



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ - ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:

**ΈΛΕΓΧΟΣ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΙΡΚΑΔΙΩΝ
ΓΟΝΙΔΙΩΝ CLOCK ΚΑΙ BMAL ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ
ΕΠΙΜΥΩΝ ΕΩΣ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ
ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ**

ΠΑΠΑΧΡΙΣΤΟΦΗ ΒΑΣΙΛΙΚΗ

Υπεύθυνος Καθηγητής: **Δημήτριος Λουτράδης**

Αθήνα, 2017

Ευχαριστώ πολύ για την ανάθεση της
παρούσας πειραματική μελέτη τον Δρ.
Δημήτρη Λουτράδη, Καθηγητή Μαιευτικής
- Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών και
διευθυντή Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής
κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α.
«Αλεξάνδρα».

Ευχαριστώ θερμά για την άψογη
συνεργασία, τη πολύτιμη βοήθεια της
καθώς και για τον χρόνο που αφιέρωσε
κατά την εκτέλεση του εργαστηριακού
μέρους αλλά και για τις συμβουλές και τις
γνώσεις της κατά τη συγγραφή της
εργασίας, την Δρ Δ. Μαυρογιάννη
υπεύθυνη βιολόγο της Α' Μαιευτικής-
Γυναικολογικής κλινικής Πανεπιστημίου
Αθηνών στο Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», στη
μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους
γονείς μου, Μανώλη και Βίκυ για την
οικονομική καθώς και για την ηθική
στήριξη που μου παρείχαν όλο αυτό το
χρονικό διάστημα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	Σελίδα 5
ABSTRACT	Σελίδα 6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	
A. ΑΠΟ ΤΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ	
I. Αρχέγονα Γαμετικά Κύτταρα	Σελίδα 7
II. Γαμετογένεση	Σελίδα 8
III. Μίτωση	Σελίδα 9
IV. Μείωση	Σελίδα 10
V. Ωογένεση	Σελίδα 12
VI. Σπερματογένεση	Σελίδα 13
B. ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	
I. Ανάπτυξη θυλακίου και έκκριση οιστρογόνων κατά την πρώιμη και μέση θυλακική φάση	Σελίδα 16
II. Ωοθυλακιορρηξία	Σελίδα 17
III. Στάδια κύκλου οίστρου στα θηλυκά ποντίκια	Σελίδα 18
Γ. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ	
I. Τελικό στάδιο ωρίμανσης σπερματοζωαρίων	Σελίδα 20
II. Γονιμοποίηση	Σελίδα 21
Δ. ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	
I. Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων επίμυος	Σελίδα 22
II. Αναπτυξιακά στάδια επίμυων	Σελίδα 24
III. Εμβρυική ενεργοποίηση επίμυων	Σελίδα 26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

A. ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

- | | |
|-----------------------------|-----------|
| I. Εισαγωγή | Σελίδα 28 |
| II. Υπερχιασματικός Πυρήνας | Σελίδα 29 |

B. ΚΙΡΚΑΔΙΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

- | | |
|--|-----------|
| I. Χαρακτηριστικά Κιρκάδιων γονιδίων | Σελίδα 32 |
| II. Μοριακός μηχανισμός Κιρκάδιων γονιδίων στα θηλαστικά | Σελίδα 35 |

Γ. ΚΙΡΚΑΔΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

- | | |
|--|-----------|
| I. Εισαγωγή | Σελίδα 37 |
| II. Κιρκάδια γονίδια και εφηβεία | Σελίδα 38 |
| III. Κιρκάδια γονίδια και ενήλικη αναπαραγωγική λειτουργία | Σελίδα 39 |
| IV. Έκφραση κιρκάδιων γονιδίων σε ιστούς | Σελίδα 42 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

A. ΣΚΟΠΟΣ

Σελίδα 47

B. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

Σελίδα 47

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΤΟΚΟΛΛΟ

Σελίδα 52

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

A. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σελίδα 63

B. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Σελίδα 70

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

BΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Σελίδα 78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στα θηλαστικά, ο σχηματισμός του ζυγωτού προκύπτει ύστερα από τη συνένωση του θηλυκού και του αρσενικού γαμέτη στη λήκυθο της σάλπιγγας. Το γονιμοποιημένο ωάριο μεταφέρεται από τη σάλπιγγα στη μήτρα όπου και εμφυτεύεται. Σε αυτή τη διαδρομή, το προ-έμβρυο 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. Στο ποντίκι, στο στάδιο των 2-κυττάρων σταματάει ο μητρικός αναπτυξιακός έλεγχος και ενεργοποιείται το ζυγωτικό γονιδίωμα, όπου το έμβρυο αναλαμβάνει τον έλεγχο της ανάπτυξής του.

Το κirkάδιο ρολόι είναι μια αυτοσυντηρούμενη 24ωρη λειτουργική οντότητα που εντοπίζεται στον εγκέφαλο, πιο συγκεκριμένα στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN), και είναι συντονισμένη με τον περιβάλλοντα χώρο, ώστε να επιτρέπει στους οργανισμούς να ανταποκρίνονται χρονικά σωστά σε ερεθίσματα. Έχει βρεθεί ότι μια σειρά γονιδίων γνωστά ως clock genes αποτελούν την “μηχανή” του κirkάδιων ρυθμών και είναι υπεύθυνα για την ρύθμιση των κirkάδιου μηχανισμού σε μοριακό επίπεδο, η ρύθμιση αυτή πραγματοποιείται μέσω θετικών και αρνητικών αναδράσεων σε μεταγραφικό και μεταφραστικό επίπεδο. Τα πιο γνωστά πυρηνικά κirkάδια clock genes είναι: clock, per1, per2, per3, cry1, cry2, Bmal/Mor3, Bmal2/Mor9, Npas2/Mor4, Tim, CK1ε, Rev-Erba. Το θετικό κομμάτι της ρύθμισης γίνεται μέσω δύο μεταγραφικών παραγόντων, του Clock και του Bmal1.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων Clock και Bmal σε προ-έμβρυα ποντικίου, στο στάδιο των 2-κυττάρων έως το στάδιο της βλαστοκύστης ώστε να καθιερωθεί ένα εμβρυικό μεταγραφικό προφίλ και να επισημανθούν οι πιθανοί μοριακοί και κυτταρικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με μια φυσιολογική εμβρυική ανάπτυξη.

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής μελέτης τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν in vitro σε συνθήκες και πρωτόκολλα που να προσομοιάζουν απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον μέσα στη μήτρα. Για την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων αυτών, μετά την απομόνωση του mRNA από κάθε αναπτυξιακό στάδιο και την παρασκευή του cDNA, εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR) με σκοπό τον προσδιορισμό της έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων.

ABSTRACT

In mammals, the formation of the zygote results from the fusion of the female and male gametes in the ampulla of the fallopian tube. The fertilized egg is transferred from the fallopian tube to the uterus where it is implanted. On this path, the pre-embryo undergoes many structural changes. Initially, the fertilized egg is divided into 2, 4 and 8 cells, then it is condensed by forming morula and finally, by creating a cavity, forming the blastocyst. In mice, the maternal developmental control stops at the 2-cell stage, the zygotic genome is activated, and the embryo undertakes the control of its own growth.

The Circadian clock is the 24-hour self-sustaining functional entity located in the brain, more specifically in the suprachiasmatic nucleus (SCN) of the brain, and is coordinated with the surrounding in order to permit organisms to respond appropriately to stimuli. It has been found that a series of genes, known as clock genes, function as the "machine" of the circadian rhythm and they are responsible for the regulation of the circadian mechanism on the molecular level. The regulation is performed through positive and negative feedback on the transcriptional and translational level. The most well-known nuclear clock genes are: clock, per1, per2, per3, cry1, cry2, Bmal / Mop3, Bmal2 / Mop9, Npas2 / Mop4, Tim, CK1 ϵ , Rev-Erba. The positive feedback of the regulation is implemented through two transcription factors, Clock and Bmal1.

The purpose of this thesis is to investigate the expression of the Clock and Bmal genes in mouse pre-embryos, from the 2-cell stage to the blastocyst stage, in order to be established an embryonic transcriptional profile and to be identified the potential molecular and cellular mechanisms involved with a normal embryonic development.

During this experimental study, the mouse embryos were cultured in vitro under conditions and protocols which imitated the physiological environment of the uterus. To evaluate the expression of these two circadian genes, after the isolation of mRNA from each developmental stage and cDNA preparation, the method of Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) was used in order to determine the expression of these under-study genes.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Α. ΑΠΟ ΤΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΣΤΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ

Ι. Αρχέγονα Γεννητικά Κύτταρα

Στον άνθρωπο, τα ώριμα αρρενα και θήλεα γεννητικά κύτταρα αποτελούν απόγονους των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων τα οποία εμφανίζονται στο πρωτογενές εξώδερμα του εμβρύου κατά την δεύτερη εβδομάδα της ανάπτυξης. Στα τέλη της τρίτης εβδομάδας μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις σε μια εξωεμβρυϊκή δομή, τον λεκιθικό ασκό. Κατά την τέταρτη εβδομάδα, μεταναστεύουν από το τοίχωμα του εντερικού σωλήνα, και από εκεί, μέσω του μεσεντερίου, προς το ραχιαίο σωματικό τοίχωμα. Τα περισσότερα από αυτά εγκαθίστανται στην περιοχή του σωματικού τοιχώματος που βρίσκεται εκατέρωθεν του 10ου θωρακικού σπονδύλου, από την οποία θα σχηματιστούν οι γονάδες [2].

Στα ποντίκια τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα (PGCs) προέρχονται από το επιβλάστιο. Δεν υπάρχουν στοιχεία διαχωρισμένων βλαστικών σειρών στην εσωτερική κυτταρική μάζα των βλαστοκύστεων έως 4.5 dpc (day post coitum). Τα κύτταρα του επιβλαστιδίου σε αυτό το στάδιο μπορεί να οδηγήσουν στη δημιουργία τόσο σωματικών ιστών όσο και γαμετών. PGCs εντοπίζονται για πρώτη φορά κατά τη διάρκεια της γαστριδίσωσης την 7,0 dpc ως διακριτός πληθυσμός κυττάρων που βρίσκονται στο εξωεμβρυϊκό μεσόδερμα της οπίσθιας αμνιακής πτυχής. Στη συνέχεια ενσωματώνονται στη βάση της αλλαντοΐδας, σχηματίζοντας μια συνεκτική δέσμη 75 κυττάρων. Κατά την 8,0 dpc, η μικρή δέσμη των PGCs αρχίζει να διασπείρεται, αφήνουν το ενδόδερμα του εντέρου, διασχίζουν το ραχιαίο μεσεντέριο προς την σπλαχνική κοιλότητα και τα πρώτα κύτταρα φτάνουν στις γεννητικές ακρολοφίες κατά την 10,5-11,5 DPC. Μέχρι την 13 dpc 25.000 PGCs έχουν αποικίσει σε κάθε αρχέγονη γονάδα. Τα πρώτα σημάδια του σεξουαλικού διμορφισμού των αρχέγονων γονάδων δεν είναι εμφανή μέχρι τη 12.5 dpc. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από αλλαντοΐδα, τα PGCs διαιρούνται περίπου μία φορά κάθε 16 ώρες.

Η μετακίνηση τους από το έντερο προς τις γεννητικές ακρολοφίες περιλαμβάνει ενεργές μεταναστευτικές κινήσεις, πιθανώς εξαρτώνται από ένα κατάλληλο υπόστρωμα και ενδεχομένως περιλαμβάνουν χημειοτακτικά σήματα, έτσι ώστε να εξασφαλισθεί ότι η πλειονότητα των κυττάρων που συγκλίνουν στις γεννητικές ακρολοφίες.

II. Γαμετογένεση

Στους οργανισμούς που αναπαράγονται αμφιγονικά (εγγενής αναπαραγωγή-σεξουαλική αναπαραγωγή) ο κύκλος ζωής περιλαμβάνει ένα στάδιο κατά το οποίο ο αρσενικός και ο θηλυκός γαμέτης συντήκονται για το σχηματισμό του ζυγωτού. Ο αρσενικός γαμέτης ο οποίος καλείται σπερματοζώαριο είναι μικρός και ευκίνητος, ενώ ο θηλυκός γαμέτης είναι μεγάλος, ακίνητος και καλείται ωάριο.

Οι γαμέτες σχηματίζονται από τα γαμετικά κύτταρα του εμβρύου. Τα γαμετικά κύτταρα αναφέρονται ως γαμετική αναπαραγωγική σειρά, όρος ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τους γαμέτες καθώς επίσης και τα κύτταρα από τα οποία προέρχονται οι μελλοντικοί γαμέτες. Όλα τα υπόλοιπα κύτταρα του οργανισμού ονομάζονται σωματικά. Η σημασία της αναπαραγωγικής σειράς έγκειται στο ότι η γενετική πληροφορία των κυττάρων της μπορεί να μεταφερθεί στην επόμενη γενιά, πράγμα που δεν ισχύει για τα σωματικά κύτταρα. Μια μεταλλαγή λοιπόν στην αναπαραγωγική σειρά δηλαδή μια μεταλλαγή στα γαμετικά κύτταρα μπορεί να μεταφερθεί στην επομένη γενιά, σε αντίθεση με μια μεταλλαγή σε σωματικά κύτταρα.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης τα γαμετικά κύτταρα περνούν μια περίοδο πολλαπλασιασμού. Επίσης, μεταναστεύουν από τη θέση όπου σχηματίζονται στη γονάδα. Η γονάδα προκύπτει από το μεσόδερμα και αρχικά αποτελείται εξ' ολοκλήρου από σωματικούς ιστούς. Μετά την άφιξη τους, ενσωματώνονται πλήρως στη γονάδα και κατά την μετεμβρυϊκή ζωή διαφοροποιούνται στους γαμέτες, μέσα από μια διαδικασία που καλείται *γαμετογένεση*.

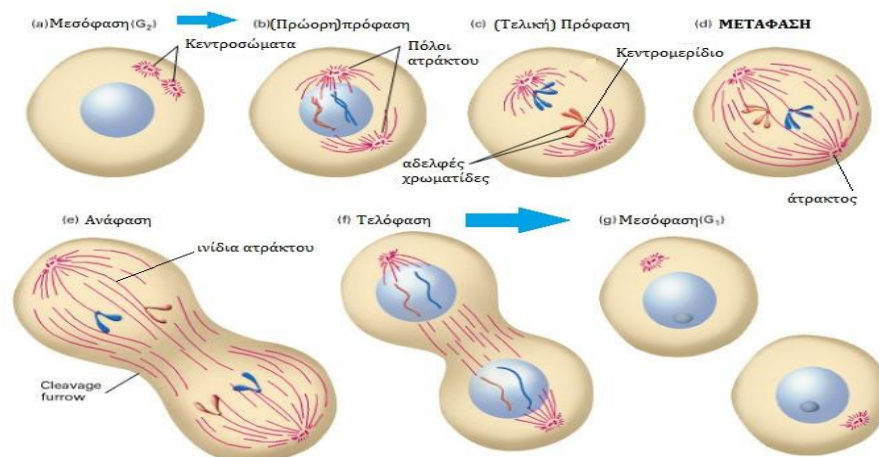
Κάθε γαμέτης φέρει ένα απλοειδές σύνολο χρωμοσωμάτων. Έτσι το ζυγωτό είναι διπλοειδές και περιέχει δυο αντίγραφα από κάθε χρωμόσωμα, ένα πατρικής και ένα μητρικής προέλευσης [1].

Στη γαμετογένεση παρατηρούνται δυο είδη κυτταρικής διαίρεσης, η μίτωση και η μείωση. Αυτά τα δυο είδη κυτταρικής διαίρεσης παρατηρούνται σε ορισμένες φάσεις της γαμετογένεσης και είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη των αρχέγονων κυττάρων. Αρκετοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της ισορροπίας μεταξύ των δυο αυτών διεργασιών και εξασφαλίζουν την φυσιολογική εξέλιξη της ωογένεσης και της σπερματογένεσης.

III. Μίτωση

Η διαίρεση του ζυγωτού γίνεται μιτωτικά και έτσι όλα τα κύτταρα του οργανισμού έχουν τον ίδιο αριθμό χρωμοσωμάτων. Η μιτωτική διαίρεση περιλαμβάνει 5 κύρια στάδια και είναι τα εξής:

- **Πρόφαση:** Αυτό το στάδιο χαρακτηρίζεται από σταδιακή συσπείρωση των χρωμοσωμάτων, αποδιάταξη, τελική εξαφάνιση του πυρηνίσκου και έναρξη σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου. Τα κεντριόλια σχηματίζουν κέντρα από τα οποία απλώνονται ακτινωτά οι μικροσωληνίσκοι και μετακινούνται ακτινωτά για να καταλάβουν θέσεις στους δυο πόλους του κυττάρου.
- **Προμετάφαση:** Σε αυτή τη φάση της διαίρεσης διαρρηγνύεται η πυρηνική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τα χρωμοσώματα να διασκορπίζονται μέσα στο κύτταρο και να συνδέονται στους μικροσωληνίσκους της ατράκτου. Σε αυτό το σημείο τα χρωμοσώματα συσπειρώνονται ακόμη περισσότερο χωρίς να βρίσκονται στο μέγιστο βαθμό συσπείρωσής τους.
- **Μετάφαση:** Τα χρωμοσώματα πλέον βρίσκονται στο μέγιστο βαθμό συσπείρωσής τους και καταλαμβάνουν συγκεκριμένη θέση στο ισημερινό πεδίο του κυττάρου.
- **Ανάφαση:** Το στάδιο αυτό ξεκινάει αμέσως μετά τον αποχωρισμό των χρωμοσωμάτων στο κεντρομερές, επιτρέποντας στις δύο χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος να κινηθούν προς τους αντίθετους πόλους του κυττάρου.
- **Τελόφαση:** Τα χρωμοσώματα αρχίζουν να αποσυσπειρώνονται από την κατάσταση μέγιστης συμπύκνωσης. Σχηματίζεται η πυρηνική μεμβράνη γύρω από κάθε θυγατρικό πυρήνα. Σταδιακά κάθε πυρήνας αποκτά μεσοφασική εμφάνιση [4].



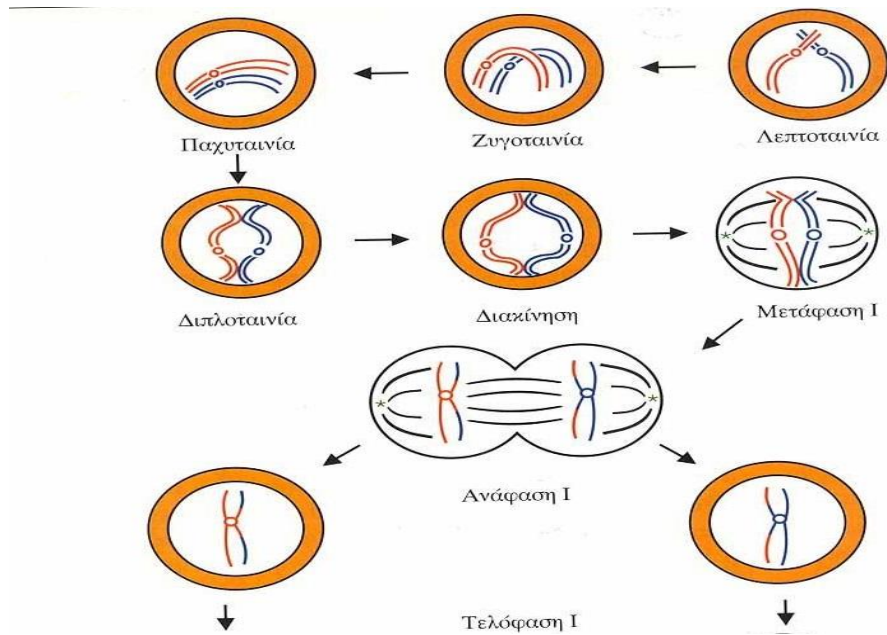
Εικόνα 1: Στάδια μιτωτικής διαίρεσης

IV. Μείωση ή Αναγωγική Πυρηνοδιαίρεση

Η δημιουργία των γαμετών είναι αποτέλεσμα μειωτικής πυρηνοδιαίρεσης και στην συγκεκριμένη περίπτωση λέγεται γαμετική μείωση. Πρόκειται για έναν τροποποιημένο κυτταρικό κύκλο κατά τον οποίο ο αριθμός των χρωμοσωμάτων μειώνεται στο μισό [1]. Από τη διαδικασία της μείωσης με δυο συνεχείς πυρηνοδιαίρεσεις, μια αναγωγική και μια δεύτερη εξισωτική, προκύπτουν από έναν αρχικό πυρήνα τέσσερις θυγατρικοί που περιέχουν το μισό αριθμό χρωμοσωμάτων από τον αρχικό. Αυτό συμβαίνει διότι ο πυρήνας διαιρείται ουσιαστικά δύο φορές ενώ τα χρωμοσώματα μια. Τα κύρια στάδια της μείωσης είναι τα εξής: [5]

1. Αναγωγική Διαίρεση ή Μείωση I

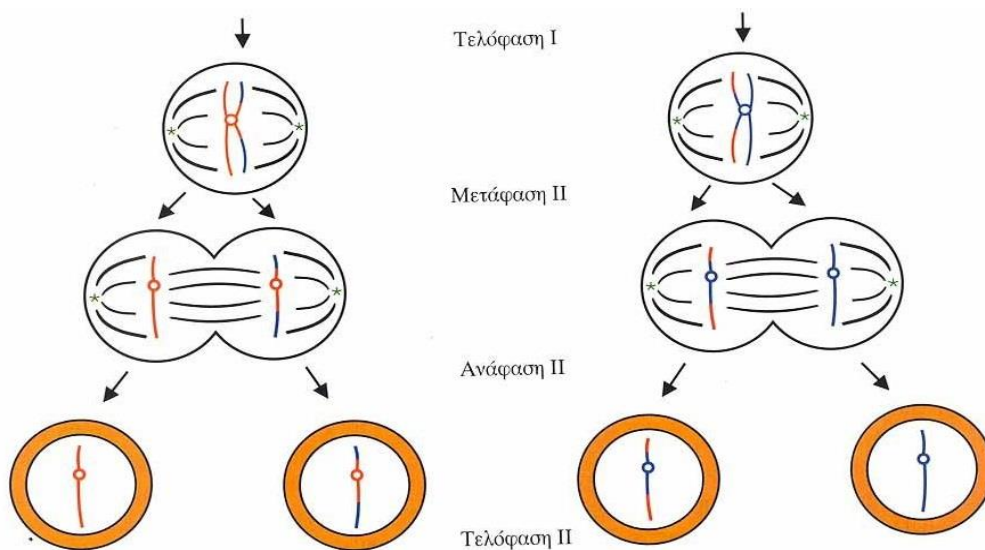
- *Πρώτη Πρόφαση:* Είναι το πιο παρατεταμένο στάδιο της αναγωγικής διαίρεσης. Υποδιαιρείται σε άλλες μικρότερης διάρκειας φάσεις κατά τις οποίες προετοιμάζονται τα χρωμοσώματα και διαλύεται η πυρηνική μεμβράνη και ο πυρηνίσκος. Οι φάσεις αυτές είναι: η Λεπτοταινία (έναρξη συμπύκνωσης), η Ζυγοταινία (ζευγάρωμα), η Παχυταινία (βράχυνση και πάχυνση), η Διπλοταινία και η Διακίνηση.
- *Πρώτη Μετάφαση:* Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται η διάλυση της πυρηνικής μεμβράνης και ο σχηματισμός της πυρηνικής ατράκτου. Τα ζεύγη των ομολόγων χρωμοσωμάτων παρατάσσονται στο ισημερινό πεδίο, ενώ τα κεντρομερή τους προσανατολίζονται προς τους αντίθετους πόλους. Τέλος, γίνεται επιχiasμός ανάμεσα στα διπλασιασμένα ομόλογα χρωμοσώματα.
- *Πρώτη Ανάφαση:* Εδώ διαχωρίζονται τα δύο μέλη του ζεύγους των ομολόγων χρωμοσωμάτων και τα δύο κεντρομερή με τις αδελφές χρωματίδες τοποθετούνται σε αντίθετους πόλους του κυττάρου. Αποτέλεσμα είναι ο αριθμός των χρωμοσωμάτων να μειώνεται στο μισό και κάθε απόγονος να αποτελείται από έναν απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων, με κάθε χρωμόσωμα να έχει δυο αδελφές χρωματίδες.
- *Πρώτη Τελόφαση:* Οι δυο απλοειδείς σειρές χρωμοσωμάτων έχουν συγκεντρωθεί στους αντίθετους πόλους του κυττάρου.



Εικόνα 2: Στάδια πρώτης μειωτικής διαίρεσης

2. Εξισωτική Διαίρεση ή Μείωση II

Η δεύτερη μείωση είναι όμοια με μια τυπική μίτωση, αλλά ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του κυττάρου που εισέρχεται στην εξισωτική διαίρεση είναι απλοειδής. Τελικό αποτέλεσμα της διαδικασίας είναι η δημιουργία τεσσάρων απλοειδών κυττάρων καθένα από τα οποία περιέχει 23 χρωμοσώματα [4],[5].



Εικόνα 3: Στάδια δεύτερης μειωτικής διαίρεσης

V. Ωογένεση

1. Προγεννητική Ωρίμανση

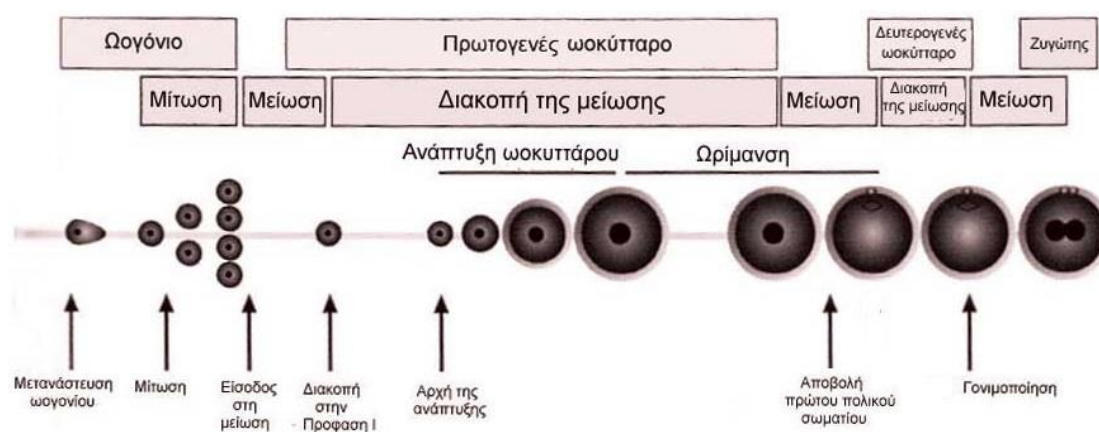
Αρχικά πραγματοποιείται η μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στις γονάδες η οποία ολοκληρώνεται την 12^η ημέρα στα έμβρυα μυός και διαφοροποιούνται σε ωογόνια. Κατόπιν μιτωτικών διαιρέσεων διατάσσονται σε ομάδες οι οποίες περιβάλλονται από μια στιβάδα θυλακικών κυττάρων. Όλα τα ωογόνια κάθε ομάδας πιθανόν να προέρχονται από το ίδιο αρχέγονο γεννητικό κύτταρο, ενώ τα θυλακικά κύτταρα, προέρχονται από το βλαστικό επιθήλιο της ωοθήκης. Μερικά από τα ωογόνια διαφοροποιούνται σε *πρωτογενή ωοκύτταρα*. Αμέσως μετά το σχηματισμό τους, αντιγράφουν το DNA τους και εισέρχονται στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Το πρωτογενές ωοκύτταρο μαζί με τα θυλακικά κύτταρα που το περιβάλλουν ονομάζεται *αρχέγονο ωοθυλάκιο*.

2. Μεταγεννητική Ωρίμανση

Λίγο πριν την γέννηση όλα τα αρχέγονα ωοκύτταρα έχουν αρχίσει την πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Αντί όμως να προχωρήσουν στο στάδιο της μετάφρασης, εισέρχονται στο στάδιο της διπλοταινίας, γεγονός που πραγματοποιείται κατά την 18^η ημέρα της ανάπτυξης του εμβρύου. Σε αυτή τη φάση της ωογένεσης τα πρωτογενή ωοκύτταρα παραμένουν στην πρόφαση και δεν ολοκληρώνουν την πρώτη μειωτική διαίρεσή τους πριν τα θηλυκά άτομα ωριμάσουν. Μετά την 6^η εβδομάδα 5-15 αρχέγονα ωοθυλάκια αρχίζουν να ωριμάζουν σε κάθε ωοθηκικό κύκλο. Το πρωτογενές ωοκύτταρο αρχίζει να αυξάνει σε μέγεθος και τα θυλακικά κύτταρα που το περιβάλλουν πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολύστιβου επιθηλίου κοκκιωδών κυττάρων. Το ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται πλέον ως *πρωτογενές ωοθυλάκιο*. Τα κοκκιώδη κύτταρα επικάθονται σε μια βασική μεμβράνη σχηματίζοντας τη θήκη του ωοθυλακίου. Επιπλέον, τα κοκκιώδη κύτταρα εκκρίνουν ένα στρώμα γλυκοπρωτεϊνών στην επιφάνεια του ωοκυττάρου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό της διαφανούς ζώνης. Καθώς προχωρά η ανάπτυξη, εμφανίζονται μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων χώροι γεμάτοι υγρό, οι οποίοι όταν συνενωθούν σχηματίζουν το *άντρο* του ωοθυλακίου. Σε αυτό το στάδιο το ωοθυλάκιο χαρακτηρίζεται ως *δευτερογενές ωοθυλάκιο*.

Μόλις το ωοθυλάκιο καταστεί ώριμο (τριτογενές ή *γραφιανό ωοθυλάκιο*), το πρωτογενές ωοκύτταρο ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεσή του, με αποτέλεσμα το σχηματισμό

δυο ανισομεγέθη θυγατρικών κυττάρων, τα οποία όμως έχουν από 23 διπλασιασμένα χρωμοσώματα. Το ένα από αυτά τα κύτταρα, το δευτερογενές ωκύτταρο, παίρνει όλο το κυτταρόπλασμα, ενώ το άλλο, το *πρώτο πολικό σωματίο*, δεν παίρνει πρακτικά καθόλου κυτταρόπλασμα. Η πρώτη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται λίγο πριν από την ωοθυλακιορρηξία. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται μόνο εάν γονιμοποιηθεί το ωάριο [3],[6].



Εικόνα 4: Ωογένεση

VI. Σπερματογένεση

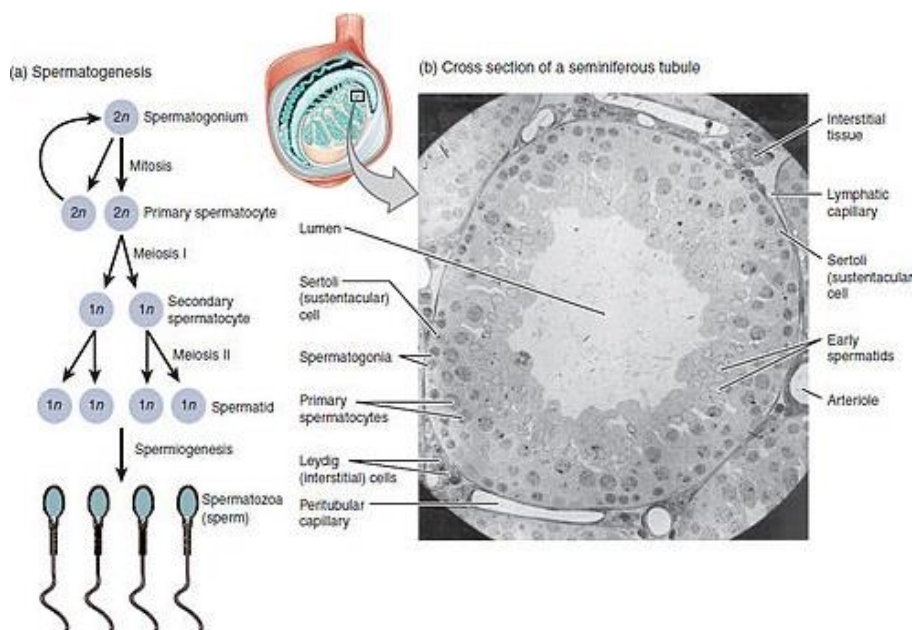
Η σπερματογένεση περιλαμβάνει όλες τις διεργασίες με τις οποίες τα σπερματογονία μετασχηματίζονται σε σπερματοζωάρια. Οι διεργασίες αυτές στα αρσενικά άτομα αρχίζουν κατά την ήβη και συνεχίζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Κατά τη γέννηση τα γεννητικά κύτταρα του άρρενος εντοπίζονται στις γεννητικές δοκίδες του όρχεως περιβαλλόμενα από στηρικτικά κύτταρα. Τα στηρικτικά κύτταρα προέρχονται από το βλαστικό επιθήλιο του αδένος και εξελίσσονται σε κύτταρα Sertoli, τα οποία συμμετέχουν άμεσα στην διαφοροποίηση των γαμετών.

Λίγο πριν την ήβη οι γεννητικές δοκίδες αποκτούν αυλό και γίνονται τα σπερματικά σωληνάρια, την ίδια περίοδο τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα παράγουν τα *σπερματογόνια*. Τα κύτταρα που υποβάλλονται στην διεργασία της σπερματογένεσης προκύπτουν από τη μιτωτική διαίρεση των σπερματογονίων. Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, τα εν λόγω κύτταρα μετατοπίζονται σταδιακά από τη βασική μοίρα του σπερματικού σωληναρίου προς τον αυλό, διερχόμενα ανάμεσα από τα κύτταρα Sertoli. Στη διάρκεια αυτής της μεταναστευτικής πορείας, τα *πρωτογενή σπερματοκύτταρα* πραγματοποιούν χωρίς διακοπή

τις δυο μειωτικές διαιρέσεις, παράγοντας αρχικώς δυο *δευτερογενή σπερματοκύτταρα* και εν συνεχεία τέσσερις *σπερματίδες*, η κάθε μια από τις οποίες περιέχει 23 απλοειδή χρωμοσώματα.

Τα ωριμάζοντα σπερματοκύτταρα και οι σπερματίδες συνδέονται με τα κύτταρα Sertoli μέσω κυτταροπλασματικών αποφυάδων που ονομάζονται σωληνοβολβικά συμπλέγματα. Πιστεύεται ότι μέσω των σωληνοβολβικών συμπλεγμάτων μεταφέρεται το πλεονάζον κυτταρόπλασμα από τους αναπτυσσόμενους γαμέτες προς τα κύτταρα Sertoli. Με αυτόν τον τρόπο οι σπερματίδες υφίστανται έντονες μεταβολές στο σχήμα και στην εσωτερική οργάνωση τους με αποτέλεσμα την μετατροπή τους σε *σπερματοζωάρια*. Τελικά, οι εναπομένουσες συνδέσεις διαρρηγνύονται με αποτέλεσμα την απελευθέρωση των σπερματοζωαρίων στον αυλό των σωληναρίων [2]. Η σειρά των μεταβολών που έχουν ως αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό των σπερματίδων σε σπερματοζωάρια ονομάζεται σπερμιόγνεση. Οι μεταβολές αυτές περιλαμβάνουν:

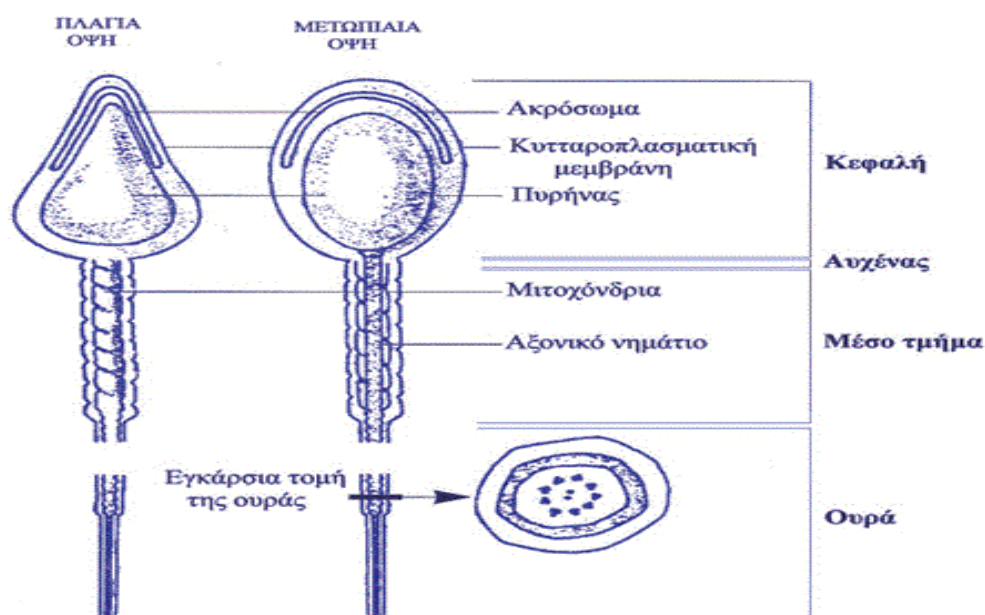
- Το σχηματισμό του ακροσώματος, το οποίο καλύπτει πάνω από το ήμισυ της επιφάνειας του πυρήνα και περιέχει ένζυμα που βοηθούν το σπερματοζωάριο να διεισδύσει στο ωάριο
- Την πύκνωση του πυρήνα
- Τον σχηματισμό του αυχένα, του μέσου τμήματος και της ουράς
- Την αποβολή του μέγιστου μέρους του κυτταροπλάσματος [3].



Εικόνα 5: (α) Σπερματογένεση, (β) Εγκάρσια τομή του σπερματικού σωληναρίου

Τα ώριμα σπερματοζωάρια αποθηκεύονται στην *επιδιδυμίδα*, μια ειδική περιοχή του σπερματικού πόρου κοντά στην έκφυσή του από τον όρχι. Αποτελούνται από:

- Την *κεφαλή*, η οποία περιέχει τον πυκνωτικό πυρήνα και καλύπτεται από ένα κορυφαίο κυστίδιο γεμάτο με υδρολυτικά ένζυμα, το οποίο ονομάζεται *ακρόσωμα*.
- Το *μεσαίο τμήμα*, το οποίο περιέχει μεγάλα ελικοειδή μιτοχόνδρια και παράγει την δύναμη για την κινητική δραστηριότητα του κυττάρου
- Την *ουρά*, η οποία περιέχει τους μικροσωληνίσκους που αποτελούν μέρος του προωθητικού συστήματος του σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 6: Μορφολογία ώριμου σπερματοζωαρίου

Η σπερματογένεση επιτελείται κατά συνεχή “κύματα” σε όλη την έκταση του σπερματικού επιθηλίου. Σε κάθε επιμέρους περιοχή του σπερματικού επιθηλίου η παραγωγή των γαμετών είναι συγχρονισμένη. Ωστόσο αυτό δεν ισχύει για όλη την έκταση των σπερματικών σωληναρίων. Σε πολλά είδη θηλαστικών, ο κλώνος των σπερματογονίων που προέρχεται από κάθε αρχέγονο σπερματογόνιο αποικίζει μια ορισμένη περιοχή των σπερματικών σωληναρίων και εμφανίζει συγχρονισμένη σπερματογένεση.

Τα σπερματοζωάρια διέρχονται από ένα τελικό στάδιο λειτουργικής ωρίμανσης που αποκαλείται *ενεργοποίηση* (capacitation) [2].

B. ΩΟΘΗΚΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Στην έναρξη της εφηβείας η γυναίκα αρχίζει να παρουσιάζει τακτικούς μηνιαίους κύκλους, οι οποίοι είναι γνωστοί ως γενετήσιοι κύκλοι. Το πρώτο επίπεδο ρύθμισης ορμονών των γενετήσιων κύκλων και γενικότερα του αναπαραγωγικού συστήματος ελέγχεται από τον υποθάλαμο μέσω της παραγωγής GnRH. Η ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπινών, η GnRH, μεταφέρεται μέσω αιμοφόρων αγγείων στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης όπου διεγείρουν την έκκριση γοναδοτροπινών. Αυτές οι ορμόνες, η *θυλακιοτρόπος ορμόνη* (FSH) και η *ωχρινοτρόπος ορμόνη* (LH) διεγείρουν και ελέγχουν τις κυκλικές μεταβολές της ωοθήκης [3],[7].

I. Ανάπτυξη θυλακίου και έκκριση οιστρογόνων κατά την πρώιμη και μέση θυλακική φάση

Στις ενήλικες ωοθήκες υπάρχει πάντα ένας αριθμός θυλακίων χωρίς άντρο και ένα αριθμός που βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης. Η περαιτέρω ανάπτυξή τους απαιτεί διέγερση από τις FSH και LH, οι οποίες έχουν διαφορετικές επιδράσεις στα ωοθυλάκια. Η FSH δρα στα κοκκιώδη κύτταρα διεγείροντάς τα ώστε να παράγουν οιστρογόνα, διεγείροντας επίσης το σχηματισμό και την μεγέθυνση του άντρου. Τα παραγόμενα οιστρογόνα μαζί με την FSH διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Η αύξησή τους οδηγεί στην περαιτέρω παραγωγή οιστρογόνων.

Στην συνέχεια η συγκέντρωση της FSH μειώνεται, γεγονός που αποσκοπεί στην επιλογή του *κυρίαρχο ωοθυλακίου*. Με την πτώση της συγκέντρωσης της FSH συνεχίζει να αναπτύσσεται μόνο το ωοθυλάκιο που είναι πιο ευαίσθητο στην FSH δηλαδή εκείνο που διαθέτει κοκκιώδη κύτταρα με αυξημένο αριθμό υποδοχέων FSH. Επίσης, καθώς το κυρίαρχο ωοθυλάκιο ωριμάζει εμφανίζονται και υποδοχείς LH στα κοκκιώδη κύτταρα, το οποίο είναι αποτέλεσμα της δράσης της FSH.

Κατά το πρώιμο και μέσο στάδιο της θυλακικής το κυρίαρχο θυλάκιο αρχίζει να παράγει οιστρογόνα με αποτέλεσμα την ραγδαία αύξηση της συγκέντρωσης τους στο πλάσμα. Τα οιστρογόνα εξασκούν αρνητικο-ανατροφοδοτική ρύθμιση στις γοναδοτροπίνες. Επομένως, καθώς η θυλακική φάση εξελίσσεται, η συγκέντρωση της FSH και σε μικρότερο βαθμό της LH, μειώνεται λόγω του ανυψούμενου επιπέδου των οιστρογόνων.

Κατά το όψιμο στάδιο της θυλακικής φάσης, η συγκέντρωση των οιστρογόνων παραμένει σταθερά υψηλή. Τότε ασκείται μια θετικο-ανατροφοδοτική επίδραση που ενισχύει την ευαισθησία του GnRH μηχανισμού έκκρισης της LH στην υπόφυση. Τελικό αποτέλεσμα της θετικο-ανατροφοδοτικής επίδρασης των οιστρογόνων κατά το όψιμο στάδιο της θυλακικής φάσης είναι η δημιουργία παλινρροιακού κύματος στην έκκριση της LH.

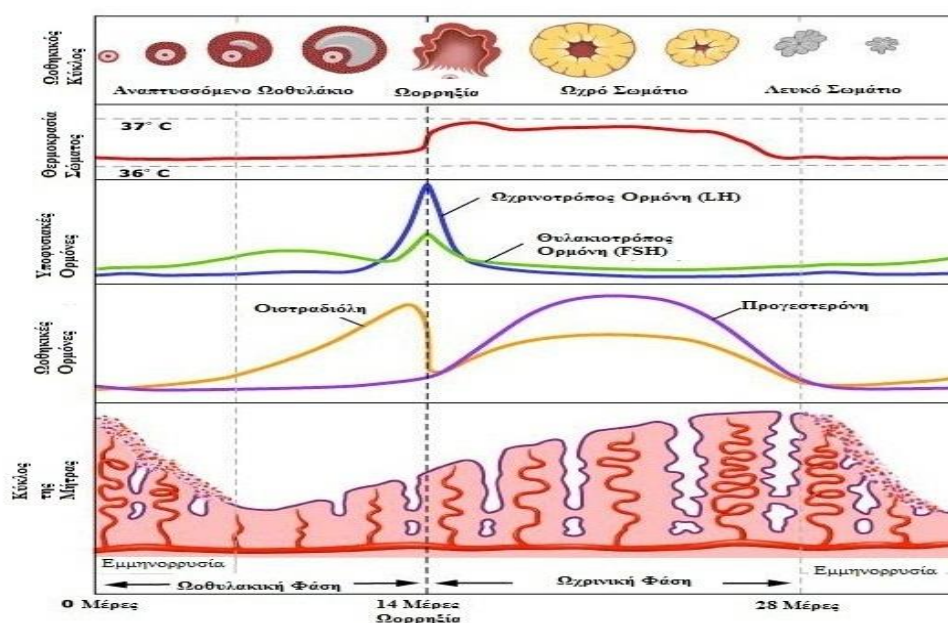
Η μεσοκυκλική παλινρροιακή έκκριση της LH αποτελεί το γεγονός το οποίο επιφέρει *ωορρηξία*, καθώς διεγείρει εκείνες της διεργασίες οι οποίες μετατρέπουν τα κοκκιώδη κύτταρα και τα κύτταρα θήκης σε *ωχρό σωμάτιο*. Το ωχρό σωμάτιο εκκρίνει μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων, προγεστερόνης και ανασταλτίνης. Σε μια γυναίκα που δεν καθίσταται έγκυος το ωχρό σωμάτιο εκφυλίζεται και τότε ο καταμήνιος κύκλος ξεκινά πάλι από την αρχή. Κατά τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου, η συγκέντρωση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης στο πλάσμα μειώνεται και η έκκριση της FSH και της LH αυξάνεται, με αποτέλεσμα την διέγερση μιας νέας ομάδας ωοθυλακίων [8]

II. Ωοθυλακιωρρηξία

Κατά την *ωορρηξία* το λεπτό τοίχωμα του θυλακίου και της ωοθήκης διαρρηγνύονται στο σημείο που είναι ενωμένα μεταξύ τους, λόγω ενζυμικής πέψης. Το δευτερογενές ωοκύτταρο, περιβαλλόμενο από το υγρό του άντρου, μεταφέρεται έξω από την ωοθήκη, προς την επιφάνειά της. Όλες αυτές οι διαδικασίες συμβαίνουν στον άνθρωπο κατά τη 14^η ημέρα του καταμήνιου κύκλου, ενώ στο ποντίκι κάθε 5 ημέρες [8].

Με τη τελική ωρίμανση του γραφιανού ωοθυλακίου, το πρωτογενές ωοκύτταρο, το οποίο μέχρι αυτήν τη στιγμή παρέμενε στο στάδιο της διπλοταινίας, επανακτά και ολοκληρώνει τη πρώτη μειωτική διαίρεσή του. Ταυτόχρονα, η επιφάνεια της ωοθήκης αρχίζει να παρουσιάζει μια τοπική προεκβολή, λόγω της τοπικής εξασθένησης και της εκφύλισης της ωοθηκικής επιφάνειας, το ωοκύτταρο μαζί με τα γύρω κοκκιώδη κύτταρα αποσπάται και εγκαταλείπει την ωοθήκη [3]. Μετά την απελευθέρωση του υγρού του άντρου και του ωαρίου, το εναπομείναν θυλακικό υλικό συρρικνώνεται, τα κοκκιώδη κύτταρα μεγεθύνονται σχηματίζοντας μια αδενώδη δομή, γνωστή και ως *ωχρό σωμάτιο* η οποία εκκρίνει οιστρογόνα, προγεστερόνη και ανασταλτίνη. Εάν το ωάριο δεν γονιμοποιηθεί το ωχρό σωμάτιο ακολούθως εκφυλίζεται με απόπτωση [8].

Πιστεύεται ότι το ωοκύτταρο που περιβάλλεται από μερικά θυλακικά κύτταρα μεταφέρεται στο εσωτερικό του ωαγωγού με τις σαρωτικές κινήσεις των κροσσών του και τις δονήσεις των μικροσκοπικών κροσσών του επιθηλίου του ωαγωγού[3]. Μόλις εισέλθει στον ωαγωγό το ωάριο κινείται προωθούμενο από τους κροσσούς και από τις συστολές της λείας μυϊκής επικάλυψης των ωαγωγών. Στην συνέχεια, λόγω της αναστολής των μυϊκών συστολών το ωάριο κινείται μονό με τις κινήσεις των κροσσών, πράγμα που καθιστά την κίνησή του πολύ αργή. Απαιτούνται 4 ημέρες ώστε αυτό να φτάσει στη μήτρα, γι' αυτό το λόγο η γονιμοποίηση γίνεται συνήθως στον ωαγωγό [8].



Εικόνα 7: Αλλαγές στα επίπεδα των ορμονών κατά τον καταμήνιο κύκλο

III. Στάδια Κύκλου Οίστρου στα Ποντίκια

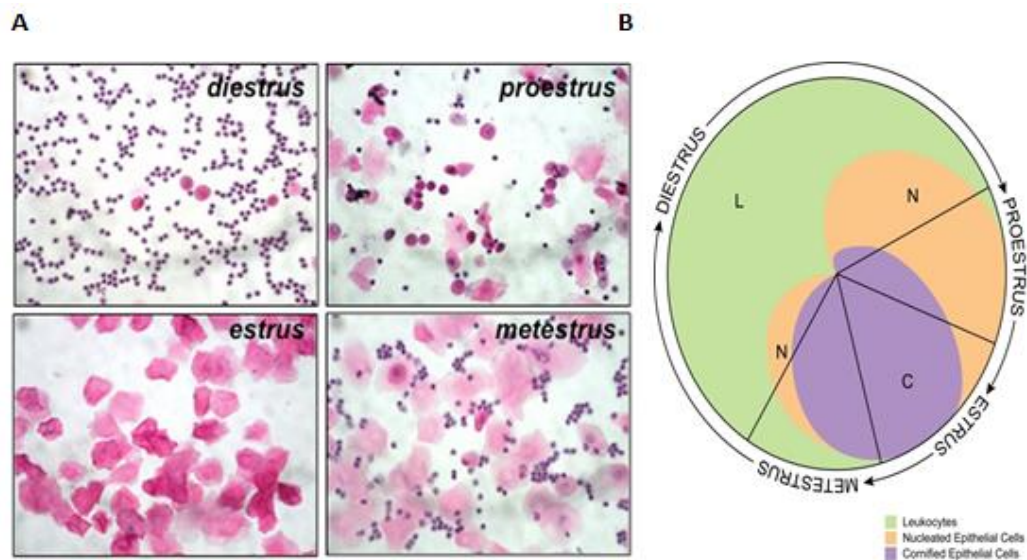
Ο σύντομος σε διάρκεια αναπαραγωγικός κύκλος που παρατηρήθηκε στα τρωκτικά λέγεται κύκλος οίστρου και περιγράφει τις αλλαγές που παρατηρούνται κατά την διάρκεια του αναπαραγωγικού τους κύκλου. Στα τρωκτικά, η ταυτοποίηση του σταδίου του οίστρου βασίζεται στην αναλογία των κυτταρικών τύπων που παρατηρείται στην κολπική έκκριση. Οι τύποι κυττάρων είναι τρεις, τα εμπύρνηνα επιθηλιακά κύτταρα, τα κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα και τα λευκοκύτταρα. Στο ποντίκι, ο κύκλος οίστρου διαιρείται σε 4 στάδια (προοίστρο, οίστρο, μεταοίστρο και διοίστρο) και επαναλαμβάνεται κάθε 4 έως 5 ημέρες, εκτός εάν διακοπεί από εγκυμοσύνη, ψευδοκύηση ή ανοίστρο.

Προοίστρος: Σε αυτή τη φάση κυριαρχούν τα εμπύρρινα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία εμφανίζονται είτε ομαδικά είτε μεμονωμένα. Παρατηρούνται επίσης και κερατινοποιημένα κύτταρα, αλλά σε μικρές συγκεντρώσεις. Ο προοίστρος συμβαίνει την ημέρα της προωορρηξίας, όπου τα επίπεδα των γοναδοτροπινών (FSH και LH) είναι αυξημένα.

Οίστρος: Χαρακτηριστικό αυτού του σταδίου είναι η εμφάνιση κερατινοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων σε ομάδες, όπου δεν υπάρχει εμφανής πυρήνας και το κυτταρόπλασμα έχει ακανόνιστο σχήμα. Ο οίστρος παρατηρείται την ημέρα της ωοθυλακιωρρηξίας, όπου τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι υψηλά την ημέρα και πέφτουν κατά την διάρκεια της νύχτας στα φυσιολογικά επίπεδα.

Μεταοίστρος: Σε αυτό το στάδιο παρατηρείται αυξημένο επίπεδο λευκοκυττάρων. Επίσης υπάρχουν λίγα εμπύρρινα ή και κερατινοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα. Αυτή η φάση ταυτίζεται με την περίοδο σχηματισμού του ωχρού σωματίου, το οποίο αρχίζει να παράγει προγεστερόνη, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει την λειτουργία της FSH. Τα επίπεδα των οιστρογόνων στο πλάσμα είναι χαμηλά.

Διοίστρος: Σε αυτό το στάδιο υπάρχουν κυρίως λευκοκύτταρα. Αυτό το στάδιο ταυτίζεται με την απόπτωση του ωχρού σωματίου. Τα επίπεδα των οιστρογόνων αρχίζουν να αυξάνονται [10].



Εικόνα 8: Α. Μικροσκοπική απεικόνιση των 3 ειδών κυττάρων κατά τα 4 στάδια του οίστρου (διοίστρος, προοίστρος, οίστρος, μεταοίστρος). Β. Διαγραμματική απεικόνιση των 3 ειδών κυττάρων κατά τα 4 στάδια του οίστρου (L: Λευκοκύτταρα, N: Εμπύρρινα επιθηλιακά κύτταρα, C: Κερατινοποιημένα κύτταρα

Γ. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

Ι. Τελικό Στάδιο Ωρίμανσης Σπερματοζωαρίων

Κατόπιν της εκσπερμάτωσης, τα σπερματοζωάρια περνούν γρήγορα από τον κόλπο στην κοιλότητα της μήτρας και από κει στους ωαγωγούς. Η γονιμοποίηση πραγματοποιείται στην λήκυθο του ωαγωγού. Τα σπερματοζωάρια μόλις εισέλθουν στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα δεν είναι έτοιμα να γονιμοποιήσουν το ωάριο. Πέραν από την βιοχημική ωρίμανση που υπόκεινται στην επιδιδυμίδα, μόλις εισέλθουν στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα θα πρέπει να υποστούν *ενεργοποίηση* (capacitation) και *ακροσωματική αντίδραση* [7],[9].

Η *ενεργοποίηση* του σπέρματος είναι η διαδικασία που υπόκειται το σπέρμα κατά την μεταφορά του από τον κόλπο στους ωαγωγούς. Στην διάρκειά της το γλυκοπρωτεϊνικό κάλυμμα απομακρύνεται από την κυτταρική μεμβράνη που καλύπτει την ακροσωματική περιοχή των σπερματοζωαρίων.

Η *ακροσωματική αντίδραση* είναι η διεργασία που απαιτείται για την ολοκλήρωση της ενεργοποίησης. Επιτελείται υπό την επίδραση ουσιών που προέρχονται από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου. Ουσιαστικά η κυτταρική μεμβράνη ενώνεται με την εξωτερική ακροσωματική μεμβράνη σε πολλά σημεία, γεγονός που επιτρέπει την απελευθέρωση του ακροσωματικού περιεχομένου, το οποίο χρειάζεται για την διέλευση του ακτινωτού στεφάνου και της διαφανούς ζώνης. Κατά την ακροσωματική αντίδραση απελευθερώνονται 2 βασικές ουσίες, η υαλουρονιδάση, η οποία βοηθά το σπερματοζωάριο να διαπεράσει τον φραγμό του ακτινωτού στεφάνου και η ακροσίνη οι οποίες βοηθά το σπερματοζωάριο να διαπεράσει τη διαφανή ζώνη (zona pellucida).

Για να γονιμοποιήσουν, τα σπερματοζωάρια των ευθήριων θηλαστικών πρέπει να υποβάλλονται σε ενεργοποίηση (capacitation) εντός του γυναικείου γεννητικού συστήματος. Υποκυτταρικές αλλαγές που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση φαίνεται τελικά να επιτρέπουν την εισροή Ca^{2+} που απαιτούνται για την έναρξη της ακροσωματικής αντίδρασης και έχει ως αποτέλεσμα μια μορφή υπερενεργοποιημένης κινητικότητας. Ωστόσο, γιατί η ενεργοποίηση έχει εμφανιστεί ως απαραίτητη προϋπόθεση για την γονιμοποίηση είναι άγνωστο. Και οι δύο πτυχές της ενεργοποίησης ίσως αντικατοπτρίζουν τους νέους κυτταρικούς μηχανισμούς ελέγχου για τη ρύθμιση των δραστηριοτήτων του σπέρματος και απαιτούνται λόγω της εξελικτικής αλλαγής στο ωοκύτταρο [9].

II. Γονιμοποίηση

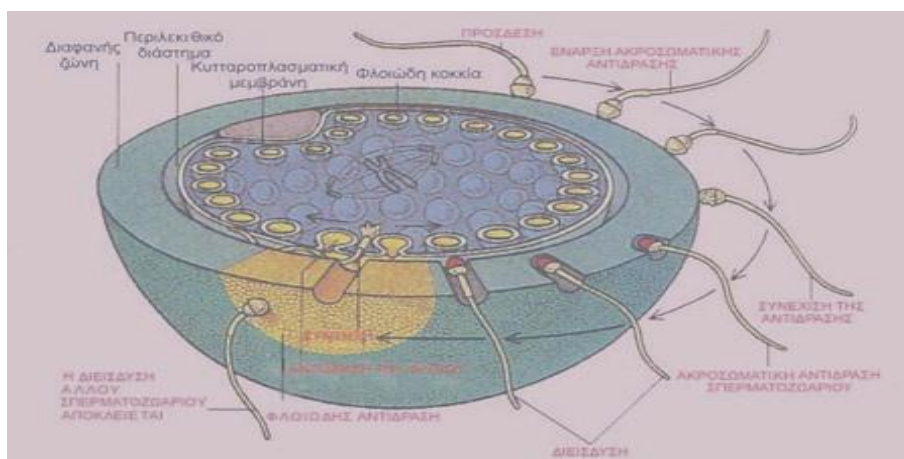
Η γονιμοποίηση αποτελεί σειρά διαδικασιών παρά ένα μεμονωμένο γεγονός. Αρχίζει όταν τα σπερματοζωάρια ξεκινούν να διεισδύουν τον ακτινωτό στέφανο που περιβάλλει το ωάριο και τελειώνει με την ανάμειξη των πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων, αφού το σπερματοζωάριο διεισδύσει στο ωάριο [7].

Η γονιμοποίηση χωρίζεται σε τρεις φάσεις:

1. Διάσπαση του ακτινωτού στεφάνου: Ο πρώτος φραγμός που συναντούν τα σπερματοζωάρια μόλις συναντήσουν το ωάριο είναι ο ακτινωτός στέφανος, ο οποίος είναι κυτταρική στιβάδα που αποτελείται από πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, ειδικά υαλουρονικό οξύ. Το ένζυμο υαλουρονιδάση θεωρείται υπεύθυνο για τη διάσπαση των κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου. Τελικά διαπιστώθηκε ότι οι κολυμβητικές κινήσεις των σπερματοζωαρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην διέλευσή τους από τον ακτινωτό στέφανο.

2. Διέλευση από την διάφανη ζώνη: Η διαφανής ζώνη είναι ο δεύτερος φραγμός που συναντούν τα σπερματοζωάρια και αποτελείται κυρίως από τρεις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP2, ZP3. Αφού διεισδύσουν στον ακτινωτό στέφανο τα σπερματοζωάρια δεσμεύονται στην διαφανή ζώνη με τη βοήθεια της πλασματικής μεμβράνης της κεφαλής του σπέρματος. Στη δέσμευση με τη διαφανή ζώνη τα σπερματοζωάρια των θηλαστικών υποβάλλονται σε ακροσωμική αντίδραση. Μόνο μετά την ακροσωμική αντίδραση μπορούν τα σπερματοζωάρια να διεισδύσουν μέσα στην διαφανή ζώνη. Η διείσδυση επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό της μηχανικής προώθησης των κινήσεων της ουράς του σπερματοζωαρίου και της δράση ακροσωμικών ενζύμων, το πιο σημαντικό από τα οποία είναι η ακροσίνη (acrosin).

3. Συνένωση των κυτταρικών μεμβρανών του ωοκυττάρου και του σπερματοζωαρίου: Μετά από μια σύντομη χρονική περίοδο στον χώρο μεταξύ του πλάσματος του ωαρίου και της διαφανούς ζώνης, έρχεται σε επαφή με το ωάριο. Σε δυο διακριτές φάσεις το σπερματοζωάριο αρχικά δεσμεύεται και στη συνέχεια συγχωνεύεται με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου. Μετά την συγχώνευση το περιεχόμενο του σπερματοζωαρίου περνά μέσα στο ωάριο. Κατόπιν αυτού ξεκινά η διαίρεση. [7].



Εικόνα 9: Τα 3 στάδια της γονιμοποίησης (πρόσδεση, ακροσωμική αντίδραση, διείσδυση)

Δ. ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

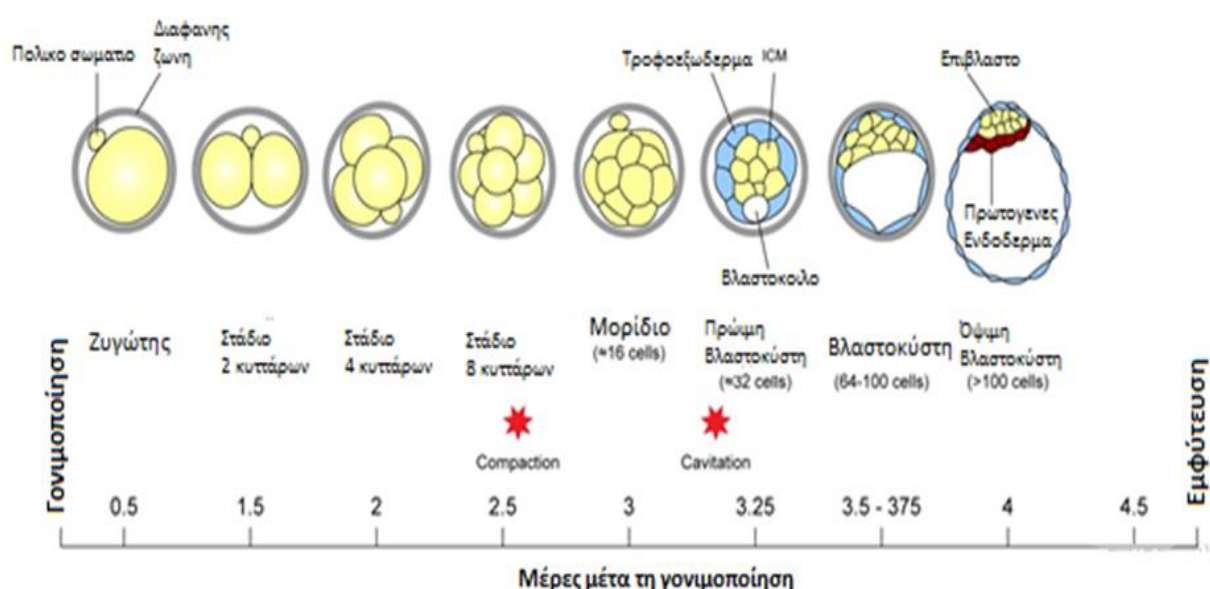
Ι. Προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου ποντικού

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” έχει διάρκεια 4 έως 5 ημέρες στον ποντικό. Το γονιμοποιημένο ωάριο (το ζυγωτό) διαιρείται διαδοχικά για να σχηματιστεί ένα έμβρυο 2-, 4-, 8-κυττάρων και ούτω καθεξής. Το προ-εμφυτευτικό έμβρυο συνεχίζει να περιβάλλεται από τη διαφανή ζώνη, που αποτρέπει το έμβρυο από τη σύνδεση του με το τοίχωμα της σάλπιγγας κατά τη διάρκεια της διαδρομής που διανύει μέχρι να φτάσει στη μήτρα, αποτρέποντας έτσι μια έκτοπη κύηση.

Μέχρι το πρώιμο στάδιο των 8-κυττάρων το σχήμα των βλαστομερών παραμένει ευδιάκριτο. Όμως, λίγο αργότερα στο στάδιο των 8-16 κυττάρων παρατηρείται συμπίεση των βλαστομεριδίων με ταυτόχρονη μεγιστοποίηση των διακυτταρικών τους επαφών και το έμβρυο αποκτά ένα πιο σφαιρικό και ομαλοποιημένο σχήμα. Το έμβρυο σε αυτό το στάδιο ονομάζεται μορίδιο. Το φαινόμενο αυτό καλείται σύμπληξη [11]. Κατά την περίοδο αυτή σχηματίζονται δεσμοσώματα και στενοσύνδεσμοι που δημιουργούν έναν αδιαπέραστο

φραγμό στο εσωτερικό και το εξωτερικό του εμβρύου. Όταν σχηματιστούν περίπου 32 κύτταρα, μερικά από τα βλαστομερή συσσωρεύουν υγρό στα μεσοκυττάρια διαστήματα μεταξύ τους για να σχηματίσουν μια κοιλότητα, το βλαστόκυκλο. Το έμβρυο τώρα ονομάζεται βλαστοκύστη (βλέπε εικόνα 3). Η βλαστοκύστη αναπτύσσεται καθώς τα κύτταρα διαιρούνται και η κοιλότητα διαστέλλεται έως ότου φθάσει στη μήτρα κατά την 4η εμβρυική μέρα, ενώ την E4,5 εκκολάπτεται από τη διαφανή ζώνη και εμφυτεύεται στο τοίχωμα της μήτρας [12].

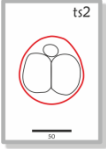
Καθώς το μορίδιο αναπτύσσεται σε βλαστοκύστη, μερικά από τα κύτταρα παραμένουν στο εξωτερικό του εμβρύου, ενώ άλλα βρίσκονται στο εσωτερικό του μοριδίου και σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ) όπως φαίνεται στην εικόνα 2. Τα κύτταρα που εντοπίζονται στην επιφάνεια αναπτύσσουν ασύμμετρες περιοχές στην πλασματική τους μεμβράνη και είναι πολωμένα. Αυτά τα κύτταρα θα σχηματίσουν το τροφοεξώδερμα. Τα εσωτερικά κύτταρα θα σχηματίσουν την εσωτερική κυτταρική μάζα (ΕΚΜ). Τα κύτταρα της ΕΚΜ δεν έχουν ασύμμετρες κυτταρικές επιφάνειες, (δεν είναι πολωμένα) και παραμένουν παντοδύναμα, δεδομένου ότι μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε από τα κύτταρα του εμβρύου. Τα κύτταρα της ΕΚΜ θα διαφοροποιηθούν στο επίβλαστο, από το οποίο θα σχηματιστεί το έμβρυο και αργότερα και άλλες εξωεμβρυικές μεμβράνες, και στο πρωτογενές ενδοδερμα. Ενώ, το τροφοεξώδερμα θα παράγει τα κύτταρα του τροφοβλάστη και του χορίου που θα σχηματίσουν τον πλακούντα.

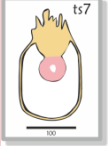
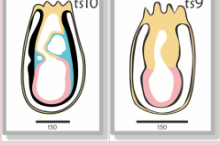
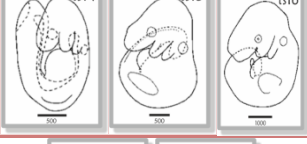
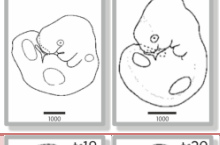
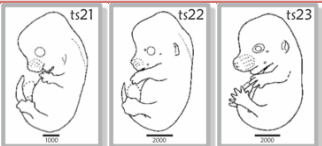


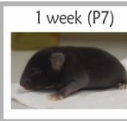
Εικόνα 10: Χρονοδιάγραμμα της ανάπτυξης του εμβρύου

II. Στάδια ανάπτυξης του ποντικού

Όσον αφορά τη σταδιοποίηση της ανάπτυξης του ποντικού υπάρχουν διάφορα συστήματα για τον καθορισμό της. Το αρχικό και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι το σύστημα Theiler, το οποίο χωρίζει την ανάπτυξη του ποντικού σε 26 προγεννητικά και 2 μεταγεννητικά στάδια όπου κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένα αναπτυξιακά γεγονότα. Καθότι το σύστημα του Theiler είναι πολύ ευρύ και γενικό, αδυνατεί να διαχωρίσει τα πρώιμα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης, ως εκ τούτου προτείνεται στα στάδια αυτά να χρησιμοποιούνται επικουρικά και συμπληρωματικά κριτήρια, όπως ο αριθμός των κυττάρων ή άλλα κριτήρια που ορίστηκαν από τους Downs and Davies (1993). Επιπλέον, έμβρυα της ίδιας ηλικίας κύησης μπορεί να διαφέρουν ελαφρώς στο αναπτυξιακό στάδιο, για αυτό τον λόγο στον πίνακα που ακολουθεί δίνεται και ένα εύρος ηλικίας κύησης στο οποίο μπορεί να παρατηρηθεί κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Ακόμη και κάθε διαφορετικό στέλεχος ποντικού μπορεί να έχει διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης με αισθητές διαφοροποιήσεις [12].

	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, πρωτογενές ενδόδερμα καλύπτει την επιφάνεια του βλαστούκου 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 εμβρυϊκός άξονας, αρχίζει η γαστρίδιωξη, αρχίζει ο σχηματισμός του αμνιακού υγρού
	11	7.5	Νευρική πλάκα, διαδικασία σχηματισμού του κεφαλιού, εγκόλπωση του πρόσθιου εντέρου
	12	8	Σχηματισμός σωματιών, 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 σωματίτες 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, τα βλέφαρα κλείνουν, και να σχηματίζεται το αφτί πάνω στον ακουστικό πόρο
			27-28	19	Νεογέννητο ποντίκι, μεταγεννητική ανάπτυξη

Πίνακας 1: Σταδιοποίηση της ανάπτυξης του ποντικού

III. Ενεργοποίηση εμβρυικού γονιδιώματος

Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι μια από τις πρώτες κρίσιμες διαδικασίες στην ζωή ενός νέου οργανισμού. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας το έμβρυο αποκτά την ικανότητα να μεταγράψει το νεοσυσταθέν γονιδίωμα του. Ο συγχρονισμός της κατάλληλης χρονικής στιγμής της ενεργοποίησης του γονιδιώματος και της συστοιχίας των γονιδίων που ενεργοποιούνται παίζουν σημαντικό ρόλο στον σωστό έλεγχο αυτής της διαδικασίας [13]. Το πιο κρίσιμο σημείο της διαδικασίας ενεργοποίησης του εμβρυικού γονιδιώματος είναι ο σχηματισμός αυτού από τα δυο γαμετικά γονιδιώματα. Αυτή είναι μια σύνθετη διαδικασία που περιλαμβάνει εκτεταμένες αλλαγές στον πυρηνικό φάκελο και στις πρωτεΐνες χρωματίνης καθώς ο προπυρήνας σχηματίζεται δημιουργώντας σταδιακά το μονό εμβρυικό γονιδίωμα [14].

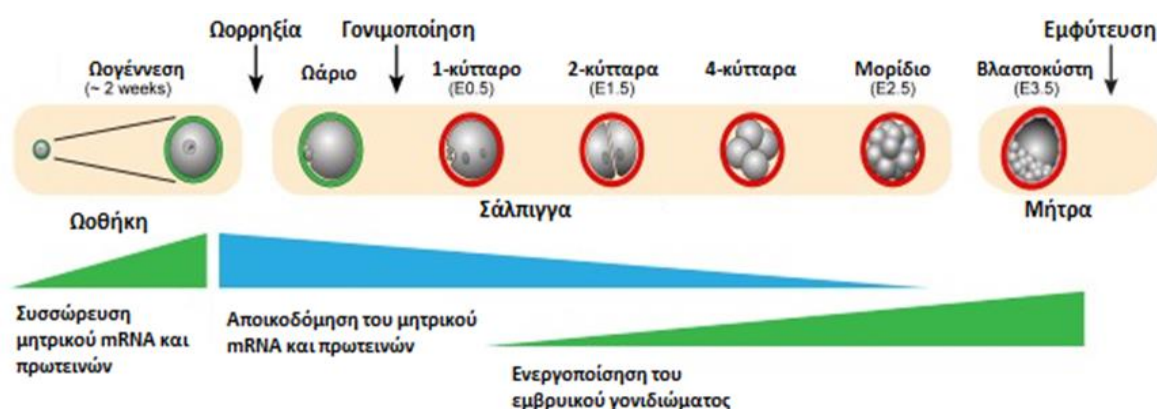
Τα πρώιμα στάδια της προεμφυτευτικής εμβρυικής ανάπτυξης ελέγχονται εξ'ολοκλήρου από το μητρικό γονιδίωμα καθώς το γονιμοποιημένο έμβρυο βρίσκεται σε μία μεταγραφική ηρεμία στην αρχή της ανάπτυξης του. Κατά τη διάρκεια της ωογένεσης και μετέπειτα στο ώριμο ωάριο αποθηκεύονται και συσσωρεύονται οι πρωτεΐνες καθώς και τα mRNAs της μητέρας που είναι απαραίτητα για την διεξαγωγή και την καθοδήγηση των πρώτων κυτταρικών κύκλων και την 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 τον μητρικό έλεγχο και να ξεκινήσει η ενεργοποίηση του γονιδιώματος τους διαφέρει μεταξύ των ειδών. Στο ποντίκι αυτή η μετάβαση ξεκινάει στο

στάδιο των 2 κυττάρων [15]. 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.

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). Οι μεταβολές στην περιεκτικότητα καθώς και στην δομή των πρωτεϊνών χρωματίνης, ιδιαίτερα των ιστονών, φαίνεται να ρυθμίζουν τη διαθεσιμότητα του γονιδιώματος για μεταγραφή επίσης παρέχουν εξειδίκευση στην διαδικασία αυτή. Αρχικά δεν απαιτούνται ενισχυτές γονιδίων για τη μεταγραφή, παρόλα αυτά φαίνεται να γίνονται απαραίτητοι όσο η δομή της χρωματίνης μεταβάλλεται [13].

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. 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 [14].



Εικόνα 11: Ενεργοποίηση εμβρυικού γονιδιώματος

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

A. ΚΙΡΚΑΔΙΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

I. Εισαγωγή

Ο βηματοδότης είναι μία αυτοσυντηρούμενη λειτουργική οντότητα, εντοπιζόμενη στους υπερχιασματικούς πυρήνες του εγκεφάλου, που επιτρέπει στους οργανισμούς να αντιμετωπίζουν ή να ανταποκρίνονται σε χρονικά συγκεκριμένες λειτουργίες. Αυτός ο βηματοδότης, είναι επίσης γνωστός ως «κirkάδιο ρολόι», ο όρος kirkάδιος (circadian) έχει τη ρίζα του στις λατινικές λέξεις «circa» που σημαίνει «περίπου» και «dies» που σημαίνει ημέρα. Απαραίτητη προϋπόθεση για την σωστή λειτουργία του kirkαδίου ρολογιού είναι ο συντονισμός του με τον περιβαλλοντικό χρόνο, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η φυσιολογική ομοιόσταση του οργανισμού.

Οι kirkάδιοι ρυθμοί όπως προαναφέρθηκε είναι αυτοσυντηρούμενοι, περίπου 24ωροι ρυθμοί, οι οποίοι υπάρχουν στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς, από τους μονοκύτταρους έως τα θηλαστικά, και επιτρέπουν στον οργανισμό να αντεπεξέρχεται στον κύκλο φωτός – σκοταδιού [16],[17]. Ένας ρυθμός, για να χαρακτηριστεί ως kirkάδιος, πρέπει να ικανοποιεί τα παρακάτω 3 κριτήρια:

1. **Ο ρυθμός έχει μια ενδογενή περίοδο που διαρκεί περίπου 24 ώρες.** Ο ρυθμός συνεχίζει να υφίσταται και σε μόνιμες καταστάσεις (πχ μόνιμο σκοτάδι) με περίοδο περίπου 24 ωρών. Το κριτήριο αυτό είναι για να διακρίνει τους kirkάδιους ρυθμούς από τις απλές αντιδράσεις σε εξωτερικά ερεθίσματα.
2. **Ο ρυθμός «ευθυγραμμίζεται» με τα εξωτερικά ερεθίσματα.** ο ρυθμός έχει την ιδιότητα να προσαρμόζεται και να επαναρρυθμίζεται επηρεασμένος από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα οι κοινωνικές αλληλεπιδράσεις, η καθημερινή ρουτίνα και περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως κύκλοι φωτός/σκοταδιού.
3. **Ο ρυθμός παρουσιάζει θερμοκρασιακή αντιστάθμιση.** Με άλλα λόγια διατηρεί kirkάδια περιοδικότητα μέσα σε ένα εύρος φυσιολογικών θερμοκρασιών. Πολλοί οργανισμοί διαβιώνουν σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και διαφορές στη θερμική ενέργεια επηρεάζουν την κινητική όλων των μοριακών διεργασιών στα

κύτταρά τους. Με σκοπό τη στενή παρακολούθηση του χρόνου, το κινκάρδιο ρολόι ενός οργανισμού πρέπει να διατηρεί μια περιοδικότητα περίπου 24 ωρών, πάρα τις αλλαγές στη κινητική των μορίων. Αυτή η ιδιότητα ονομάζεται «θερμοκρασιακή αντιστάθμιση» [18].

Το κινκάρδιο σύστημα των θηλαστικών απαρτίζεται από τρεις κύριες συνιστώσες, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή και το συντονισμό του βηματοδότη [17]: α) έναν ενδογενή κινκάρδιο βηματοδότη, β) μία οδό εισροής δεδομένων (input pathway), για την ανίχνευση και τη σηματοδότηση περιβαλλοντικών χρονικών παραμέτρων για το συντονισμό του βηματοδότη και γ) οδούς «εκροής» πληροφοριών (output pathway), για την έκφραση έκδηλων ρυθμών περιοδικότητας στη βιοχημεία, φυσιολογία και συμπεριφορά του οργανισμού. Η ικανότητα των οργανισμών να αντεπεξέρχονται ή να ανταποκρίνονται σε χρονικά-ειδικές συμπεριφορές, εξαρτάται από το συγχρονισμό του ενδογενούς «ρολογιού» τους με τον περιβαλλοντικό χρόνο.

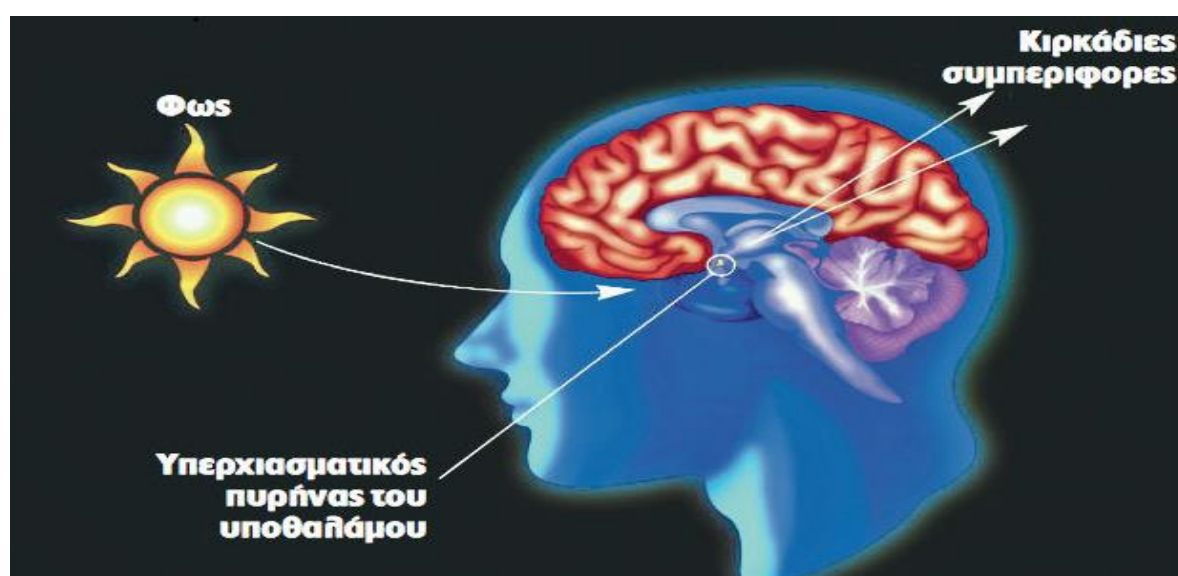
Η ενσωμάτωση ή συγχρονισμός είναι η διαδικασία μέσω της οποίας ένας περιβαλλοντικός ρυθμός, όπως ο κύκλος σκοταδιού - φωτός, μπορεί να ρυθμίσει την ενδογενή περιοδικότητα ενός αυτοσυντηρούμενου κινκάρδιου ρολογιού, με τέτοιο τρόπο, ώστε και οι δύο ρυθμοί να επαναλαμβάνονται με την ίδια σχέση φάσης [19]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το φως είναι ο κύριος περιβαλλοντικός συντονιστής του κινκάρδιου ρολογιού στα θηλαστικά [20],[21],[22]. Οι πληροφορίες σχετικά με το φως καθίστανται αντιληπτές μέσω ειδικών φωτοευαίσθητων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, τα οποία έχουν άμεσες προσεκβολές στον υπερχιασματικό πυρήνα του εγκεφάλου (SCN) [23], στη θέση εντόπισης του κινκάρδιου βηματοδότη των θηλαστικών, μέσω της μονοσυναπτικής αμφιβληστροειδο-υποθαλαμικής οδού (RHT).

II. Υπερχιασματικός Πυρήνας

Ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) ορίζεται ως το αμφοτερόπλευρο συμμετρικό όργανο, το οποίο εντοπίζεται άνωθεν του οπτικού χιάσματος του προσθίου υποθαλάμου και επί τα εκτός της τρίτης κοιλίας [24],[25]. Ο SCN αφορά σε ένα ζεύγος μικροκυτταρικών νευρικών σωματίων, το οποίο απαρτίζεται από μικρά κυτταρικά σωματίδια, που είναι χωρισμένα σε δύο μέρη, ανάλογα με τις νευροδραστικές ουσίες και τις οπτικές προσεκβολές.

Αν και ο SCN περιγράφηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1920 από τον Gurdjian, η σημασία του, όσον αφορά σε σχέση με τους κινκάρδιους ρυθμούς [26],[27]. εδραιώθηκε στη

δεκαετία του 1970, μετά από τη διαπίστωση μίας σειράς διαταραχών του SCN. Ο πρώτος επιστήμονας που διαπίστωσε την ύπαρξη της οδού εισαγωγής δεδομένων φωτός και ως επακόλουθο το ρόλο του SCN, ήταν ο Robert Moore. Χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένα αμινοξέα κατάφερε να ταυτοποιήσει την ύπαρξη της αμφιβληστροειδο-υποθαλαμικής οδού (RHT), η οποία προσεκβάλλει στο SCN [25]. Έχει αποδειχθεί ότι ο κirkάδιος βηματοδότης των θηλαστικών είναι περισσότερο ευαίσθητος στο φως, συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη χρονική υπόδειξη [20]. Οι πληροφορίες σχετικά με το φως καθίστανται αντιληπτές μέσω ειδικών φωτοευαίσθητων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, τα οποία έχουν άμεσες προσεκβολές στον SCN [28],[29] στη θέση εντόπισης του κirkάδιου βηματοδότη των θηλαστικών, μέσω της μονοσυναπτικής RHT.



Εικόνα 12: Υπερχιασματικός πυρήνας

Μελέτες που διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας διαγονιδιακά ποντίκια, των οποίων τα ραβδία και τα κωνία είχαν καταστραφεί πλήρως, έδειξαν ότι τα ποντίκια διαθέτουν επιπρόσθετους οφθαλμικούς φωτοϋποδοχείς, οι οποίοι τους επιτρέπουν να ελέγχουν την κirkάδια ρυθμικότητα [30]. Αυτό υποδηλώνει ότι άλλοι φωτοϋποδοχείς στον αμφιβληστροειδή είναι κυρίως υπεύθυνοι για το συντονισμό των κirkάδιων ρυθμών, οι οποίοι όμως δρουν συμπληρωματικά με το σύστημα ραβδίων/κωνίων. Πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι οι φωτοϋποδοχείς συντονισμού είναι αμφιβληστροειδικά γαγγλιακά κύτταρα (RGCs) που προσεκβάλλουν στον SCN [28].

Το σύστημα εξόδου (output component) του κirkάδιου συστήματος χρονισμού μεταφράζει τον εσωτερικό χρόνο σε φυσιολογική δράση, γεγονός που επιτυγχάνεται άμεσα μέσω των

εκκρινόμενων παραγόντων και μέσω των πολυ-συναπτικών νευρικών οδών του SCN. Τα κύτταρα του SCN περιέχουν ένα ευρύ φάσμα νευροδιαβιβαστών, ορμονών και κυτοκινών καθώς και υποδοχείς για ένα εξίσου ευρύ φάσμα προσδετών. Ο SCN μεταδίδει πληροφορίες στον περιφερειακούς ιστούς και τα όργανα μέσω χυμικών και νευρικών οδών.

Τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες (αργινίνη βαζοπρεσίνη, TGF- α , και η PROK2) εκκρίνονται απευθείας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό από τον υπερχιασματικό πυρήνα, ρυθμίζοντας έτσι τη θερμοκρασία και την κινητική δραστηριότητα [31],[32],[33]. Οι νευρικές συνδέσεις μεταξύ του SCN και των περιφερειακών οργάνων είναι εκτεταμένες ώστε να ελέγχεται η επίφυση [34], τα επινεφρίδια [35], ο θυρεοειδής [36], η καρδιά [37], το ήπαρ [38] και το πάγκρεας [39]. Τέλος, ο υπερχιασματικός πυρήνας έχει άμεσο έλεγχο στην έκκριση της εκλυτικής ορμόνης των γοναδοτροπινών (GnRH) [40],[41].

Το SCN σηματοδοτεί την ώρα της ημέρας σε ολόκληρο τον οργανισμό μέσω αυτού του ρεπερτορίου σηματοδοτικών οδών προς τον υπόλοιπο εγκέφαλο, τους ενδοκρινείς αδένες και άλλους περιφερειακούς ιστούς, διευκολύνοντας την αλληλεπίδραση των φυσιολογικών συστημάτων με την εξωτερική φωτοπερίοδο, διατηρώντας με αυτόν τον τρόπο τον συγχρονισμό μεταξύ των εσωτερικών οργάνων. Οι νευρικές οδοί είναι το κύριο μέσο για τον έλεγχο του ρυθμού του εγκεφάλου και των περιφερικών ιστών. Η πιο γνωστή οδός ελέγχει την επιφυσιακή παραγωγή και έκκριση της μελατονίνης [42], [34].

Ο χρονισμός του ρυθμού της μελατονίνης και οι μεταβολές στο εύρος του ρυθμού αυτού, είναι το αποτέλεσμα της δραστηριότητας του SCN. Ως εκ τούτου η μελατονίνη που εκκρίνεται παρέχει μια πρόσθετη σύνδεση μεταξύ του κερκαδικού συστήματος χρονισμού και των περιφερειακών οργάνων και την “ενορχήστρωση” των εποχιακών αλλαγών της γονιμότητα [43]. Οι υποδοχείς μελατονίνης εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο SCN [44], [45] και στο *pars tuberalis* [46],[47]. Στην πρώτη περίπτωση η ορμόνη παρέχει ένα σταθεροποιητικό σήμα ανάδρασης στο κερκάδιο ρολόι [48], ενώ στην δεύτερη, η μελατονίνη συμμετέχει στην εποχιακή παραγωγή και έκκριση της προλακτίνης [49].

Τέλος, ο SCN είναι ένα αυτοσυντηρούμενο σύστημα όπου ακόμα και υπό την απουσία ρυθμικών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων συνεχίζει να εκφράζει ορμονικούς και συμπεριφερικούς ρυθμούς. Όταν απομονωθεί και καλλιεργηθεί *in vitro*, διατηρεί τον 24ωρο ρυθμό νευρικών ώσεων αποδεικνύοντας τον ενδογενή ρόλο ρύθμισης που διαθέτει εκ φύσεως [50].

B. ΚΙΡΚΑΔΙΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΣΕ ΜΟΡΙΑΚΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

Τα clock genes είναι η «μηχανή» του κιρκάδιου μηχανισμού και η ρύθμιση των κιρκάδιων ρυθμών σε μοριακό επίπεδο μεσολαβείται μέσω αντιγραφής και μετάφρασης θετικών και αρνητικών αυτορυθμιζόμενων αγκυλών μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η περιοδικότητα. Ο ρόλος των θετικών συνιστωσών είναι να ενεργοποιούν τα clock genes και οι προκύπτουσες clock-πρωτεΐνες λειτουργούν ως αναστολείς της δράσης των θετικών συνιστωσών.

I. Χαρακτηριστικά Κιρκάδιων γονιδίων (Clock genes)

Clock genes: Το γονίδιο clock κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελεί μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας-αγκύλης-έλικας (bHLH)-PAS. Ο τομέας bHLH διευκολύνει τη DNA-σύνδεση, τον πρωτεϊνικό διμερισμό και τομείς ενεργοποίησης, δρώντας έτσι ως θετική συνιστώσα, η οποία κατευθύνει τη μεταγραφή clock genes [51],[52]. Οι ετεροζυγώτες φορείς της μετάλλαξης, αλλά και ομοζυγώτες, παρουσίασαν ένα συγκεκριμένο μοτίβο αντιδράσεων. Αρχικά, δραματική αύξηση της περιοδικότητας κατά 4 ώρες, έπειτα μια βραδεία κιρκάδια ρυθμικότητα, έως εν τέλει την πλήρη απώλεια αυτής στους ομοζυγώτες της μετάλλαξης [52].

Πιο συγκεκριμένα, σε έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια knockout για το συγκεκριμένο γονίδιο φάνηκε ότι στα μεταλλαγμένα ποντίκια CLOCK^{Δ19}, όπου έχει προκληθεί η παράληψη του εξονίου 19 και η απώλεια 51 αμινοξέων από το C-άκρο της παραγόμενης πρωτεΐνης, είναι μη ικανά να κατευθύνουν τη διαδικασία της μεταγραφής παρόλο που η CLOCK^{Δ19} παραγόμενη πρωτεΐνη είναι σε θέση να σχηματίσει διμερές με την BMAL πρωτεΐνη [53],[54],[55].

Κατόπιν μεταφοράς CLOCK^{Δ19} μεταλλαγμένων ποντίκων σε σταθερό σκοτάδι παρατηρείται αρχικά η διατήρηση της κιρκάδιας ρυθμικότητας για ένα διάστημα 26-27 ωρών παρόλο που σε πολλά πειραματόζωα αυτή η ρυθμική εμφάνιση σταδιακά εξαφανίζεται. Τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης του ήπατος, της καρδιάς, των νεφρών των CLOCK^{Δ19} μεταλλαγμένων μυών είναι είτε αρρυθμικά είτε αισθητά μειωμένα [56],[57]. Τέλος, μελέτες μικροσυστοιχίας έχουν δείξει ότι η έκφραση ενός μεγάλου φάσματος clock-ελεγχόμενων γονιδίων διαταράσσεται σε περιφερειακούς ιστούς [58].

Bmal1/Mop3 gene: Αποτελεί μέλος της οικογένειας των bHLH-PAS μεταγραφικών παραγόντων, εμφανίζοντας έτσι πολλές ομοιότητες στη λειτουργία με το clock gene που αναφέρθηκαν παραπάνω και δρώντας ως το ετεροδιμερές ζεύγος του. Φορείς της Bmal1/Mop3 μετάλλαξης έχουν άμεση και πλήρη απώλεια της κirkάδιας ρυθμικότητας [59].

Πιο συγκεκριμένα, Bmal1 knockout ποντίκι εμφανίζουν μειωμένα επίπεδα δραστηριότητας σε συνδυασμό με αδυναμία εδραίωσης της δραστηριότητας στη σκοτεινή περίοδο [59], αλλαγές στην αρχιτεκτονική του ύπνου και αύξηση του ημερήσιου χρόνου ύπνου [60]. Τέλος, η έκθεση σε συνεχές σκοτάδι έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη έκφραση και απώλεια της ρυθμικότητας των *per1* και *per2* στο SCN, ενώ η έκφραση του clock-ελεγχόμενου γονιδίου *dbp* είναι υπορυθμιζόμενη και αρρυθμική στο ήπαρ [59].

Bmal2/Mop9 gene: Δεν υπάρχουν φορείς μετάλλαξης και για αυτό θεωρείται απλά ως μια παραλλαγή του προηγούμενου γονιδίου [51].

Period genes (*per1*, *per2*, *per3*): Και τα τρία γονίδια αποτελούν μέλη της πρωτεϊνικής οικογένειας PAS: πρόκειται για τομείς αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών με πρωτεΐνες που μεσολαβούν για το σχηματισμό ετεροδιμερών. Οι πρωτεΐνες που προκύπτουν από τη μετάφρασή τους δρουν μέσω αρνητικής ανάδρασης, ρυθμίζοντας τη μεταγραφή των ίδιων τους των γονιδίων. Φορείς μηδενικών μεταλλάξεων (null mutants) του *Per1* εμφάνισαν κirkάδιο φαινότυπο βραχύτερο κατά 1 ώρα, ενώ πλήρη απώλεια της ρυθμικότητάς τους παρατηρήθηκε δυο εβδομάδες μετά. Ομοζυγώτες της μετάλλαξης *Per2* εμφάνισαν κirkάδιο φαινότυπο με περίοδο εγρήγορσης βραχύτερη κατά 1,5 ώρα. Οι φορείς μετάλλαξης *Per3* εμφάνισαν πολύ μικρή βράχυνση της περιοδικότητας, ως εκ τούτου η πρωτεΐνη και το γονίδιο *Per3* δεν θεωρούνται κρίσιμοι παράμετροι του κirkάδιου μηχανισμού [61].

Cryptochrome genes (*cry1*, *cry2*): Αποτελούν μέλη της οικογένειας των φλαβοπρωτεϊνών που κωδικοποιούν μόρια με αρνητική δράση στον κirkάδιο μοριακό ρυθμιστικό μηχανισμό. Φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το *cry1* εμφάνισαν περίοδο εγρήγορσης βραχύτερη κατά 1 ώρα, ενώ η ικανότητα του φωτός να επάγει την έκφραση του *per2* γονιδίου δεν επηρεάστηκε από την απώλεια του *cry1* και τα πειραματόζωα εξακολούθησαν να παρουσιάζουν μια καθημερινή διακύμανση του *per1* και του *per2* [62].

Οι φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το *cry2* παρουσίασαν περίοδο μεγαλύτερη κατά 1 ώρα σε συνεχές σκοτάδι, αλλά διατηρούν ένα ρυθμό στην έκφραση του *per1* και του *cry1* στον SCN. Η απώλεια και των δυο *cry* γονιδίων έχει σαν αποτέλεσμα την απόλυτη

απορρύθμιση της συμπεριφοράς στο απόλυτο σκοτάδι, υποδεικνύοντας ότι το ένα υποκαθιστά το άλλο, ώστε να συντηρείται η σωστή κιρκάδια λειτουργία. (van der Horst et al., 1999). Το διπλό knock out σε *cry1* και *cry2* οδηγεί στην απώλεια της ρυθμικότητας της έκφρασης του *per1* στον SCN, όπως και στην επαγόμενη από το φως έκφραση του *per1*, καθώς και στη δυσλειτουργία της έκφρασης των clock γονιδίων στο ήπαρ και γενικότερα δυσλειτουργία στην έκφραση γονιδίων που εμπλέκονται σε μια πληθώρα λειτουργιών όπως ο μεταβολισμός, το ανοσοποιητικό σύστημα και η κυτταρική σηματοδότηση [57]. Επομένως, τα γονίδια *cry1* και *cry2* αποτελούν δύο ταλαντωτές αντίθετης δράσης [62].

Npas2/Mop4 gene: Άλλο ένα μέλος των bHLH-PAS μεταγραφικών παραγόντων. Φορείς της μετάλλαξης εμφάνισαν ελαφρά βραχύτερη περίοδο εγρήγορσης κατά 0,2 ώρες, ενώ παρατηρήθηκε τροποποιημένος ύπνος και προσαρμοστικότητα συμπεριφοράς σε αυτούς [51].

Timeless gene (Tim): Έχει επαγωγικό χαρακτήρα και μπορεί να αλληλεπιδρά με τα γονίδια *per*, όπως αποδείχθηκε στη *Drosophila*. Στα θηλαστικά, αντιθέτως, η αλληλεπίδραση *Per-Tim* δεν παρατηρείται, αλλά έχει αντικατασταθεί από την αλληλεπίδραση *Per-Per*. Ομόζυγες μεταλλάξεις του *tim* οδήγησαν σε πρώιμη εμβρυική θνησιμότητα, ενώ οι ετεροζυγώτες δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά με τα πειραματόζωα άγριου τύπου [63],[51].

Casein kinase I, epsilon: Είναι μέλος των σερινη/θρεονίνη κινασών και αποτελεί ένα ένζυμο με έμμεσο μηχανισμό δράσης, καθώς ο ρόλος του είναι να φωσφορυλιώνει τις πρωτεΐνες *PER* [64]. Επιπρόσθετα, προάγει την φωσφορυλίωση σε όλα τα πυρηνικά clock genes, καταλήγοντας τελικά στην αποδόμηση τους μέσω της οδού ubiquitin-proteasome. Ετεροζυγώτες φορείς εμφάνισαν βράχυνση της κιρκάδιας περιόδου κατά 4 ώρες, ενώ στους ομοζυγώτες η βράχυνση αυτή έφτασε μόνο έως τις 2 ώρες [63],[64].

Rev-Erb-alpha gene (Rev-Erba): Κωδικοποιεί έναν ορφανό πυρινικό υποδοχέα και ο ρόλος του είναι να συνδέει το θετικό με το αρνητικό σκέλος της παλίνδρομης ρύθμισης. Είναι ο κύριος ρυθμιστής της μεταγραφής του *bmal1*. Σε *Rev-Erba* knock out πειραματόζωα παρατηρήθηκε βράχυνση της κιρκάδιας περιόδου, εντούτοις το συγκεκριμένο γονίδιο δεν θεωρείται ζωτικό στη ρύθμιση του κιρκάδιου ρολογιού [65].

II. Μοριακός μηχανισμός του κιρκάδιου ρολογιού

Ο μηχανισμός περιοδικότητας των θηλαστικών εξαρτάται από ένα στενά ελεγχόμενο συντονισμού και έκφραση συγκεκριμένων clock γονιδίων. Η κυτταρική ρυθμικότητα του SCN παράγεται από μια σειρά αλληλεπικαλυπτόμενων θετικών και αρνητικών ανατροφοδοτήσεων [66]. Οι πρωτεΐνες των γονιδίων αυτών συμμετέχουν στον 24ωρο κύκλο, μέσω του αρνητικού σκέλους της παλίνδρομης ρύθμισης, όπου αναστέλλουν τους εκκινήτές τους. Το πρωτεύον θετικό σκέλος της ρυθμικότητας δημιουργείται από δύο μεταγραφικούς παράγοντες, τον παράγοντα Clock (circadian locomotor output cycle kaput) και τον Bmal1 (brain and muscle ARNT-like protein 1, γνωστό και Mor3). Τα βήματα του κιρκάδιου κύκλου παρίστανται παρακάτω και είναι τα εξής:

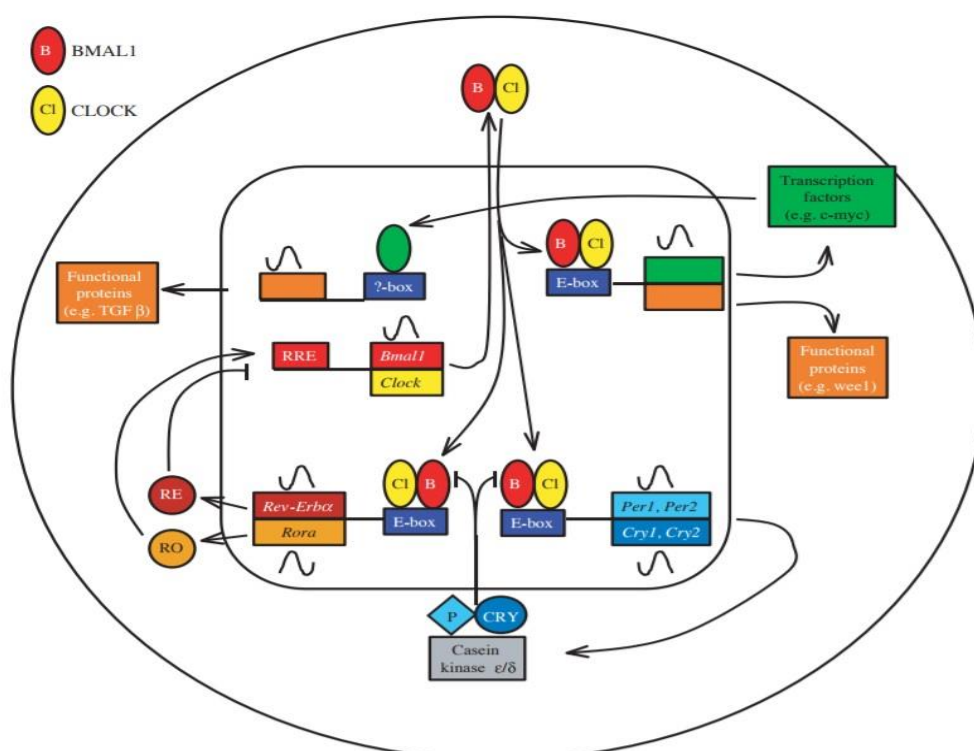
Ο κιρκάδιος κύκλος ξεκινά το πρωί όπου μετά την μεταγραφή και την μετάφραση των γονιδίων Clock και Bmal δημιουργείται το πρωτεϊνικό σύμπλοκο BMAL/CLOCK το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα και ενεργοποιεί την μεταγραφή των γονιδίων Per και Cry. Η σύνδεση του διμερούς πρωτεϊνικού συμπλόκου BMAL/CLOCK πραγματοποιείται σε μια ειδική ακολουθία βάσεων DNA CACGTG γνωστή ως E-box [67],[53]. Τα επίπεδα των PER και Cry αγγελιοφόρων RNAs κορυφώνονται κατά την μέση έως όψιμη κιρκάδια ημέρα και στη συνέχεια απελευθερώνονται στο κυτταρόπλασμα. Αμέσως μετά το έξοδο τους συνδέονται με ριβοσωμάτια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της μετάφρασης του γενετικού υλικού σε πρωτεΐνες [52].

Κατόπιν μια ενζυμική κινάση, η CKIε, προάγει τα σταδιακή φωσφορυλίωση των PER και CRY πρωτεϊνών, οι οποίες στη συνέχεια θα σχηματίσουν ένα σταθερό ετεροδιμερές σύμπλοκο PER/CRY. Η φωσφορυλίωση και η πρωτεόλυση των clock-πρωτεϊνών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του 24ωρου μοριακού μηχανισμού γιατί αλλάζει την σταθερότητα των πρωτεϊνών και επομένως την ταχύτητα του κύκλου ανάδρασης [68],[69].

Το βράδυ, 4 ώρες μετά περίπου, το σύμπλοκο PER/CRY μετακινείται στον πυρήνα, όπου και ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλέγματος BMAL1/CLOCK. Αποτέλεσμα αυτού είναι η σταδιακή ελάττωση των επιπέδων των Per και Cry mRNAs και κατά συνέπεια στη σταδιακή μείωση των PER και CRY πρωτεϊνών οι οποίες θα εξαφανιστούν πλήρως εντός των επόμενων 12 ωρών. Με αυτό τον τρόπο ελευθερώνεται η αναστολή των μεταγραφικών ενεργοποιητών BMAL και CLOCK, με αποτέλεσμα να ξαναρχίσει ο κύκλος [68].

Επιπρόσθετα, το διμερές BMAL1/CLOCK σύμπλοκο ενεργοποιεί ταυτόχρονα τη μεταγραφή του γονιδίου πυρηνικού υποδοχέα Rev-Erba. Η REV-ERBA πρωτεΐνη συνδέει τα ROREs (retinoic acid-related orphan receptor response elements) με τους υποκινητές τους και αναστέλλει τη μεταγραφή από το γονίδιο Bmal και πιθανότατα από τα γονίδια Clock και Cry1 [68],[70].

Ένα ακόμη μονοπάτι αρνητικής ανάδρασης επιτυγχάνεται από τη μεταγραφή των γονιδίων *dec1* και *dec2*, η οποία ελέγχεται και αυτή από το σύμπλεγμα CLOCK/BMAL1 μέσω των E-Boxes στους δικούς τους υποκινητές. Οι DEC1 και DEC2 πρωτεΐνες εμποδίζουν την έκφραση κινκιδίων γονιδίων μέσω του σχηματισμού μη λειτουργικού ετεροδιμερούς με το BMAL1 [71]. Οι γοναδοτροπίνες και η ινσουλίνη είναι γνωστό ότι επάγουν τη γονιδιακή έκφραση του *dec1* και αυτό ίσως παρέχει μια ευκαιρία στο αναπαραγωγικό σύστημα και στο πάγκρεας να επηρεάζουν τον κινκιδιο ρυθμό [72]. Τέλος, το BMAL1/CLOCK σύμπλεγμα ενεργοποιεί ορισμένα γονίδια τα οποία δεν ανήκουν στην κατηγορία των clock genes, αλλά φέρουν E-boxes και επομένως εξαρτώνται από το σύμπλεγμα. Αυτά είναι τα επονομαζόμενα clock-ελεγχόμενα γονίδια, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με περίοδο πολύ κοντά στις 24 ώρες και είναι συχνά σημαντικά για τη μεσολάβηση τοπικών διαδικασιών εντός ειδικών ιστών [73].



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού του κινκιδιο ρολογιού

Γ. ΚΙΡΚΑΔΙΟΙ ΡΥΘΜΟΙ ΚΑΙ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ι. Εισαγωγή

Είναι ευρέως γνωστό ότι το κirkάδιο ρολόι εμπλέκεται στη λειτουργία ενός μεγάλου εύρους συστημάτων της φυσιολογίας, συμπεριλαμβανομένου και του αναπαραγωγικού συστήματος. Ένας από τους πιο προφανείς ρόλους του κirkάδιου ρυθμού σε ένα σύστημα όπως το αναπαραγωγικό, είναι ότι παρέχει την πολύτιμη έννοια του χρόνου της ημέρας, ώστε ο οργανισμός να εξασφαλίσει ότι τα σημαντικά φυσιολογικά και συμπεριφορικά γεγονότα θα συμπίπτουν [74].

Πολλά θηλαστικά παρουσιάζουν εποχιακούς αναπαραγωγικούς ρυθμούς που βρίσκονται σε μεγάλο βαθμό υπό τη ρύθμιση της φωτοπεριόδου. Σε αυτά τα είδη, το κirkάδιο σύστημα και η επίφυση είναι κρίσιμα συστατικά του μηχανισμού που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση του μήκους ημέρας.

Ο ρυθμός της έκκρισης της επιφυσιακής μελατονίνης οδηγείται από μια νευρική οδό που περιλαμβάνει τους κirkαδικούς ταλαντωτές (circadian oscillators) στους υπερχιασματικούς πυρήνες [75]. Οι υποδοχείς μελατονίνης εκφράζονται κατά κύριο λόγο στο SCN και στο pars tuberalis. Στην πρώτη περίπτωση η ορμόνη παρέχει ένα σταθεροποιητικό σήμα ανάδρασης στο κirkάδιο ρολόι [48], ενώ στην δεύτερη, η μελατονίνη συμμετέχει στην εποχιακή παραγωγή και έκκριση της προλακτίνης [49].

Η μελατονίνη εκκρίνεται τη νύχτα σε όλα τα θηλαστικά και η διάρκεια κάθε νυκτερινού επεισόδιου έκκρισης μελατονίνης σχετίζεται αντιστρόφως ανάλογα με το μήκος της ημέρας. Ο ρυθμός της επιφυσιακής μελατονίνης φαίνεται να χρησιμεύει ως ένα εσωτερικό σήμα που αντιπροσωπεύει το μήκος ημέρας και το οποίο είναι σε θέση να ρυθμίζει μια ποικιλία εποχιακών φυσιολογικών και συμπεριφορικών λειτουργιών [75].

Λειτουργίες όπως για παράδειγμα η ωορρηξία και η δεκτικότητα του θηλυκού είναι ζωτικό να συγχρονίζονται με την εγρήγορση του αρσενικού. Σε αρκετά είδη, ιδιαίτερα σε εκείνα με σύντομο κύκλο ζωής, μικρή διάρκεια κύησης και χρόνο απογαλακτισμού μικρότερο του ενός έτους, οι κirkάδιοι ρυθμοί παρέχουν την αίσθηση της εποχής του χρόνου. Επομένως, οι παρατηρούμενες αλλαγές στο εξωτερικό ερέθισμα του φωτός ανάλογα με την εποχή του έτους, πιθανώς συνδέονται με έναν αυστηρά ελεγχόμενο εποχικό κύκλο γονιμότητας και υπογονιμότητας [76].

Η φύση καθώς και ο αριθμός των βιολογικών ρολογιών μέσω των οποίων ο αναπαραγωγικός και ο αναπτυξιακός χρονισμός συγχρονίζεται δεν έχουν διευκρινιστεί ακόμα πλήρως. Παρόλα αυτά έχει προταθεί ότι το κερκάδιο ρολό θα μπορούσε επίσης να συμβάλλει στον αναπτυξιακό χρόνο του εμβρύου καθώς και στον συγχρονισμό μεταξύ αυτού και του ενδομήτρου [77],[78].

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι ο SCN εκβάλλει σε άλλα μέρη του εγκεφάλου που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή, συμπεριλαμβανομένης της μεσοπρο-οπτικής περιοχής (MPOA) και των GnRH- θετικών σε κυττάρων [79]. Μελέτες από το εργαστήριο Buijs έδειξαν ότι η απελευθέρωση της SCN αγγειοπρεσίνης μπορεί να παίζει ρόλο στην έκκριση GnRH και συνεπώς το χρονισμό και το μέγεθος της αύξησης LH [41],[76]. Τα αποτελέσματα της μελέτης του εργαστηρίου Buijs ενισχύονται από επιπροσθετες μελέτες σε επίμυες οι οποίες έχουν δείξει ότι η διακοπή της επικοινωνίας μεταξύ υπερχιασματικού πυρήνα (SCN) και των νευρώνων της GnRH, είτε μέσω πλήρους εκτομής του υπερχιασματικού πυρήνα είτε τραυματίζοντας τα νευρικά μονοπάτια επικοινωνίας του πυρήνα, έχει σαν αποτέλεσμα διαταραχές του έμμηνου κύκλου και υπογονιμότητα [80].

II. Κιρκάδια γονίδια και εφηβεία

Η βιολογική ωρίμανση των συστημάτων αναπαραγωγής σηματοδοτείται μέσα από την έναρξη της εφηβείας, επομένως είναι αναμενόμενο πως το κερκάδιο ρολόι θα διαδραματίζει κάποιο ρόλο την περίοδο της εφηβείας. Στα τρωκτικά, η εμφάνιση της εφηβείας βρίσκεται σε άμεση εξάρτηση με το μήκος της ημέρας, έτσι σε μακρά παραμονή σε σκότος, η σεξουαλική ωρίμανση αναστέλλεται [81]. Η επίδραση της συντομότερης ημέρας είναι ιδιαίτερα προφανής σε τρωκτικά που ζουν σε περιοχές μεγάλου γεωγραφικού πλάτους όπου η διαθεσιμότητα τροφής εμφανίζει εποχικότητα. Σε οργανισμούς με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής, έχει παρατηρηθεί εκούσια αναβολή της σεξουαλικής τους ωρίμανσης, όταν οι εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες δεν είναι ευνοϊκές, ώστε οι πιθανότητες επίτευξης εγκυμοσύνης και υγιών απογόνων να είναι οι μέγιστες δυνατές [82].

Στην περίπτωση των επίμυων που μεγάλωσαν επί σειρά γενεών σε αυστηρά ελεγχόμενες και σταθερές εργαστηριακές συνθήκες όπου επιλέγονταν μόνο επίμυες με υψηλή γονιμότητα και ικανότητα τεκνοποίησης, οι κερκάδιες επιδράσεις στην έναρξη της εφηβείας

ήταν σπάνιες[83],[84]. Παρόλα αυτά, υπάρχουν στελέχη που υπό αυτές τις συνθήκες διατηρούν την ικανότητα φωτο-απόκρισής τους, αν και η αιτία είναι άγνωστη [85].

Μια ενδιαφέρουσα μελέτη με σκοπό την εξιχνίαση της παραπάνω ιδιαίτερης παρατήρησης, έδειξε πως όταν στα πειραματόζωα προκαλούνταν ανοσμία ή τους χορηγούνταν διατροφή χαμηλής πρωτεΐνης, εκείνα ανταποκρίνονταν σε βραχύτερο μήκος ημέρας [86]. Ίσως αυτό να οφείλεται στο γεγονός πως αυτές οι προκληθείσες διαταραχές επαναφέρουν την ευαισθησία των οργανισμών σε ορμονικούς ρυθμούς, που έπειτα από σειρά γενεών μέσα στο εργαστήριο κανονικά θα έπρεπε να έχουν απωλέσει. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός πως από όλα τα στελέχη που χρησιμοποιούνται, μόλις δύο διαθέτουν σε λειτουργική κατάσταση τα ένζυμα AA-NAT και HIOMT που τους επιτρέπουν να συνθέσουν μελατονίνη και επομένως να μεταφράσουν ένα φωτοπεριοδικό ερέθισμα σε ορμονικό σήμα [87],[88].

Οι μελέτες σχετικά με την εποχική εμφάνιση του menarche στους ανθρώπους [89] είναι δύσκολο να ερμηνευθούν με όρους κιρκαδικής ή φωτοπεριοδίας, καθώς επηρεάζονται σημαντικά από το μέγεθος κατά τη γέννηση [90] τη διατροφή, το κλίμα, το άγχος και τις συνθήκες διαβίωσης [91],[92]. Ωστόσο, είναι ευρεως γνωστό ότι κατά την εφηβεία υπάρχει η εμφάνιση ρυθμικότητας στην έκκριση γοναδοτροπίνης καθώς και στην έκκριση στεροειδών σε αγόρια και κορίτσια [93]. Τα υψηλότερα επίπεδα ορμονών παρατηρούνται κατά τη διάρκεια της νύχτας, αλλά αυτή η ρυθμικότητα εξαφανίζεται στην ενήλικη ζωή.

III. Κιρκάδια γονίδια και ενήλικη αναπαραγωγική λειτουργία

1. Στα Αρσενικά

Οι εποχιακοί ρυθμοί της αναπαραγωγικής λειτουργίας είναι πολύ ισχυροί σε αρσενικά πολλών διαφορετικών ειδών, ειδικά στους επίμυες [81] και τα πρόβατα [94]. Τα κριάρια για παράδειγμα είναι σε θέση να αποκωδικοποιούν τις καθημερινές αλλαγές του φωτός καθ' όλη τη διάρκεια του έτους και να μετατρέπουν αυτή την πληροφορία σε ορμονικά σήματα που μειώνουν και έπειτα επάγουν ξανά τη γοναδική λειτουργία και λίμπιντο. Κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου όμως υπάρχουν ελάχιστα στοιχεία που να αποδεικνύουν την οποιαδήποτε κιρκάδια ρυθμικότητα στην έκκριση των ορμονών, με εξαίρεση την προλακτίνη και την μελατονίνη [95].

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει την έκφραση των clock γονιδίων σε όρχεις πειραματόζωων, με αξιοσημείωτο συμπέρασμα πως οι όρχεις φαίνονται να είναι ο μοναδικός ιστός που έχει μελετηθεί έως σήμερα και δεν παρουσιάζει καμία ρυθμικότητα. Ο Morse και συν. εξέτασαν τη γονιδιακή έκφραση των clock γονιδίων στους όρχεις επίμυων με την παραδοχή ότι όλα τα αναπτυξιακά γεγονότα που συμβαίνουν στα σπερμογόνα, τα σπερματοζωάρια και τις σπερματίδες φαίνονται να είναι συντονισμένα.

Έγινε η υπόθεση, επομένως, πως κάποιο βιολογικό ρολόι συντονίζει τις αναπτυξιακές αποφάσεις όλων αυτών των διαφορετικών κυτταρικών τύπων. Παρατηρήθηκε έκφραση του *per1* γονιδίου χωρίς προφανή μεταβολή αυτής της έκφρασης σε ένα 24ωρο και δεδομένου του ρόλου του γονιδίου *bmal1* στην έκφραση του *per1*, δεν προκάλεσε έκπληξη το γεγονός πως ούτε εκείνο παρουσίασε κάποια ρυθμική έκφραση στους όρχεις. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, επομένως, μπορεί να μην παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης στα κερκάδια γονίδια, όμως περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε πως η έκφραση της PER1 πρωτεΐνης ποικίλει ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο του σπέρματος, υποδηλώνοντας πως η γονιδιακή έκφραση είναι αναπτυξιακά εξαρτώμενη.

Η έκφραση του *per1* γονιδίου στους όρχεις διατηρήθηκε ακόμη και σε επίμυες με μετάλλαξη, αποδεικνύοντας πως υπάρχει εναλλακτικό ρυθμιστικό μονοπάτι στον ορχικό ιστό για την έκφραση του *per1* γονιδίου σε σύγκριση με τους υπόλοιπους περιφερειακούς ιστούς. Αυτά τα αποτελέσματα στη συνέχεια επιβεβαιώθηκαν και τα *per2*, *cry1* και *hpas2* προστέθηκαν στη λίστα των clock γονιδίων που εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο σπέρμα και στα κύτταρα Leydig χωρίς ρυθμικότητα [96], [97].

Η έκφραση των γονιδίων clock έχει επίσης μελετηθεί σε τρωκτικά όπου η *per1* μεταγραφά κορυφώνεται αργά τη νύχτα [98]. Αντιθέτως, η έκφραση του *bmal1* γονιδίου σε μακράς διάρκειας φωτοπεριόδους δεν ήταν ξεκάθαρη, ενώ παράλληλα η έκφραση των *per2* και *clock* γονιδίων εμφάνιζε σημαντική διακύμανση κατά τη διάρκεια της ημέρας. Αναφέρθηκε, επίσης, σε αυτά τα είδη ότι η μακρά έκθεση σε συνεχές σκοτάδι με σκοπό τη γοναδική αναστολή, τελικά μετέβαλε το πρωτόκολλο έκφρασης των γονιδίων clock στους όρχεις. Υπό αυτές τις συνθήκες, η έκφραση των *per1* μετάγραφων έγινε αρρυθμική, ενώ η *bmal1* έκφραση απόλυτα ρυθμική. Έτσι, παρότι υπάρχει εποχική μεταβολή στην αναπαραγωγή των αρσενικών σε πολλά είδη, αν το κερκάδιο ρολόι είναι υπεύθυνο για αυτές τις αλλαγές στο επίπεδο των γονάδων, τότε θα πρέπει να περιλαμβάνει έναν διαφορετικό μηχανισμό.

2. Στα Θηλυκά

Οι κirkάδιοι ρυθμοί είναι γνωστό ότι έχουν ένα κρίσιμο ρόλο στον κύκλο οίστρου των εργαστηριακών τρωκτικών. Στους αρουραίους και τα ποντίκια η αύξηση της LH ξεκινάει αργά το απόγευμα στο στάδιο του προ-οίστρου (pro-estrus), με επακόλουθη ωορρηξία και ζευγάρωμα που συμβαίνουν περίπου 6 ώρες μετά κατά τη διάρκεια της σκοτεινής περιόδου.

Πιο συγκεκριμένα, κατά τη διάρκεια της ωοθυλακικής φάσης του ωοθηκικού κύκλου, η οιστραδιόλη σταδιακά αυξάνεται σε περιβάλλον αυξημένης παλλόμενης LH. Καθώς το κυρίαρχο θυλάκιο συνεχίζει να αναπτύσσεται, υπάρχει μια μετάβαση από τη σχετική αναστολή της έκκρισης GnRH σε μια θετική συντονισμένη διέγερση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση της LH από την υπόφυση και την επακόλουθη ωορρηξία ώριμων ωοκυττάρων. Σε ποντικούς και αρουραίους, η αύξηση της LH αρχίζει περίπου στις 16 ώρες, με την ωορρηξία να συμβαίνει τα μεσάνυχτα.

Ο ρόλος του kirkάδιου συστήματος σε αυτό το γεγονός επιδείχθηκε για πρώτη φορά με τη χορήγηση φαινοβαρβιτάλης το απόγευμα του προ-οίστρου τόσο σε χάμστερ όσο και σε αρουραίους. Η αναμενόμενη αύξηση του κύματος της LH και η ωορρηξία παρεμποδίστηκαν, αλλά καθυστέρησαν μόνο κατά 24 ώρες, καθώς το επόμενο απόγευμα υπήρξε φυσιολογικό κύμα LH σε ζώα που έλαβαν το φάρμακο [99].

Οι βλάβες στον SCN έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια ανταπόκρισης στο αυξανόμενο επίπεδα οιστρογόνου και ως εκ τούτου προκαλείται παύση της ωορρηξίας στους αρουραίους [100]. Είναι γνωστό ότι το SCN προεκβάλλει σε GnRH-θετικούς νευρώνες στον υποθάλαμο και η περιοχή εκφράζει επίσης υποδοχείς οιστρογόνων [101],[102],[103], παρέχοντας μια πιθανή οδό στεροειδών ικανή να επηρεάσει το χρονισμό της ωορρηξίας.

Επιπλέον σε πειράματα όπου πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση κυττάρων GT1-7 (Immortalised GnRH neuronal cells) με Clock^{D19} ώστε να υπάρξει υπερέκφραση μιας μεταλλαγμένης μορφής πρωτεΐνης CLOCK με ελαττωματική μεταγραφική δραστηριότητα, είχε ως αποτέλεσμα να μειωθεί σημαντικά η συχνότητα των παλμών GnRH, ενώ η υπερέκφραση του cry1 αύξησε το εύρος παλμού GnRH χωρίς να μεταβάλλει τη συχνότητα [104].

Αυτά τα αποτελέσματα παρέχουν αναμφισβήτητες αποδείξεις ότι το SCN καθώς και τα συστήματα ενδογενών ρυθμών σε άλλα μέρη του υποθαλάμου είναι κρίσιμης σημασίας για το χρονισμό του κύματος LH στα τρωκτικά.

IV. Έκφραση κερκάδιων γονιδίων σε ιστούς

1. Έκφραση κερκάδιων γονιδίων στη μήτρα

Οι αποδείξεις για τη λειτουργία του κερκάδιου ρολογιού στη μήτρα είναι περιορισμένες, παρόλα αυτά οι μέχρι τώρα αποδείξεις υποστηρίζουν τη συμβολή του στη διαδικασία της εμφύτευσης, την ανάπτυξη του εμβρύου και τον ενδεχόμενο τοκετό [106],[107],[108]. Ο Johnson και οι συνεργάτες του ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν την έκφραση κερκάδιων γονιδίων στη μήτρα [105]. Η ρυθμικότητα στην έκφραση των κερκάδιων γονιδίων στην μήτρα φαίνεται να επηρεάζεται από τον αναπαραγωγικό κύκλο και από την διέγερση με ωοθηκικά στεροειδή.

Αρχικά, μπορούσαμε μόνο να υποθέσουμε έμμεσα πως επιδρά η ρυθμικότητα της μήτρας στην ανάπτυξη εμβρύων, καθώς δεν υπήρχαν άμεσες μελέτες. Τη στιγμή της εμφύτευσης, υπάρχουν αλλαγές στην παραγωγή HIF και VEGF, αυξημένη αγγειογένεση, μείωση της έκφρασης των αντι-προσκολλητικών πρωτεϊνών (MUC1 και MUC4) και αυξημένη έκφραση των πρωτεϊνών προσκόλλησης. Η έκφραση αυτών των γονιδίων επηρεάζεται από μεταβολές των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και του οξυγόνου μεταξύ άλλων, αρκετά από αυτά τα γονίδια και πρωτεΐνες είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρούν με παράγοντες μεταγραφής κερκάδιων γονιδίων. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη BMAL1 μπορεί να σχηματίσει διμερές σύμπλοκο με τον παράγοντα HIF1a in vitro το οποίο με τη σειρά του δυνητικά δεσμεύεται στο εκκινητή γονιδίων στοιχείων απόκρισης υποξίας και οδηγούν τη μεταγραφή των γονιδίων στόχων [106].

Περαιτέρω, έρευνες δείχνουν ότι η αποσιώπηση του κερκάδιου γονιδίου *bmal1* διακόπτει την εμφύτευση, αλλάζει το επίπεδο της σύνθεσης στεροειδών ορμονών και επηρεάζει αρνητικά τη γονιμότητα [107]. Περαιτέρω, η στοχευμένη εξάλειψη της έκφρασης γονιδίου *bmal1* στο μυομήτριο εμποδίζει την φυσιολογική εμφύτευση του εμβρύου [108].

Τέλος, πρόσφατα αναφέρθηκε ότι η έκφραση των κερκάδιων γονιδίων στα ESCs (endometrial stromal cells) εξασθενούσε κατά την διάρκεια της διαδικασίας γνωστής ως ακινητοποίηση (decidualization). Σε αντίθεση με τα δεδομένα από τις ωοθήκες, τους όρχεις και τον θύμο αδένιο όπου η μοριακή κερκάδια λειτουργία συνδέεται με την κυτταρική διαφοροποίηση και την ωρίμανση, αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η αποσιώπηση του κερκάδιου ρολογιού στα στρωματικά κύτταρα της μήτρας μπορεί να συμβάλει στην κυτταρική διαφοροποίηση και ωρίμανση [109].

2. Έκφραση κερκάδιων γονιδίων στην σάλπιγγα

Όπως ακριβώς με την περίπτωση της μήτρας, η αρχική έρευνα για την κερκάδια λειτουργία στην σάλπιγγα έγινε από τον Johnson και τους συνεργάτες του περίπου πριν μια δεκαετία. Τα επόμενα δέκα χρόνια ακολούθησαν ελάχιστες έρευνες οι οποίες βοήθησαν στην περεταίρω κατανόηση της κερκάδιας λειτουργίας στο συγκεκριμένο ιστό.

Για την ακρίβεια, μόνο μια επιπρόσθετη έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τον Kennaway και τους συνεργάτες του εξέτασε την κερκάδια λειτουργία στην σάλπιγγα. Αυτοί οι συγγραφείς περιέγραψαν ρυθμικότητα σε πολλά κερκάδια γονίδια συμπεριλαμβανομένου των *per2*, *bmal1*, *dbp*, αναστολέα ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1) και *rev-erb* στο ωάριο, υποστηρίζοντας την ιδέα ότι το έμβρυο εκτίθεται σε ρυθμικές περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διέλευση προς την μήτρα [110]. Επιπλέον, οι συγγραφείς προτείνουν ότι η ρυθμική εκκριτική δραστηριότητα των επιθηλιακών κυττάρων μπορεί να είναι κρίσιμη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη.

3. Έκφραση κερκάδιων γονιδίων στην ωοθήκη

Υπάρχουν ελάχιστες δημοσιευμένες μελέτες για την έκφραση του γονιδίου *clock* ή την πιθανή ρυθμικότητα άλλων γονιδίων στην ωοθήκη. Ωστόσο, ένα από τα γονίδια που εμπλέκεται σε ένα σύστημα ανάδρασης, βοηθώντας την κυτταρική ρύθμιση, είναι το *dec1* που εκφράζεται στην ωοθήκη αρουραίων και επάγεται προσωρινά από το eCG and HCG στα κύτταρα της θήκης και στα κοκκώδη.

Στην ωοθήκη, το *dec1* έχει το ρόλο καταστολέα και είτε άμεσα είτε έμμεσα επηρεάζει την έκφραση διάφορων άλλων γονιδίων στην ωοθήκη. Για παράδειγμα, επηρεάζει την έκφραση του γονιδίου του υποδοχέα της FSH καθώς επίσης και του γονιδίου της PTGS2 (prostaglandin endoperoxidase synthase 2). Επιπροσθέτως, έχει παρατηρηθεί ότι επηρεάζει με έναν γοναδοτροπino-εξαρτώμενο τρόπο και άλλα E-BOX εξαρτώμενα γονίδια.

Δεδομένου του κερκάδιου ρυθμού έκφρασης του *dec1* γονιδίου, είναι αρκετά πιθανή η εικασία ότι πιθανόν υπάρχει κερκάδια ρύθμιση σε κυτταρικές λειτουργίες τόσο σε επίπεδο ωοθηκών, όσο και σε επίπεδο υποθαλάμου κατά τη διάρκεια της ωορρηξίας [111].

4. Έκφραση κικκάδιων γονιδίων σε ωκύτταρα και σε έμβρυα

Καθώς έμβρυο αναπτύσσεται, χρειάζεται έως και 4 ημέρες για να εισέλθει στη μήτρα και να εμφυτευτεί, με την επίδραση του κικκάδιου μηχανισμού κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου να παραμένει ελάχιστα κατανοητή. Έχει καταγραφεί, ωστόσο, μητρική έκφραση των clock γονιδίων έως και το στάδιο των δύο κυττάρων στα ποντίκια [112], ενώ οι ημιποσοτικές μετρήσεις της έκφρασης των clock γονιδίων στα έμβρυα δείχνουν πτώση έπειτα, μέχρι τη φάση της συμπύκνωσης (compaction) [113].

Δεν έχει αξιολογηθεί την έκφραση των clock γονιδίων σε 24ωρη διάρκεια και δεν είναι ξεκάθαρο εάν η έκφρασή τους διατηρείται σε επαναλαμβανόμενα χαμηλά επίπεδα ή αν παρουσιάζουν κάποια ρυθμικότητα. Εντούτοις, είναι πιθανό το αναπτυσσόμενο έμβρυο να εκτίθεται σε ρυθμικά σήματα μητρικής προέλευσης κατά την όδευση του προς τη μήτρα, αν και μελέτη του 2003 κατέδειξε πως στον ωαγωγό ποντικίου εκφράζονται γονίδια clock σε μια βάση 24ώρου [110]. Είναι ζωτικής σημασίας να αποκαλυφθούν και να αξιολογηθούν τα σήματα που επιδρούν και συντονίζουν τη ρυθμικότητα της έκφρασης των γονιδίων στα έμβρυα, γιατί κατά την ανάπτυξη ενός εμβρύου *in vitro* δεν υπάρχουν ρυθμικές αλλαγές στο περιβάλλον του, που ίσως τελικά να είναι απαραίτητες.

Δ. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΚΙΡΚΑΔΙΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ

Τα τελευταία χρόνια, αρκετές μελέτες, κατά πλειοψηφία σε πειραματόζωα, έχουν δείξει ότι μεταλλάξεις στα clock genes μπορούν να οδηγήσουν σε διαταραχή ή απώλεια του κιρκάδιου ρυθμού και στην εμφάνιση σπανίων συνδρόμων πρώιμης ή καθυστερημένης έναρξης ύπνου (ASPS και DSPS) [114].

Μέχρι σήμερα, μόνο δύο μεταλλάξεις έχουν προσδιοριστεί στους ανθρώπους. Η πρώτη είναι ένας πολυμορφισμός μήκους στο κιρκάδιο γονίδιο Per3, η οποία συσχετίστηκε με το σύνδρομο DSPS. Η δεύτερη μετάλλαξη που αναγνωρίστηκε, είναι στο κιρκάδιο γονίδιο Per2, η οποία συσχετίστηκε με το σύνδρομο ASPS [115],[116]. Για παράδειγμα, σε μία οικογένεια με μετάλλαξη στο γονίδιο per2 που εμποδίζει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης PER2, όλα τα μέλη πάσχουν από ύπνο προχωρημένης φάσης (ASPS). Με την ελάττωση της φωσφορυλίωσης της PER2 και με την επέκταση της ημίσιας ζωής της, ο ενδογενής κυτταρικός ρυθμός επιταχύνεται, με αποτέλεσμα την πρώιμη έναρξη του ύπνου 4 ώρες νωρίτερα [117]. Παρόλο που και τα δύο σύνδρομα έχουν προσδιοριστεί σε πολύ μικρό αριθμό ανθρώπων. Ωστόσο, πιστεύουμε ότι υπάρχουν μη διαγνωσμένοι ασθενείς με διαταραχές του κιρκάδιου ρυθμού, οι οποίοι πρέπει να χαρακτηριστούν και να μελετηθούν.

Εκτός όμως από την διερεύνηση των Per γονιδίων για την συσχέτιση τους με το σύνδρομο ASPS και DSPS, πολυμορφισμοί του period γονιδίου έχουν διερευνηθεί σε ιστό μαστού για την εύρεση πιθανής σύνδεσής τους με την εμφάνιση καρκίνου του μαστού [116]. Το συμπέρασμα ήταν ότι μία ή και περισσότερες PER πρωτεΐνες εκφράζονταν διαφορετικά σε καρκινικά κύτταρα σε σύγκριση με τον υγιή ιστό στο 96% των ασθενών που μελετήθηκαν. Παρότι εντοπίστηκε μια πληθώρα πολυμορφισμών στα γονίδια per μέσα από αυτή τη μελέτη, φάνηκε τελικά πως η κατάσταση μεθυλίωσης των εκκινητών είχε τη μεγαλύτερη επίδραση στην έκφραση της πρωτεΐνης PER στα κύτταρα του μαστού [119].

Επιπρόσθετα, μια μελέτη που διεξάχθηκε το 2005, έδειξε ότι ποντίκια μεταλλαγμένα στο γονίδιο clock γίνονται παχύσαρκα ως αποτέλεσμα της υπερφαγίας και στη συνέχεια, αυτό οδηγεί σε μεταβολικό σύνδρομο που χαρακτηρίζεται από υπερλεπτιναιμία, υπερλιπιδαιμία, ηπατική στεάτωση, υπεργλυκαιμία και αντίσταση στην ινσουλίνη [114].

Πολυμορφισμοί στο ανθρώπινο clock γονίδιο (πιο συγκεκριμένα στο T3111C αλληλόμορφο) έχουν παρατηρηθεί και καταγραφεί, η ακριβής σημασία αυτών όμως βρίσκεται υπό συζήτηση. Κάποια δεδομένα συνδέουν τους πολυμορφισμούς στο clock με DSPS (10-44

λεπτά καθυστέρησης κάθε μέρα), ιδιαίτερα σε άτομα που πάσχουν από κατάθλιψη και αϋπνία [120], [121]. Κάποιες μελέτες υποστήριξαν πως ο T3111C πολυμορφισμός σχετίζεται με το σύνδρομο DSPS [123], ενώ άλλες απέτυχαν να εντοπίσουν ανάλογη συσχέτιση [122].

Τέλος, μια μετάλλαξη στο γονίδιο της κινάσης της καζεΐνης 13 έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της σερίνης από το ένζυμο. Η φωσφορυλίωση της σερίνης του ενζύμου φυσιολογικά έχει την ικανότητα να ελαττώνει τη δραστηριότητα του ενζύμου, επομένως η μετάλλαξη σε αυτό το γονίδιο αύξησε την ενεργότητα του ενζύμου *in vitro* 1.8 φορές [124]. Άτομα που φέρουν αυτόν το πολυμορφισμό έχουν λιγότερες πιθανότητες να πάσχουν από σύνδρομο καθυστερημένης φάσης ύπνου (DSPS) σε σύγκριση με τον υπόλοιπο πληθυσμό [125].

Οι διαταραχές στον κιρκάδιο ρυθμό δεν οφείλονται μόνο σε γονιδιακές μεταλλάξεις. Σε ανθρώπους που εργάζονται ασυνήθιστες ώρες (πχ νυχτερινές) έχει παρατηρηθεί τροποποίηση του υπερχιασματικού πυρήνα και του κιρκάδιου ρυθμού των περιφερικών ιστών.

Είναι προφανές πως μια σειρά φυσιολογικών συστημάτων επηρεάζονται, συμπεριλαμβανομένου πιθανώς και του αναπαραγωγικού. Γυναίκες που εργάζονται σε αεροπορικές εταιρείες με δυσκολία στην προσαρμογή του κιρκάδιου ρυθμού στην ρουτίνα της ζωής τους [126], έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά αυτόματων αποβολών, ασταθείς κύκλους έμμηνου ρύσεως, μικρό βάρος νεογνών και πρόωρους τοκετούς [127],[128].

Σε άλλες μελέτες, βέβαια, έχει καταδειχτεί πως διαταραγμένοι κιρκάδιοι ρυθμοί μπορούν να έχουν σοβαρές συνέπειες στη γονιμότητα μίας γυναίκας μόνο εφόσον οι διαταραχές αυτές είναι πολύ ισχυρές και με μεγάλη συχνότητα [129],[130].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

A. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των κερκάδιων γονιδίων clock και bmal1 στα πεντε προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου ποντικού, από το στάδιο των 2-κυττέρων έως του σταδίου της βλαστοκύστης. Τα έμβρυα θα καλλιεργηθούν in vitro σε συνθήκες που προσομοιάζουν της συνθήκες μέσα στη μήτρα του ποντικού από το αναπτυξιακό στάδιο των 2 πολικών σωμάτων έως το στάδιο της βλαστοκύστης. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε και έλεγχος της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων σε προκοιλωτικά ωοθυλάκια τα οποία είχαν καλλιεργηθεί in vitro παρουσία CRH.

Για τη μελέτη του προτύπου έκφρασης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο προκειμένου να ανιχνεύσουμε τη ποσοτική έκφραση των γονιδίων που θέλουμε να μελετήσουμε σε κάθε ένα από τα πέντε αναπτυξιακά στάδια του προ-εμβρύου ποντικού καθώς και στα προκοιλωτικά ωοθυλάκια.

B. ΜΕΘΟΔΟΙ- ΥΛΙΚΑ

Οι τεχνικές- μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι εξής:

I. Απομόνωση RNA

Το RNA αποτελεί πρώτη ύλη σε μια σειρά βασικών πειραμάτων όπως ανάλυση Northern, κατασκευή cDNA βιβλιοθήκης, in vitro μετάφραση, RT-PCR κλπ.. Για όλα τα παραπάνω πειράματα απαιτείται RNA υψηλής ποιότητας. Καθώς όμως το RNA είναι από τη φύση του ευαίσθητο μόριο η απομόνωσή του πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι απομόνωσης του RNA. Ανεξάρτητα πάντως από τη μέθοδο που χρησιμοποιεί κανείς, πριν προχωρήσει στην απομόνωση θα πρέπει να έχει αποφασίσει τι είδους RNA χρειάζεται.

Το RNA βρίσκεται πάν τα συνδεδεμένο με πρωτεΐνες στο κύτταρο, από τις οποίες πρέπει να απαλλαγεί προκειμένου να απομονωθεί σε καθαρή μορφή. Η απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το RNA μπορεί να επιτευχθεί με απορρυπαντικά τα οποία αποδιατάσσουν τις πρωτεΐνες (αναστέλλοντας συγχρόνως και τη δράση των νουκλεασών). Συνήθως χρησιμοποιείται SDS (Sodium Dodecyl Sulphate). Παρουσία SDS διασπώνται οι μη ομοιοπολικοί δεσμοί που συγκρατούν τα σύμπλοκα νουκλεϊκού οξέος-πρωτεΐνης και στη

συνέχεια οι πρωτεΐνες μπορούν να αφαιρεθούν με τη μέθοδο της κλασμάτωσης με επίδραση φαινόλης: Η φαινόλη διαλύεται ελάχιστα στο νερό και επομένως η ανάμειξη φαινόλης με ένα υδατικό διάλυμα δημιουργεί δύο φάσεις, την υδατική στο πάνω μέρος και τη φαινολική στο κάτω, λόγω διαφοράς ειδικής πυκνότητας. Η φαινόλη αλληλεπιδρά με τις υδρόφοβες περιοχές των πρωτεϊνών, ενώ ταυτόχρονα τις αποδιατάσσει, και έτσι οι πρωτεΐνες γίνονται διαλυτές στη φαινόλη. Αντίθετα, το RNA έχει πολύ λιγότερες υδρόφοβες ομάδες, οπότε παραμένουν στην υδατική φάση.

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι ευαίσθητα σε μεταβολές του pH και στις κυτταρικές νουκλεάσες. Είναι λοιπόν σημαντικό κατά την απομόνωση του RNA, να χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα που θα εξασφαλίζουν το βέλτιστο pH και αντιδραστήρια που καταστέλλουν τη δράση των κυτταρικών νουκλεασών, όπως οι χηλικοί παράγοντες (κυτρικό ιόν και EDTA).

Η φύση των μοριακών δεσμών και η ποσότητα των νουκλεασών ποικίλλουν στους διάφορους οργανισμούς και από ιστό σε ιστό. Έτσι, δεν υπάρχει μια γενική μέθοδος για την απομόνωση και τον καθαρισμό των νουκλεϊκών οξέων. Για κάθε είδος ιστού εφαρμόζονται ειδικές τεχνικές που βασίζονται στην μοριακή κατασκευή των κυττάρων.

Για την απομόνωση του RNA από τα έμβρυα χρησιμοποιείται το ειδικό RNesay 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.

II. Δημιουργία συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA)

Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών.

Η αντίστροφη μεταγραφάση επέτρεψε τη μετατροπή των ευαίσθητων μορίων RNA σε σταθερά, συμπληρωματικά μόρια DNA, τα οποία μπορούν να υποστούν χειρισμούς και να μελετηθούν όπως τα υπόλοιπα μόρια DNA (PCR, κλωνοποίηση, αλληλούχηση κ.λπ.). Επίσης,

έδωσε νέες δυνατότητες στη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης, ενώνοντας την αντίστροφη μεταγραφά με την κλασική ή την ποσοτική PCR.

Η αντίδραση σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA (First strand cDNA synthesis) πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεταγραφάσες είναι η μεταγραφάση του ιού μυελοβλαστώματος των πτηνών, Avian Myeloblastosis Virus transcriptase (AMV), και η μεταγραφάση του ιού Moloney της λευχαιμίας των ποντικών, Moloney Murine Leukemia Virus transcriptase (M-MLV)). Για τη σύνθεση cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών:

Oligo-dT: Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-A ουρά των mRNAs. Με τη χρήση τους μπορούν να συντεθούν ακέραια (ολόκληρα) τα μόρια mRNA, η χρήση τους όμως δεν συνιστάται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA, >4 Kb ή όταν τα μόρια του RNA στόχου δεν έχουν πολυ-A ουρά (RNA προκαρυωτικών οργανισμών).

Μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών: Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς και σε όλο το μήκος τους). Στην πράξη χρησιμοποιείται συνήθως ένα μίγμα oligo-dT και εξανουκλεοτιδικών εκκινητών.

Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο: Όταν το ζητούμενο είναι η αυξημένη ευαισθησία και ο έλεγχος ενός μόνο ή μικρού αριθμού γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές ειδικοί για τα επιθυμητά γονίδια. Στην πράξη, αυτή η μέθοδος δεν έχει ευρεία εφαρμογή, γιατί απαιτείται προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης για κάθε ξεχωριστό εκκινητή.

Η σύνθεση cDNA εκτελείται τυπικά στους 45-55° C, ανάλογα με το ένζυμο που χρησιμοποιείται, για χρονικό διάστημα από 15 min έως 1 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA. Στη συνέχεια, με θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία (85° C) καταστρέφονται η αντίστροφη μεταγραφάση και η αλυσίδα του RNA. Το νεοσυντεθέν cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από τη θυμίνη.

Στην παρούσα διπλωματική μελέτη χρησιμοποιήθηκε το kit και το πρωτόκολλο Superscript II First Strand Synthesis System for RT-PCR, της εταιρίας Invitrogen, κατάλληλο για μικρές

συγκεντρώσεις RNA, όπως και το kit απομόνωσης στο προηγούμενο στάδιο. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA έγινε με την προσθήκη τυχαίων εξανουκλεοτιδικών για να δράσουν ως εκκινητές στην αλληλουχία των γονιδίων Clock και Bmal μια μέθοδος λιγότερο ειδική αλλά απαραίτητη εξαιτίας του μικρού αριθμού δειγμάτων.

Για την αποτελεσματική δημιουργία συμπληρωματικού DNA, εκτός από την χρήση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης το ποίο είναι υπεύθυνο για την σύνθεση του cDNA, είναι απαραίτητη η χρήση των ακόλουθων συμπαραγόντων:

RT- Buffer: Ρυθμιστικό διάλυμα

Mg-Cl₂: Συμπάροντας του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης το οποίο είναι σημαντικό για τη διατήρηση της ιοντικής ισορροπίας του διαλύματος.

DTT: Υπεύθυνο για την καταστροφή δισουλφιδικών δεσμών, αποδυναμώνει την δευτεροταγή δομή του RNA

RNase Out: Πρωτεϊνικής φύσης προστατευτικός παράγοντας για το mRNA

III. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR)

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος ενίσχυσης συγκεκριμένων τμημάτων γενετικού υλικού in vitro. Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης PCR το επιθυμητό τμήμα γενετικού υλικού πολλαπλασιάζεται μέχρι και ένα τρισεκατομμύριο φορές, γεγονός που είναι απαραίτητο για μετέπειτα χειρισμούς, όπως η ηλεκτροφόρηση, η πέψη με ένζυμα περιορισμού, η ανάγνωση της αλληλουχίας βάσεων.

Η ποσοτική PCR έχει εξελιχθεί πολύ από το 1993 μέχρι σήμερα και πλέον αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης μορίων DNA και cDNA. Εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Σήμερα είναι δυνατή η ταυτόχρονη χρήση μέχρι και 21 διαφορετικών χρωστικών σε μια αντίδραση PCR.

Η βασική διαφορά ανάμεσα στην ποσοτική και την κλασική PCR είναι η φάση της αντίδρασης κατά την οποία συλλέγονται τα δεδομένα και εξάγονται τα αποτελέσματα. Ο ορισμός της Real-Time PCR προκύπτει από το γεγονός πως σε κάθε κύκλο ο φθορισμός που εκπέμπεται αποτυπώνεται σε μια καμπύλη ενίσχυσης, δίνοντας τη δυνατότητα της συνεχούς παρακολούθησης κατά την πορεία της αντίδρασης σε κάθε κύκλο.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: αρχική/λανθάνουσα, την εκθετική και τη φάση κορεσμού. Η αρχική/λανθάνουσα φάση ή background φάση διαρκεί μέχρι τη στιγμή όπου το σήμα φθορισμού από το προϊόν της PCR ξεπερνάει το σήμα φθορισμού του μη-ειδικού σήματος. Η εκθετική φάση ξεκινάει όταν το σήμα φθορισμού του προϊόντος είναι έντονο εξαιτίας της συσσωρευμένης ποσότητας προϊόντος και μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από το background. Ακολουθεί η φάση κορεσμού, όπου η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης μειώνεται αισθητά. (LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual Software Version 1.5, 2008)

Στην Real-Time PCR τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή C_p , που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR ξεπερνά το βασικό επίπεδο (baseline). Το C_p αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει έναν συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής. Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο ότι όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA ή cDNA στο αρχικό δείγμα τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ικανός αριθμός προϊόντων ώστε ο φθορισμός του δείγματος να ξεπεράσει το επίπεδο ανίχνευσης. Επομένως δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο C_p από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα. Επίσης είναι καλό να σημειωθεί ότι η παραγωγή του προϊόντος της PCR έχει γραμμική συσχέτιση με τον παραγόμενο φθορισμό. (τεχνικές pdf)

Η Real-Time PCR πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος Light Cycler 480 Real-Time PCR Instrument, της εταιρίας Roche.

IV. Αναλώσιμα Υλικά – Όργανα μέτρησης

Αναλώσιμα Υλικά – Όργανα Μέτρησης	
Γοναδοτροπίνες	1. PMSG, Sigma Chemical Co 2. hCG Sigma Chemical Co
Θρεπτικά υλικά	1. Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine, Gibco 2. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco 3. BSA

Αντιδραστήρια	1. RT- Buffer 2. Mg-Cl₂ 3. DTT 4. RNase Out 5. Superscript II Reverse Transcriptase
Πρόσθετα υλικά	1. Χειρουργικά εργαλεία 2. Πιπέτες 3. Τρυβλία Petri (35mm και 60mm) 4. Σύριγγες (1ml) & Βελόνες (0,40* 12,7mm) 5. Tubes & Falcons
Όργανα μέτρησης και καλλιέργειας	1. Στερεοσκόπιο 2. PCR thermal cycler 3. Light Cycler 480 Real-Time PCR Instrument 4. Κλίβανος υγρής καλλιέργειας

Πίνακας 1: Αναλώσιμα Υλικά - Όργανα Μέτρησης

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων που είχαν ως στόχο την μελέτη της έκφρασης των κινκάρδιων γονιδίων Clock και Bmal σε έμβρυα ποντικού ακολουθήθηκε το παρακάτω πειραματικό πρωτόκολλο:

Ι. Πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας με χορήγηση γοναδοτροπινών

Για την επαγωγή ωορρηξίας, χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά σε θηλυκά ποντίκια (4-5 εβδομάδων) η ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη, FSH, 5 IU. Στο συγκεκριμένο πείραμα το εμπορικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η PMSG, Sigma Chemical Co, γοναδοτροπίνη που έχει προέλθει από ορό εγκύου φοράδας. 48 ώρες μετά την χορήγηση της FSH χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά η χοριακή γοναδοτροπίνη hCG, 5IU, ώστε να πραγματοποιηθεί η ρήξη των ωοθυλακίων. Η hCG μιμείται την ωχρινότροπο ορμόνη (LH). Το εμπορικό φάρμακο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτό το πρωτόκολλο ήταν η hCG Sigma Chemical Co. Αμέσως μετά την χορήγηση της hCG τα θηλυκά ποντίκια τοποθετούνται μεμονωμένα σε κλουβιά με ένα αρσενικό ηλικίας 9 εβδομάδων, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας, ώστε να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση. 24 ώρες μετά την χορήγηση της hCG πραγματοποιείται η απομόνωση των εμβρύων.

II. Απομόνωση και ανάπτυξη γονιμοποιημένων ωαρίων

Τα πειραματόζωα θυσιάζονταν με αυχενική μετατόπιση σε ασηπτικές συνθήκες για την απομόνωση των ωαγωγών τους. Η αφαίρεση των ωαγωγών γινόταν με γρήγορο και λεπτομερή τρόπο μετά την απομάκρυνση του λιπώδη ιστού και των αιμοφόρων αγγείων που τους περιέβαλε. Αφού αφαιρούνταν οι ωαγωγοί, τοποθετούνταν σε πιάτο καλλιέργειας petri 60x15mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) με μέσο καλλιέργειας που αποτελείται από DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) με 10% BSA (Αλβουμίνη, παράγοντας V από ορό βοοειδούς, Sigma-Aldrich) σε αναλογία 9:1. Το διάλυμα DPBS παρέχει ένα ρυθμιστικό περιβάλλον για τη διατήρηση ενός φυσιολογικού pH, αλλά και τη διατήρηση της τονικότητας και της βιωσιμότητας των κυττάρων μέσα σε μια κυτταροκαλλιέργεια, ενώ το BSA με τη σειρά του χρησιμοποιείται εξαιτίας της ιδιότητάς του να ενισχύει τη δράση του DPBS.



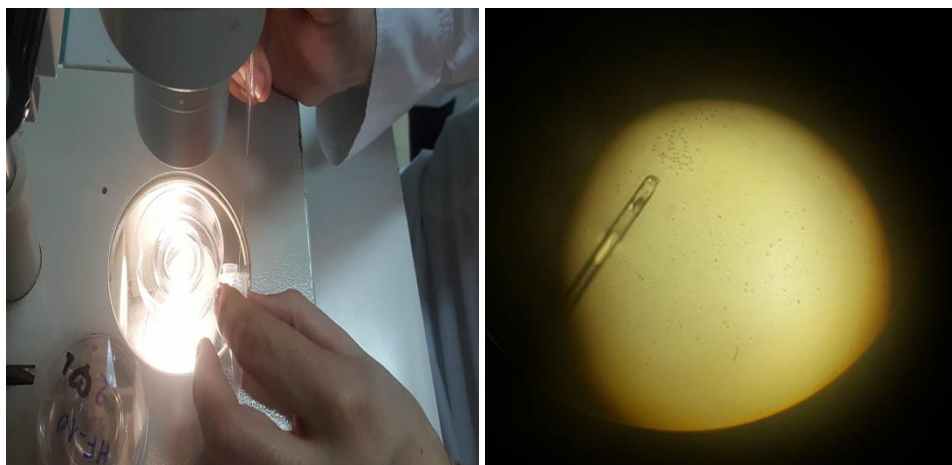
Εικόνα 14: Απομόνωση ωαγωγών από θηλυκούς επίμυες

Για την απελευθέρωση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέσα από τους ωαγωγούς χρησιμοποιείται στερεοσκόπιο, λαβίδα και υποδερμική βελόνα. Τα γονιμοποιημένα ωάρια απομονώθηκαν με τον εξής τρόπο: αρχικά γινόταν η ακινητοποίηση του ωαγωγού με λαβίδα και με την βοήθεια του στερεοσκοπίου, στην περιοχή όπου ο ωαγωγός φαινόταν πιο διογκωμένος, σχιζόταν με βελόνα. Αφού τα γονιμοποιημένα ωάρια ελευθερώνονταν

στο μέσο συλλέγονταν και κατόπιν με μια πιπέτα τοποθετούνταν σε τρυβλία Petri με διάλυμα πλύσης DBPS: BSA, 9:1.

Για την απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων από τα γονιμοποιημένα ωάρια εφαρμόζονται διαδοχικές πλύσεις. Αρχικά, τοποθετούνται στην περιφέρεια του πιάτου καλλιέργειας και έπειτα αναρροφώνται και τοποθετούνται στο κεντρικό πηγάδι καινούργιου πιάτου petri που περιέχει το διάλυμα πλύσης (DBPS: BSA, 9:1).

Η διαδικασία των πλύσεων επαναλαμβάνεται έως ότου τα γονιμοποιημένα ωάρια απαλλαχθούν πλήρως από τα κοκκώδη κύτταρα που βρίσκονται στην περιφέρεια τους. Κατόπιν τα απαλλαγμένα από κοκκώδη γονιμοποιημένα ωάρια τοποθετούνται ανά ομάδες των 10-12 εμβρύων, στο κεντρικό πηγάδι του πιάτου καλλιέργειας το οποίο περιέχει καλλιεργητικό μέσο Ham's [Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine, Gibco], ένα ειδικά σχεδιασμένο διάλυμα για την ανάπτυξη των εμβρύων, που σε αντίθεση με άλλα μέσα καλλιέργειας, το συγκεκριμένο περιέχει ψευδάργυρο, υποξανθίνη και θυμιδίνη. Εντούτοις, επειδή δεν περιέχει πρωτεΐνες ή αυξητικούς παράγοντες, συνδυάζεται με προσθήκη BSA, το οποίο είναι ένα πρωτεϊνικής φύσης διάλυμα που χρησιμοποιείται ως πηγή θρεπτικών στοιχείων κατά την καλλιέργεια των κυττάρων.

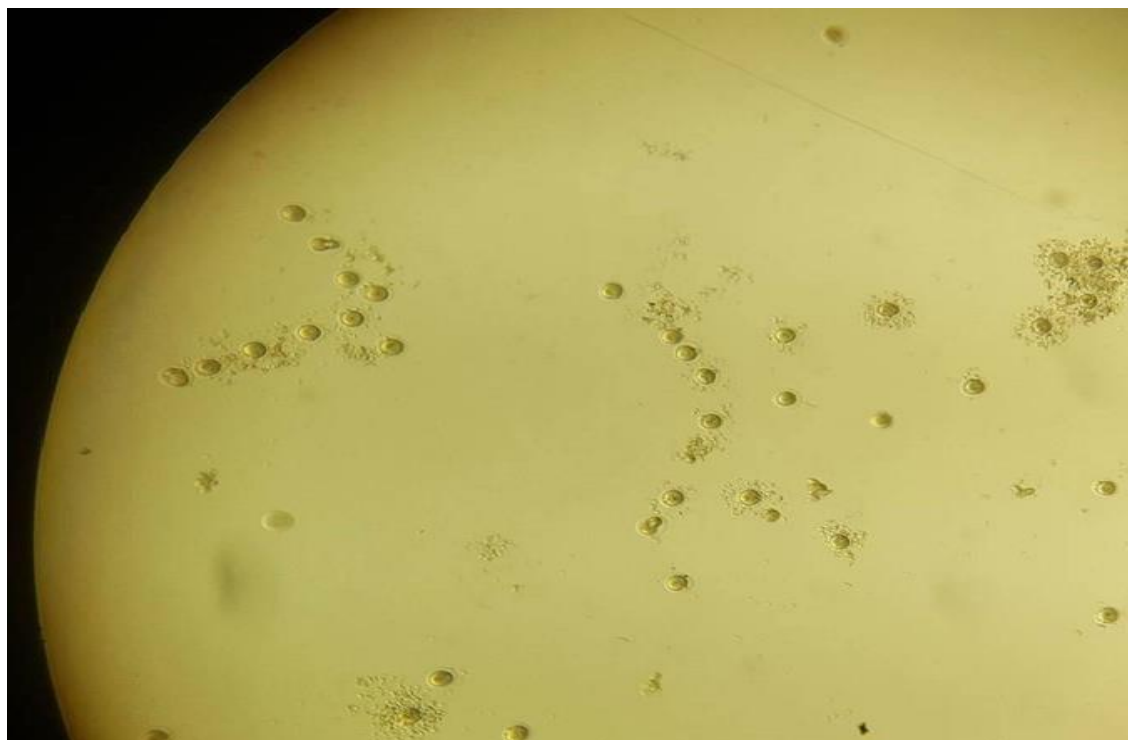


Εικόνα 15: Απομάκρυνση κοκκωδών κυττάρων με τη βοήθεια στερεοσκοπίου και γυάλινης πιπέτας αναρρόφησης

Τέλος, πραγματοποιείται η τοποθέτηση των τρυβλίων με τα γονιμοποιημένα ωάρια σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας, με συνθήκες 37°C, 5% CO₂, pH 5. Οι συγκεκριμένες συνθήκες βοηθούν το καλλιεργητικό διάλυμα HF10: BSA, 9:1 που χρησιμοποιεί το ρυθμιστικό σύστημα του διττανθρακικού νατρίου να διατηρήσει ένα σταθερό φυσιολογικό pH. (Behr et

al., 1990) Πρέπει να σημειωθεί ότι στην επανάληψη του πειράματος ως καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το IVF medium έναντι του HF-10 όμως οι συνθήκες του πειράματος παρέμειναν απολύτως ίδιες.

Για τον έλεγχο και την συλλογή των εμβρύων στο κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο πραγματοποιήθηκαν συχνοί στερεοσκοπικοί έλεγχοι στις 24, 36, 48, 72 και 96 ώρες μετά την συλλογή των γονιμοποιημένων ωαρίων. Απομονώθηκαν έμβρυα σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης. Σε κάθε έλεγχο, απομονώνονταν τα έμβρυα που έχουν επιτυχώς φτάσει στο αντίστοιχο αναπτυξιακό στάδιο. Τοποθετούνταν σε erpendorf χωρητικότητας 1,5ml, έπειτα γινόταν προσθήκη 10μl RNA later που σταθεροποιεί και προστατεύει το απομονωμένο mRNA, ακολουθεί κατάψυξη των εμβρύων στους -80oC. Η σταθεροποίηση του δείγματος αποτελεί διαδικασία απαραίτητη για την αξιόπιστη ανάλυση γονιδιακής έκφρασης. Η σταθεροποίηση του δείγματος θα πρέπει να πραγματοποιείται άμεσα κατά τη συλλογή του δείγματος για να αποφευχθούν αλλαγές στην γονιδιακή έκφραση λόγω αποδόμησης του RNA αλλά και επαγωγής της μεταγραφικής δραστηριότητας.



Εικόνα 16: Δείγμα επιτυχημένης γονιμοποίησης

III. Απομόνωση mRNA από τα έμβρυα

Για την απομόνωση του mRNA από τα έμβρυα χρησιμοποιείται το ειδικό RNesay Plus Micro kit της εταιρείας Qiagen (Valencia, CA), 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 διέθετε.

Η διαδικασία της απομόνωσης του mRNA ακολουθεί τα εξής βήματα:

Ποσότητα/Διάρκεια		Παρατηρήσεις
Προσθήκη Buffer RTL plus	75μl	Λύση κυττάρων
Προσθήκη Carrier RNA	5μl	
Vortex	1min	Ομογενοποίηση δείγματος
Μεταφορά στη στήλη gDNA Eliminator		
Φυγοκέντρηση	1min 1200rpm	
Αφαίρεση στήλης		
Αιθανόλη 70%	350μl	Κατακρήμνιση RNA
Μεταφορά στη στήλη Rneasy Mini Elute		Η στήλη διατηρείται στους 4°C και περιέχει ειδική μεμβράνη πρόσδεσης του RNA
Φυγοκέντρηση	1min 1200rpm	
Αφαίρεση εκλούματος		
Buffer RWI στη στήλη	700μl	
Φυγοκέντρηση	1min 12000rpm	
Αφαίρεση εκλούματος		
Buffer RPE	500μl	
Φυγοκέντρηση	1min 12000rpm	

Αφαίρεση εκλούματος		
Αιθανόλη 80% στη στήλη	500μl	
Φυγοκέντρηση	2min 12000rpm	
Αφαίρεση εκλούματος		
Φυγοκέντρηση	5min 14000rpm	
Μεταφορά της στήλης Rneasy Mini Elute σε καθαρό erpendorf		
Προσθήκη νερού στο κέντρο του φίλτρου	14μl	Δεν περιέχει RNAσες
Επώαση	5min	Σε θερμοκρασία δωματίου
Φυγοκέντρηση	2min 14000rpm	
Απομάκρυνση στήλης		

Πίνακας 2: Πρωτόκολλο Απομόνωσης mRNA

IV. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA (cDNA)

Αρχικά, το RNA που έχει ήδη απομονωθεί και αποθηκευτεί στους – 80oC μεταφέρεται και το τοποθετείται στο cooler για την ομαλή απόψυξή του. Ταυτόχρονα, ξεκινάει η προετοιμασία για την παρασκευή του cDNA, δίνοντας στα δείγματα το χρόνο να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου.

Σε κάθε erpendorf 0,5ml εκ των οποίων το καθένα περιέχει 4μl RNA γίνεται η προσθήκη των διαλυμάτων:

A

Διαλύματα	(μL)
dNTPs	1
random hexamers	4

Στη συνέχεια γίνεται η μεταφορά τους στον θερμοκυκλοποιητή, όπου τα δείγματα εκτίθενται:

B

Θερμοκρασία	Διάρκεια
65°C	5min
4°C	10min

Η διαδικασία αυτή εξασφαλίζει την αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του mRNA, το οποίο έπειτα μένει εκτεθειμένο σε μια γραμμική κατάσταση και υποδέχεται τους τυχαίους εκκινητές που έχουν προστεθεί στην αντίδραση

Παράλληλα, σε ένα μεγαλύτερου μεγέθους erpendorf 1,5ml γίνεται η προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων:

Γ

Διαλύματα	(μL)
RT- Buffer	2
Mg-Cl ₂	4
DTT	2
RNAse Out	1
Superscript II Reverse Transcriptase	1

Από το παραπάνω μίγμα διαλυμάτων, 10μl προστίθενται σε κάθε erpendorf των 0,5ml, και στη συνέχεια τοποθετούνται ξανά στον θερμοκυκλοποιητή για:

Δ

Θερμοκρασία	Διάρκεια
42°C	50 min
70°C	15 min

Πίνακας 3: (Α-Δ) Πρωτόκολλο δημιουργίας cDNA

Τέλος, τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.



Εικόνα 17: Θερμοκυκλοποιητής για την κατασκευή του cDNA

V. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR)

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον έλεγχο της έκφρασης κικκάδιων γονιδίων Clock και Bmal στα έμβρυα με τη χρήση του μηχανήματος Light Cyclor 480 Real-Time PCR Instrument, της εταιρίας Roche. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

Σε σωληνάρια erppendorf των 0,5ml έγινε προσθήκη:

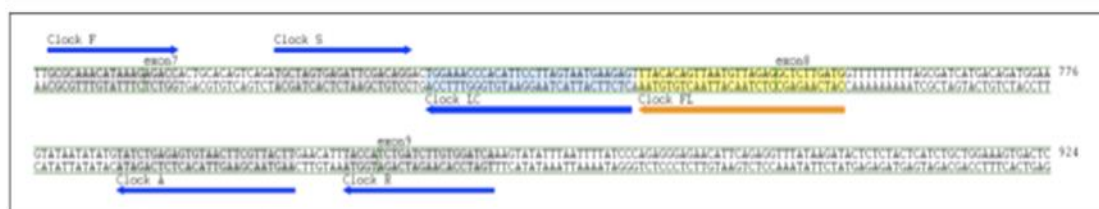
Αντιδραστηρια	Ποσότητα (μl)
Luna Universal Probe One-step Reaction Mix	10μl
Εκκινητής S	0,8μl
Εκκινητής A	0,8μl
Ανιχνευτής FL	0,4μl
Ανιχνευτής LC	0,4μl
Δείγμα cDNA	5μl
Nuclease-free Water	2,6μl

Πίνακας 4: Πειραματικό πρωτόκολλο RT-PCR

Η προσθήκη του νερού προσαρμόζεται ανάλογα, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 20μl.

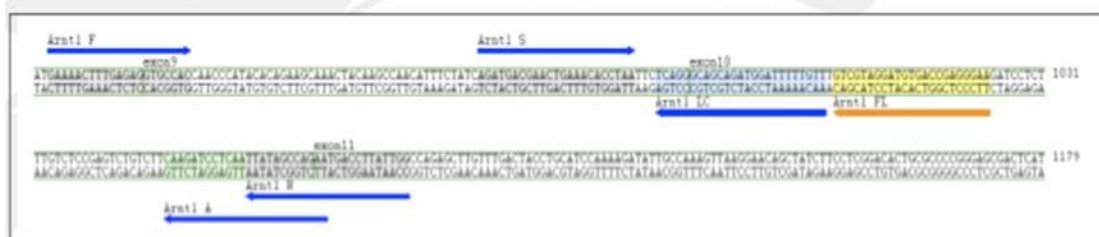
Στις διάφορες θέσεις της μικροπλακέτας τοποθετούνται δείγματα από διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο και για ένα μόνο γονίδιο τη φορά, και στη συνέχεια η μικροπλακέτα φυγοκεντρείται για 1min στις 1000rpm προτού πραγματοποιηθεί η real-time PCR.

943985	mu circadian locomoter output cycles kaput		NM_007715	Tm
Clock F	gCgCAAACATAAAgAgACC	S	631-649	52,4°C
Clock S	TgCTAgTgAgATTcGACAgg	S	664-683	52,3°C
Clock A	AAgTAACgAAgTTACACTCTCAgATA	A	814-789	51,7°C
Clock R	TgATCCACAAGATCAgATggTA	A	843-822	52,0°C
Clock FL	CATCAAgAgCCTCTAACATTAACtTgTgTAA-FL	A	746.717	59,1°C
Clock LC	640-CTCTTCATTACTAAggAATgTgggTTTCCA p	A	715-686	63,1°C



Εικόνα 18: Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου clock

943985	mu Arntl		NM_007489	Tm
Arntl F	gAAAACtTTgAgAggTgCCAC	S	886-906	55,6°C
Arntl S	AgATgACgAACTgAAACACCTAA	S	949-971	54,1°C
Arntl A	TTCTggCTATAATTgAggATCTTg	A	1074-1051	54,1°C
Arntl R	CCAATAAggTCATTCTggCTATAA	A	1086-1063	54,4°C
Arntl FL	TTCCCTCgTgTCACATCCTACgAC-FL	A	1023-1001	62,1°C
Arntl LC	640-AACAAAAATCCATCTgTgCCCTgA p	A	999-975	63,2°C



Εικόνα 19: Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου clock

VI. Μελέτη έκφρασης κερκάδων γονιδίων σε προκοιλιακά ωοθυλάκια

Μετά το πέρας της μελέτης έκφρασης των γονιδίων clock και bmal στα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια εμβρύων επίμυος, διερευνήθηκε η έκφραση των ίδιων γονιδίων σε προκοιλιακά ωοθυλάκια. Για την επίτευξη αυτού του στόχου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα προκοιλιακών ωοθυλακίων τα οποία είχαν καλλιεργηθεί in vitro κατά την εκπόνηση της διπλωματικής εργασίας της Μωραΐτη Ευτυχίας.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολούθησε η κα. Μωραΐτη Χρησιμοποιήθηκαν δύο ομάδες προκοιλιακών ωοθυλακίων 1) control group το οποίο αποτελούταν από προκοιλιακά ωοθυλάκια που καλλιεργήθηκαν in vitro σε βασικό καλλιεργητικό μέσο και 2) CRH 10^{-7} mol/liter group στο οποίο τα προκοιλιακά ωοθυλάκια καλλιεργήθηκαν στο ίδιο βασικό καλλιεργητικό μέσο το οποίο όμως είχε εμπλουτισθεί με CRH σε συγκέντρωση 10^{-7} mol/ liter

Σε κάθε κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν έξι F1 θηλυκοί μύες ηλικίας 12-14 ημερών οι οποίοι αρχικά θανατώθηκαν με τη μέθοδο της αυχενικής μετατόπισης. Ακολούθησε ασηπτική αφαίρεση των ωοθηκών με τομή στο δέρμα παράλληλα προς την κοιλιακή περιοχή με προσεκτικούς χειρισμούς ώστε να απομακρυνθεί και να αποφευχθεί τραυματισμός τα εσωτερικών οργάνων. Στη συνέχεια εντοπίστηκαν οι ωοθήκες με τη βοήθεια των ωαγωγών με προσοχή ώστε να μην τραυματιστεί το έντερο. Κατόπιν ακλούθησε η αφαίρεση των ωοθηκών και η τοποθέτησή τους σε τρυβλία καλλιέργειας petri 60x15mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) που περιείχαν 5ml μείγματος DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco):BSA (Αλβουμίνη, παράγοντας V από ορό βοοειδούς, Sigma-Aldrich) ως μέσο απομόνωσης. Ο μηχανικός τεμαχισμός των ωοθηκών με χρήση υποδερμικών βελόνων και συλλογή προκοιλιακών ωοθυλακίων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στερεοσκοπίου. Τέλος, ακολούθησε ξέπλυμα ωοθυλακίων δύο φορές σε μέσο απομόνωσης και μία σε καλλιεργητικό μέσο και η τοποθέτησή τους σε τρυβλία καλλιέργειας. Επώαση τους έγινε σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας για εννέα ημέρες, σε συνθήκες 37°C , 5%CO₂ και 95% υγρασία.

Τα ωοθυλάκια καλλιεργήθηκαν σε καλλιεργητικό μέσο α-MEM, κάθε δεύτερη ημέρα το καλλιεργητικό μέσο ανανεωνόταν με προσθήκη 0,5ml νέου καλλιεργητικού μέσου. Την ένατη ημέρα πραγματοποιήθηκε προσθήκη EGF και hCG με στόχο την πρόκληση ωοθυλακιόρρηξης. Τέσσερις ώρες μετά από την προσθήκη της hCG και του EGF συλλέχθηκαν τα ωοθυλάκια από ένα τρυβλίο control και ένα CRH και τοποθετήθηκαν σε

δοχεία erpedorf και σε θερμοκρασία -80°C. Στα δοχεία προστέθηκε αντιδραστήριο RNA later για τη σταθεροποίηση του δείγματος.

Μετά από την ολοκλήρωση της συλλογής των ωοθυλακίων ακολούθησε η εφαρμογή τεχνικών μοριακής βιολογίας και συγκεκριμένα εξαγωγή RNA (RNA extraction) και σύνθεση cDNA (cDNA synthesis). (Μωραΐτη, 2014) Τέλος, για της ανάγκες της παρούσας διπλώματικής συλλέχθηκαν τα δείγματα και με την τεχνική της RT-PCR ελέγχθηκε η έκφραση των κirkάδιων γονιδίων clock και bmal1 σύμφωνα με το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ανίχνευση της έκφρασης κirkάδιων γονιδίων στα προεμφυτευτικά έμβρυα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι ο έλεγχος της έκφραση κirkάδιων γονιδίων πραγματοποιήθηκε μόνο στην ομάδα ελέγχου δηλαδή στα προκυλιωτικά ωοθυλάκια που αναπτύχθηκαν απουσία του CRH

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Α. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

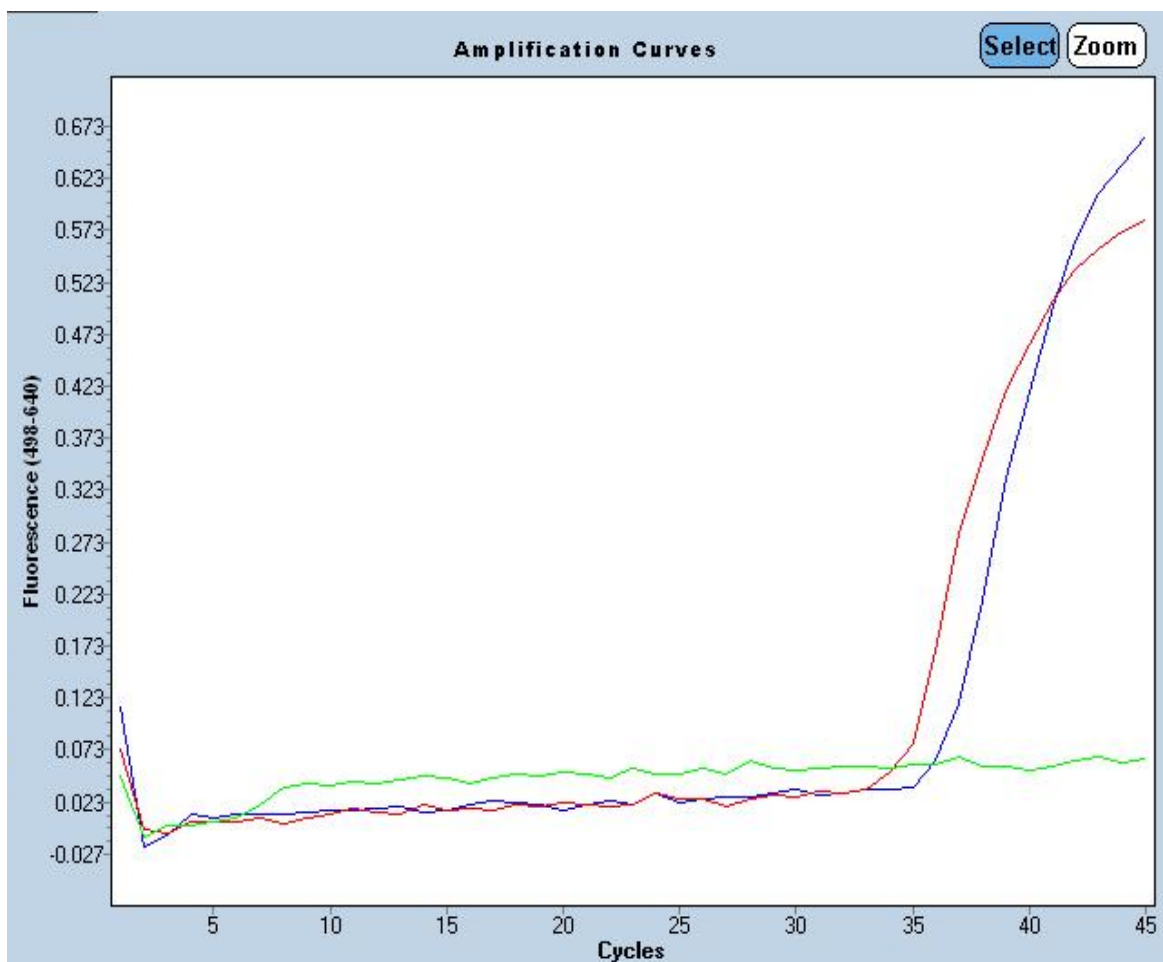
Βασικό αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε η έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων *clock* και *bmal1* στα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου επίμυων, έως και το στάδιο της βλαστοκύστης. Τα έμβρυα, κατόπιν της συλλογής τους από τους αγωγούς των θηλυκών επίμυων, καλλιεργήθηκαν in vitro σε συνθήκες και πρωτόκολλα που να μιμούνται απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον του αναπαραγωγικού συστήματος, και στη συνέχεια απομονώθηκαν στο στάδιο των 2 κυττάρων, στο στάδιο των 4 κυττάρων, στο στάδιο των 8 κυττάρων, καθώς και στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης. Μελετήθηκαν, επίσης, και δείγματα προκυτοτικών ωοκυττάρων τα οποία είχαν απομονωθεί από τις ωοθήκες θηλυκών επίμυων και στην συνέχεια, καλλιεργήθηκαν in vitro. Για την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων εφαρμόστηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (RT-PCR), δίνοντας τα ακόλουθα αποτελέσματα.

- Ι. Έκφραση κirkάδιων γονιδίων *clock* και *bmal1* στα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια του εμβρύου επίμυων

	2 κυττάρων	4 κυττάρων	8 κυττάρων	Μορίδιο	Βλαστοκύστη
Clock	Cp= 35,78	Cp= 30,03	Cp= 35,22	Cp= 33,95	-
Bmal1	-	Cp= 34,12	Cp= 40,00	-	-

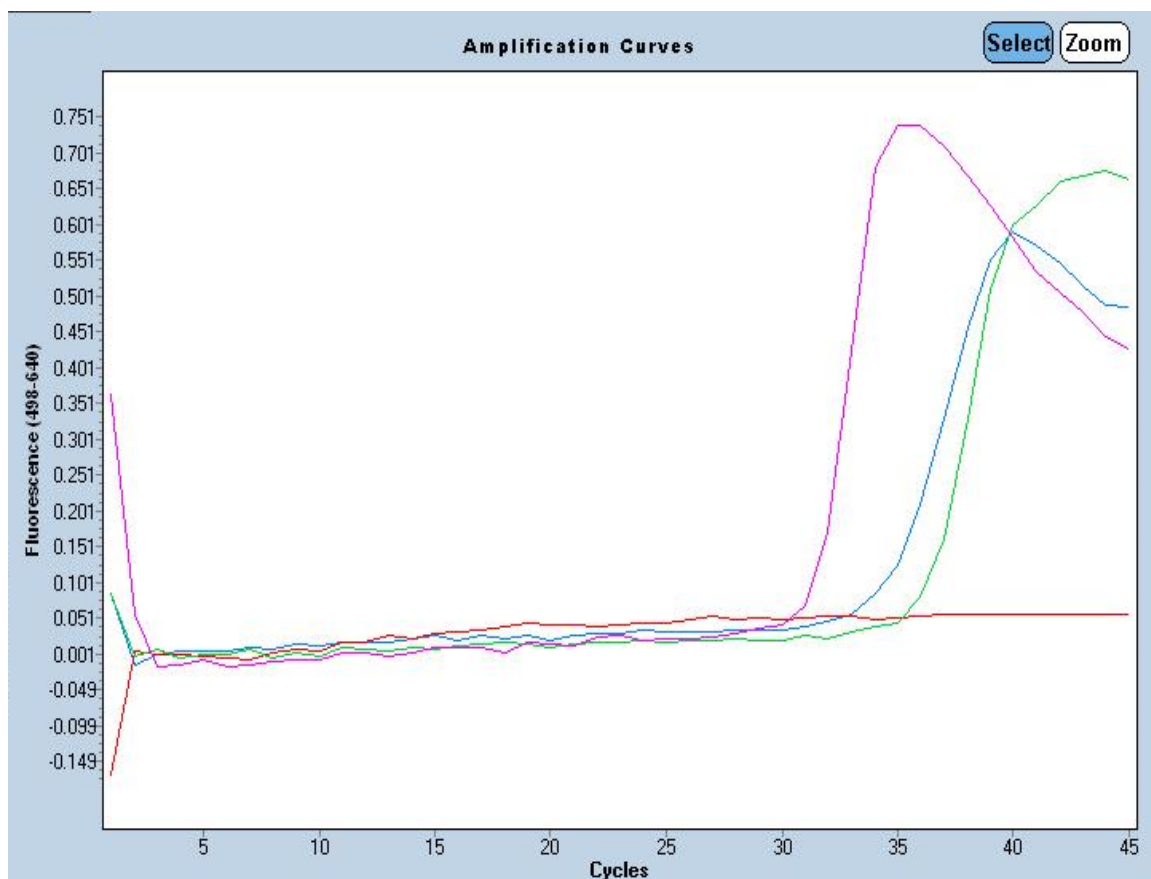
Πίνακας 5: Αποτελέσματα έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων *clock* και *bmal1* σε προ-έμβρυα μυός

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒	Blue	E1	clock_2cell		35.78
☒	Red	E2	clock_morula		33.95
☒	Green	E3	clock_b1		



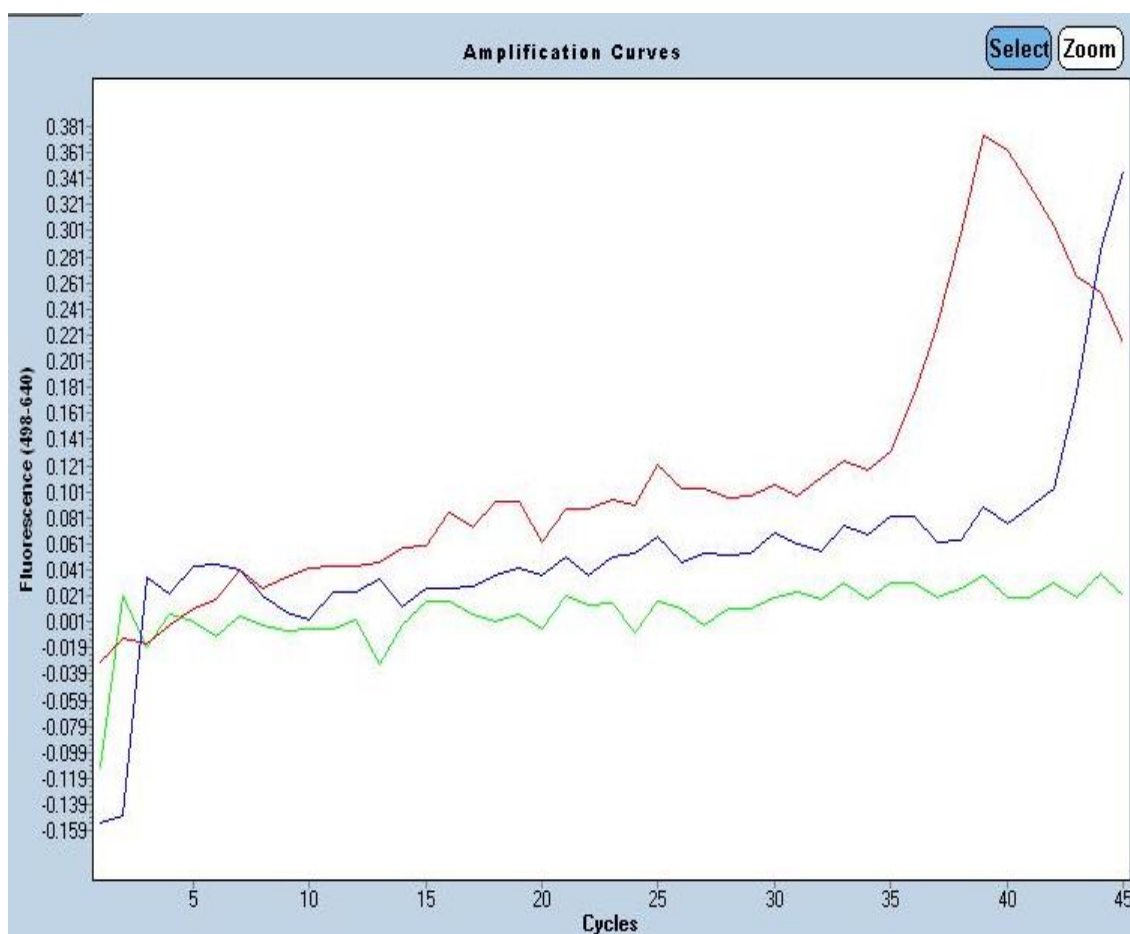
Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου clock σε έμβρυα επιμυός όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. **Μπλε καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων, **Κόκκινη καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο του Μοριδίου, **Πράσινη καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο της Βλαστοκύστης

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒	Blue	A1	2cells		33.91
☒	Red	A2	2cells		
☒	Green	A3	8cells		35.22
☒	Magenta	A4	RNA4cells		30.03



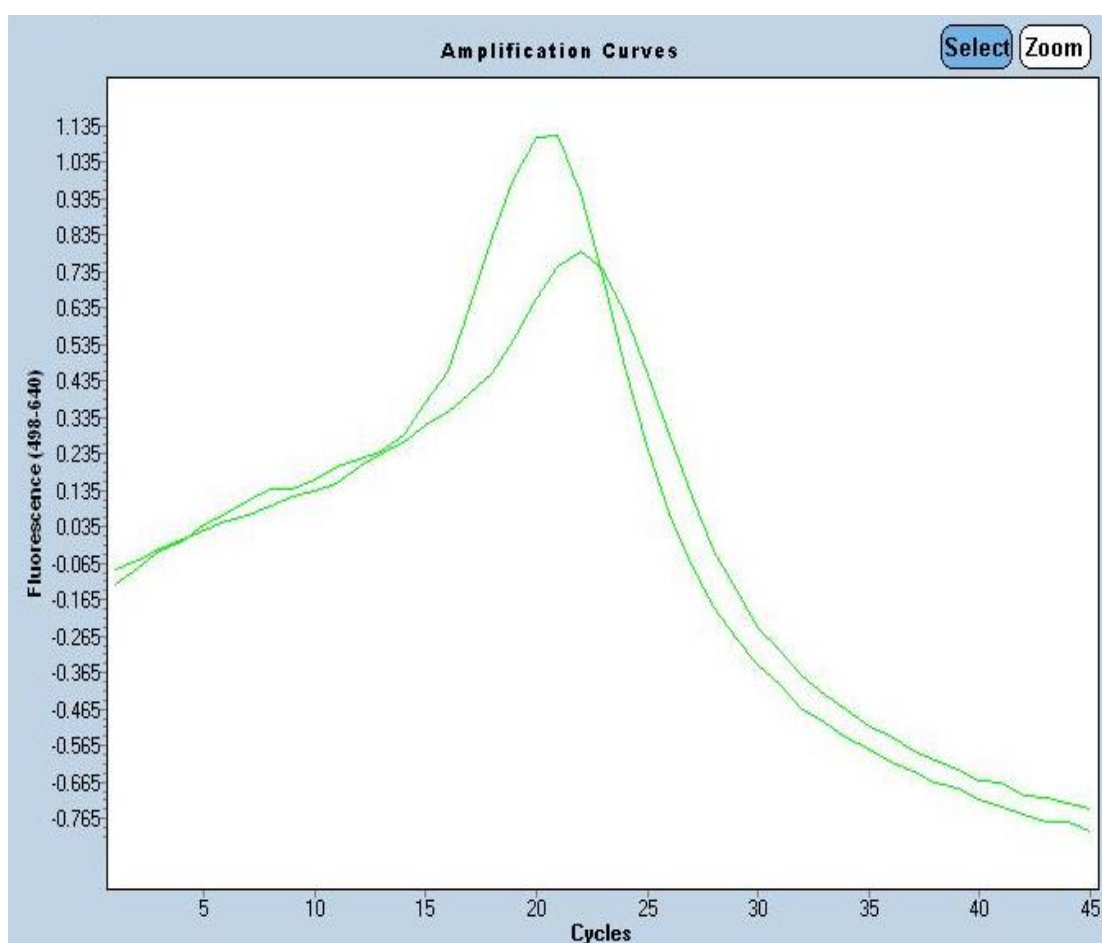
Εικόνα 21: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου clock σε έμβρυα επιμυός όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ: **Μπλε** καμπύλη: έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων, **Πράσινη** καμπύλη: έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων, **Ροζ** καμπύλη: έμβρυα στο στάδιο των 4 κυττάρων. ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ: **Κόκκινη** καμπύλη: έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒	■	H10	Bmal_2c		
☒	■	H11	Bmal_4c		34.12
☒	■	H12	Bmal_8c		40.00



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου *bmal1* σε έμβρυα επιμυός όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. ΘΕΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ: **Κόκκινη καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο των 4 κυττάρων, **Μπλε καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων, ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ: **Πράσινη καμπύλη:** έμβρυα στο στάδιο των 2 κυττάρων

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒		B1	Bmal_Mor		
☒		B2	Bmal_BL		



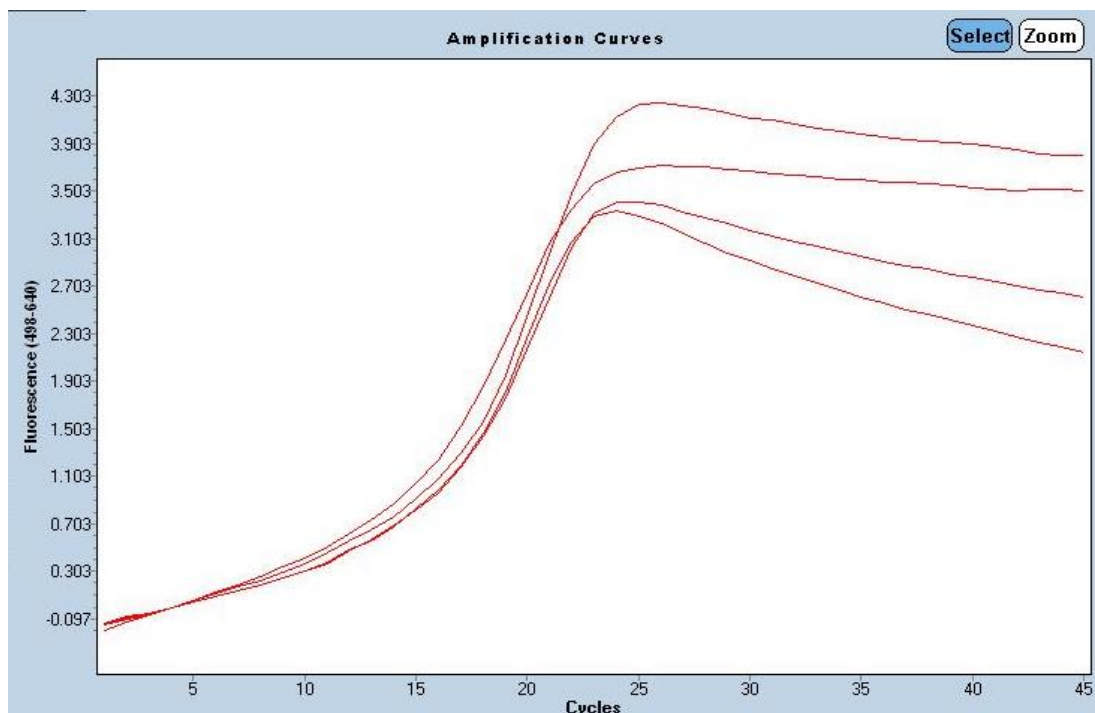
Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της έκφρασης του γονιδίου *bmal1* σε έμβρυα επιμυός όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. Οι πράσινες καμπύλες αντιστοιχούν στην απουσία έκφρασης του γονιδίου στο στάδιο του Μοριδίου και της Βλαστοκύστης

II. Έκφραση κιρκάδιων γονιδίων clock και bmal σε προκοιλιακά ωοθυλάκια επίμυων

	Bmal1	Clock
Control group	C1: Cp = 14,94	C4: Cp = 17,86
	C2: Cp = 16,97	C5: Cp = 18,36
	C3: Cp = 16,86	C6: Cp = 19,57
	C3': Cp = 15,41	C5': Cp = 17,57

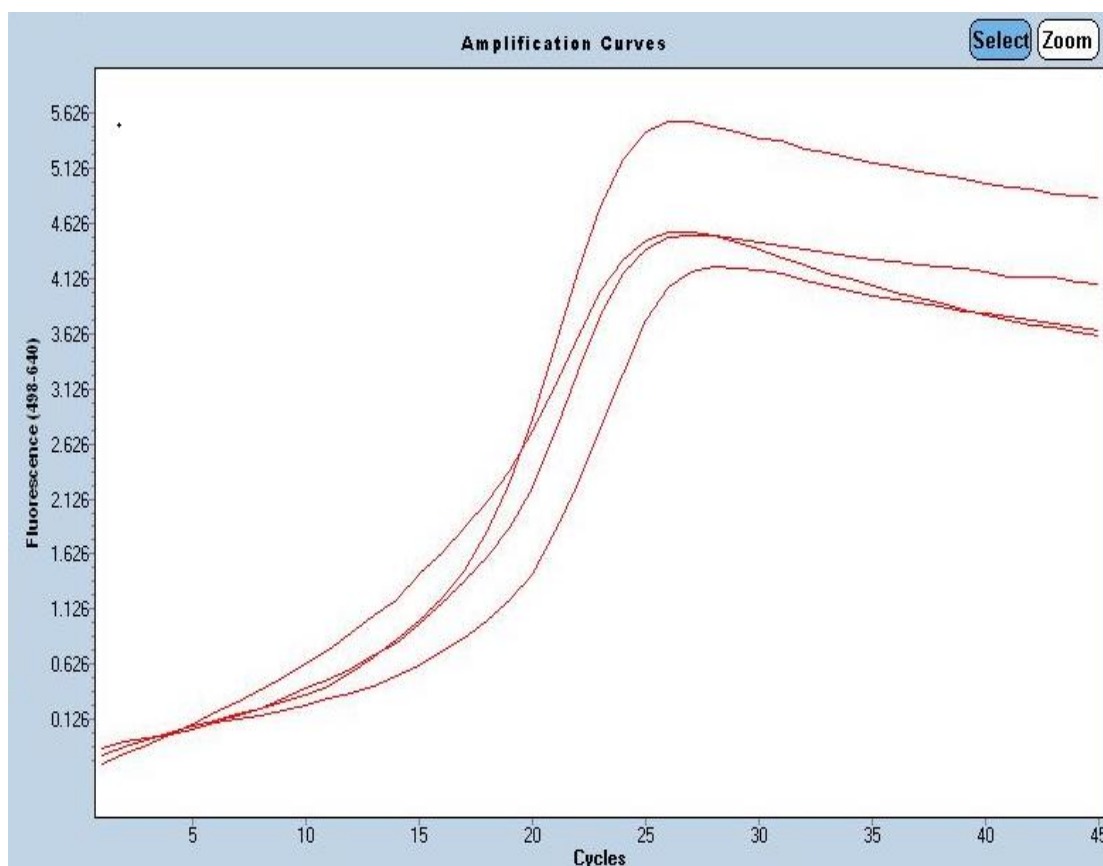
Πίνακας 6: Αποτελέσματα έκφρασης κιρκάδιων γονιδίων clock και bmal σε προκοιλιακά ωοθυλάκια

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒	■	D1	Bmal_C1		14.94
☒	■	D2	Bmal_C2		16.97
☒	■	D3	Bmal_C3		16.86
☒	■	D4	bmal_C3'		15.41



Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. Οι κόκκινες καμπύλες αντιστοιχούν στην παρουσία έκφρασης του γονιδίου bmal1 σε προκοιλιακά ωοθυλάκια της ομάδας ελέγχου

Samples					
Include	Color	Pos	Name		Cp
☒	■	E1	CLOCK_C4		17.86
☒	■	E2	CLOCK_C5		18.36
☒	■	E3	CLOCK_C6		19.57
☒	■	E4	CLOCK_C5'		17.57



Εικόνα 25: Σχηματική αναπαράσταση όπως εκείνη αποτυπώνεται στο λογισμικό του LightCycler480 κατά την εφαρμογή της real-time PCR. Οι κόκκινες καμπύλες αντιστοιχούν στην παρουσία έκφρασης του γονιδίου clock σε προκοιλιακά ωοθυλάκια της ομάδας ελέγχου

B. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Από τη στιγμή της γονιμοποίησης του ωαρίου, το νέο ενισχυμένο κύτταρο ονομάζεται πια ζυγωτό και στο κυτταρόπλασμα αυτού ξεκινούν οι έντονες διεργασίες και προετοιμασίες για τις συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις που θα ακολουθήσουν. Ένα ενδιαφέρον στοιχείο που αξίζει να σημειωθεί είναι πως τα πρώτα αυτά στάδια ανάπτυξης ελέγχονται ουσιαστικά από το μητρικό γονιδίωμα. Άρα στα συγκεκριμένα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης δεν παρατηρείται σύνθεση mRNA από τα χρωμοσώματα του προ-εμβρύου, τα οποία είναι μεταγραφικά ανενεργά. Το εμβρυικό γονιδίωμα ενεργοποιείται κατά τη 2^η με 3^η ημέρα της ανάπτυξής του [132].

Οι επακόλουθες μιτωτικές διαιρέσεις έχουν ως αποτέλεσμα το σχηματισμό εμβρύου 2, 4, 8 κυττάρων, προτού εκείνο φτάσει στη θέση εμφύτευσης στη μήτρα. Έως και το στάδιο των 8 κυττάρων, τα βλαστομερίδια είναι αρκετά ευδιάκριτα με σαφή τα σύνορα μεταξύ τους. Στα επόμενα στάδια διαίρεσης συμπιέζονται και το έμβρυο αποκτά ένα πιο σφαιρικό σχήμα, με τα βλαστομερίδια από τα οποία αποτελείται να καλύπτουν με ασαφή και ακανόνιστο τρόπο την εικόνα του. Το έμβρυο σε αυτό το σημείο αποκαλείται μορίδιο.

Κατά τη μετάβαση από το στάδιο του μοριδίου στη βλαστοκύστη, κάποια από τα κύτταρα συγκεντρώνονται στο εσωτερικού του εμβρύου και κάποια στην επιφάνειά του. Εκείνα που εντοπίζονται στο εσωτερικό, σχηματίζουν τη λεγόμενη εσωτερική κυτταρική μάζα και διαθέτουν τη σημαντική ιδιότητα να μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κύτταρο και να μην είναι πολωμένα. Η ομάδα αυτή των κυττάρων στην μετέπειτα εμβρυική ανάπτυξη θα διαφοροποιηθεί στο επίβλαστο, από το οποίο σχηματίζεται το έμβρυο, αλλά και σε εξωεμβρυικές μεμβράνες και το πρωτογενές ενδόδερμα. Τα κύτταρα που εντοπίζονται στην επιφάνεια είναι πολωμένα, δηλαδή έχουν διαφορά δυναμικού στην κυτταρική τους μεμβράνη, και σχηματίζουν το τροφοεξώδερμα που θα κατασκευάσει τα κύτταρα του τροφοβλάστη και του χορίου, που με τη σειρά τους θα σχηματίσουν τον πλακούντα [133],[134].

Στα θηλαστικά εντοπίζεται μια ομάδα κirkάδιων γονιδίων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (Clock, Bmal1, Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3) και εκφράζονται στα περισσότερα όργανα, ιστούς και κύτταρα. Αυτοί οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι οι κύριοι ρυθμιστές του κirkάδιου ρολογιού, ρυθμίζοντας τον χρόνο στον οποίο παρατηρούνται πολλά φαινόμενα φυσιολογίας, όπως ο ύπνος, οι μεταβολικές λειτουργίες και η κυτταρική ανάπτυξη [135],[136].

Αυτά τα γονίδια ταξινομούνται σε δύο μεγάλες ομάδες: τους παράγοντες που επάγουν την μεταγραφή (Clock, Bmal1) και τους παράγοντες που καταστέλλουν τη μεταγραφή (Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3) [66]. Επειδή η μεταγραφή της κάθε ομάδας ενεργοποιείται εναλλάξ κάθε 24 ώρες, με αιχμή κάθε 12 περίπου ώρες, πολλά γονίδια των οποίων η μεταγραφή εξαρτάται από τους παραπάνω κirkάδιους παράγοντες εμφανίζουν μια αντίστοιχη 24ωρη μεταγραφική διακύμανση [70].

Οι μοριακοί μηχανισμοί της μεταγραφικής ρύθμισης από πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα κirkάδια γονίδια έχουν μερικώς αποκαλυφθεί έως σήμερα. Η βασική ιδέα πίσω από τον μηχανισμό, παρόλα αυτά, είναι γνωστή. Οι πρωτεΐνες CLOCK και BMAL1 που συσσωρεύονται στο κύτταρο, σχηματίζουν ένα σύμπλοκο χρησιμοποιώντας τους τομείς Pas-Arnt-Sim και επειδή το σύμπλοκο έχει μια βασική περιοχή έλικας-βρόχου-έλικας, συνδέεται σε ένα E-Box του οποίου η αλληλουχία είναι η CACGTG, και προάγει τη μεταγραφή πολυάριθμων CCGs (clock-controlled genes) που διαθέτουν αλληλουχία E-box στην περιοχή του εκκινητή τους [52],[66].

Επιπλέον, τα γονίδια Cry1, Cry2, Per1, Per2 και Per3 έχουν επίσης αλληλουχία E-box στην περιοχή του εκκινητή τους και η μεταγραφή τους προωθείται παρομοίως από το από το διμερές σύμπλοκο CLOCK-BMAL, οι παραγόμενες πρωτεΐνες CRY1, CRY2, PER1, PER2 και PER3 συσσωρεύονται στη συνέχεια στα κύτταρα. Μεταξύ αυτών των πρωτεϊνών, οι πρωτεΐνες CRY1 και CRY2 είναι οι μόνες που μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 και ισχυρά να καταστέλλουν την επαγωγική μεταγραφική δράση των υπόλοιπων κirkάδιων γονιδίων. Εξαιτίας της καταστολής αυτής, η ενδοκυτταρική συγκέντρωση των μετάγραφων των cry1 και cry2 ελαττώνεται και το σύμπλοκο CLOCK-BMAL1 ενεργοποιείται ξανά [137].

Κύριο αντικείμενο μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων *clock* και *bmal1* σε προεμφυτευτικά στάδια σε έμβρυα επίμυων. Επίσης ερευνήθηκε η παρουσία των δυο αυτών γονιδίων και σε προκοιλιακά ωοθυλάκια τα οποία είχαν καλλιιεργηθεί in vitro, καθώς το μεγάλο εύρος των μηχανισμών φυσιολογίας στους οποίους οι κirkάδιοι ρυθμοί επιτελούν ρυθμιστικό ρόλο, θέτει εύλογα το ερώτημα του ρόλου των γονιδίων αυτών και στο περίπλοκο φαινόμενο της αναπαραγωγής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας δείχνουν πως στα έμβρυα των επίμυων η έκφραση του γονιδίου *clock* είναι ενεργή σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια πλην του σταδίου της βλαστοκύστης. Μάλιστα η έκφραση του γονιδίου εμφανίζεται σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια ανάπτυξης, χωρίς κάποια αξιοσημείωτη διαβάθμιση, με μοναδική αμελητέα πτώση στο στάδιο των 4 κυττάρων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της RT-PCR ανιχνεύθηκαν περίπου 100 μετάγραφα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Όσον αφορά το γονίδιο *bmal1* δεν ανιχνεύθηκε σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης των εμβρύων παρά μόνο σε αυτό των 4 και των 8 κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα στο στάδιο των 4 κυττάρων ανιχνεύθηκαν 100 μετάγραφα ενώ στην συνέχεια, στο στάδιο των 8 κυττάρων ο αριθμός των μεταγραφών σχεδόν υποδεκαπλασιάστηκε.

Επιπλέον, παρατηρήθηκε έκφραση των κirkάδιων γονιδίων *clock* και *bmal1* στα προκοιλιακά ωοθυλάκια τα οποία όπως προαναφέρθηκε είχαν απομονωθεί και στην συνέχεια είχαν καλλιιεργηθεί in vitro. Σε όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν ο αριθμός των μεταγραφών που ανιχνεύθηκαν είναι αισθητά μεγαλύτερος από αυτόν που ανιχνεύθηκε στα προεμφυτευτικά έμβρυα και πιο συγκεκριμένα ξεπερνά τα 10.000 copies τόσο στην περίπτωση του γονιδίου *clock* όσο και σε αυτήν του *bmal*. Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι στο *bmal* group ο αριθμός των μεταγραφών φάνηκε να είναι ελαφρώς πιο αυξημένος συγκριτικά με την *clock* ομάδα. Το γεγονός αυτό μπορεί να μας οδηγήσει στο συμπέρασμα ότι η BMAL θα μπορούσε να επιτελεί και άλλο ρόλο πέρα από τον σχηματισμό του ετεροδιμερούς συμπλόκου CLOCK-BMAL. Παρόλα αυτά περαιτέρω έρευνες θα πρέπει να πραγματοποιηθούν ώστε να διευκρινιστεί ο ρόλος του *bmal*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα, όσον αφορά την έκφραση των κirkάδιων γονιδίων σε προεμφυτευτικά έμβρυα, βρίσκονται σχεδόν σε πλήρη συμφωνία με τη μελέτη των Johnson και Day, η οποία κατέδειξε πως η έκφραση του *clock* ήταν αισθητή σε ωκύτταρα καθώς και σε όλα τα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια μελέτης, με χαρακτηριστική βέβαια πτώση της έκφρασης μετά το στάδιο των 2 κυττάρων, το οποίο και επιβεβαιώθηκε από την παρούσα διπλωματική εργασία. Η έκφραση του *bmal1* γονιδίου, στη μελέτη των Johnson και Day, ήταν ανιχνεύσιμη τόσο στα ωκύτταρα όσο και στα αναπτυξιακά στάδια έως και το στάδιο της βλαστοκύστης [78],[113], γεγονός που επιβεβαιώθηκε εν μέρει από την παρούσα διπλωματική εργασία καθώς δεν ανιχνεύθηκε έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης.

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, πολλές φορές η έκφραση των κirkάδιων γονιδίων σε έμβρυα είναι χαμηλή και γι αυτό το λόγο βρίσκεται στο όριο ανίχνευσης της real-time PCR. Επιπλέον, και η έκφραση του *bmal1* σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ανιχνεύεται, φαινόμενο που αποδίδεται στην αποδόμηση του μητρικού RNA στα πρώτα στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης [138],[139].

Σύμφωνα με την μελέτη των Amano και συν. ο μεγαλύτερος αριθμός *clock* μεταγραφών παρατηρήθηκε στα ωκύτταρα (πάνω από 10000 αντίγραφα) ενώ τα μετάγραφα αυτού του γονιδίου σχεδόν εξαντλήθηκαν μετά το στάδιο των 2 κυττάρων. Ο αριθμός των μεταγραφών *clock* στα έμβρυα που συλλέχθηκαν από το στάδιο των δυο κυττάρων και έπειτα ήταν σταθερός [141], γεγονός που συμφωνεί απόλυτα με τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Ο αριθμός των *bmal1* μεταγραφών σε ωκύτταρα ξεπερνούσε τα 10000 αντίγραφα, γεγονός σύμφωνο με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν από την παρούσα διπλωματική εργασία. Από το στάδιο των 2 κυττάρων και έπειτα τα αντίγραφα σχεδόν εξαντλήθηκαν και η ποσότητα παρέμεινε σταθερή στη συνέχεια, πράγμα που επιβεβαιώθηκε εν μέρει από τα αποτελέσματα της παρούσας διπλωματικής διότι ναι μεν ο αριθμός των μεταγράφων παρουσίασε μεγάλη μείωση, πιο συγκεκριμένα δεν ξεπερνούσε τα 100 αντίγραφα άλλα η έκφραση του γονιδίου *bmal1* ανιχνεύθηκε μόνο στο στάδιο των 4 και 8 κυττάρων.

Σύμφωνα με τους Amano και συν. μια πιθανή εξήγηση του παραπάνω φαινομένου της απουσίας κirkάδιας έκφρασης γονιδίων, είναι ότι ίσως να οφείλεται στην έλλειψη συγχρονισμού των επιμέρους κυττάρων από τα οποία απαρτίζεται το έμβρυο, πριν την εμφύτευση. Ένας τέτοιος συντονισμός απαιτεί ένα εξωτερικό ερέθισμα, όπως ένα ερέθισμα μητρικής προέλευσης. Επομένως, στα έμβρυα δεν αποκλείεται τα μεμονωμένα κύτταρα να ακολουθούν κirkάδιους ρυθμούς, αν και ασυντόνιστα μεταξύ τους, παρουσιάζοντας το καθένα εντελώς διαφορετικά μοτίβα έκφρασης mRNA.

Η μελέτη των Amano και συν. αναφέρει, επίσης, πως η μειωμένη μεταγραφική παρουσία των κirkάδιων γονιδίων σε όλα τα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια εμβρύων έως και τη βλαστοκύστη πιθανότατα παύει να ισχύει στα πιο προχωρημένα αναπτυξιακά στάδια, όπου εκεί με κινητήριο ερέθισμα πια την εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα, είναι πιθανόν τα δεδομένα να αλλάζουν με τη μετάδοση του κirkάδιου ρυθμού της μητέρας στο έμβρυο [140]. Καταλήγοντας, αναφέρουν πως η έκφραση των κirkάδιων γονιδίων ενδεχομένως να μην σχετίζεται στη φάση αυτή απαραίτητα με τη ρύθμιση του κirkάδιου ρολογιού στα έμβρυα [141].

Η παραπάνω υπόθεση των Amano και συν. ότι δηλαδή με κινητήριο ερέθισμα πια την εμφύτευση του εμβρύου στη μήτρα, είναι πιθανόν τα δεδομένα να αλλάζουν με τη μετάδοση του κirkάδιου ρυθμού της μητέρας στο έμβρυο επιβεβαιώνεται από μια πιο πρόσφατη έρευνα των Reiter και συν. Σύμφωνα με αυτήν την έρευνα η ύπαρξη σταθερών μητρικών κirkάδιων ρυθμών βελτιστοποιούν την φυσιολογία του πλακούντα καθώς και την εμβρυική ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα μέσα στη μελέτη αναφέρεται ότι η βέλτιστη κirkάδια ρυθμικότητα στη μητέρα είναι σημαντική, καθώς το κirkάδιο ρολόι της, είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω του ρυθμού μελατονίνης, συμβάλει στο σωστό προγραμματισμό του αναπτυσσόμενου εμβρύου. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι διαταραγμένοι μητρικοί κirkάδιοι ρυθμοί, και οι διαταραγμένοι κύκλοι μελατονίνης έχουν αρνητικές συνέπειες στην ανάπτυξη κirkάδιας ρυθμικότητας του εμβρύου [142].

Ακόμα και μελέτες στις οποίες έχουν εντοπιστεί μετάγραφα κirkάδιων γονιδίων σε προεμφυτευτικά στάδια στους επίμυες, δεν ήταν σε θέση να διευκρινίσουν αν τα

μετάγραφα αυτά παρουσίαζαν 24ωρη διακύμανση στη συγκέντρωσή τους. Η ύπαρξη των μεταγραφών δεν αρκεί για να επιβεβαιώσει αυτόματα και την ύπαρξη κirkάδιου ρυθμού στα προεμφυτευτικά έμβρυα. Είναι απαραίτητο να προσδιοριστεί εάν τα μετάγραφα των κirkάδιων γονιδίων εμφανίζουν «συμπτώματα» περιοδικότητας. Για την ταυτοποίηση της πιθανής διακύμανσης απαιτείται συλλογή εμβρύων κάθε 6 ώρες [141].

Επιπλέον, προτείνεται πως κάποια κirkάδια γονίδια εκτός από τη συμμετοχή στο κirkάδιο μηχανισμό, επιδρούν και στη μειωτική διαίρεση των ωοκυττάρων. Επομένως, θεωρητικά μια τέτοια παρατήρηση καθιστά την εύρεση του γονιδίου όχι απαραίτητα μια απόλυτη διαπίστωση της ύπαρξης κirkάδιας λειτουργίας, αλλά ένα πιθανό ρόλο του γονιδίου στις διαιρετικές διεργασίες των κυττάρων [141].

Αυτή η διαπίστωση επιβεβαιώνεται και από πιο πρόσφατες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες έχει διασαφηνιστεί ότι τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (ESC) και τα πρώιμα έμβρυα δεν εμφανίζουν διακριτή κirkάδια μοριακή ρυθμικότητα. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι η κirkάδια ρυθμικότητα καταργείται όταν διαφοροποιημένα κύτταρα επαναπρογραμματίζονται για να ανακτήσουν την πολυδύναμο ικανότητα μέσω έκφρασης του παράγοντα επαναπρογραμματισμού (Oct3 / 4, Sox2, Klf4 και c-Myc), υποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη του κirkάδιου ρολογιού στα κύτταρα των θηλαστικών είναι στενά συσχετιζόμενη με τη διαδικασία κυτταρικής διαφοροποίησης [143].

Το γεγονός ότι τα κirkάδια γονίδια συμμετέχουν και σε άλλες φυσιολογικές διεργασίες του οργανισμού πέραν της ρύθμισης της κirkάδιας περιοδικότητας επιβεβαιώνεται επιπλέον από την έρευνα του Xu J και συν. οι οποίοι κατέδειξαν ότι η διαγραφή του γονιδίου Bmal1 μειώνει σημαντικά την ταχύτητα γονιμοποίησης ωοκυττάρων, την ανάπτυξη πρώιμου εμβρύου και το δυναμικό εμφύτευσης σε θηλυκά ποντίκια, και αυτά μπορεί να προκαλούνται πιθανώς από την υπερβολική ποσότητα ROS που παράγεται στα κύτταρα των ωοθηκών και των σαλπίνγων [144].

Η ανακάλυψη των κirkάδιων γονιδίων, η αναγνώριση της τεράστιας επιρροής τους ως μεταγραφικοί παράγοντες και η αλληλεπίδρασή τους με μια πληθώρα γονιδίων αναθερμαίνει το ενδιαφέρον γύρω από τον πραγματικό ρόλο των γονιδίων αυτών

στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Τα κirkάδια γονίδια έχουν διατηρηθεί ακέραια, από τα φυτά και τη *Drosophila*, έως τα τρωκτικά και τον άνθρωπο. Δεδομένου του ρόλου των κirkάδιων γονιδίων στον έλεγχο της περιοδικότητας, αλλά και της ρύθμισης της αναπαραγωγής στα ζώα, θα φαινόταν παράλογο να αγνοείται ο ρόλος τους στην ανθρώπινη αναπαραγωγή.

Οι ενδείξεις ότι οι κirkάδιοι ρυθμοί και η αναπαραγωγή αλληλοσυνδέονται αυξάνονται συνεχώς. Το κirkάδιο σύστημα είναι σε θέση να επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών της φυσιολογίας μέσω ορμονικών και νευρικών οδών, με αποτέλεσμα οποιαδήποτε επέμβαση στην έκφραση των κirkάδιων γονιδίων, να οδηγεί σε μεταβολικές αλλαγές και αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες. Όμως, ένας σαφής προσδιορισμός του ρόλου του κirkάδιου μηχανισμού δεν έχει συστηματικά μελετηθεί. Οι πολυμορφισμοί στα ανθρώπινα κirkάδια γονίδια έχουν εντοπιστεί και συσχετίζεται με αλλαγές στο χρονοδιάγραμμα ύπνου και δυσλειτουργίες στη συμπεριφορά του ύπνου, ως εκ τούτου ο ισχυρισμός ότι πολλοί από αυτούς τους πολυμορφισμούς πιθανότατα επηρεάζουν και τη γονιμότητα είναι βάσιμος.

Οι πιθανές συνδέσεις μεταξύ δυσλειτουργίας των κirkάδιων ρυθμών, μεταβολικού συνδρόμου και γονιμότητας είναι αχαρτογράφητες. Τα επόμενα χρόνια είναι πιθανό πως αυτές οι συνδέσεις θα γίνουν σαφέστερες, καθώς η έρευνα γύρω από τον κirkάδιο μηχανισμό έχει στραφεί στη διερεύνηση της έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων υπό το αναπαραγωγικό πρίσμα και στον πιθανό ρόλο αυτών στην ανάπτυξη του εμβρύου [77],[145].

Η προσέγγιση των κirkάδιων ρυθμών υπό το πρίσμα της αναπαραγωγής δίνει μια διάσταση στην έρευνα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής που ποτέ άλλοτε δεν είχε προσεγγιστεί. Σε μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να αποσαφηνιστεί ποιός είναι ακριβώς ο ρόλος των κirkάδιων γονιδίων και πόσο σημαντική παράμετρο ίσως αποτελούν στην επιτυχή έκβαση των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής καθώς οι τεχνολογίες της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιλαμβάνουν *in vitro* καλλιέργειες κυττάρων και χειρισμό των εμβρύων κατά τη μεταφορά τους στη μήτρα, σε ένα περιβάλλον πλήρους έλλειψης περιβαλλοντικών ερεθισμάτων, με τελικό αποδέκτη την μητέρα όπου πια βρίσκεται εντελώς εκτός φάσης με το έμβρυο.

Επιπλέον, λόγω της διαπίστωσης ότι τα κirkάδια γονίδια εμπλέκονται και σε άλλους φυσιολογικούς μηχανισμούς όπως αυτός της κυτταρικής διαίρεσης των ωκυττάρων και της κυτταρικής διαφοροποίησης των ESC, είναι σημαντικό σε μελλοντικές έρευνες να αποσαφηνιστεί ο ακριβής μοριακός μηχανισμός μέσω του οποίου δρουν αυτά τα γονίδια έτσι ώστε να μπορέσουμε να κατανοήσουμε σε βάθος την φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος και να βελτιστοποιήσουμε της τεχνικές in vitro καλλιέργειας και in vitro ωρίμανσης τόσο των εμβρύων αλλά πολύ περισσότερο των ωκυττάρων.

Πέραν όμως της μελέτης έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων, σημαντικό αντικείμενο μελέτης επίσης θα μπορούσε να αποτελέσει η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης των κirkάδιων γονιδίων με άλλα γονίδια, το γεγονός αυτό θα μπορούσε να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε σε ποιους άλλους μηχανισμούς εμπλέκονται αυτά τα γονίδια πέραν του κirkάδιου μηχανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] J.M.W.SLACK, Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης, 2nd edition, Blackwell: Ακαδημαϊκές εκδόσεις.
- [2] William J. Larsen, Εμβρυολογία του Ανθρώπου, 3d edition, Γ.Ν. Αντωνακόπουλος (επιμ.ελλ.)
- [3] LANGMAN'S, T.SADLER, Ιατρική εμβρυολογία, Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας
- [4] T. Thompson M.W. McInnes R.R, Willard H.F, Μοσχονάς Ν. (επιμ. ελλ.) Γεωργίου Ι. (επιμ. ελλ.) Σύρρου Μ. (επιμ. ελλ.) (1992) Ιατρική Γενετική, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης
- [5] Σταμάτης Αλαχιώτης, Εισαγωγή στην Γενετική, Εκδόσεις: Ελληνικά γράμματα
- [6] RICHARD M. SCHULTZ, PAUL M. WASSARMAN, BIOCHEMICAL STUDIES OF MAMMALIAN OOGENESIS: PROTEIN SYNTHESIS DURING OOCYTE GROWTH AND MEIOTIC MATURATION IN THE MOUSE, Department of Biological Chemistry and Laboratory of Human Reproduction and Reproductive Biology, Harvard Medical School, 45 Shattuck Street, Boston, Massachusetts 02115, U.S.A. J. Cell Sci. 34, 167-194 (1977)
- [7] Bruse M. Carlson, Human Embryology & Developmental Biology, 2nd edition, Mosby
- [8] Vander, Sherman, Luciano, Μ. Τσακόπουλος (επιμ.ελλ.), Ν. Γελαδάς (επιμ.ελλ.), 2001, Φυσιολογία Ανθρώπου II: Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού, 8^η έκδοση, Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- [9] J.M. Bedford, Significance of the Need for Sperm Capacitation Before Fertilization in Eutherian Mammals, Departments of Obstetrics and Gynecology and Cell Biology and Anatomy Cornell University Medical College New York, New York 10021, BIOLOGY OF REPRODUCTION 28, 108-120 (1983)
- [10] Claudia Caligoni, Assessing Reproductive Status/Stages in Mice (1999)
- [11] Grigoriou, M. (2006). Mouse. Στο J. Slack, Essential Development Biology (σσ. 151-188). United Kingdom: Blackwell.
- [12] 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>.

- [13] Latham, K. E., & Schultz, R. M. (2001, June 1). Embryonic Genome Activation. *Frontiers in Bioscience*, σσ. 748-759.
- [14] Latham, K. E. (1999). Mechanisms and Control of Embryonic Genome Activation in Mammalian Embryos. *Int Rev Cytol*(199), σσ. 71-124.
- [15] Studart, D. (2010). Fastbleep. Ανάκτηση από Embryonic gene activation: <http://www.fastbleep.com/biology-notes/32/159/865>
- [16] Njus D, McMurry L, Hastings JW. Conditionality of circadian rhythmicity: synergistic action of light and temperature. *J Comp Physiol* 1977; 117:335-344.
- [17] Roenneberg T, Morse D. Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 1993; 362:362-364.
- [18] Johnson, Carl (2004). *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., σελ. 67–105.
- [19] Wright Jr PK, Hughes RJ, Kronauer RE, Dijk D-J, Czeisler CA. Intrinsic near-24-h pacemaker period determines limits of circadian entrainment to a weak synchronizer in humans. *Neurobiol* 2001; 98:14027-14032.
- [20] Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, et al. Bright light induction of strong (Type O) resetting of the human circadian pacemaker. *Science* 1989; 244:1328-1333.
- [21] Czeisler CA, Richardson GS, Zimmerman JC, Moore-Ede MC, Weitzman ED. Entrainment of human circadian rhythms by light-dark cycles: a reassessment. *Photochem Photobiol* 1981; 34:239-247.
- [22] Wever RA, Polasek J, Wildgruber CM. Bright light affects human circadian rhythms. *Plufgers Arch* 1983; 396:85-87
- [23] Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 2001; 4:1165.
- [24] Moore RY, Silver R. Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol Int* 1998; 15:475-487.
- [25] Klein DC, Moore RY, Reppert SM. In: *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York: Oxford UP, 1991.
- [26] Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42:201-206.
- [27] Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:1583-1586

- [28] Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* 2002; 295:1070-1073.
- [29] Hattar S, Lucas RJ, Mrosovsky N, Thompson S, Douglas RH, Hankins MW, et al. Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature* 2003; 424:76-81.
- [30] Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z K, et al. Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* 1999; 284:502-504.
- [31] Schwartz WJ & Reppert SM 1985 Neural regulation of the circadian vasopressin rhythm in cerebrospinal fluid: a pre-eminent role for the suprachiasmatic nuclei. *Journal of Neuroscience* 5 2771–2778.
- [32] Kramer A, Yang FC, Snodgrass P, Li X, Scammell TE, Davis FC & Weitz CJ 2001 Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. *Science* 294 2511–2515.
- [33] Cheng MY, Bullock CM, Li C, Lee AG, Bermak JC, Belluzzi J, Weaver DR, Leslie FM & Zhou QY 2002 Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. *Nature* 417 405–410.
- [34] Teclemariam Mesbah R, Ter Horst GJ, Postema F, Wortel J & Buijs RM 1999 Anatomical demonstration of the suprachiasmatic nucleus–pineal pathway. *Journal of Comparative Neurology* 406 171–182.
- [35] Buijs RM, Wortel J, van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, Romijn HJ & Kalsbeek A 1999 Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *European Journal of Neuroscience* 11 1535–1544.
- [36] Kalsbeek A, Fliers E, Franke AN, Wortel J & Buijs RM 2000 Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology* 141 3832–3841.
- [37] Scheer FA, Ter Horst GJ & Buijs RM 2001 Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *American Journal of Physiology* 280 H1391–H1399.
- [38] La Fleur SE, Kalsbeek A, Wortel J & Buijs RM 2000 Polysynaptic neural pathways between the hypothalamus, including the suprachiasmatic nucleus, and the liver. *Brain Research* 871 50–56
- [39] Buijs RM, Chun SJ, Nijima A, Romijn HJ & Nagai K 2001 Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. *Journal of Comparative Neurology* 431 405–423.

- [40] van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, van den Hurk R & Buijs RM 1997a Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of Comparative Neurology* 384 569–579.
- [41] Palm IF, van der Beek EM, Wiegant VM, Buijs RM & Kalsbeek A 2001 The stimulatory effect of vasopressin on the luteinizing hormone surge in ovariectomized, estradiol-treated rats is time-dependent. *Brain Research* 901 109–116.
- [42] Larsen PJ, Enquist LW and Card JP (1998) Characterization of the multisynaptic neuronal control of the rat pineal gland using viral transneuronal tracing. *Eur J Neurosci* 10,128–145.
- [43] Lincoln GA, Andersson H and Loudon A (2003b) Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *J Endocrinol* 179,1–13.
- [44] Vanecek J, Pavlik A and Illnerova H (1987) Hypothalamic melatonin receptor sites revealed by autoradiography. *Brain Res* 435,359–362.
- [45] Reppert SM, Weaver DR and Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* 13,1177–11
- [46] Williams LM and Morgan PJ (1988) Demonstration of melatonin-binding sites on the pars tuberalis of the rat. *J Endocrinol* 119,R1–R3.85.
- [47] Barrett P, MacLean A, Davidson G and Morgan PJ (1996) Regulation of the Mel 1a melatonin receptor mRNA and protein levels in the ovine pars tuberalis: evidence for a cyclic adenosine 30,50-monophosphate-independent Mel 1a receptor coupling and an autoregulatory mechanism of expression. *Mol Endocrinol* 10,892–902.
- [48] Redman J, Armstrong S and Ng KT (1983) Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 219,1089–1091.
- [49] Lincoln GA, Andersson H and Hazlerigg D (2003a) Clock genes and the long-term regulation of prolactin secretion: evidence for a photoperiod/ circannual timer in the pars tuberalis. *J Neuroendocrinol* 15,390–397.
- [50] Green DJ & Gillette R 1982 Circadian rhythm of firing rate recorded from single cells in the rat suprachiasmatic brain slice. *Brain Research* 245 198–200.
- [51] OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim>
- [52] Dunlap JC. Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96:271-290.

- [53] Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science* 1998; 280:1564-1569.
- [54] King DP, Vitaterna MH, Chang AM, Dove WF, Pinto LH, Turek FW & Takahashi JS 1997a The mouse Clock mutation behaves as an antimorph and maps within the W19H deletion, distal of Kit. *Genetics* 146 1049–1060.
- [55] King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL et al. 1997b Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89 641–653.
- [56] Oishi K, Fukui H & Ishida N 2000 Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice: differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 268 164–171.
- [57] Noshiro M, Furukawa M, Honma S, Kawamoto T, Hamada T, Honma K & Kato Y 2005 Tissue-specific disruption of rhythmic expression of Dec1 and Dec2 in clock mutant mice. *Journal of Biological Rhythms* 20 404–418.
- [58] Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi GI, Ohkura N, Azama T, Mesaki M, Yukimasa S et al. 2003 Genomewide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *Journal of Biological Chemistry* 278 41519–41527.
- [59] Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenen C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 2000; 103:1009-1017
- [60] Laposky A, Easton A, Dugovic C, Walisser J, Bradfield C & Turek F 2005 Deletion of the mammalian circadian clock gene BMAL1/- Mop3 alters baseline sleep architecture and the response to sleep deprivation. *Sleep* 28 395–409.
- [61] Bae K, Jin X, Maywood E, Hastings M, Reppert S, Weaver D. Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. *Neuron* 2001; 30(2):525-536.
- [62] van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, et al. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 1999; 398:627-630.
- [63] Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zamenides PD, Ralph MR, et al. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* 2000; 288:483-491
- [64] Ko HW, Jiang J, Edery I. Role for Slimb in the degradation of Drosophila period protein phosphorylated by doubletime. *Nature* 2002; 420:673-678.

- [65] Preitner N, Damiola F, Luis-Lopez-Molina, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U. The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* 2002; 110(2):251-260.
- [66] Reppert SM & Weaver DR 2002 Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418 935–941.
- [67] Hao H, Allen DL, Hardin PE. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7):3687-3693.
- [68] Lowrey PL, Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genom Hum Gen* 2004; 5:407-441.
- [69] Clayton JD, Kyriacou CP, Reppert SM. Keeping time with the human genome. *Nature* 2001; 409:829-831.
- [70] Ueda HR, Chen W, Adachi A, Wakamatsu H, Hayashi S, Takasugi T, et al. A transcription factor response element for gene expression during circadian night. *Nature* 2002; 418:534-539.
- [71] Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, Fujimoto K, Sato F, Noshiro M, Kato Y & Honma K 2002 Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature* 419 841–844
- [72] Yamada K, Kawata H, Mizutani T, Arima T, Yazawa T, Matsuura K, Shou Z, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T et al. 2004 Gene expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biology of Reproduction* 70 76–82.
- [73] Hastings MH, Reddy AB, Maywood ES. A clockwork web: circadian timing in the brain and periphery, in health and disease. *Nat rev: neurosci* 2003; 4:649-661.
- [74] Kennaway, D. J., Varcoe, T. J., & Mau, V. J. (2003). Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Molecular human reproduction*, 9(9), 503-507.
- [75] Bruce D. Goldman. The circadian timing system and reproduction in mammals. *Department of Physiology and Neurobiology, University of Connecticut, U-154, Storrs, CT 06269, Steroids* 64 (1999) 679–685.
- [76] Kennaway, D. J., Voultsios, A., Varcoe, T. J., & Moyer, R. W. (2003). Melatonin and activity rhythm responses to light pulses in mice with the Clock mutation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 284(5), R1231-R1240.
- Johnson M 2002 Time and development. *Reproductive Biomedicine Online* 4 (suppl. 1), 39–45.
- [77] Johnson MH, Day ML 2000 Egg timers: how is developmental time measured in the early vertebrate embryo? *BioEssays* 22, 57–63.

- [78] Johnson, M. H., Lim, A., Fernando, D., & Day, M. L. (2002). Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), 140-145.
- [79] van der Beek EM, Horvath TL, Wiegant VM, van den Hurk R & Buijs RM 1997a Evidence for a direct neuronal pathway from the suprachiasmatic nucleus to the gonadotropin-releasing hormone system: combined tracing and light and electron microscopic immunocytochemical studies. *Journal of Comparative Neurology* 384 569–579.
- [80] Roenneberg, T., & Morse, D. (1993). Two circadian oscillators in one cell. *Nature*, 362(6418), 362-364.
- [81] Reiter RJ (1980) The pineal and its hormones in the control of reproduction in mammals. *Endocr Rev* 1,109–131
- [82] Foster DL, Ebling FJ and Claypool LE (1988) Timing of puberty by photoperiod. *Reprod Nutr Dev* 28,349–364.
- [83] Clark BR and Price EO (1981) Sexual maturation and fecundity of wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *J Reprod Fertil* 63,215–220.
- [84] Lee TM and McClintock MK (1986) Female rats in a laboratory display seasonal variation in fecundity. *J Reprod Fertil* 77,51–59.
- [85] Leadem CA (1988) Photoperiodic sensitivity of prepubertal female Fisher 344 rats. *J Pineal Res* 5,63–70.
- [86] Blask DE, Nodelman JL, Leadem CA and Richardson BA (1980) Influence of exogenously administered melatonin on the reproductive system and prolactin levels in underfed male rats. *Biol Reprod* 22,507–512.
- [87] Ebihara S, Marks T, Hudson DJ and Menaker M (1986) Genetic control of melatonin synthesis in the pineal gland of the mouse. *Science* 231,491–493.
- [88] Goto M, Oshima I, Tomita T and Ebihara S (1989) Melatonin content of the pineal gland in different mouse strains. *J Pineal Res* 7,195–204.
- [89] Bronson FH (1995) Seasonal variation in human reproduction: environmental factors. *Q Rev Biol* 70,141–164.
- [90] Adair LS (2001) Size at birth predicts age at menarche. *Pediatrics* 107,E59.
- [91] Wolanski N, Dickinson F and Siniarska A (1994) Seasonal rhythm of menarche as a sensitive index of living conditions. *Stud Hum Ecol* 11,171–191.

- [92] Gueresi P (1997) Monthly distribution of menarche in three provinces of north Italy. *Ann Hum Biol* 24,157–168.
- [93] Boyar R, Finkelstein J, Roffwarg H, Kapen S, Weitzman E and Hellman L (1972) Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N Engl J Med* 287,582–586.
- [94] Lincoln GA (2003) Neuroendocrine regulation of seasonal gonadotrophin and prolactin rhythms: lessons from the Soay ram model. *Reproduction* 59 (Suppl),131–147.
- [95] Kennaway DJ, Obst JM, Dunstan EA and Friesen HG (1981) Ultradian and seasonal rhythms in plasma gonadotropins, prolactin, cortisol, and testosterone in pinealectomized rams. *Endocrinology* 108,639–646.
- [96] Alvarez JD, Chen D, Storer E and Sehgal A (2003) Non-cyclic developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod* 69,81–91.
- [97] Bittman EL, Doherty LS, Huang L and Paroskie A (2003) Period gene expression in mouse endocrine tissues. *Am J Physiol* 285,R561–R569.
- [98] Tong Y, Guo H, Brewer JM, Lee H, Lehman MN and Bittman EL (2004) Expression of haPer1 and haBmal1 in Syrian hamsters: Heterogeneity of transcripts and oscillations in the periphery. *J Biol Rhythms* 19, 113–125.
- [99] Everett JW & Sawyer CH 1950 A 24-h periodicity in the 'LH-release apparatus' of female rats, disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology* 47 198–218.
- [100] Mosko SS & Moore RY 1979 Neonatal suprachiasmatic nucleus lesions: effects on the development of circadian rhythms in the rat. *Brain Research* 164 17–38.
- [101] van der Beek EM, Wiegant VM, van der Donk HA, van den Hurk R and Buijs RM (1993) Lesions of the suprachiasmatic nucleus indicate the presence of a direct vasoactive intestinal polypeptide-containing projection to gonadotrophin-releasing hormone neurons in the female rat. *J Neuroendocrinol* 5,137–144.
- [102] de la Iglesia HO, Blaustein JD and Bittman EL (1995) The suprachiasmatic area in the female hamster projects to neurons containing estrogen receptors and GnRH. *Neuroreport* 6,1715–1722.
- [103] Watson RE, Langub MC, Engle MG and Maley BE (1995) Estrogenreceptive neurons in the anteroventral periventricular nucleus are synaptic targets of the suprachiasmatic nucleus and perisuprachiasmatic region. *Brain Res* 689,254–264.

- [104] Chappell PE, White RS and Mellon PL (2003) Circadian gene expression regulates pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretory patterns in the hypothalamic GnRH-secreting GT1-7 cell line. *J Neurosci* 23,11202–11213.
- [105] JohnsonMH,LimA,FernandoD, DayML.Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reprod Biomed Online* (2002) 4:140. doi:10.1016/S1472-6483(10)61931-1
- [106] Ratajczak CK, Herzog ED, Muglia LJ. Clock gene expression in gravid uterus and extra-embryonic tissues during late gestation in the mouse. *ReprodFertilDev* (2010) 22:743–50. doi:10.1071/RD09243
- [107] Ratajczak CK,Boehle KL,Muglia LJ. Impaired steroidogenesis and implantation failure in *Bmal1*^{-/-} mice. *Endocrinol- ogy* (2009) 150:1879–85. doi: 10.1210/en.2008-1021
- [108] RatajczakCK, AsadaM, Allen GC, McMahan DG,Muglia LM, Smith D, etal.Generation of myometrium-specific*Bmal1* knock out mice for parturition analysis. *Reprod Fertil Dev* (2012) 24:759–67. doi:10.1071/RD11164
- [109] Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Jain, S., & Bradfield, C. A. (1998). The basic-helix–loop–helix-PAS orphan MOP3 forms transcriptionally active complexes with circadian and hypoxia factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5474-5479.
- [110] Kennaway DJ, Varcoe TJ, Mau VJ .Rhythmic expression of clock and clock-controlled genes in the rat oviduct. *Mol Hum Reprod* (2003) 9:503–7. doi: 10.1093/molehr/gag067
- [111] Yamada, K., Kawata, H., Mizutani, T., Arima, T., Yazawa, T., Matsuura, K., ... & Miyamoto, K. (2004). Gene expression of basic helix-loop-helix transcription factor, SHARP-2, is regulated by gonadotropins in the rat ovary and MA-10 cells. *Biology of reproduction*, 70(1), 76-82.
- [112] Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A., & Ko, M. S. (2004). Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell*, 6(1), 117-131.
- [113] Johnson, M. H., Lim, A., Fernando, D., & Day, M. L. (2002). Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reproductive biomedicine online*, 4(2), 140-145.
- [114] Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian clock mutant mice. *Science* 2005; 308:1043-1045.
- [115] Archer NS, Robilliard LD, Skene JD, Smits M, Williams A, Arendt J, et al. A length polymorphism in the circadian clock gene *per3* is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep* 2003; 26:413-415.

- [116] Carpen JD, Archer SN, Skene DJ, Smits M, von Schantz M. A single-nucleotide polymorphism in the 5'-untranslated region of the hPER2 gene is associated with diurnal preference. *J Sleep Res* 2005; 14:293-297.
- [117] Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinze WA, Virshup DM, Ptacek LJ & Fu Y-H 2001 An hper2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep-phase syndrome. *Science* 291 1040–1043.
- [118] Chen ST, Choo KB, Hou MF, Yeh KT, Kuo SJ & Chang JG 2005 Deregulated expression of the per1, per2 and per3 genes in breast cancers. *Carcinogenesis* 26 1241–1246.
- [119] Metz RP, Qu X, Laffin B, Earnest D & Porter WW 2006 Circadian clock and cell cycle gene expression in mouse mammary epithelial cells and in the developing mouse mammary gland. *Developmental Dynamics* 235 263–271.
- [120] Katzenberg D, Young T, Finn L, Lin L, King DP, Takahashi JS & Mignot E 1998 A Clock polymorphism associated with human diurnal preference. *Sleep* 21 569–576.
- [121] Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Katoh M et al. 2002 Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research* 109 121–128.
- [122] Robilliard, D. L., Archer, S. N., Arendt, J., Lockley, S. W., Hack, L. M., English, J & Von Schantz, M. (2002). The 3111 Clock gene polymorphism is not associated with sleep and circadian rhythmicity in phenotypically characterized human subjects. *Journal of sleep research*, 11(4), 305-312
- [123] Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H & Mishima Y 2005 The 3111T/C polymorphism of hClock is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *American Journal of Medical Genetics Part B. Neuropsychiatric Genetics* 133 101–104.
- [124] Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Kamei Y, Kitajima T, Shibui K, Katoh M, Watanabe T et al. 2004 A missense variation in human casein kinase I epsilon gene that induces functional alteration and shows an inverse association with circadian rhythm sleep disorders. *Neuropsychopharmacology* 29 1901–1909.
- [125] Gietzen KF & Virshup DM 1999 Identification of inhibitory autophosphorylation sites in casein kinase Bisanti L, Olsen J, Basso O, Thonneau P, Karmaus W, Juul S, Fletcher T,
- [126] Dumont, M., Benhabrou-Brun, D., & Paquet, J. (2001). Profile of 24-h light exposure and circadian phase of melatonin secretion in night workers. *Journal of Biological Rhythms*, 16(5), 502-511.

- [127] Bisanti L, Olsen J, Basso O, Thonneau P, Karmaus W, Juul S, Fletcher T, Bolumar F, Figatalamanca I, Pantelakis S et al. 1996 Shift work and subfecundity - a European multicenter study. *Journal of Occupational & Environmental Medicine* 38 352–358.
- [128] Knutsson A 2003 Health disorders of shift workers. *Occupational Medicine* 53 103–108.
- [129] Cone JE, Vaughan LM, Huete A & Samuels SJ 1998 Reproductive health outcomes among female flight attendants: an exploratory study. *Journal of Occupational & Environmental Medicine* 40 210–216.
- [130] Aspholm R, Lindbohm ML, Paakkulainen H, Taskinen H, Nurminen T & Tiitinen A 1999 Spontaneous abortions among Finnish flight attendants. *Journal of Occupational & Environmental Medicine* 41 486–491.
- [131] Zhu JL, Hjollund NH, Boggild H & Olsen J 2003 Shift work and subfecundity: a causal link or an artefact?. *Occupational and Environmental Medicine* 60 E12.
- [132] Ciemerych M., & Sicinski P. (2005). Cell cycle in mouse development. *Oncogene*, 2877-2892.
- [133] Veek, L. L. (1990). The morphological assessment of human oocytes and early conception. *Hand-Book of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*. CRC Press, Boca Raton, 353-369.
- [134] Hardarson, T., Hanson, C., Sjögren, A., & Lundin, K. (2001). Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Human Reproduction*, 16(2), 313-318.
- [135] Bjarnason, G. A., Jordan, R. C., Wood, P. A., Li, Q., Lincoln, D. W., Sothorn, R. B., ... & Ben-David, Y. (2001). Circadian expression of clock genes in human oral mucosa and skin: association with specific cell-cycle phases. *The American journal of pathology*, 158(5), 1793-1801.
- [136] Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302(5643), 255-259.
- [137] Kume, K., Zylka, M. J., Sriram, S., Shearman, L. P., Weaver, D. R., Jin, X., ... & Reppert, S. M. (1999). mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*, 98(2), 193-205.
- [138] Flach, G., Johnson, M. H., Braude, P. R., Taylor, R. A., & Bolton, V. N. (1982). The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO journal*, 1(6), 681.
- [139] Schultz, R. M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays*, 15(8), 531-538.

- [140] Pfister, S., Steiner, K. A., & Tam, P. P. (2007). Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development. *Gene Expression Patterns*, 7(5), 558-573.
- [141] Amano, T., Matsushita, A., Hatanaka, Y., Watanabe, T., Oishi, K., Ishida, N & Saeki, K. (2009). Expression and functional analyses of circadian genes in mouse oocytes and preimplantation embryos: Cry1 is involved in the meiotic process independently of circadian clock regulation. *Biology of reproduction*, 80(3), 473-483.
- [142] Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA,(2014), Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology, *Hum Reprod Update*. Mar-Apr;20(2):293-307.
- [143] Yasuhiro Umemura, Nobuya Koike, Munehiro Ohashi, Yoshiki Tsuchiya, Qing Jun Meng, Yoichi Minami, Masayuki Hara, Moe Hisatomi, and Kazuhiro Yagita,(2017). Involvement of posttranscriptional regulation of Clock in the emergence of circadian clock oscillation during mouse development, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 5; 114(36): E7479–E7488.
- [144] Xu J, Li Y, Wang Y, Xu Y, Zhou C. (2016) Loss of Bmal1 decreases oocyte fertilization, early embryo development and implantation potential in female mice, *Zygote*. Oct;24(5):760-7.
- [145] Seron-Ferre, M., Valenzuela, G. J., & Torres-Farfan, C. (2007). Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 81(3), 204-214.