροφη μεταγραφάση, η οποία κατόπιν αντιγράφει το RNA σε μια συμπληρωματική αλυσίδα DNA, σχηματίζοντας έτσι μια υβριδική έλικα DNA/RNA. Η έκθεση της υβριδικής έλικας DNA/RNA σε αλκαλικό διάλυμα οδηγεί σε εκλεκτική αποδόμηση του RNA κλώνου στα επιμέρους νουκλεοτίδια του. Στη συνέχεια, το μονόκλωνο cDNA αντιγράφεται σε δίκλωνο cDNA από το ένζυμο DNA πολυμεράση.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε το kit και το πρωτόκολλο Superscript II First Strand Synthesis System for RT-PCR, της εταιρίας Invitrogen, κατάλληλο για μικρές συγκεντρώσεις mRNA, όπως και το kit απομόνωσης στο προηγούμενο στάδιο. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA έγινε με την προσθήκη τυχαίων εξαμερών για να δράσουν ως εκκινητές στην αλληλουχία του γονιδίου RPLP0, μια μέθοδος λιγότερο ειδική αλλά απαραίτητη εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Υλικά

- dNTPs (deoxynucleotides- ATP, GTP, TTP, CTP) απαραίτητα για τον υβριδισμό.
- Random Hexamers για την ενίσχυση του κύκλου. Συγκεκριμένα, δρουν ως εκκινητές για να αρχίσουν τη σύνθεση του πρώτου κλώνου cDNA.
- RT-Buffer 10x (Real Time Buffer), το οποίο αποτελεί ένα ρυθμιστικό διάλυμα.
- Mg-Cl₂. Το χλωριούχο μαγνήσιο αποτελεί συμπαράγοντα της αντίστροφης μεταγραφάσης και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας στο διάλυμα.
- DTT. Η διθειοθρεϊτόλη αποτελεί ένα αντιδραστήριο οξειδοαναγωγής μικρών μορίων. Συνεπώς, καταστρέφει τους δισουλφιδικούς δεσμούς με αποτέλεσμα την αποδυνάμωση της δευτεροταγούς δομής του RNA. Παράλληλα, αποτελεί προστατευτικό παράγοντα των ομάδων θειόλης του DNA.
- RNaseOUT (Recombinant RNase Inhibitor) προστίθεται για την προστασία από την υποβάθμιση του RNA στόχου λόγω μόλυνσης από τη ριβονουκλεάση.
- SS RT (Superscript II Reverse Transcriptase) είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για τη σύνθεση του cDNA.

Πειραματική Διαδικασία

- Προσθήκη 1μL dNTPs σε καινούργιο eppendorf.
- Προσθήκη 5μL random hexamers.
- Προσθήκη 4μL από το RNA μας, το οποία είχαμε βγάλει από τους -80°C και το είχαμε τοποθετήσει σε cooler για να ξεπαγώσει.
- Τοποθέτηση του eppendorf στον θερμοκυκλοποιητή στους 65°C για 5 λεπτά και έπειτα στους 4°C για 10 λεπτά. Αυτή η διαδικασία έχει σκοπό την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του mRNA. (EIKONA 19)
- Διατήρηση του eppendorf στο cooler και προσθήκη 2μL RT-Buffer 10x.
- Προσθήκη 4μL Mg-Cl₂.
- Προσθήκη ακόμα 2μL DTT.
- Έπειτα, 1μL RNaseOUT.
- Τέλος, 1μL SS RT και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.

- Τοποθέτηση του erppendorf στον θερμοκυκλοποιητή στους 42°C για 50 λεπτά και έπειτα στους 70°C για 15 λεπτά
- Παραλαβή του erppendorf με το cDNA και αποθήκευσή του στους -20 °C.



ΕΙΚΟΝΑ 19. Θερμοκυκλοποιητής για την κατασκευή του cDNA

VIII. ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ (RT-PCR)

Αρχή της Μεθόδου

Με τη μέθοδο PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) ο πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται με πολλαπλούς γύρους αντιγραφής της αλληλουχίας-στόχου, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία προσδένονται στο μονόκλωνο DNA στα άκρα της αλληλουχίας στόχου σύμφωνα με τον κανόνα της συμπληρωματικότητας.

Με τη Real-Time PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου), η οποία αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR υπάρχει η δυνατότητα παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων καθώς χρησιμοποιούνται φθορίζοντες ανιχνευτές που είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο DNA-στόχο ή σε dsDNA (που σχηματίζεται όταν ο εκκινητής προσδένεται στο DNA-στόχο) και να εκπέμπουν φθορίζοντα σήματα. Τα φθορίζοντα σήματα που εκπέμπονται κατά τη διάρκεια των κύκλων της Real-Time PCR, συσχετίζονται με την ποσότητα του προϊόντος που υπάρχει στην αντίδραση, επιτρέποντας κατ' αυτόν τον τρόπο, τον άμεσο υπολογισμό του αριθμού των αντιγράφων της νουκλεϊκής αλληλουχίας-στόχου. Σε κάθε κύκλο της Real-Time PCR, προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης ως αποτέλεσμα του εκπέμψαντος φθορισμού, γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί, ανά πάσα στιγμή, την πορεία της αντίδρασης. Η καμπύλη ενίσχυσης, διακρίνεται σε τρεις φάσεις: αρχική/λανθάνουσα, την εκθετική και τη φάση κορεσμού.

Η αρχική/λανθάνουσα φάση ή background φάση διαρκεί έως ότου το σήμα φθορισμού από το προϊόν της PCR να είναι μεγαλύτερο/ισχυρότερο από το φθορισμό του μη-ειδικού σήματος. Η εκθετική φάση ξεκινά όταν έχει συσσωρευτεί αρκετή ποσότητα προϊόντος και μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από το background, ενώ τελειώνει όταν η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης μειώνεται καθώς η αντίδραση εισέρχεται στη φάση κορεσμού (*LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual Software Version 1.5, 2008*)

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle) ή C_p (Crossing point). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο. Η τιμή C_p είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος. Η διεξαγωγή της Real-Time PCR έγινε με τη χρήση του μηχανήματος Light Cycler 480 Real-Time PCR Instrument, της εταιρίας Roche

και η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης έγινε με Hybridization Probes και SYBR green I .

Παράλληλα με την αντίδραση της Real-time PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου RPLP0, πραγματοποιήθηκε η αντίστοιχη αντίδραση για το γονίδιο της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορικής γλυκόζης (*muG6PD*). Το *muG6PD*, όντας ένα γονίδιο που εκφράζεται σταθερά από τα κύτταρα και τους ιστούς, χρησιμοποιείται ως γονίδιο αναφοράς, με τη βοήθεια του οποίου κανονικοποιείται η τιμή του άγνωστου DNA-στόχου.

Για την ποσοτικοποίηση του γονιδίου *miR-302* χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα ουσία SYBR green I και το μίγμα της αντίδρασης προετοιμάζεται σε σωληνάρια erppendorf 0.5 ml όπως φαίνεται παρακάτω.

Υλικά

- Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X)
- Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)
- Forward Primer (10μM)
- Reverse Primer (10μM)
- Probe 1 (10μM)
- Probe 2 (10μM)
- Nuclease-free Water
- cDNA

Πειραματική Διαδικασία

- Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται η διαδοχική σειρά προσθήκης και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν:

COMPONENTS	20μL REACTION	FINAL CONCENTRATION
Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2X)	10 μL	1X
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20X)	1 μL	1X
Forward Primer (10μM)	0,8 μL	0,4μM
Reverse Primer (10μM)	0,8 μL	0,4μM
Probe 1 (10μM)	0,4 μL	0,2μM
Probe 2 (10μM)	0,4 μL	0,2μM
Nuclease-free Water	1,6 μL	=< 1μg (total RNA)
cDNA	5 μL	
Τελικός Όγκος	20 μL	

Κάθε αντίδραση λαμβάνει χώρα σε διαφορετική θέση στη μικροπλακέτα. Επιπλέον, τοποθετείται το δείγμα cDNA γνωστής συγκέντρωσης για το γονίδιο αναφοράς mG6PD και ένα δείγμα που ορίζεται ως αρνητικός μάρτυρας.

Η μικροπλακέτα φυγοκεντρείται για 1min στις 1000rpm και στη συνέχεια τοποθετείται στον κυκλικό θερμοποιητή, όπου πραγματοποιείται η real-time PCR.



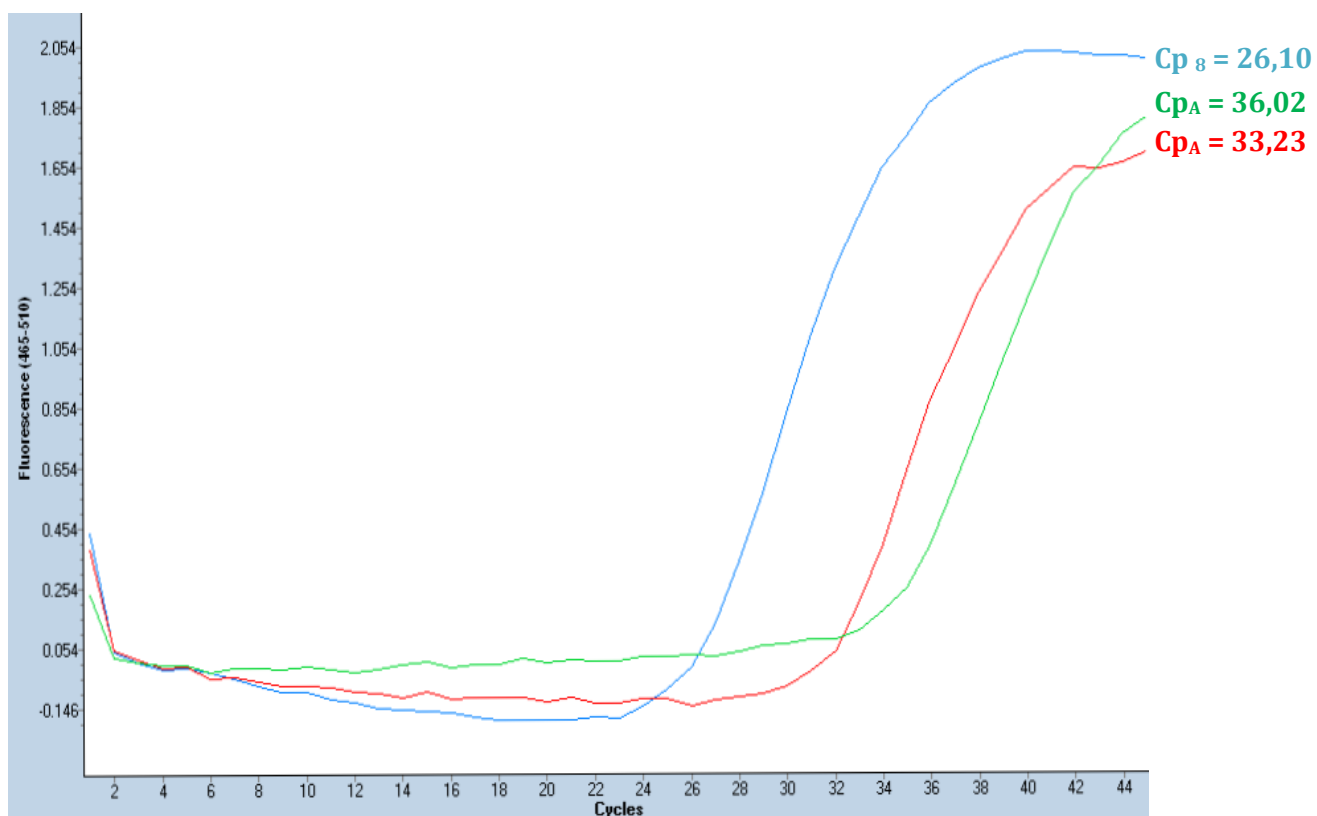
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου κυτταρικού κύκλου RPLP0 σε έμβρυα επίμυ στο στάδιο των οκτώ κυττάρων, αποτέλεσε το βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συνθήκες και πρωτόκολλα που να μιμούνται απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον μέσα στη μήτρα και στη συνέχεια απομονώθηκαν τα αποπτωτικά έμβρυα καθώς επίσης και όσα έφτασαν στο στάδιο των 8 κυττάρων για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε την έκφραση του γονιδίου. Για τη μελέτη αυτή, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), δίνοντας τα ακόλουθα αποτελέσματα. (ΠΙΝΑΚΑΣ 6)

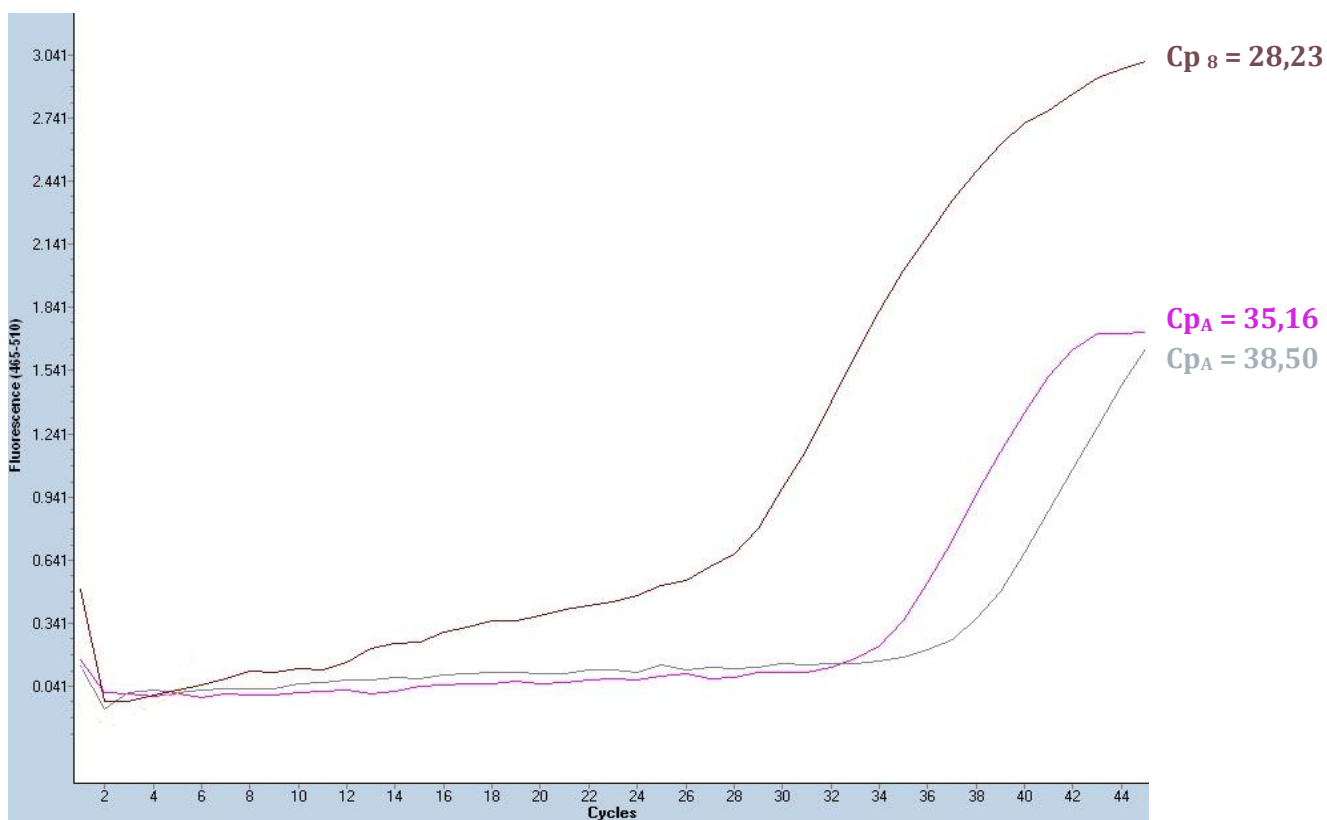
ΓΟΝΙΔΙΟ	ΑΠΟΠΤΩΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ	ΣΤΑΔΙΟ 8 ΚΥΤΤΑΡΩΝ
RPLP0	Cp1 = 33,23	Cp1 = 26,10
	Cp2 = 35,16	Cp2 = 28,23
	Cp3 = 36,02	
	Cp4 = 36,52	
	Cp5 = 38,50	

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR για το γονίδιο RPLP0 σε αποπτωτικά έμβρυα και σε έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων

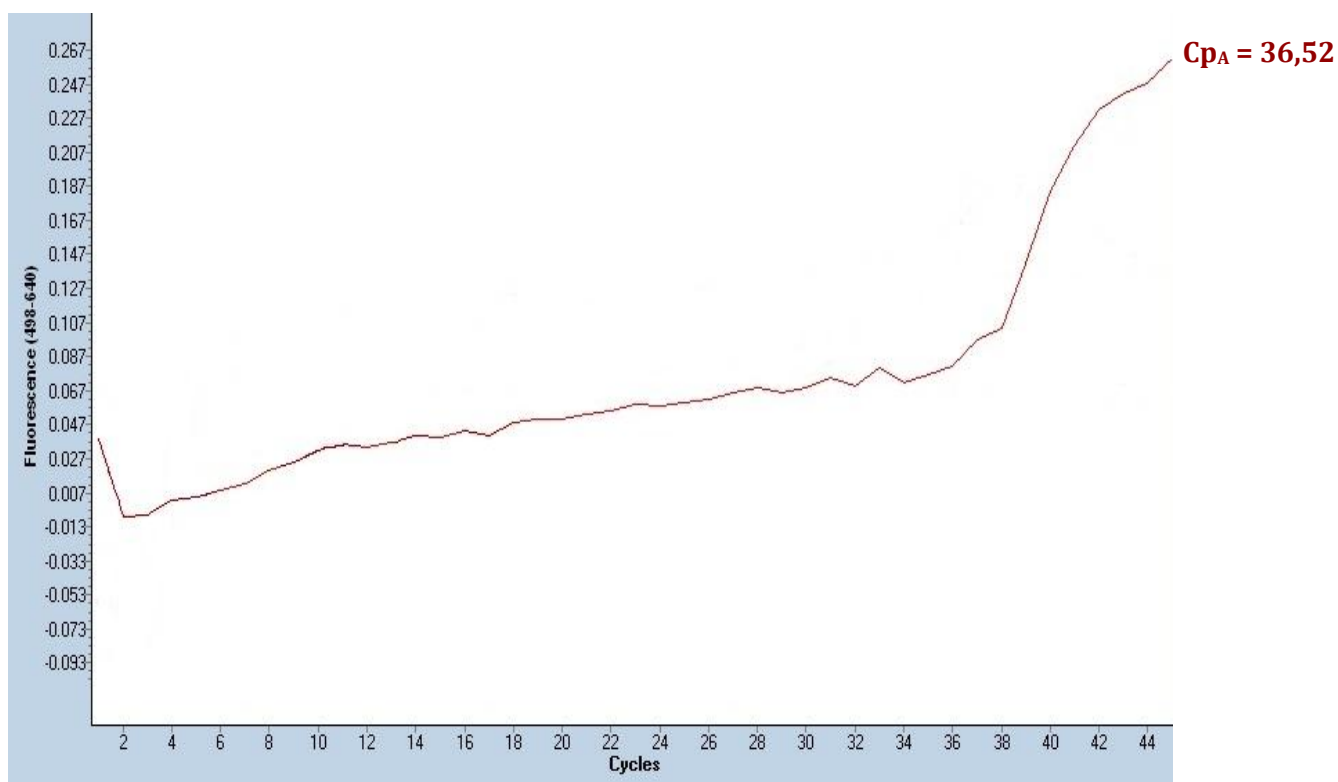
Το γονίδιο RPLP0 είχε θετική έκφραση σε όλα τα υπό μελέτη δείγματα. Στα έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων ο μέσος όρος του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης βρέθηκε $Cp_8 = 27,2$. Η έκφραση του γονιδίου στα αποπτωτικά έμβρυα κυμαινόταν μεταξύ 33,23 και 38,50 με μέσο όρο $Cp_A = 35,9$.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 1: Παρουσίαση της καμπύλης από τη μέθοδο Real Time PCR για το γονίδιο RPLP0 σε δείγματα από αποπτωτικά έμβρυα (πράσινο και κόκκινο) και σε δείγμα από έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων(μπλε). Στον κάθετο άξονα αναφέρονται οι τιμές της απορρόφησης ενώ στον οριζόντιο οι κύκλοι της Real Time PCR Επισημαίνονται ακόμα, οι τιμές Cp.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 2: Παρουσίαση της καμπύλης από τη μέθοδο Real Time PCR για το γονίδιο RPLP0 σε δείγματα από αποπτωτικά έμβρυα (γκρι και ροζ) και σε δείγμα από έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων(καφέ). Στον κάθετο άξονα αναφέρονται οι τιμές της απορρόφησης ενώ στον οριζόντιο οι κύκλοι της Real Time PCR Επισημαίνονται ακόμα, οι τιμές Cp.



ΔΙΑΓΡΑΜΜΑ 3: Παρουσίαση της καμπύλης από τη μέθοδο Real Time PCR για το γονίδιο RPLP0 σε δείγμα από αποπτωτικά έμβρυα (βυσσινί). Στον κάθετο άξονα αναφέρονται οι τιμές της απορρόφησης ενώ στον οριζόντιο οι κύκλοι της Real Time PCR Επισημαίνονται ακόμα, οι τιμές C_p .

Οι παραπάνω καμπύλες αποτελούν δεδομένα των αποτελεσμάτων μας. Παρουσιάζεται η έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου μας RPLP0 στις αντίστοιχες ομάδες εμβρύων. Παράλληλα, παρατίθενται οι τιμές C_p .

Η τιμή C_p (Crossing point), όπως προαναφέραμε, αποτελεί τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο. Όσο λιγότερα αντίγραφα περιέχονται στο δείγμα, τόσο περισσότεροι κύκλοι απαιτούνται για να εισέλθει η αντίδραση στην εκθετική της φάση και να ανιχνευτεί το παραγόμενο σήμα που αντιστοιχεί στη μεταβολή του ρυθμού αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Επομένως, αυτό που μας παρουσιάζεται είναι ότι το γονίδιο RPLP0 εκφράζεται στα έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων πολύ πιο ισχυρά από ότι στα αποπτωτικά έμβρυα. Συγκεκριμένα, στα έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων όπου ο μέσος όρος του αριθμού των κύκλων της αντίδρασης βρέθηκε $Cp_8 = 27,2$, δηλώνει ότι έχουμε $2^{27,2}$ (154.175.683) αντίγραφα. Η έκφραση του γονιδίου στα αποπτωτικά έμβρυα με μέσο όρο $Cp_A = 35,9$ δηλώνει ότι έχουμε $2^{35,9}$ (64.117.538.956) αντίγραφα. Παρόλο, λοιπόν, που φαίνεται μια διαφορά 9 κύκλων, είναι σημαντικό να έχουμε στο μυαλό μας ότι αυτό αντιστοιχεί σε δισεκατομμύρια αντίγραφα.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν θα μπορούσαμε να πούμε ότι το γονίδιο RPLP0 αποτελεί δείκτη της βιωσιμότητας των εμβρύων. Όπως φαίνεται, τα έμβρυα στα οποία εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό το συγκεκριμένο γονίδιο, προχωράνε σε αναπτυξιακά στάδια, γεγονός αναμενόμενο αφού το RPLP0 εμπλέκεται στη μετάφραση του γενετικού υλικού και εφόσον κωδικοποιεί ριβοσωμική πρωτεΐνη άρα συμμετέχει στις ενεργειακές ανάγκες του κυττάρου. Για τον ίδιο λόγο η έκφραση είναι χαμηλότερη, καθώς αυτά δεν έχουν ανάγκη για σύνθεση πρωτεϊνών. Ωστόσο, γεννάται το ερώτημα γιατί υπάρχει έστω και αυτή η μικρή έκφραση στα αποπτωτικά έμβρυα, αφού δε χρειάζεται να καλυφθούν ενεργειακές ανάγκες; Η αιτία της παρουσίας αντιγράφων του γονιδίου είναι ότι πιθανότατα η απομόνωσή τους να συνέβη σε πολύ λίγη ώρα μετά το θάνατό τους και επομένως για αυτό να βρέθηκε ποσότητα του γονιδίου RPLP0.



ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσφατη έρευνα της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, (Μάμαλη Γεωργία «Η έκφραση των γονιδίων *RPLP0*, *RB*, *RBBP6*, *MOS* και *PER1* στην *in vitro* ανάπτυξη ανθρώπινων εμβρύων», 2011) συσχέτιζε την έκφραση του γονιδίου *RPLP0* με την ποιότητα της μορφολογίας εμβρύων στο στάδιο των 8 κυττάρων. Βάσει των αποτελεσμάτων αυτής της διατριβής, παρουσιάζεται υψηλότερη έκφραση στα καλής μορφολογίας έμβρυα, ενώ στα κακής ποιότητας έμβρυα η έκφραση ακόμη κι όταν ανιχνεύεται, είναι χαμηλή. Τα κακής μορφολογίας έμβρυα που υπολείπονται είτε σε αριθμό είτε σε μέγεθος κυττάρων είναι πιθανό να έχουν χαμηλότερους μεταφραστικούς ρυθμούς από τα άριστα έμβρυα και κατά συνέπεια ο μηχανισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης να διαφοροποιείται ως προς τη συχνότητα ή και σταδιακά να αναστέλλεται.

Η Kiessling και οι συνεργάτες της επιβεβαίωσαν ότι πολλά γονίδια που εμπλέκονται στον κερκάδιο ρυθμό και την κυτταρική διαίρεση υπερεκφράζονται στο στάδιο των 8-κυττάρων ενώ άλλα που αποτελούν σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου αποσιωπώνται (Kiessling et al., 2009). Επιπλέον, αποτελέσματα μελέτης κατέδειξαν τη διαφορετική μεταγραφική δραστηριότητα γονιδίων κατά τη σύγκριση προεμβρύων ανθρώπου καλής και κακής μορφολογίας και ποντικίου στο αναπτυξιακό στάδιο των 8-κυττάρων (Koutsi et al., 2014). Η κατανόηση της αιτίας αλλά και της χρονικής στιγμής όπου ξεκινά η γονιδιακή έκφραση, είναι στοιχείο απαραίτητο για την καλύτερη γνώση των κυτταρικών μηχανισμών που διέπουν τα εμβρυικά στάδια της ανάπτυξης.

Η πρωτεϊνοσύνθεση είναι μια από τις βασικότερες λειτουργίες του κυττάρου. Απουσία αυτής της διεργασίας τα κύτταρα μπαίνουν στη διαδικασία της απόπτωσης. Κατά τη μεταγραφική σιγή του ζυγώτη, η πρωτεϊνική σύνθεση διατηρείται από την μετάφραση αποθηκευμένων mRNAs τα οποία έχουν συσσωρευτεί κατά την ωογένεση. Με την πάροδο του χρόνου και καθώς το έμβρυο φτάνει τα 8 κύτταρα και γίνεται μεταγραφικά ενεργό, το ριβόσωμα, που καταλύει την πρωτεϊνοσύνθεση, κατέχει μια ακόμη πιο σημαντική θέση μέσα στο κύτταρο. Έρευνες έδειξαν ότι το γονίδιο *RPLP0* που

αποτελεί μέρος του ριβοσώματος, υπερεκφράζεται σε προέμβρυα αυτού του αναπτυξιακού σταδίου. (Kiessling et al., 2009)

Τα πειράματα της παρούσας έρευνας, επιβεβαιώνουν την παραπάνω θεωρία. Η διαφορά έκφρασης που παρατηρείται μεταξύ εμβρύων στο αναπτυξιακό στάδιο των 8 κυττάρων και αποπτωτικών εμβρύων μπορεί να θεωρηθεί εν μέρει αναμενόμενη (το γεγονός δηλαδή, της υψηλότερης έκφρασης του γονιδίου RPLP0 στα έμβρυα του σταδίου των 8 κυττάρων και της χαμηλότερης έκφρασης στα αποπτωτικά έμβρυα). Τα έμβρυα που έχουν καταφέρει να προχωρήσουν στα αναπτυξιακά στάδια είναι λογικό να έχουν τους ορθούς μεταφραστικούς ρυθμούς και κατά συνέπεια το φυσιολογικό μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Σε αντίθεση, τα αποπτωτικά έμβρυα έχουν χαμηλότερους μεταφραστικού ρυθμούς και ο μηχανισμός της πρωτεϊνοσύνθεσης τους διαφοροποιείται ως προς τη συχνότητα ή και σταδιακά αναστέλλεται.

Σε προηγούμενη μελέτη που συνέκρινε γονίδια αναφοράς της μήτρας του ποντικίου κατά την περίοδο της εμφύτευσης για RT-PCR, το RPLP0 αποτέλεσε ένα από τα υποψήφια γονίδια. Η μελέτη αυτή χρησιμοποίησε διάφορα μοντέλα ποντικών, όπως πρώιμη εγκυμοσύνη, ψευδοεγκυμοσύνη, καθυστερημένη εμφύτευση και ενεργοποίηση, τεχνητό μοντέλο αποικοδόμησης και ορμονική θεραπεία. Αξιολογήθηκαν δέκα υποψήφια γονίδια αναφοράς (RG) για την καταλληλότητά τους ως εσωτερικοί έλεγχοι για σχετική ποσοτικοποίηση qRT-PCR (PPIA, RPLP0, HPRT1, GAPDH, ACTB, TBP, B2M, 18S, UBC και TUBA) που βρέθηκαν σε ιστούς μήτρας. Τα GeNormPLUS, NormFinder και BestKeeper χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση αυτών των υποψήφιων γονιδίων αναφοράς. Όλες αυτές οι μέθοδοι αναγνώρισαν τα RPLP0 και GAPDH ως τους πιο σταθερούς υποψήφιους και φαίνεται πιθανό ότι ο συνδυασμός τους θα ήταν βέλτιστος για περαιτέρω ανάλυση. Το RG του RPLP0 είχε μικρή ή καθόλου παραλλαγή στα διάφορα πειραματικά μοντέλα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, όπως εκτιμήθηκε από τα τρία πακέτα λογισμικού. Επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι η RPLP0 έχει εξαιρετικά σταθερή έκφραση. Είναι επομένως πιθανό ότι από τα RG που εκτιμήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, το RPLP0 είναι το καλύτερο RG για την αξιολόγηση γονιδιακής έκφρασης στη μήτρα ποντικίου. (PengFei Lin et al., 2013)

Σε μία ακόμα διατριβή, μελέτησαν την έκφραση των ριβοσωμικών πρωτεϊνών Rplp0, Rplp1 και Rplp2 σε γυναικολογικούς όγκους. Έχοντας ως δεδομένο ότι η έκφραση της ριβοσωματικής πρωτεΐνης Rplp1 αθανατοποιεί τα πρωτογενή κύτταρα και εμπλέκεται στον μετασχηματισμό, για να ερευνήσουν το ρόλο των πρωτεϊνών P στην ογκογένεση, εξετασαν τα επίπεδα έκφρασης του αγγελιοφόρου RNA των Rplp0, Rplp1 και Rplp2 σε μια σειρά 32 ασθενών με γυναικολογικούς όγκους. Το επίπεδο έκφρασης RNA αγγελιοφόρου όλων των 3P πρωτεϊνών αυξήθηκε σημαντικά στον ιστό του όγκου, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό. Επιπλέον, εξετάστηκαν συνολικά 140 βιοψίες γυναικολογικών καρκίνων (46 ενδομητριοειδών και 94 ωοθηκών). Μία ανοδική ρύθμιση της έκφρασης της πρωτεΐνης P παρατηρήθηκε με ανοσοϊστοχημεία σε μέσο 27% των όγκων, σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς. Επιπλέον, το επίπεδο αύξησης της πρωτεΐνης P συσχετίζεται σημαντικά με την έκφραση p53 σε καρκίνο των ωοθηκών. Αυτό είναι ένα σημαντικό γεγονός, επειδή το επίπεδο υπερέκφρασης των πρωτεϊνών P συσχετίζεται με την παρουσία μεταστάσεων λεμφαδένων σε ορούς καρκίνων των ωοθηκών. Συνολικά, η μελέτη δείχνει ότι οι πρωτεΐνες P εμπλέκονται στον καρκίνο του ανθρώπου και υποδεικνύει ότι το επίπεδο έκφρασης αυτών των πρωτεϊνών θα μπορούσε να είναι χρήσιμο ως προγνωστικός δείκτης σε συγκεκριμένους υποτύπους γυναικολογικών όγκων. (Artero-Castro A et al., 2011)

Το σημαντικότερο αναπτυξιακό γεγονός που λαμβάνει χώρα αμέσως μετά τη γονιμοποίηση είναι η μετάβαση του αναπτυξιακού ελέγχου από τη μητέρα στο ζυγωτό γνωστή και ως γονιδιακή ενεργοποίηση του ζυγωτού (Schultz, 2002). Στον άνθρωπο, η αντικατάσταση των μητρικών μεταγράφων και πρωτεϊνών από τα γονίδια του νεοσυντιθέμενου προ εμβρύου πραγματοποιείται στο αναπτυξιακό στάδιο των 8-κυττάρων.

Τα βλαστομερίδια στο στάδιο των 8-κυττάρων της ανθρώπινης εμβρυικής ανάπτυξης είναι μοναδικά και χαρακτηρίζονται από παντοδυναμία. Παρόλη τη θεμελιώδη σημασία που κατέχει αυτό το στάδιο στην ανθρώπινη αναπαραγωγή, εντούτοις, ελάχιστα είναι γνωστά για τον κυτταρικό έλεγχο στην έκφραση των γονιδίων και στο διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων (Kiehl et al., 2010).

Οι πληροφορίες σχετικά με τη χρονική στιγμή που ενεργοποιείται το εμβρυϊκό γονιδίωμα στον άνθρωπο παρουσιάζουν αξιοσημείωτο ενδιαφέρον όχι μόνο για τα θεραπευτικά τους εφαρμογή στην εξωσωματική γονιμοποίηση και την εμβρυομεταφορά αλλά κυρίως για την επιτυχή ανάπτυξη τεχνικών για την προεμφυτευτική διάγνωση ορισμένων κληρονομούμενων γενετικών ασθενειών (Braude et al., 1988).

Αποσαφηνίζοντας τον τρόπο με τον οποίο ρυθμίζεται ο κυτταρικός κύκλος στο στάδιο των 8-κυττάρων θα βελτιώσει τα αποτελέσματα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και θα παράσχει γνώσεις σχετικά με τον κυτταρικό μηχανισμό που χρησιμοποιείται από το ωάριο για να επαναπρογραμματίσει τον πυρήνα του από διαφοροποιημένο σε παντοδύναμο (Kieślting et al., 2010). Αυτή η πληροφορία μπορεί να βελτιώσει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού μη γονιμοποιημένων ωαρίων και σωματικών κυττάρων σε ειδικά, για κάθε ασθενή, βλαστικά κύτταρα και κατά συνέπεια την περαιτέρω χρήση τους στην έρευνα και στη θεραπεία διαφόρων ασθενειών.

Η περαιτέρω μελέτη του γονιδίου RPLP0 είναι απαραίτητη καθώς το γονίδιο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει ένα χρήσιμο μοριακό δείκτη για την εξέλιξη της εγκυμοσύνης. Όπως ακριβώς στον προγεννητικό έλεγχο, θα μπορούσαμε, πριν τη διαδικασία της εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα της γυναίκας, να ελέγξουμε την έκφραση του γονιδίου RPLP0. Καθώς το γονίδιο αυτό μας δίνει πληροφορίες για την εξέλιξη του εμβρύου, μια υψηλή τιμή στην RT-PCR θα μας έδινε την έγκριση να πραγματοποιήσουμε την εμφύτευση. Αντίστοιχα, μια χαμηλή τιμή της έκφρασης θα μας έδινε την πληροφορία ότι το συγκεκριμένο έμβρυο δε δύναται να προχωρήσει σε περαιτέρω αναπτυξιακά στάδια, οπότε η εμφύτευση θα είναι μάταιη.

Αποτέλεσμα αυτής της ενέργειας, θα είναι η μείωση του ποσοστού των αποβολών και αντίστοιχα η άνοδος του ποσοστού των εξελισσόμενων κυήσεων. Παράλληλα, όταν η κύηση ολοκληρώνεται επιτυχώς, η γυναίκα αποφεύγει τη σωματική ταλαιπωρία μιας αποβολής, καθώς επίσης και το ψυχολογικό βάρος μιας ατελέσφορης διαδικασίας υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Επιπλέον μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να κατανοήσουμε πλήρως την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη και να θεσπιστεί ένα εμβρυϊκό μεταγραφικό προφίλ για όλα τα στάδια του προ-εμβρύου το οποίο θα αποτελούσε ένα σημαντικό μοριακό εργαλείο για τη βιολογία αλλά και την εξέλιξη της ιατρικής.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αριστείδης Αντσακλής, 2008, «Μαιευτική και Γυναικολογία» εκδόσεις Παρισιάνου.
- Alberts, 2000, «Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας».
- Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Cajal SR, Lleonart ME. 2010. "Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors." *Hum Pathol.* 42(2):194-203. Epub Oct 30
- Artero-Castro A, Castellvi J, García A, Hernández J, Ramón y Cajal S, Lleonart ME, 2011, "Expression of the ribosomal proteins Rplp0, Rplp1, and Rplp2 in gynecologic tumors"
- Artus , J., & Cohen-Tannoudji , M. (2008). *Cell cycle regulation during early mouse embryogenesis. Mol Cell Endocrinol*, σσ. 78-86.
- Behr, B. R., Stratton, C. J., Foote, W. D., Knutzen, V., & Sher, G. (1990). "In vitro fertilization (IVF) of mouse ova in HEPES-buffered culture media." *Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 7(1), 9-15.
- Braude P, Bolton V, Moore S. "Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development." *Nature.* 1988 Mar 31;332(6163):459-61.
- Braun-Breton C, Jendoubi M, Brunet E, Perrin L, Scaife J, Pereira da Silva L. "In vivo time course of synthesis and processing of major schizont membrane polypeptides in *Plasmodium falciparum*." *Mol Biochem Parasitol.* 1986 Jul;20(1):33-43.

- Ciemerych , M., & Sicinski, P. (2005). "Cell cycle in mouse development." *Oncogene*, 2877-2892.

- Goutzourelas N, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, Haroutounian S, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D. "Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells." *Mol Med Rep*. 2015 Oct;12(4):5846-56. doi: 10.3892/mmr.2015.4216. Epub 2015 Aug 12.

- Kiessling AA, Bletsa R, Desmarais B, Mara C, Kallianidis K, Loutradis D. 2009 "Evidence that human blastomere cleavage is under unique cell cycle control." *J Assist Reprod Genet*. 2009 Apr;26(4):187-95. Epub 2009 Mar 14.

- Kiessling A. A., Bletsa R., Desmarais B., Mara C., Kallianidis K., & Loutradis D. (2010). "Genome-wide microarray evidence that 8-cell human blastomeres over-express cell cycle drivers and under-express checkpoints." *Journal of assisted reproduction and genetics*, 27(6), 265-276.

- Latham, 1999 Latham, K. E. (1999). "Mechanisms and control of embryonic genome activation in mammalian embryos." *International review of cytology*, 193, 71-124.

- Latham, K. E., & Schultz, R. M. (2001, June 1). Embryonic Genome Activation. *Frontiers in Bioscience*, σσ. 748-759.

- Mutter GL, Zahrieh D, Liu C, Neuberg D, Finkelstein D, Baker HE, Warrington JA. "Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays." *BMC Genomics*. 2004 Nov 10;5:88.

- PengFei Lin, XiangLi Lan, FengLei Chen, YanZhou Yang, YaPing Jin, and AiHua Wang, "Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative PCR Analysis of the Mouse Uterus in the Peri-Implantation Period", 2013.

- Peter J. Russell, «iGenetics Μια Μενδελική Προσέγγιση» Τόμος δεύτερος, Εκδόσεις Πελεκάνος, 2009

- Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, Fox JH, Hornstein MD, Ginsburg ES. "The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or day 5 transfer." *Fertil Steril*. 2000 Mar;73(3):558-64.

- Ramacha M, Jimenez-Diaz A, Santos C, Briones E, Zambrano R, Rodriguez Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JP. 1995 "Proteins P1,P2 and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects." *Biochem Cell Biol*. 73(11-12):959-68.

- Reik W, Walter J. *Nat Rev Genet*. "Genomic imprinting: parental influence on the genome." 2001 Jan;2(1):21-32. Review.

- Richardson, L., Venkataraman, S., Stevenson, P., Yang, Y., Moss, J., Graham, L., και συν. (2014). EMAGE mouse embryo spatial gene expression database. Ανάκτηση από EMAP eMouse Atlas Project: <http://www.emouseatlas.org>

- Ρωξάνη Αγγελοπούλου, «Εμβρυολογία», β' έκδοση, Ιατρικές εκδόσεις, Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004.

- Santos C, Ballesta JP., 1995, "The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2." *J Biol Chem*. 1;270(35):20608-14.

- Schultz RM, "The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo." *Hum Reprod Update*. 2002 Jul-Aug;8(4):323-31

- Studart D. Fastbleep. Ανάκτηση από Embryonic gene activation: <http://www.fastbleep.com/biology-notes/32/159/865> (2010).

- Tchórzewski M, Krokowski D, Rzeski W, Issinger OG, Grankowski N. 2003 "The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2, P0 proteins." *Int J Biochem Cell Biol*. 35(2):203-11.

- Tchórzewski M, "The acidic ribosomal P proteins" 2002 *Int J Biochem Cell Biol*. 34(8):911-5

- Thompson & Thompson, «Ιατρική Γενετική», εκδόσεις Πασχαλίδη, 2011

- Wahl, Möller, 2002, "Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins". *Curr Protein Pept Sci*. 3(1) 93-106.

- Ζήσης Μαμούρης, Κατερίνα Μούτου «Εργαστηριακές Ασκήσεις Κυτταρικής Βιολογίας» Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας