



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ -ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
Α' ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΑΘΗΝΩΝ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΛΟΥΤΡΑΔΗΣ

ΜΟΝΑΔΑ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ, Γ.Ν.Α ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

Μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *per1* και *INCENP*
σε μορίδιο και βλαστοκύστη εμβρύου επίμυος

Μακρή Χριστιάννα – Βιολόγος

ΑΘΗΝΑ 2021

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Δρακάκης Πέτρος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».

Ντόμαλη Αικατερίνη: Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Αθηνών, Α' Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική ΓΝΑ «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ».

Μαυρογιάννη Δέσποινα: Βιολόγος, υπεύθυνη τμήματος στη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης της Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α. «ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ»,

Ευχαριστείες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος "Αναπαραγωγική και Αναγεννητική Ιατρική" του τμήματος Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Ως την ελάχιστη δυνατή μνεία, με την παρούσα παράγραφο οφείλω να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην εκπόνησή της.

Ευχαριστώ τον Δρ. Δημήτρη Λουτράδη Καθηγητή Μαιευτικής - Γυναικολογίας Πανεπιστημίου Αθηνών και διευθυντή Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», που εμπιστεύτηκε την αγάπη μου για το αντικείμενο και με συμπεριέλαβε στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Μαυρογιάννη Δέσποινα υπεύθυνη βιολόγο της Α' Μαιευτικής-Γυναικολογικής κλινικής Πανεπιστημίου Αθηνών στο Γ.Ν.Α. «Αλεξάνδρα», στη μονάδα εξωσωματικής γονιμοποίησης, για την πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση των πειραμάτων, στην κατανόηση των αποτελεσμάτων και που ήταν δίπλα μου για να λύσει κάθε μου απορία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κωνσταντίνο και Μαρία όπως και τον αδερφό μου Βαγγέλη για την ηθική τους στήριξη και τους ευγνωμονώ που στέκονται πάντα δίπλα μου τόσο στις επιτυχίες όσο και στις αποτυχίες δίνοντας μου τη δύναμη και την ελπίδα να συνεχίσω να προσπαθώ για το καλύτερο.

Στην οικογένειά μου...

Στους φίλους μου...

Περιεχόμενα

Περίληψη	7
Summary	8
A. Θεωρητικό Μέρος	9
A.1. Γονιμοποίηση.....	10
A.1.1 Εισαγωγή	10
A.1.2 Γονιμοποίηση στον ποντικό	13
A.2. Ανάπτυξη του εμβρύου (εμβρυογένεση)	19
A.2.1 Αρχή της αυλάκωσης	19
A.2.2 Ενεργοποίηση του Εμβρυϊκού Γονιδιώματος.....	22
A.3. Κυτταρική Διαίρεση	24
A.3.1 Εισαγωγή	24
A.3.2 Κυτταρικός Κύκλος.....	24
A.3.3 Κεντροσωματικός κύκλος / Κεντρόσωμα	27
A.3.4 Απορύθμιση κυτταρικού και κεντροσωματικού κύκλου	30
A.4.Μιτωτική Άτρακτος.....	31
A.4.1 Εισαγωγή	31
A.4.2 Κινητοχώρος	32
A.5. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μίτωσης	33
A.5.1 Aurora κινάσες.....	33
A.5.1.1 Aurora A.....	34
A.5.1.2 Aurora B.....	35
A.5.1.3 Aurora C.....	37
A.5.2 INCENP (Inner Centromere Protein)	37
A.5.3 Πρωτεΐνη INCENP και κυτταρικός κύκλος	38
A.5.4 Σύμπλοκο πρωτεϊνών-επιβατών	39
A.6. Κιρκάδιοι Ρυθμοί	42
A.6.1 Εισαγωγή	42
A.6.2 Κιρκάδιο σύστημα.....	44
A.6.3 Η δομή του μοριακού κιρκάδιου ρολογιού	45
A.6.4 Κυτταρικός κύκλος και κιρκάδιο σύστημα	48
A.6.5 Κιρκάδιοι Ρυθμοί και γονιμότητα	49
B. Πειραματικό Μέρος	51

B.1. Σκοπός της εργασίας	52
B.2. Γονίδια υπό μελέτη	53
B.2.1. G6PD gene (Glucose – 6 – Phosphate Dehydrogenase)	53
B.2.2. PER1 gene (Period 1)	54
B.2.3. INCENP gene (inner centromere protein).....	55
B.3. Πειραματική Πορεία	56
B.3.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ MUS MUSCULUS.....	57
B.3.1α. Υλικά	57
B.3.1β. Πειραματική Διαδικασία	57
B.3.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ	58
B.3.2α. Υλικά	58
B.3.2β. Πειραματική Διαδικασία	59
B.3.3. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ	62
B.3.4. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ mRNA	64
B.3.4α. Υλικά	64
B.3.4β. Πρωτόκολλο	65
B.3.5. Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΠΟ ΤΟ mRNA	66
B.3.5α. Υλικά	67
3.5β. Πρωτόκολλο	67
B.3.6. Η ΜΕΘΟΔΟΣ RT-PCR (ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ PER1 ΚΑΙ INCENP	69
B.3.6.α Πρωτόκολλο.....	74
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	76
Γ.1α Έκφραση του γονιδίου G6PD	76
Γ.1β Έκφραση του γονιδίου per1.....	77
Γ.1γ Έκφραση του γονιδίου INCENP	78
Γ. 2 Συγκεντρικά αποτελέσματα	79
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	81
Ε. Βιβλιογραφία	85

Περίληψη

Στα θηλαστικά ο σχηματισμός του ζυγωτού προκύπτει ύστερα από τη συνένωση του αρσενικού με το θηλυκό προπυρήνα. Αρχικά, το γονιμοποιημένο ωάριο διαιρείται σταδιακά σε δύο, τέσσερα και οκτώ κύτταρα. Μέχρι το πρώιμο στάδιο των 8 κυττάρων το σχήμα των βλαστομεριδίων παραμένει ευδιάκριτο. Το έμβρυο στο στάδιο των 8-βλαστομεριδίων είναι μια χαλαρή δομή με αρκετό χώρο μεταξύ των κυττάρων. Στο στάδιο αυτό, μετά την 3^η αυλάκωση, τα κύτταρα αλλάζουν συμπεριφορά, συσφίγγονται (*compaction*) και σχηματίζουν μια σφαίρα. Το έμβρυο στο στάδιο αυτό ονομάζεται **μορίδιο**. Όταν το μορίδιο εισέλθει στην κοιλότητα της μήτρας, υγρό αρχίζει να διεισδύει μέσω της διάφανης ζώνης στους μεσοκυττάριους χώρους της έσω κυτταρικής μάζας. Οι μεσοκυττάριοι χώροι αρχίζουν να συνενώνονται και τελικά σχηματίζεται μια κοιλότητα, ο βλαστοκύστος. Το έμβρυο χαρακτηρίζεται ως **βλαστοκύστη** και αποτελείται από 16 έως 32 κύτταρα.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της έκφρασης των PER1 και INCENP πρωτεϊνών στο αναπτυξιακό στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης σε έμβρυα ποντικού.

Η PER1 πρωτεΐνη αποτελεί προϊόν του Per1 γονιδίου, το οποίο ανήκει στη μεγαλύτερη κατηγορία των "ωρολόγιων γονιδίων" που αποτελούν τη βασική δομή του κirkάδιου ρολογιού, το οποίο ρυθμίζει τους μεταβολικούς και φυσιολογικούς ρυθμούς σε διάφορους οργανισμούς. Η πρωτεΐνη INCENP είναι μια από τις βασικές υπομονάδες του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών που περιλαμβάνουν την Aurora-B πρωτεΐνη ως βασική μονάδα. Η δράση της INCENP είναι απαραίτητη για τη σωστή ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων κατά τον αποχωρισμό τους στους αντίθετους πόλους στη διαδικασία της διαίρεσης των κυττάρων.

Για τη μελέτη της έκφρασης πραγματοποιήθηκε απομόνωση του ολικού RNA στα στάδια αυτά αφού προηγήθηκε εργαστηριακή καλλιέργεια των εμβρύων σε συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον της μήτρας. Στη συνέχεια μέσω της τεχνικής της Real Time-PCR υπολογίστηκε η συνολική έκφραση των πρωτεϊνών.

Summary

In mammals, the formation of the zygote becomes apparent after the coalescence of the female and the male pronucleus. Initially the fertilized ovum is divided into 2, 4 and 8 cells. By the early stage of eight cells, the shape of the blastomeres remains clear. The embryo is a loose structure with enough space between the cells. After the 3rd division the cells change behavior, tighten and form a sphere. The embryo at this stage is called a **morula**. When the morula enters the uterine cavity, fluid begins to penetrate through the zona pellucida into the intercellular space of the inner cell mass. The intercellular space begins to coalesce and eventually forms a cavity, the blastocoel. The embryo is characterized as a **blastocyst** and consists of 16 to 32 cells.

The aim of this dissertation is to study the expression of PER1 and INCENP proteins in the developmental stage of the morula and the blastocyst in mouse embryos.

PER1 protein is a product of the Per1 gene, which belongs to the largest category of "clock genes" that make up the basic structure of the circadian clock, which regulates metabolic and physiological rhythms in various organisms. The INCENP protein is one of the key subunits of the protein-passenger complex that includes Aurora-B protein as a key unit. The action of INCENP is necessary for the proper alignment of chromosomes during their separation at opposite poles during the cell cycle.

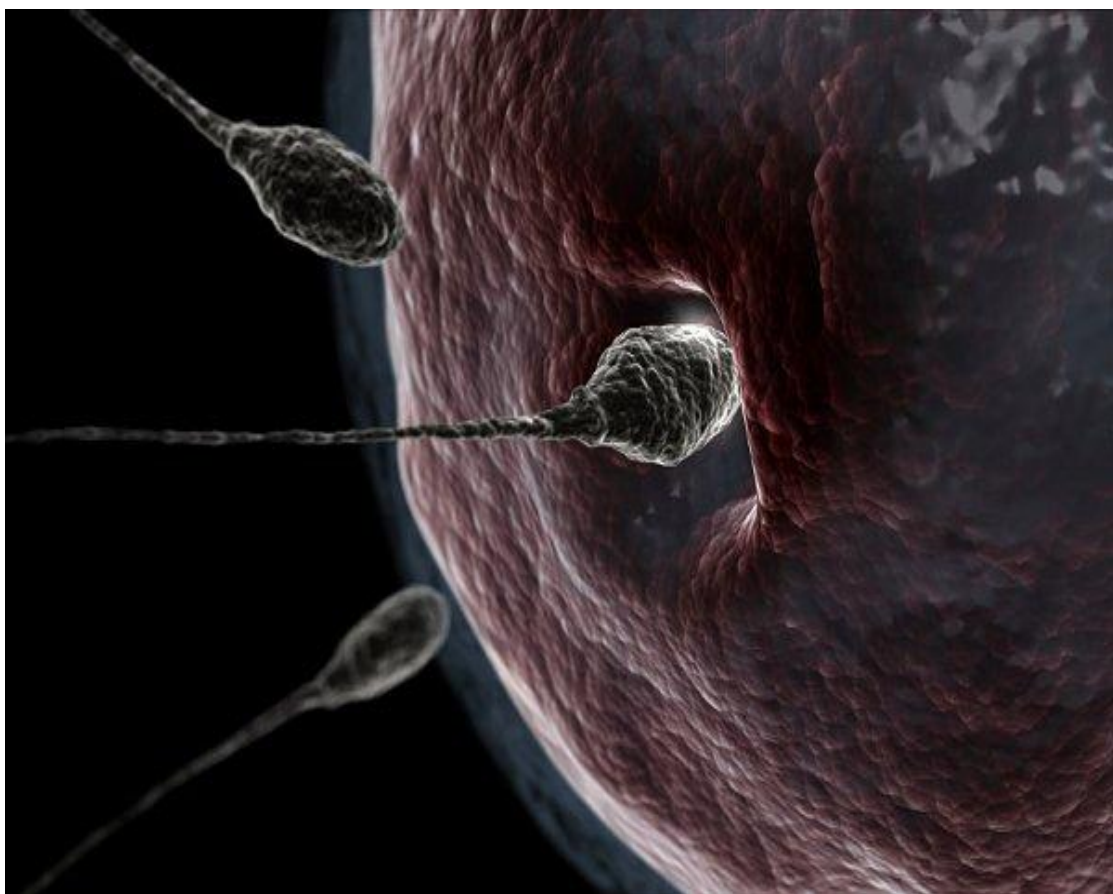
To study the expression of these proteins, the total RNA was isolated in the specific stages after the in-vitro culture of the embryos in conditions that simulate the environment of the uterus. Then, through the Real Time-PCR technique, the total expression of the proteins was calculated.

A. Θεωρητικό Μέρος

A.1. Γονιμοποίηση

A.1.1 Εισαγωγή

Με τον όρο *γονιμοποίηση* αναφερόμαστε σε μια σειρά γεγονότων που αρχίζει με την επαφή του σπερματοζωαρίου με το δευτερογενές ωοκύτταρο (Εικόνα 1) και τελειώνει με την ένωση πατρικών και μητρικών χρωμοσωμάτων στην μετάφαση της πρώτης μιτωτικής διαίρεσης του ζygώτη.



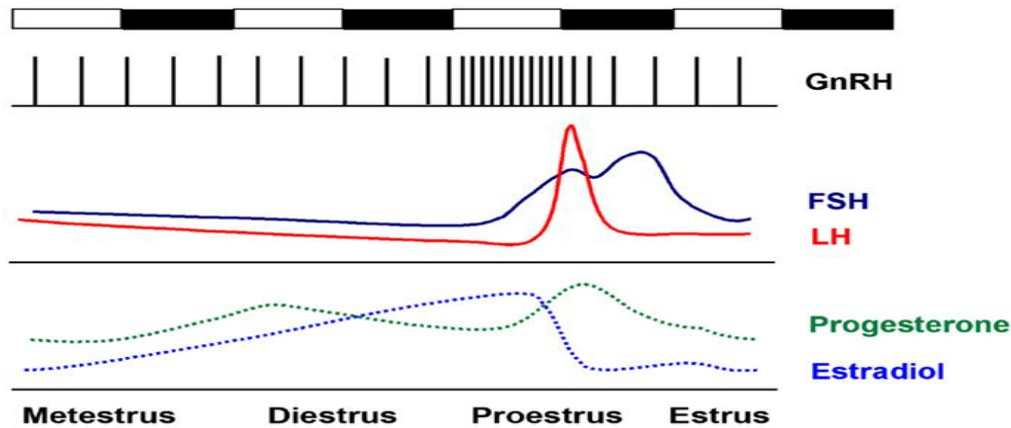
Εικόνα 1: Στιγμιότυπο της εισόδου ενός σπερματοζωαρίου στο ωάριο

Το ωάριο και το σπερματοζωάριο υφίστανται μια σειρά διαφοροποιήσεων, καθώς η βιολογική τους ωρίμανση θα τα καταστήσει ικανά για γονιμοποίηση. Στα περισσότερα θηλαστικά τα σπερματοζωάρια που απελευθερώνονται κατά τη σύζευξη δεν είναι ικανά για γονιμοποίηση. Προκειμένου να καταστούν ικανά, πρέπει να υποβληθούν σε ένα τελικό στάδιο ωρίμανσης, το οποίο επιτελείται στην αναπαραγωγική οδό του θηλυκού και καλείται *ενεργοποίηση* (*capacitation*). Η βιολογική ωρίμανση των ωοκυττάρων ολοκληρώνεται κατά τη διάρκεια της ωογένεσης με τη βοήθεια ορμονών.

Η γνώση για τον οιστρικό κύκλο του ποντικού υπάρχει ήδη από τις κλασσικές μελέτες του Allen (1922) (1). Πέρα από τη διακοπή λόγω εγκυμοσύνης, ψευδοκύησης ή άλλων αιτιών, ο ποντικός φυσιολογικά τείνει να παρουσιάσει συμπτώματα οίστρου, συμπεριλαμβανομένης και της συμπεριφοράς ζευγαρώματος, κάθε 4 ή 5 μέρες γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως πολυοιστρικό θηλαστικό. Ρυθμική αλληλεπίδραση των ορμονών της υπόφυσης και των ωοθηκών οδηγούν στη διασφάλιση της γονιμοποίησης. Η περιοδικότητα του οίστρου που παρατηρείται σε ώριμα ποντίκια, είναι αποτέλεσμα των κυκλικών αλλαγών που δημιουργούνται στις ωοθήκες. Ο οιστρικός κύκλος του ποντικού ορίζεται λοιπόν ως το διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών οίστρων ή καλύτερα δύο ωοθυλακιωρρηξιών στην ίδια οιστρική περίοδο. Ο οιστρικός κύκλος μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις περιόδους ή φάσεις (στον οίστρο, τον μέτοιστρο, τον δίοιστρο και τον πρόϊστρο).

Περιβαλλοντικοί παράγοντες (κυρίως η ποσότητα και η ποιότητα του φωτός κατά τη διάρκεια της ημέρας) διεγείρουν την έκκριση της ορμόνης **GnRH** (*–Gonadotropin Releasing Hormone*) από τον υποθάλαμο και την πρόσληψή της από την υπόφυση. Ο *μέτοιστρος* και ο *δίοιστρος* χαρακτηρίζονται από χαμηλά αλλά σταδιακά αυξηνόμενα επίπεδα οιστραδιόλης, η οποία κατά τον *πρόϊστρο* προάγει την απελευθέρωση της GnRH από τον υποθάλαμο.

Η υπόφυση με τη σειρά της εκκρίνει την γοναδοτροπίνη **FSH** (*– Follicle Stimulating Hormone*, *θυλακιοτρόπος ορμόνη*), υπό την επίδραση της οποίας ωριμάζει ένας αριθμός αρχέγονων ωοθυλακίων αλλά ένα μόνο φθάνει στην πλήρη ωρίμανση - γραφιανό ωοθυλάκιο - και απελευθερώνεται από την ωοθήκη. Κατά τη διαδικασία αυτή παράγονται οιστρογόνα τα οποία προκαλούν το ενδομήτριο να εισέλθει στην θυλακική ή στην παραγωγική του φάση και συγχρόνως διεγείρουν την υπόφυση να εκκρίνει τη γοναδοτροπίνη **LH** (*– Luteinizing Hormone*, *ωχρινοτρόπος ορμόνη*), ελαττώνοντας την απελευθέρωση της FSH (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: καμπύλες διακύμανσης των βασικών ορμονών κατά τον οιστρικό κύκλο του ποντικού.

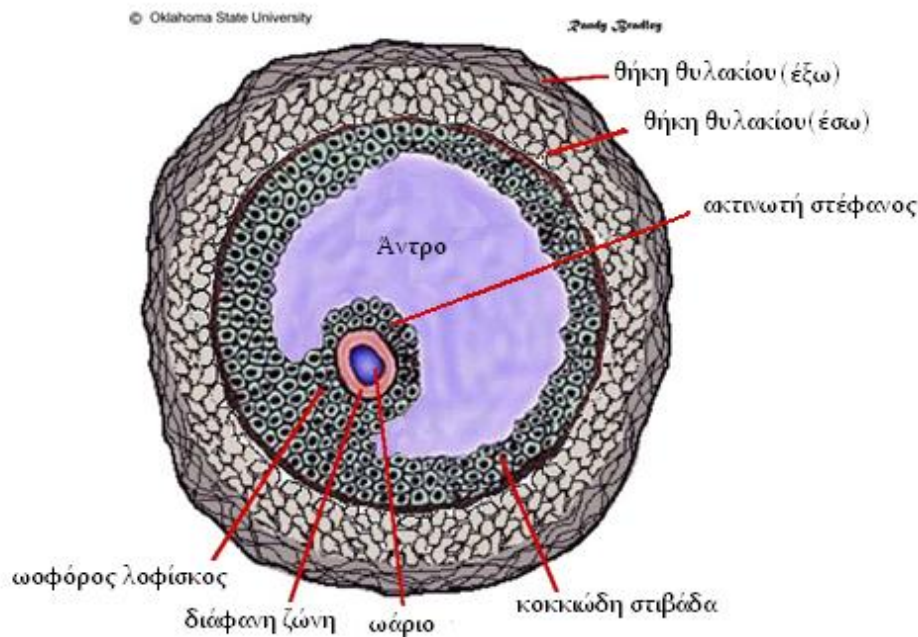
Όλες αυτές οι φάσεις λαμβάνουν χώρα με μία κυκλική αλληλουχία, εκτός από τις περιόδους του άνοιστρου (απουσία κύκλων) στα εποχιακώς οιστρικά ζώα (προβατίνα, αίγα, φοράδα) όπως επίσης στην άνοιστρο της εγκυμοσύνης και στην άνοιστρο των πρώιμων σταδίων μετά τον τοκετό (άνοιστρος γαλουχίας) για όλα τα είδη.

Γενικά κατά τον οιστρικό κύκλο παρατηρούνται σοβαρές μεταβολές στις ωοθήκες, στη μήτρα και στους ωαγωγούς καθώς επίσης και στη συμπεριφορά των ζώων. Το σύνολο των μεταβολών αυτών αποσκοπεί στην ελευθέρωση ενός ή περισσότερων ωοκυττάρων κατάλληλων για γονιμοποίηση, στην ταυτόχρονη διέγερση της επιθυμίας του θηλυκού για σύζευξη και στην προπαρασκευή της μήτρας για την αποδοχή του εμβρύου (2) (3). Όλες οι παραπάνω μεταβολές τελούν υπό τον έλεγχο νευροενδοκρινικών μηχανισμών.

A.1.2 Γονιμοποίηση στον ποντικό

Το πρωτογενές ωοθυλάκιο του ποντικού περιβάλλεται από μια διαφανή στιβάδα εξωκυττάριου υλικού, η οποία ονομάζεται **διάφανη ζώνη** (*zona pellucida*) και εκκρίνεται από τα ωοθυλακικά κύτταρα. Αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες, τις ZP1 (Mr 200 KDa το διμερές που συνδέεται με δισουλφιδικούς δεσμούς, 120 KDa το μονομερές), ZP2 (Mr 120 KDa), και ZP3 (Mr 83 KDa). Η μονάδα ZP2:ZP3 (14nm μήκος) επαναλαμβάνεται και σχηματίζει νημάτια (2-3 μm μήκος / 7nm πλάτος). Τα νημάτια αυτά συνδέονται ακανόνιστα από την ZP1. Η ZP3 είναι ο υποδοχέας του σπερματοζωαρίου (4). Ο πολυπεπτιδικός κορμός της mZP3 αποτελείται από 402 αμινοξέα (Mr 44 KDa). Ολιγοσακχαρίτες συνδέονται με N-δεσμούς (σύνδεση σε ασπαραγίνη – 3 ή 4 τέτοιες συνδέσεις στο μόριο) και O-δεσμούς (σύνδεση σε σερίνη ή/και θρεονίνη) στον πολυπεπτιδικό δεσμό. Επιπλέον, η διαφανής ζώνη περιβάλλεται από μία ή δύο στοιβάδες κοκκιωδών κυττάρων και από τη βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα κοκκιώδη κύτταρα. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο αναπτυσσόμενο εξελίσσεται σε δευτερογενές ωοθυλάκιο.

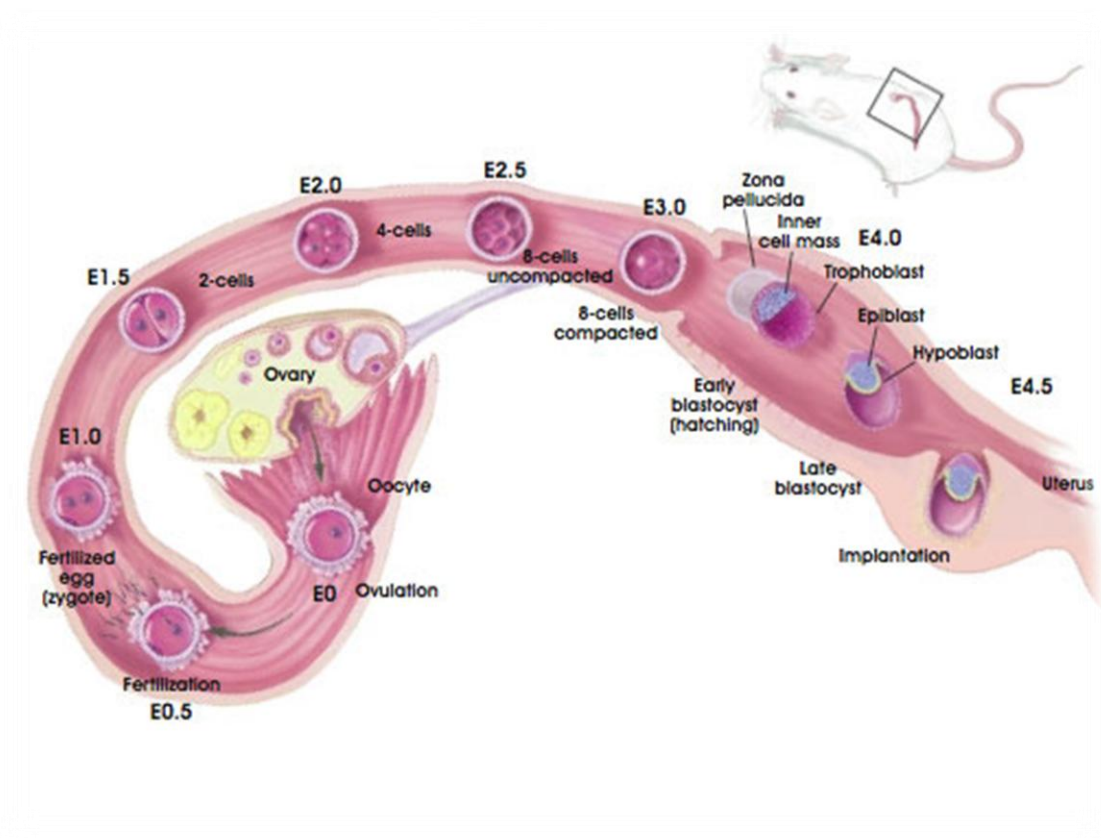
Στην αρχική του φάση, το δευτερογενές ωοθυλάκιο διαφέρει από το πρωτογενές, διότι περιλαμβάνει δύο υποπληθυσμούς κυττάρων που προέρχονται από τον πολλαπλασιασμό και την εν συνεχεία διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων. Αυτά διακρίνονται σε κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας και σε κύτταρα της έσω και της έξω θήκης. Παράλληλα, στα κύτταρα της θήκης που διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά εμφανίζονται υποδοχείς της LH, ενώ στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας εμφανίζονται υποδοχείς της FSH. Τα κύτταρα της έσω θήκης παράγουν ανδρογόνα που διαχέονται μέσω της βασικής μεμβράνης και μετατρέπονται σε οιστρογόνα απο ένζυμα (αρωματάση) στα κοκκιώδη κύτταρα. Κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης δημιουργούνται μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους σε μία ενιαία κοιλότητα γεμάτη υγρό, η οποία καλείται άντρο. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο που φτάνει στο πιο εξελιγμένο στάδιο της αυξητικής τροχιάς καλείται ώριμο, τριτογενές ή *γρραφιανό* ωοθυλάκιο και σχηματίζει το ωάριο (Εικόνα 3) (5).



Εικόνα 3: Γραφικό Ωοθυλάκιο(κατά Patten)

Κατά την είσοδο στον αγωγό, το σύμπλοκο ωοκυττάρου-ακτινωτής στεφάνου προωθείται στη χοάνη, μέσω μιας διαδικασίας που βασίζεται στη συνάφεια του κροσσώτου επιθηλίου της χοάνης με το εξωκυττάριο στρώμα του πλέγματος. Στη συνέχεια το σύμπλεγμα «αναδύεται», οπότε το εξωκυττάριο στρώμα συμπιέζεται και έτσι το σύμπλεγμα προωθείται διαμέσου του στενού στομίου προς τον αγωγό. Παρόλο που σε αρκετά είδη ζώων παρατηρείται χημειοτακτισμός των σπερματοζωαρίων προς τα ωάρια, στην περίπτωση των θηλαστικών αυτό δεν είναι σίγουρο ότι ισχύει. Η μετακίνησή τους, υποστηρίζεται ως ένα βαθμό από τις μυϊκές συσπάσεις της αναπαραγωγικής οδού του θηλυκού, οι οποίες υποβοηθούν την άνοδό τους από τον κόλπο προς τους αγωγούς μέσω της μήτρας (Parkes, 1960).

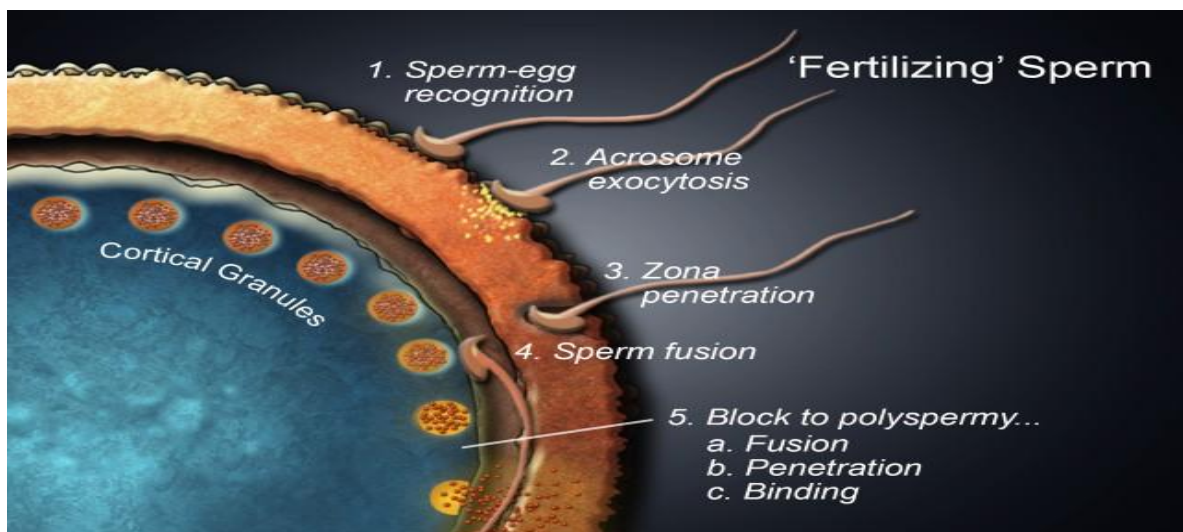
Η γονιμοποίηση στον ποντικό πραγματοποιείται στη λήκυθο του ωαγωγού η οποία είναι η ευρύτερη μοίρα του ωαγωγού και βρίσκεται πολύ κοντά στην ωοθήκη (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Αναπαραγωγικό σύστημα θηλυκού ποντικού και επισκόπηση της ανάπτυξης του εμβρύου από τη στιγμή της ωορρηξίας E0 (εμβρυική μέρα 0), μέχρι τη γονιμοποίηση E0,5 και την εμφύτευση E5 στην μήτρα.

Ένας σχετικά μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων (λιγότερα από 100) έχουν εντοπιστεί γύρω από το ωάριο τη στιγμή της γονιμοποίησης (6). Το δευτερογενές ωοκύτταρο θα πρέπει να γονιμοποιηθεί μέσα σε 12 με 24 ώρες από την ωοθυλακιωρρηξία αλλιώς εκφυλίζεται. Τα σπερματοζωάρια συνήθως είναι παρών στην λήκυθο τη στιγμή της ωοθυλακιωρρηξίας, όμως υπάρχει μια καθυστέρηση αρκετών ωρών μέχρι τη στιγμή της διείσδυσης του σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο. (7). Αυτή η καθυστέρηση είναι εμφανώς μικρότερη (1 με 3 ώρες) σε ποντίκια με τεχνητή ωοθυλακιωρρηξία σε σχέση με τη φυσική (3 με 5 ώρες).

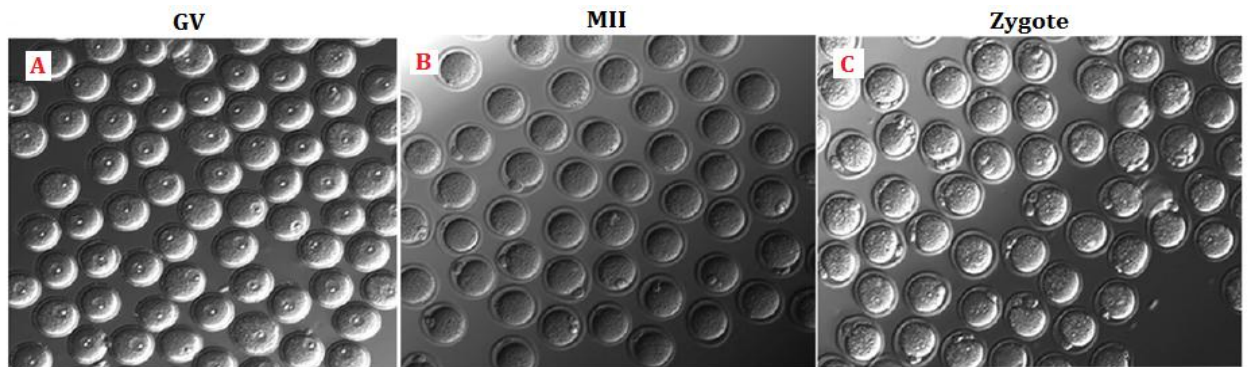
Τα σπερματοζωάρια που φτάνουν στους ωαγωγούς διατηρούν την γονιμοποιητική τους ικανότητα για περίπου 6 ώρες παρόλο που η κινητικότητά τους διατηρείται για 13,5 ώρες (8). Τα σπερματοζωάρια που παραμένουν στην μήτρα φαγοκυτταρώνονται από πολυμορφοπύρρινα λευκοκύτταρα μέσα σε 20 ώρες από τη γονιμοποίηση (6). Σύμφωνα με τον Edwards και τον Gates (9), το σπερματοζωάριο του ποντικού διεισδύει τα ωοθυλακικά κύτταρα και τη διάφανη ζώνη μέσα σε 1 ώρα περίπου και παραμένει στον περιλεκιθικό χώρο για άλλα 50 λεπτά. Μόλις το σπερματοζωάριο έλθει σε επαφή με το ωάριο, αρχίζει η ρήξη των κοκκίων του φλοιού στο σημείο επαφής και εξαπλώνεται προοδευτικά σαν κύμα σε όλη την επιφάνεια του ωαρίου. Η μεμβράνη των κοκκίων συντήκεται με την κυτταρική μεμβράνη του ωαρίου ενώ το περιεχόμενό τους απελευθερώνεται μεταξύ της λεκιθικής και της κυτταρικής μεμβράνης στον περιλεκιθικό χώρο. Τα υδρολυτικά ένζυμα που απελευθερώνονται τροποποιούν τους υποδοχείς της διάφανης ζώνης έτσι ώστε να μην είναι δυνατόν να δεσμεύει άλλα σπερματοζωάρια (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Διείσδυση του σπερματοζωαρίου και προστασία απο την πολυσπερμία

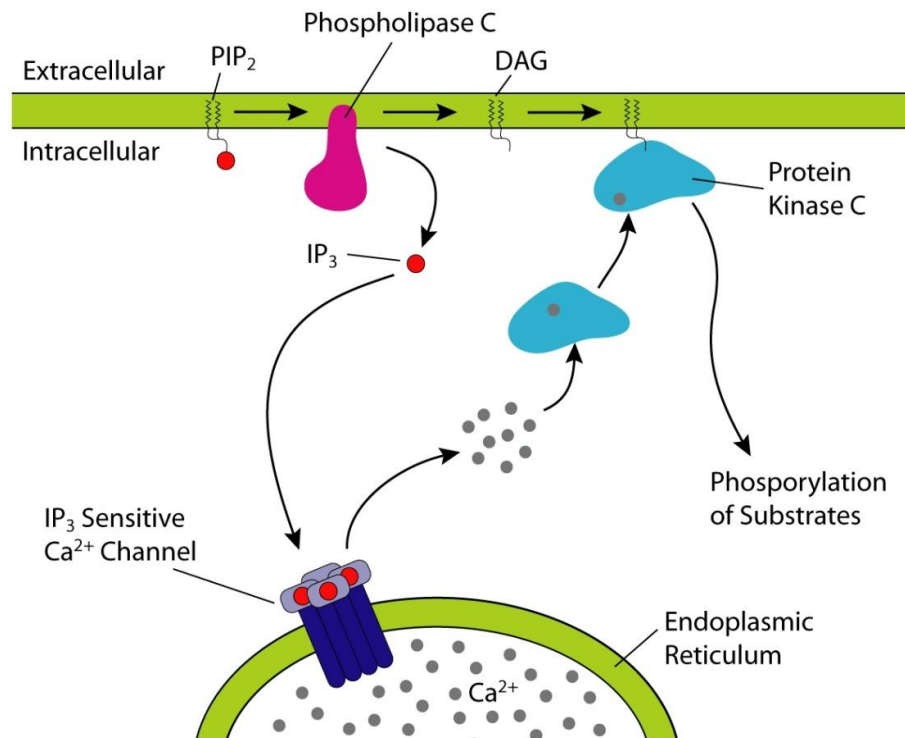
Οι προπυρήνες σχηματίζονται 4 ½ ώρες μετά και 25 ώρες μετά την διείσδυση του σπερματοζωαρίου γίνεται η πρώτη αυλάκωση. Οι δύο προπυρήνες μεταναστεύουν αργά

ο ένας προς τον άλλο, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Στα θηλαστικά οι δύο προπυρήνες δεν συντήκονται για να σχηματίσουν το ζυγωτικό πυρήνα. Αντίθετα, οι προπυρηνικοί φάκελοι αποσυγκροτούνται κατά τη συνάντησή τους και τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται με τη μιτωτική άτρακτο έτοιμα για την πρώτη αυλάκωση (Εικόνα 6).



Εικόνα 6: Αντιπροσωπευτικές εικόνες ωοκυττάρων του ποντικού σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. A) βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle - GV) B) στη μετάφαση II με ευδιάκριτο το 1^ο πολικό σωματίδιο και C) ζygώτης με τους δύο προπυρήνες.

Η σύντηξη των γαμετών προκαλεί αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, η οποία ευθύνεται για όλα τα γεγονότα που ακολουθούν. Η απελευθέρωση Ca^{2+} προκαλείται μέσω ειδικής ενεργοποίησης του μονοπατιού της φωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) από μια φωσφολιπάση C (PLC), η οποία μεταφέρεται από το σπερματοζωάριο. Η PLC διασπά το λιπίδιο PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5- biphosphate) σε DAG (diacylglycerol) και IP_3 (inositol 1,4,5- triphosphate). Τα IP_3 και DAG είναι δευτερογενή μηνυματοφόρα μόρια (Εικόνα 7) (10).



Εικόνα 7: Η ενεργοποίηση του μονοπατιού της φωσφορικής ινοσιτόλης (IP_3) από μια φωσφολιπάση C, η οποία διασπά το λιπίδιο PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5- biphosphate) σε DAG (diacylglycerol) και IP_3 (inositol 1,4,5- triphosphate).

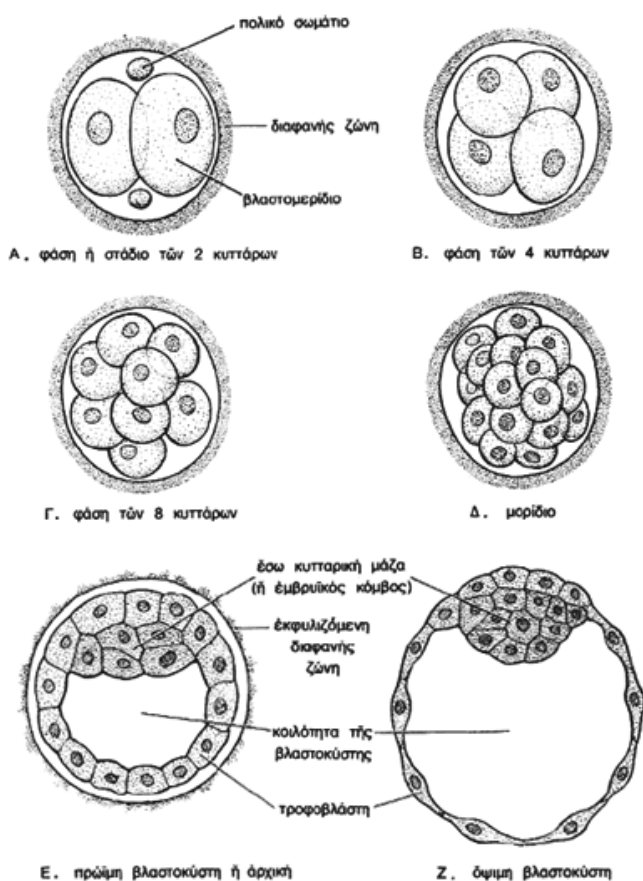
Το IP_3 συνδέεται με τους υποδοχείς του στο ενδοπλασματικό δίκτυο στο ενδόπλασμα στο σημείο εισόδου του σπερματοζωαρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση Ca^{2+} από το ενδοπλασματικό δίκτυο στο σημείο αυτό. Η τοπική αυτή απελευθέρωση προκαλεί μια δεύτερη φάση απελευθέρωσης Ca^{2+} . Ιόντα Ca^{2+} συνδέονται με υποδοχείς ευαίσθητους στο Ca^{2+} στο ενδοπλασματικό δίκτυο γύρω από τα κοκκία φλοιού. Η σύνδεση Ca^{2+} στους υποδοχείς αυτούς έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση περισσότερου Ca^{2+} που εξαπλώνεται σαν κύμα στην περιφέρεια (φλοιό) του ωαρίου και προκαλεί τη ρήξη των κοκκίων του φλοιού.

Το **DAG** ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C, η οποία φωσφορυλιώνει την πρωτεΐνη που ανταλλάσσει ιόντα Na^+ για H^+ (Na^+ / H^+ exchange protein). Ως αποτέλεσμα είναι η είσοδος Na^+ και η έξοδος H^+ και η αύξηση του pH στο ωάριο από 6.8 σε 7.3, γεγονός που «ξυπνά» το ωάριο από τη μεταβολική του αδράνεια.

Α.2. Ανάπτυξη του εμβρύου (εμβρυογένεση)

Α.2.1 Αρχή της αυλάκωσης

Η ανάπτυξη του εμβρύου είναι μια πολύπλοκη διαδικασία και γίνεται σε διαδοχικά στάδια μετά τη γονιμοποίηση. Με την είσοδο του σπερματοζωαρίου στο ωάριο αρχίζουν οι μετατοπίσεις των υλικών του κυτταροπλάσματος. Το κυτταρόπλασμα του ωαρίου περιέχει κυτταροπλασματικούς προσδιοριστές, οι οποίοι κατανέμονται σε διαφορετικά κύτταρα μετά την αυλάκωση. Οι κυτταροπλασματικοί προσδιοριστές, άμεσα ή έμμεσα ενεργοποιούν ή απενεργοποιούν γονίδια και ελέγχουν τα συμβάντα της διαφοροποίησης στο πρώιμο έμβryo. Μετά τη γονιμοποίηση μια αλληλουχία από κυτταρικές διαιρέσεις έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό του πρώιμου εμβρύου.



Εικόνα 8: Σχηματική αναπαράσταση της ανάπτυξης του εμβρύου του ποντικού από το στάδιο των 2 κυττάρων έως το στάδιο της βλαστοκύστης.

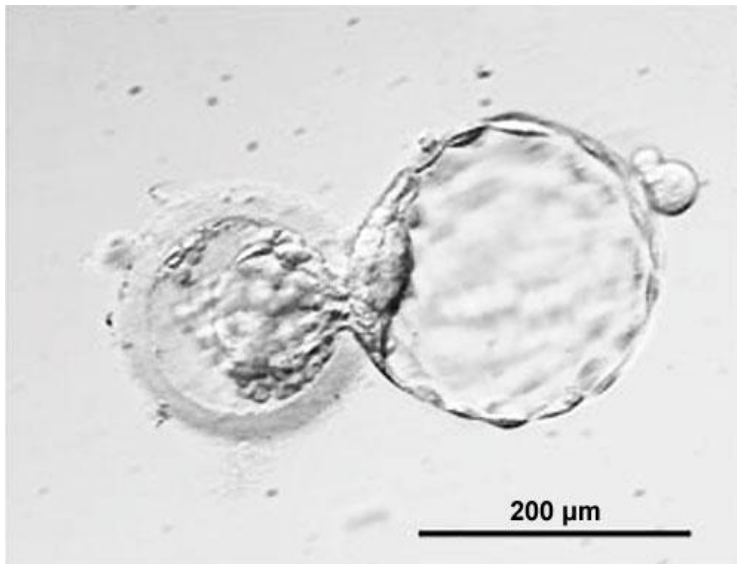
Το ζυγωτό αρχίζει να διαιρείται μιτωτικά και τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες διαιρέσεις ονομάζονται βλαστομερίδια και έχουν το μισό μέγεθος του μητρικού. Κάθε βλαστομερίδιο θεωρείται ότι είναι ικανό εάν απομονωθεί, να σχηματίσει ένα πλήρες έμβρυο. Όσο η αυλάκωση προχωρεί, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται και γίνονται προοδευτικά μικρότερα, ενώ το μέγεθος και το γενικό σχήμα του εμβρύου παραμένει το ίδιο (Εικόνα 8).

Η πρώτη αυλάκωση λαμβάνει χώρα περίπου 24 ώρες μετά από τη γονιμοποίηση, ενώ η δεύτερη και η τρίτη, οι οποίες δεν είναι εντελώς συγχρονισμένες, ακολουθούν ανά διάστημα περίπου 12 ωρών. Ο αργός ρυθμός της πρώιμης ανάπτυξης συσχετίζεται ενδεχομένως με το χρόνο που απαιτεί η προετοιμασία της μήτρας για την εμφύτευση. Μέχρι το πρώιμο στάδιο των 8 κυττάρων το σχήμα των βλαστομεριδίων παραμένει ευδιάκριτο. Το έμβρυο στο στάδιο των 8-βλαστομεριδίων είναι μια χαλαρή δομή με αρκετό χώρο μεταξύ των κυττάρων. Στο στάδιο αυτό, μετά την 3^η αυλάκωση, τα κύτταρα αλλάζουν συμπεριφορά, συσφίγγονται (*compaction*) και σχηματίζουν μια σφαίρα. Οι στενές συνδέσεις (*tight junctions*) που σχηματίζονται μεταξύ των εξωτερικών κυττάρων της μπάλας απομονώνουν ερμητικά το εσωτερικό από το εξωτερικό μέρος της.

Μετά από τρεις έως τέσσερις διαιρέσεις ο ζυγώτης, χαρακτηρίζεται ως **μορίδιο** και αποτελείται από 12 έως 16 κύτταρα. Στο στάδιο του μοριδίου, ο ζυγώτης φτάνει σε τρεις ημέρες από τη γονιμοποίηση. Τα κύτταρα διαιρούνται και σχηματίζεται μορίδιο 16-βλαστομεριδίων. Αυτό το πρώιμο μορίδιο αποτελείται από μια ομάδα κυττάρων (1 έως 2) στο εσωτερικό, τη λεγόμενη **έσω-κυτταρική μάζα** ή **εμβρυοβλάστη** (*inner cell mass*) η οποία περιβάλλεται από μια πολυπληθέστερη ομάδα από εξωτερικά κύτταρα. Οι απόγονοι των εξωτερικών κυττάρων σχηματίζουν την **τροφοβλάστη**, η οποία δεν παράγει εμβρυϊκές δομές αλλά συνεισφέρει στον σχηματισμό του πλακούντα. Όταν το μορίδιο εισέλθει στην κοιλότητα της μήτρας, υγρό αρχίζει να διεισδύει μέσω της διάφανης ζώνης στους μεσοκυττάριους χώρους της έσω κυτταρικής μάζας. Οι μεσοκυττάριοι χώροι αρχίζουν να συνενώνονται και τελικά σχηματίζεται μια κοιλότητα, ο **βλαστόκοιλος**. Το έμβρυο χαρακτηρίζεται ως βλαστοκύστη και αποτελείται από 16 έως 32 κύτταρα.

Τα τροφοβλαστικά κύτταρα αντλούν ιόντα νατρίου μέσα στο βλαστόκοιλο, τα οποία προκαλούν και την ωσμωτική είσοδο νερού. Σε αυτό το στάδιο η βλαστοκύστη περιβάλλεται ακόμη από την διαφανή ζώνη και ο συνολικός όγκος του εμβρύου παραμένει σταθερός. Ωστόσο, καθώς η κοιλότητα της βλαστοκύστης αυξάνεται, με συνέπεια τη

διόγκωσή της, η διαφανής ζώνη προοδευτικά εξασθενεί και λεπτύνεται μέσω της συντονισμένης πίεσης που ασκείται από τη διόγκωση του εμβρύου και της προοδευτικής διάβρωσής της από ένζυμα που εκκρίνονται από τη βλαστοκύστη. Η διαφανής ζώνη τελικώς ρήγνυται και από την οπή η βλαστοκύστη εκκολάπτεται ("hatching"), δηλαδή εξέρχεται σταδιακά από τη διαφανή ζώνη, από την οποία αποσπάται εντελώς (Εικόνα 9).



Εικόνα 9: Ρήξη διάφανης ζώνης και έξοδος της βλαστοκύστης

Μετά την απόδρασή του από τη διάφανη ζώνη, το έμβρυο συγκολλάται (P-CAM μόρια συγκόλλησης της τροφοβλάστης συνδέονται ομοφιλικά με ίδια μόρια στα κύτταρα του τοιχώματος της μήτρας) στο τοίχωμα της μήτρας, εκκρίνει πρωτεάσες (collagenase, plasminogen activators, μεταλλοπρωτεάσες) που πέπτουν τα μεσοκυττάρια υλικά στο τοίχωμα της μήτρας, έτσι ώστε να ξεκινήσει η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο (5) (11)(12).

A.2.2 Ενεργοποίηση του Εμβρυικού Γονιδιώματος

Η ενεργοποίηση του εμβρυικού γονιδιώματος είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα έμβρυο αρχίζει να μεταγράφει το νεοσυσταθέν γονιδίωμα του. Τόσο η χρονική στιγμή της ενεργοποίησης του γονιδιώματος όσο και η συστοιχία των γονιδίων που ενεργοποιούνται πρέπει να ελέγχονται σωστά (13).

Η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (Embryonic Genome Activation - EGA) μετά τη γονιμοποίηση είναι μια σύνθετη διαδικασία που απαιτεί μια συντονισμένη σειρά πυρηνικών και κυτταροπλασματικών ενεργειών, τα οποία μαζί εξασφαλίζουν ότι το μητρικό και το πατρικό γονιδίωμα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν πιστά και να αναδιαρθρωθούν πριν ξεκινήσει η μεταγραφή (14).

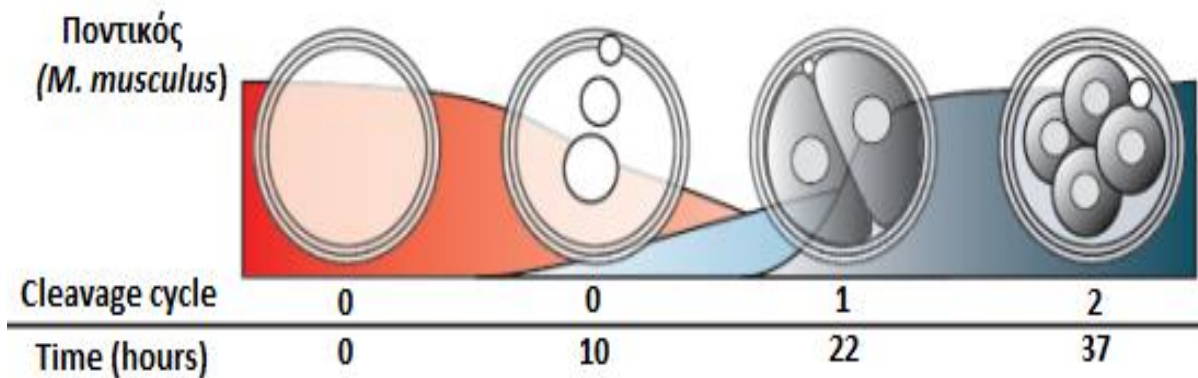
Αρχικά, το μητρικό γονιδίωμα ελέγχει όλες τις πτυχές της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης, καθώς το γονιμοποιημένο ωάριο βρίσκεται σε μία μεταγραφική ηρεμία στην αρχή της ανάπτυξης του. Κατά την περίοδο του επαναπρογραμματισμού η ακατάλληλη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στο έμβρυο. Ως εκ τούτου, ο ακριβής έλεγχος κατά τη διάρκεια του EGA είναι απαραίτητος για την σωστή εμβρυογένεση. Στον ποντικό, όπως και στα περισσότερα θηλαστικά, η ενεργοποίηση του γονιδιώματος λαμβάνει χώρα σταδιακά ξεκινώντας προς το τέλος του σταδίου του 1-κυττάρου και αποτελείται από τουλάχιστον τρεις αναγνωρίσιμες φάσεις (I,II,III). Τη μεταγραφή χωρίς μετάφραση που ξεκινά στο τέλος του σταδίου του 1-κυττάρου (I), τη μεταγραφή σε συνδυασμό με τη μετάφραση που όμως δεν ξεκινάει μέχρι το αρχικό στάδιο των 2-κυττάρων (II), και την ισχυρή μεταγραφή σε συνδυασμό με τη μετάφραση που δεν ξεκινάει πριν το όψιμο στάδιο των 2-κυττάρων (III).

Η μειωτική ωρίμανση ενεργοποιεί την αποδόμηση των μητρικών μεταγράφων, τα οποία είναι κατα 90% έτοιμα μέχρι το στάδιο των δύο κυττάρων. Η προεμφυτευτική ανάπτυξη στον ποντικό χαρακτηρίζεται από τρεις κύριες μεταβάσεις, κάθε μία από τις οποίες περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στο σχέδιο της γονιδιακής έκφρασης.

- Η πρώτη αλλαγή αναφέρεται στην μετάβαση από το μητρικό στον ζυγωτικό έλεγχο και έχει τρεις λειτουργίες. Η πρώτη είναι η καταστροφή μεταγράφων άμεσα συνδεδεμένων με το ωοκύτταρο. Η δεύτερη είναι η αντικατάσταση των μητρικών μεταγράφων που κοινώς απαντώνται στο ωοκύτταρο και στο έμβρυο, με ζυγωτικά μεταγγραφα. Παρόλο που η έκφραση αυτών των μεταγράφων δεν έχει

σαν αποτέλεσμα τον εκ νέου προγραμματισμό της γονιδιακής έκφρασης με την κλασική του έννοια, η έκφρασή τους είναι απαραίτητη για περεταίρω ανάπτυξη. Η τρίτη λειτουργία είναι η προαγωγή ενός ριζικού επαναπρογραμματισμού του σχεδίου της γονιδιακής έκφρασης που συνδέεται με την δημιουργία νέων μεταγράφων που δεν εκφράζονται στο ωκύτταρο.

- Η δεύτερη μετάβαση είναι η σύσφιξη των βλαστομεριδίων στο στάδιο των 8-κυττάρων όπως ήδη περιγράψαμε και
- η τρίτη μετάβαση είναι το στάδιο της δημιουργίας της βλαστοκύστης (Εικόνα 10) (15)



Εικόνα 10: Η κόκκινη καμπύλη αντιπροσωπεύει την αποικοδόμηση των μητρικών μεταγράφων που είναι πλέον σε μια ασταθή μορφή. Η ανοιχτή και η σκούρα μπλε καμπύλη δείχνουν το μικρό και αντίστοιχα το μεγάλο κύμα της εμβρυϊκής γονιδιακής ενεργοποίησης. Το τελευταίο εμβρυϊκό στάδιο που παρουσιάζεται είναι και το αναπτυξιακό στοιχείο που απαιτεί το μεγαλύτερο ποσοστό ζυγωτικών μεταγράφων. (Wael Tadros, 2009)

A.3. Κυτταρική Διαίρεση

A.3.1 Εισαγωγή

Τα περισσότερα κύτταρα υφίστανται μία σειρά γεγονότων τα οποία οδηγούν στο διπλασιασμό των συστατικών τους και στη συνέχεια στη διαίρεση τους σε δύο πανομοιότυπα κύτταρα. Αυτός ο κύκλος των γεγονότων καλείται **κυτταρικός κύκλος**. Η αξιοπιστία και η ακρίβεια του κυτταρικού κύκλου παίζει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση του κυττάρου, ιδιαίτερα στους πολυκύτταρους οργανισμούς, γι' αυτό και πρέπει να ρυθμίζεται. Η απώλεια ελέγχου μπορεί να οδηγήσει σε ανώμαλη ανάπτυξη, ακόμα και σε πρόκληση καρκίνου. Η **κυτταρική διαίρεση** είναι η διαδικασία κατά την οποία ένα αρχικό κύτταρο διαιρείται σε δύο θυγατρικά. Η ακριβοδίκαιη και ισόρροπη κατανομή του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα, απαιτεί τη συντονισμένη ολοκλήρωση τριών ξεχωριστών και ανεξάρτητων κύκλων που αναφέρονται ως κυτταρικός, κεντροσωματικός και πυρηνικός κύκλος (χρωμοσωματικός αποχωρισμός) (16).

A.3.2 Κυτταρικός Κύκλος

Ο κυτταρικός κύκλος (Εικόνα 11) διακρίνεται σε τέσσερις φάσεις :

(1) Φάση G1 (Gap 1), το διάστημα μεταξύ της ολοκλήρωσης της μίτωσης και έναρξης της φάσης S όπου τα κύτταρα συνθέτουν όλα τα απαραίτητα συστατικά για να δημιουργηθούν τα δύο θυγατρικά κύτταρα. Αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού είναι η αύξηση του μεγέθους του κυττάρου.

(2) Συνθετική φάση (S), κατά την οποία πραγματοποιείται η αντιγραφή του γενετικού υλικού. Αυτή η φάση του κυτταρικού κύκλου είναι η μεγαλύτερη και διαρκεί 10-12 ώρες σε ένα ευκαρυωτικό κυτταρικό κύκλο 24 ωρών.

(3) Φάση G2 (Gap 2), το διάστημα μεταξύ της ολοκλήρωσης της φάσης S και έναρξης της μίτωσης. Κατά τη διάρκεια της φάσης αυτής, τα κύτταρα ελέγχουν και επιδιορθώνουν τη δομή του DNA και επιτελούν τις απαραίτητες προετοιμασίες για τη μίτωση.

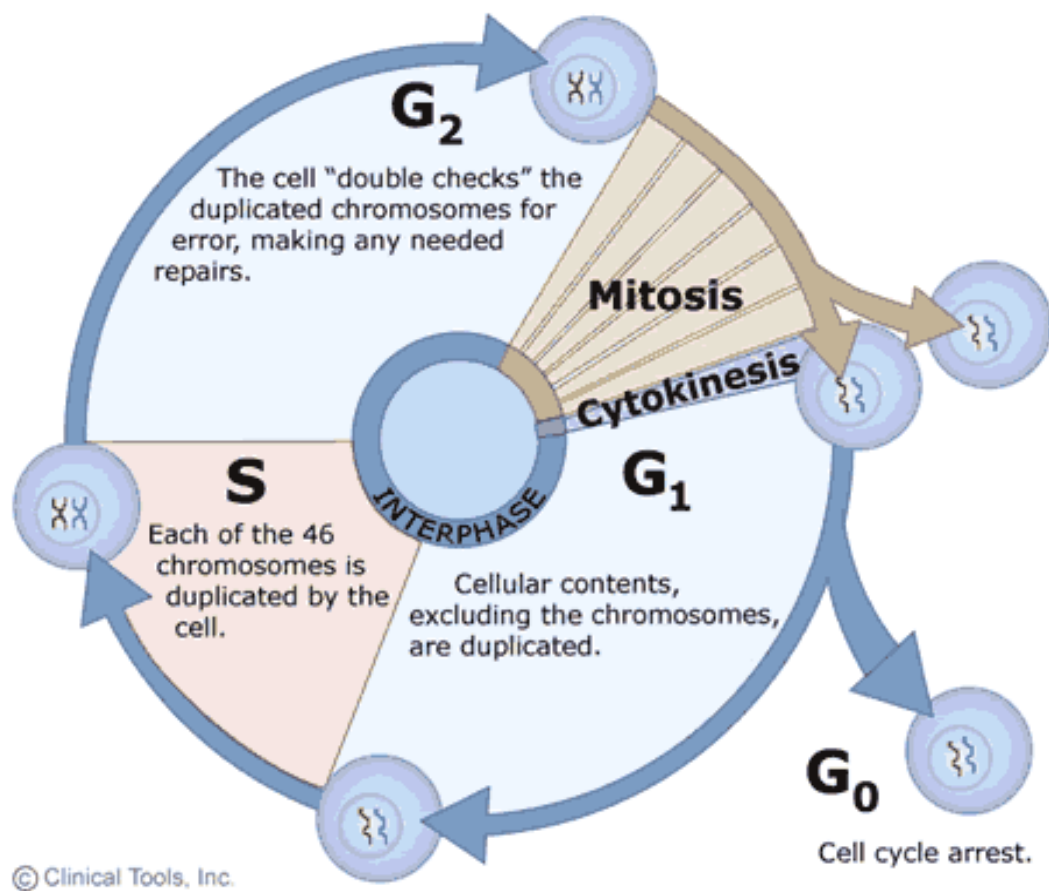
Οι φάσεις G1, S και G2 συνιστούν τη Μεσόφαση

(4) Φάση Μίτωσης (M), όπου γίνεται η ισόρροπη κατανομή του γενετικού υλικού στα θυγατρικά κύτταρα και η διαίρεση του κυτταροπλάσματος (κυτταροκίνηση). Η διαδικασία της μίτωσης είναι σύνθετη και αυστηρά καθορισμένη. Η ακολουθία των γεγονότων διαιρείται σε φάσεις, που αντιστοιχούν στην ολοκλήρωση μιας σειράς αναπαραγωγικών δραστηριοτήτων και την έναρξη της επόμενης. Αυτά τα στάδια είναι:

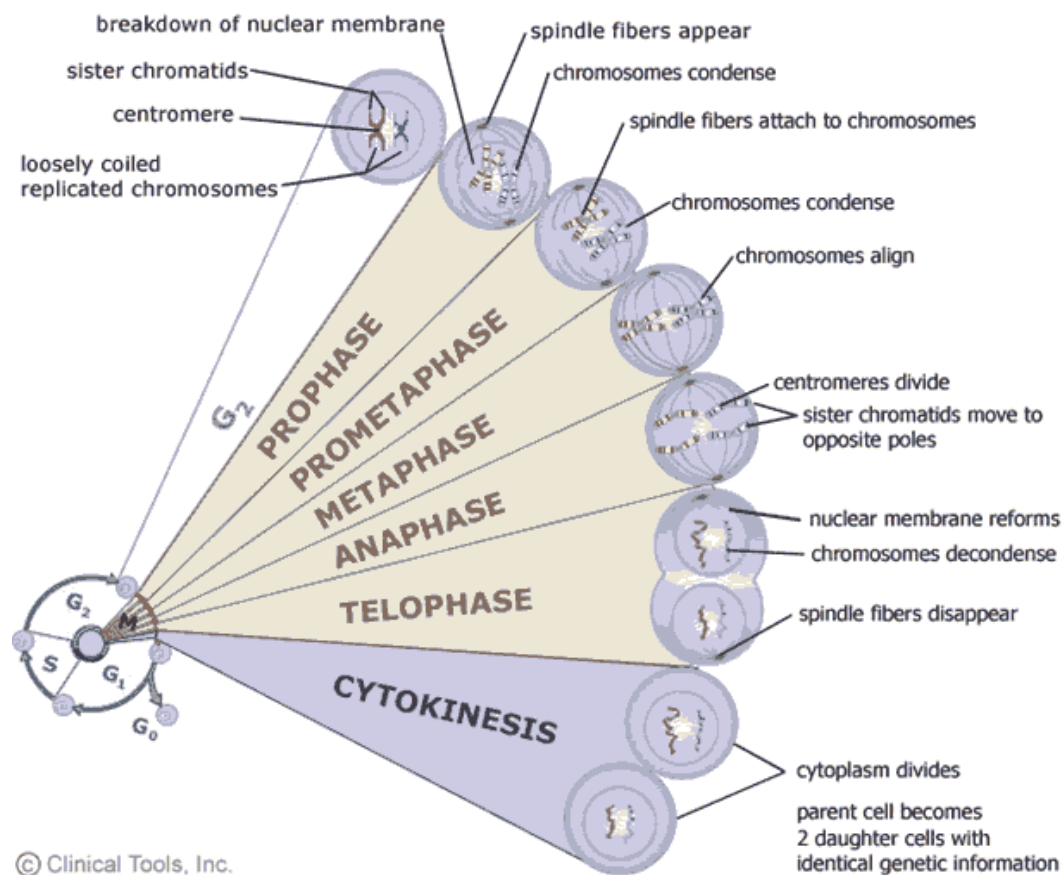
- **Πρόφαση:** σταδιακή συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων και έναρξη του σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου
- **Προμετάφαση:** αποδόμηση πυρηνικού περιβλήματος και πρόσδεση μικροσωληνίσκων στα χρωμοσώματα
- **Μετάφαση:** παράταξη χρωμοσωμάτων στον ισημερινό της ατράκτου
- **Ανάφαση:** οι δύο αδελφές χρωματίδες κάθε αντιγραμμένου χρωμοσώματος διαχωρίζονται και συγχρόνως έλκονται από την άτρακτο στους δύο αντίθετους πόλους του κυττάρου
- **Τελόφαση:** αποσυμπύκνωση χρωμοσωμάτων και επανασχηματισμός της πυρηνικής μεμβράνης. Γύρω από την κάθε ομάδα των διαχωρισμένων χρωμοσωμάτων συναρμολογείται ένα πυρηνικό περίβλημα ώστε να σχηματιστούν δύο πυρήνες

Με το τέλος της τελόφασης το κυτταροπλάσμα διαιρείται μέσω του συσταλτού δακτυλίου (contractile ring), ο οποίος αποτελείται από μια δέσμη ινιδίων ακτίνης και μυοσίνης και προκαλεί περίσφιξη. Στο ισημερινό πεδίο συγκεντρώνονται μικροσωληνίσκοι και κυστίδια και σχηματίζουν το ενδιάμεσο σώμα (mid body). (17)

Με το τέλος της κυτταροκίνησης και τη δημιουργία δύο νέων κυττάρων εξαφανίζεται το ενδιάμεσο σώμα (εικόνα 11).



Εικόνα 11: Οι τέσσερις φάσεις του κυτταρικού κύκλου ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Στις φάσεις G₁ και G₂ δεν παρατηρούνται μορφολογικές αλλαγές. Στη φάση S πραγματοποιείται διπλασιασμός του γενετικού υλικού σε σχέση με το αρχικό διπλοειδές κύτταρο, ενώ κατά τη φάση M πραγματοποιείται διπλασιασμός των θυγατρικών κυττάρων. Ένα ευκαρυωτικό κύτταρο χρειάζεται περίπου 10-20 ώρες για να πραγματοποιήσει ένα κύκλο. Το στάδιο αναστολής του κυτταρικού κύκλου είναι γνωστό ως G₀ και πολλοί τύποι κυττάρων παραμένουν σε αυτή την κατάσταση για αρκετά χρόνια.



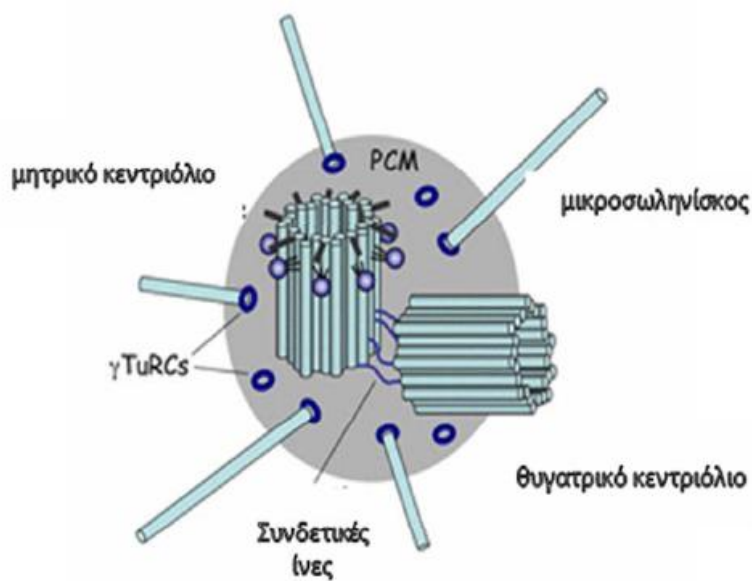
Εικόνα 12: Αναλυτικά τα στάδια της Μίτωσης

A.3.3 Κεντροσωματικός κύκλος / Κεντρόσωμα

Εξετάζοντας, παράλληλα με τον κυτταρικό κύκλο, τις μορφολογικές αλλαγές του κεντροσώματος γίνεται αντιληπτό ότι το κεντρόσωμα κατέχει ρυθμιστικό και ουσιώδη ρόλο στη σωστή πρόοδο και ολοκλήρωση του κυτταρικού κύκλου. Υπάρχει μία σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ των δύο που απαιτείται για τις μεταβάσεις από στάδιο σε στάδιο. Η απορρύθμιση του κεντροσωματικού κύκλου, επηρεάζει τη σωστή έκβαση του κυτταρικού κύκλου και διαταράσσει την ακεραιότητα του γενετικού υλικού.

Τα κεντροσώματα αποτελούν κέντρα οργάνωσης των μικροσωληνίσκων και στα ζωικά κύτταρα σχηματίζουν τη μιτωτική άτρακτο κατά την κυτταρική διαίρεση (18).

Ανάλυση σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο αποκάλυψε ότι το κεντροσώμα αποτελείται από δυο κυλινδρικές δομές που είναι κάθετες μεταξύ τους και ονομάζονται κεντριόλια (centrioles), καθένα εκ των οποίων σχηματίζεται από εννέα τριάδες μικρών μικροσωληνίσκων και περιβάλλεται από άμορφη περικεντριολική ύλη (PCM), περιοχή στην οποία λαμβάνει χώρα η πυρήνωση (Εικόνα 13), με αποτέλεσμα πολωμένους μικροσωληνίσκους με το θετικό τους άκρο να επεκτείνεται (22). Απ' την άλλη μεριά, τα κεντριόλια παίζουν ρόλο στην οργάνωση της κεντροσωματικής ύλης.



Εικόνα 13: Δομή κεντροσώματος

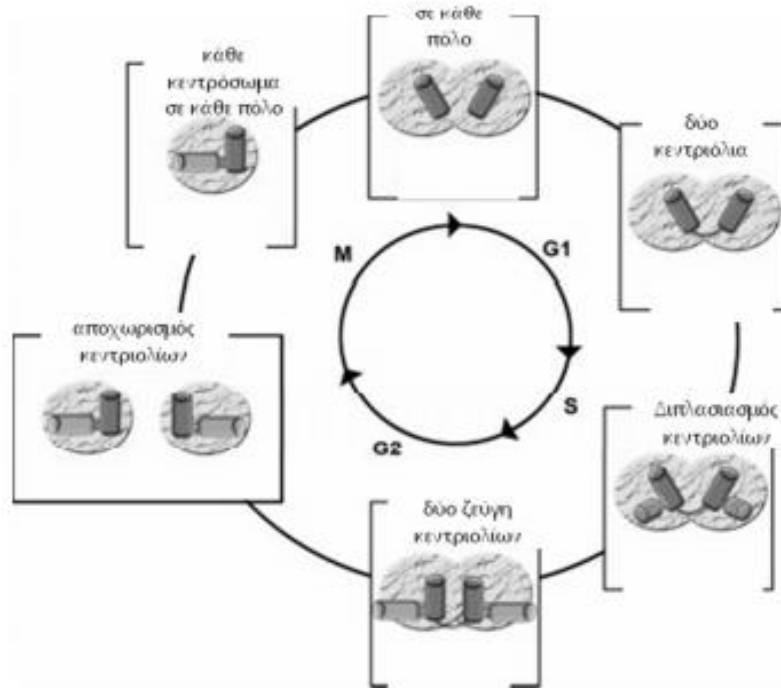
Είναι μικρά οργανίδια που συχνά σχετίζονται με την πυρηνική μεμβράνη και επιτελούν τρεις σημαντικές λειτουργίες. Συμβάλουν στην πυρήνωση των μικροσωληνίσκων και κατ'επέκταση στον πολυμερισμό των υπομονάδων τουμπουλίνης για τη συγκρότηση της δομής των μικροσωληνίσκων, οργανώνουν τους μικροσωληνίσκους, διαδραματίζοντας με τον τρόπο αυτό, ουσιώδη ρόλο στη διαμόρφωση και τη δομή της μιτωτικής ατράκτου και τέλος, διπλασιάζονται μία φορά σε κάθε κυτταρικό κύκλο (19,20). Στα περισσότερα κύτταρα των σπονδυλωτών τα κεντροσώματα είναι τα μόνα οργανίδια χωρίς μεμβράνη, πλησίον του κέντρου του κυττάρου και κοντά στην περιοχή του πυρήνα (21).

Κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου τα κεντροσώματα υφίστανται μια σειρά μορφολογικών αλλαγών, που ονομάζεται κύκλος του κεντροσώματος και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- το διπλασιασμό του κεντροσώματος (centrosome duplication)
- την ωρίμανση του κεντροσώματος (centrosome maturation)
- το διαχωρισμό (centrosome separation)
- και τον αποπροσανατολισμό των κεντριολίων του κεντροσώματος (centriole disorientation)

Μετά την κυτταροκίνηση, ένα φυσιολογικό διπλοειδές κύτταρο κληρονομεί ένα κεντρόσωμα με δύο κεντριολία, το οποίο διπλασιάζεται κατά την S φάση, ενώ ο αποχωρισμός των δύο κεντροσωμάτων λαμβάνει χώρα κατά τη G2/M μετάβαση. Οι μοριακές λεπτομέρειες όσον αφορά τον διπλασιασμό του κεντροσώματος δεν είναι ξεκάθαρες. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι ο διπλασιασμός αρχίζει κατά τη G1/S μετάβαση και συμπίπτει με την εξαρτώμενη από την Cdk2 φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων του κεντροσώματος. Τα θυγατρικά κεντριολία στη συνέχεια εμφανίζονται σε κάθε κεντρόσωμα, στην ή κοντά στην περικεντριολική ύλη και καταλήγουν ως ώριμες δομές στο τέλος της G2 φάσης. Μέχρι τη Μίτωση και τα δύο κεντροσώματα έχουν αποκτήσει το μέγιστο ποσό της περικεντριολικής ύλης.

Μετά το διπλασιασμό, τα κεντροσώματα πρέπει να αποχωριστούν και να μεταναστεύσουν περιφερειακά της πυρηνικής μεμβράνης, ώστε στην πρόφαση να βρίσκονται σε αντίθετες θέσεις, οι οποίες αντιστοιχούν στους δύο πόλους της μιτωτικής ατράκτου. Αυτή η κίνηση εξαρτάται από την παρουσία μικροσωληνίσκων και βρίσκεται υπό τον έλεγχο μοριακών κινητήρων (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Κεντροσωματικός κύκλος

Επιπρόσθετα, τα κεντροσώματα αποτελούν μία δυναμική δομή στην οποία εντοπίζονται μόρια με ρυθμιστικό ρόλο στο χρωμοσωματικό αποχωρισμό. Μελέτες δείχνουν ότι το κεντρόσωμα απαιτείται για πολλές μεταβάσεις φάσεων κατά τον κυτταρικό κύκλο, περιλαμβάνοντας τη G1/S μετάβαση, τη G2/M μετάβαση και τη μετάβαση από τη Μετάφαση στην Ανάφαση (21).

A.3.4 Απορύθμιση κυτταρικού και κεντροσωματικού κύκλου

Όπως αναφέρθηκε ο κεντροσωματικός κύκλος πραγματοποιείται παράλληλα με τον κυτταρικό κύκλο, αποφεύγοντας λάθη που επηρεάζουν το χρωμοσωματικό αποχωρισμό. Ο κεντροσωματικός κύκλος και ο κύκλος του γενετικού υλικού συμβαίνει μόνο μια φορά κατά τη διάρκεια ενός κυτταρικού κύκλου. Απώλεια αυτής της συντονισμένης λειτουργίας μεταξύ των δύο κύκλων οδηγεί σε λανθασμένο χρωμοσωματικό αποχωρισμό και σε απόκλιση του κανονικού χρωμοσωματικού αριθμού. Οποιοσδήποτε μορφολογικές ή

λειτουργικές ανωμαλίες του κεντροσώματος επηρεάζουν την οργάνωση και λειτουργία της μιτωτικής συσκευής, έχουν ως συνέπεια την ανισορροπία του γενετικού υλικού.

Έχει προταθεί ότι κεντροσωματικές ανωμαλίες οδηγούν σε ανευπλοειδία και καρκινογένεση. Σε μια ποικιλία καρκινικών όγκων, παρατηρούνται αλλαγές στον κεντροσωματικό αριθμό, το σχήμα και τη λειτουργία, μια ένδειξη της σχέσης μεταξύ κεντροσωματικών ανωμαλιών και ανευπλοειδίας. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν έχει διευκρινιστεί εάν οι κεντροσωματικές ανωμαλίες αποτελούν την αιτία ή συνιστούν συνέπεια της καρκινογένεσης.

A.4.Μιτωτική Άτρακτος

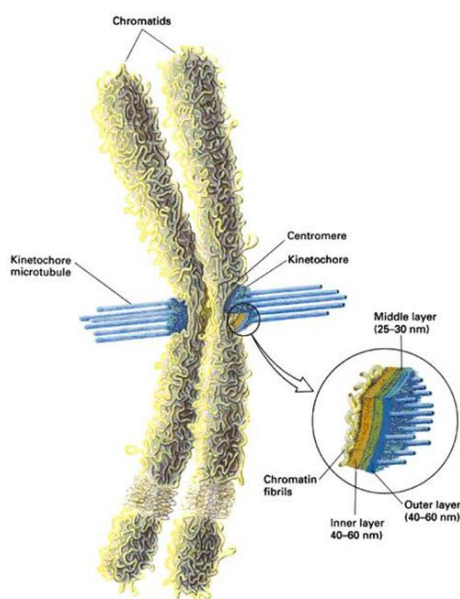
A.4.1 Εισαγωγή

Το κύτταρο εισερχόμενο στο στάδιο της μίτωσης έχει το γενετικό του υλικό διπλασιασμένο και οργανωμένο σε χρωμοσώματα. Πρέπει να διαχωρίσει με ακρίβεια τα διπλασιασμένα χρωμοσώματα στα δύο θυγατρικά κύτταρα, διαδικασία η οποία διεξάγεται από μία συσκευή μικροσωληνίσκων που καλείται μιτωτική άτρακτος. Τα μιτωτικά χρωμοσώματα διαθέτουν δυο αδελφά χρωματίδια, τα οποία συγκροτούνται μεταξύ τους στην περιοχή του **κεντρομέρους**. Σε μια ειδική συντηρημένη αλληλουχία DNA του κεντρομέρους δεσμεύεται κατά την πρόφαση ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο, το οποίο θα συγκροτήσει κατόπιν τον **κινητοχώρο**, ο οποίος συνιστά την κρίσιμη περιοχή αλληλεπίδρασης των μικροσωληνίσκων της ατράκτου για τη χρωμοσωματική κίνηση και τον αποχωρισμό. (Pihaan & Doxsey, 1999)

Επίσης, η λειτουργία της ατράκτου, αποσκοπεί στον καθορισμό της θέσης που θα πραγματοποιηθεί η διαδικασία της κυτταροκίνησης. Λανθασμένος χρωμοσωματικός αποχωρισμός μπορεί να οδηγήσει σε ανευπλοειδία, η οποία με τη σειρά της μπορεί να προκαλέσει γονιδιακή αστάθεια και εμφάνιση καρκίνου. Για την αποφυγή λαθών, η μιτωτική συσκευή έχει μηχανισμούς ελέγχου, οι οποίοι παρακολουθούν εάν όλα τα χρωμοσώματα έχουν προσδεθεί κατάλληλα στην άτρακτο προτού επιτραπεί στο κύτταρο να προχωρήσει στην Ανάφαση. Επομένως, η μιτωτική συσκευή μπορεί να μελετηθεί ως μία μακρομοριακή συσκευή, η οποία ελέγχει τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης (Walczak & Heald, 2008).

A.4.2 Κινητοχώρος

Ο κινητοχώρος κατά κύριο λόγο εξυπηρετεί την κίνηση των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης και της μίτωσης. Πάνω στους κινητοχώρους «προσδένονται» οι μικροσωληνίσκοι, οι οποίοι προέρχονται από τους αντίθετους πόλους και οργανώνουν την άτρακτο, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται οι κατάλληλες δυνάμεις και να κινούνται τα χρωμοσώματα προς την αντίθετη κατεύθυνση. Ο αριθμός των μικροσωληνίσκων που προσδένονται σε κάθε κινητοχώρο είναι διαφορετικός ανάλογα με το είδος του οργανισμού. Οι κινητοχώροι των αδελφών χρωματιδίων ενός χρωμοσώματος είναι προσανατολισμένοι προς την αντίθετη κατεύθυνση. Αυτός ο αμφιτελικός προσανατολισμός (*amphitelic orientation*) δημιουργεί την τάση μεταξύ των κινητοχώρων των αδελφών χρωματιδίων και σταθεροποιεί την πρόσδεση των μικροσωληνίσκων. Με τον τρόπο αυτό υπάρχουν οι κατάλληλες προϋποθέσεις για να αποχωριστούν σωστά τα αδερφά χρωματίδια στους δύο πόλους (εικόνα 15).



Εικόνα 15: Σχηματική απεικόνιση ενός χρωμοσώματος με τα δύο αδερφά χρωματίδια ενωμένα στην περιοχή του κεντρομέρους.

Η αλληλεπίδραση των μικροσωληνίσκων με τους κινητοχώρους, μέσω ειδικών πρωτεϊνικών συμπλόκων στην περιοχή του κεντρομέρους κάθε αδελφού χρωματιδίου, είναι

απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση και για τον αποχωρισμό τους στους αντίθετους πόλους.

Γίνεται φανερό ότι η ομαλή εξέλιξη της μίτωσης εξαρτάται από την ακεραιότητα δομών, όπως είναι το κεντρομέρος και ο κινητοχώρος, αφού βλάβες σε αυτές τις περιοχές εμποδίζουν ή καθυστερούν τις σταθερές προσδέσεις των κινητοχώρων με τους μικροσωληνίσκους της μιτωτικής ατράκτου, χωρίς να επηρεάζουν τη συγκρότηση της ατράκτου. Τέτοιες βλάβες περιλαμβάνουν μεταλλάξεις σε πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δομή του κεντρομέρους (CENP-A, CENP-C) ή τη λειτουργία πρωτεϊνών, όπως είναι οι πρωτεΐνες *survivin* και *Borealin*, ή πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη δομή του κινητοχώρου και την πρόσδεση τους στους μικροσωληνίσκους (23).

A.5. Πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη ρύθμιση της μίτωσης

A.5.1 Aurora κινάσες

Η διαδικασία του σωστού χρωμοσωματικού αποχωρισμού ρυθμίζεται στενά από έναν αριθμό πρωτεϊνικών κινασών, τις **Aurora κινάσες**. Οι Aurora κινάσες ανήκουν στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης / θρεονίνης, οι οποίες ρυθμίζουν πολλές διαδικασίες κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Οι κινάσες αυτές εμπλέκονται στον κύκλο του κεντροσώματος, στη συγκρότηση της ατράκτου, στη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων, στις προσδέσεις των μικροσωληνίσκων με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων στο σημείο ελέγχου της μίτωσης καθώς επίσης και στην κυτταροκίνηση (24).

Αρχικά η πρώτη κινάση ταυτοποιήθηκε σε ένα μεταλλαγμένο στέλεχος της *Drosophila melanogaster* που παρουσίαζε ανώμαλη μιτωτική άτρακτο. Μία μορφή κινάσης, η Ip11, εκφράζεται στον *Saccharomyces cerevisiae* ενώ στη *Drosophila* συνολικά έχουν εντοπισθεί δύο μέλη της οικογένειας, οι Aurora και οι IAL (Ip11-Aurora-Like) (25).

Στο γονιδίωμα των θηλαστικών ανακαλύφθηκαν τρία γονίδια που κωδικοποιούν τις Aurora κινάσες: η Aurora A, B, C. Η Aurora A κινάση των θηλαστικών σχετίζεται περισσότερο με την Ipl1 του *S. cerevisiae*, ενώ η Aurora B με την Aurora που βρέθηκε στη *Drosophila* (26). Φυλογενετικές μελέτες αποδεικνύουν ότι όλες οι Aurora κινάσες των σπονδυλωτών προέρχονται από έναν κοινό πρόγονο (27). Αποτελούνται περίπου από 309-403 αμινοξέα και εμφανίζουν παρόμοια αλληλουχία ιδιαίτερα στην καρβοξυτελική καταλυτική περιοχή. Με βάση αυτού, η Aurora A και B του ανθρώπου έχουν 71% ομοιότητα. Ωστόσο, οι τρεις κινάσες διαφέρουν στο μήκος και στην αλληλουχία της αμινοξυτελικής περιοχής. Παρά την ομοιότητα που παρουσιάζουν, διαφέρουν στο πρότυπο έκφρασης, στην υποκυτταρική θέση, στη δραστηριότητα και στα υποστρώματα.

A.5.1.1 Aurora A

Όπως άλλες κινάσες, έτσι και η Aurora A απαιτεί για την ενεργοποίησή της με αυτοφωσφορυλίωση, την αλληλεπίδραση με κάποιο υπόστρωμα. Η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα όχι μόνο προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωσή της, αλλά επίσης προστατεύει την ίδια την κινάση από την αποφωσφορυλίωση, εξαιτίας της δράσης φωσφατασών που αλληλεπιδρούν με αυτή (28). Μέχρι στιγμής, ο καλύτερα μελετημένος συμπαράγοντας για την ενεργοποίηση της Aurora A είναι η πρωτεΐνη TPX2, η οποία ρυθμίζει τη δράση της, αντιδρώντας στη δράση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP1 και διεγείροντας την αυτοφωσφορυλίωση της Aurora A στη θέση Thr295, γεγονός απαραίτητο για τη λειτουργία της κινάσης.

Η Aurora-A αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της συγκρότησης της ατράκτου. Αρχικά, κατά την φάση S, εντοπίζεται στα κεντροσώματα και κατά τη μίτωση αρχίζει να συσσωρεύεται στα κεντροσώματα στους πόλους της ατράκτου. Συγκεκριμένα, κατά την πρόφαση συγκεντρώνεται στην περιοχή γύρω από αυτά και κατά τη μετάφαση, μετακινείται στους μικροσωληνίσκους κοντά στους πόλους της ατράκτου. Πιθανολογείται ότι αυτή η μετατόπιση εξαρτάται από την πρωτεΐνη TPX2. Κατά την ανάφαση, η Aurora-A εντοπίζεται στους μικροσωληνίσκους κοντά στους πόλους και στην ενδιάμεση ζώνη της ατράκτου. Εκεί παραμένει μέχρι την τελόφαση. Στην τελόφαση, η Aurora-A συγκεντρώνεται στο ενδιάμεσο σώμα και προς το τέλος της κυτταροκίνησης, διασπάται από το σύμπλοκο APC/κυκλοσώματος. Μετά την ωρίμανση του κεντροσώματος, τα

κεντροσώματα μεταναστεύουν προς το τέλος της G2 φάσης για να καθορίσουν τους δύο πόλους της ατράκτου, μία διαδικασία που απαιτεί τη λειτουργία της Aurora-A. Η λειτουργία της πρωτεΐνης αποτελεί το έναυσμα για τη σωστή οργάνωση της μιτωτικής ατράκτου. Τα άλλα δύο μέλη της οικογένειας συμμετέχουν σε επόμενα στάδια του κυτταρικού κύκλου (29).

A.5.1.2 Aurora B

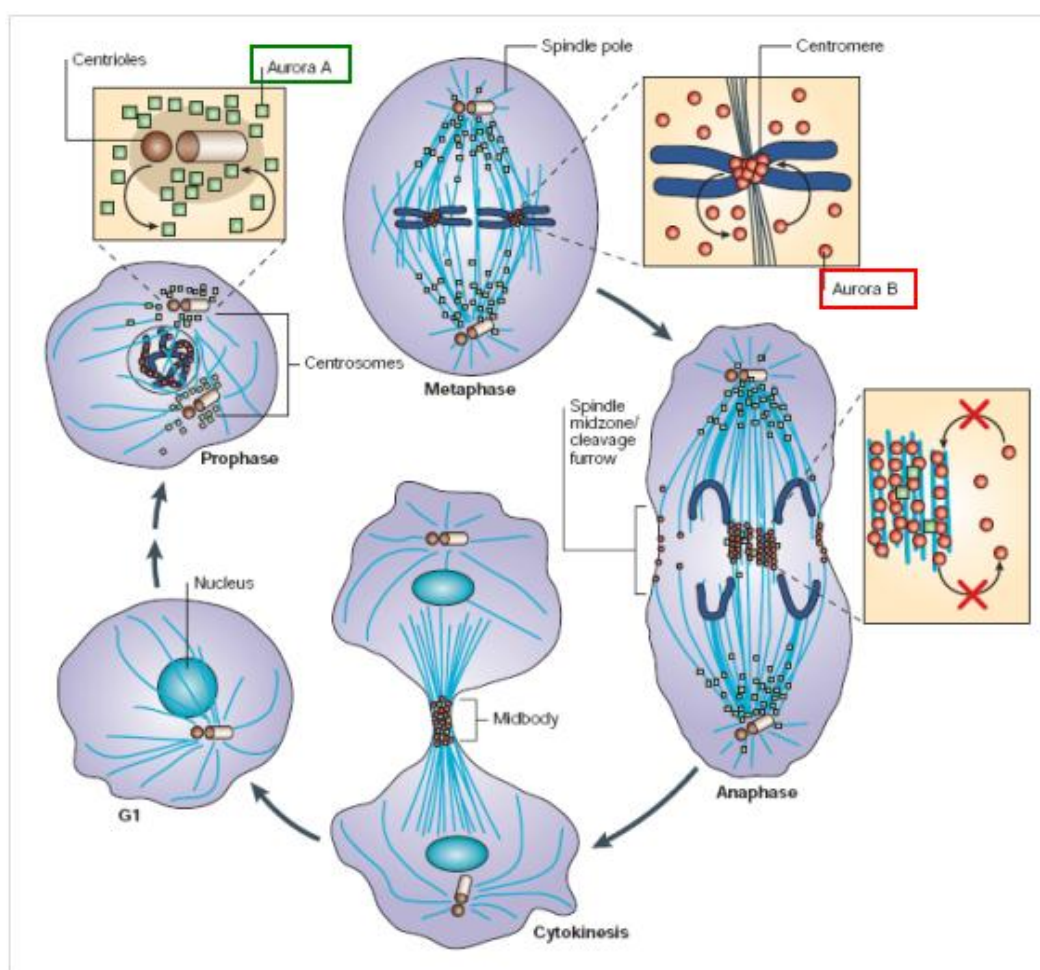
Παρόμοια με την Aurora-A κινάση, η ενεργοποίηση της Aurora-B επιτυγχάνεται με αυτοφωσφορυλίωση της μετά από αλληλεπίδραση της με το υπόστρωμα της, την πρωτεΐνη INCENP. Η Aurora B κινάση είναι μέρος του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών (*chromosome passenger proteins*), το οποίο είναι απαραίτητο για έναν αριθμό διαδικασιών κατά τη Μίτωση. Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζει την έκφραση και την δράση της Aurora B στα αναπτυσσόμενα κύτταρα. Η έκφραση της φθάνει στα μέγιστα επίπεδα κατά τη G2-M μετάβαση και το μέγιστο της δραστηριότητάς της κατά τη Μίτωση. Μόλις η κινάση συνδεθεί με τους μικροσωληνίσκους της ατράκτου κατά την Ανάφαση, η κινητικότητά της μειώνεται (24).

Ενώ η Aurora A ρυθμίζει το σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου κατά τη Μίτωση, η Aurora B διασφαλίζει τη σωστή χρωμοσωματική πρόσδεση στην άτρακτο. Η δραστηριότητα της Aurora B απαιτεί τον εντοπισμό διαφόρων πρωτεϊνών στην περιοχή του κεντροσώματος και του κινητοχώρου. Επίσης, ρυθμίζει το διπολικό προσανατολισμό των χρωμοσωμάτων ελέγχοντας τη σωστή σύνδεση μικροσωληνίσκων-κινητοχώρων, ενώ μπορεί να εμπλέκεται και στη ρύθμιση του σημείου ελέγχου της Μίτωσης (30). Πιθανόν, μη σταθερές διπολικές προσδέσεις όπου κινητοχώροι αλληλεπιδρούν με μικροσωληνίσκους που προέρχονται από τον ίδιο πόλο (συντελική πρόσδεση) είναι πιθανόν να συμβούν κατά τη μίτωση. Οι προσδέσεις αυτές θα πρέπει να επιδιορθωθούν προκειμένου να επιτευχθεί ο σωστός διαχωρισμός του γενετικού υλικού. Οι λανθασμένες αλληλεπιδράσεις αποσταθεροποιούνται με τη δράση της Aurora-B (24).

Επιπρόσθετα, η δράση της Aurora-B είναι αναγκαία για τη σωστή ολοκλήρωση της ανάφασης και τη μετάβαση στο στάδιο της κυτταροκίνησης. Ο ρόλος της Aurora-B στην παρακολούθηση των αλληλεπιδράσεων μικροσωληνίσκων-κινητοχώρων, τονίζει μία

ακόμη σημαντική λειτουργία της. Πιθανότατα να ρυθμίζει άμεσα το σημείο ελέγχου της μίτωσης.

Όπως είναι φανερό, οι Aurora κινάσες ρυθμίζουν την πρόοδο της μίτωσης σε πολλά στάδια, μία ένδειξη ότι αλληλεπιδρούν με πληθώρα πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα έρχονται σε επαφή με τα κεντροσώματα (πόλους μιτωτικής ατράκτου), τους κινητοχώρους και την κεντρική άτρακτο (περιοχή περίσφιξης κατά την κυτταροκίνηση). Οι Aurora-A και Aurora-B κινάσες ελέγχουν τη δομή και τη συμπεριφορά του χρωμοσώματος, καθώς και όλες τις λειτουργίες που σχετίζονται με την μιτωτική άτρακτο και αφορούν μικροσωληνίσκους (εικόνα 16)



Εικόνα 16: Σχηματική απεικόνιση εντοπισμού των Aurora κινάσων A και B. (Carmena & Earnshaw, 2003). Τα επίπεδα και των δύο κινάσων είναι ουσιαστικά μειωμένα στα G1 κύτταρα. Κατά την Πρόφαση, η Aurora A (πράσινο) είναι συγκεντρωμένη γύρω από τα κεντροσώματα, ενώ η Aurora B (κόκκινο) βρίσκεται στον πυρήνα. Κατά τη Μετάφαση, η Aurora A βρίσκεται στους μικροσωληνίσκους κοντά στους πόλους της ατράκτου, ενώ η Aurora B, εντοπίζεται στο κεντρομέρος.

Στην Ανάφαση, η Aurora A παρατηρείται σε μεγαλύτερο ποσοστό στους μικροσωληνίσκους κοντά στους πόλους ενώ ανιχνεύεται και στο κέντρο της ατράκτου, όπου είναι συγκεντρωμένη η Aurora B. Κατά την κυτταροκίνηση και οι δύο οι κινάσες είναι συγκεντρωμένες στο ενδιάμεσο σώμα (midbody).

A.5.1.3 Aurora C

Τα λιγότερα στοιχεία που είναι μέχρι σήμερα γνωστά αφορούν στην Aurora C κινάση, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή του κεντροσώματος από το στάδιο της Ανάφασης μέχρι και την Τελόφαση (24). Η Aurora C μοιράζεται τη θέση της στο κύτταρο και μερικές λειτουργίες με την Aurora B. Η Aurora B και η C θεωρούνται πρωτεΐνες-επιβάτες και σχηματίζουν σύμπλοκα με την INCENP και τη survivin. Η INCENP έχει βρεθεί ότι διεγείρει την ικανότητα της Aurora C για φωσφορυλίωση της ιστόνης 3 (H3).

Το γονίδιο της Aurora C εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε πολλούς ιστούς, ενώ υπερεκφράζεται σε μερικές καρκινικές κυτταρικές σειρές, όπως αυτές που προέρχονται από καρκίνους του θυρεοειδούς. Η έκφραση της Aurora C είναι παρόμοια μ' αυτή των άλλων δύο κινάσων των θηλαστικών, με τα μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης κατά τις φάσεις G2/M. Είτε υπερέκφραση της πρωτεΐνης είτε καταστολή της έκφρασης του γονιδίου που την κωδικοποιεί, προκαλεί την εμφάνιση πολυπύρηνων κυττάρων, φαινόμενο που εμφανίζεται και μετά από καταστολή της έκφρασης του γονιδίου της Aurora B.

A.5.2 INCENP (Inner Centromere Protein)

Απαραίτητη προϋπόθεση για τη σωστή ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων κατά τη μετάφαση και για τον αποχωρισμό τους στους αντίθετους πόλους είναι η αλληλεπίδραση των μικροσωληνίσκων με τους κινητοχώρους των χρωμοσωμάτων, μέσω ειδικών πρωτεϊνικών συμπλόκων στην περιοχή του κεντρομέρους κάθε αδελφού χρωματιδίου. Ορισμένες πρωτεΐνες είναι συνδεδεμένες με το κεντρομέρος και αλληλεπιδρούν άμεσα με αυτό (CENP-A, CENP-B και CENP-C), ενώ άλλες, όπως οι CENP-E, CENP-F και η έσω κεντρομερική πρωτεΐνη **INCENP (inner centromere protein)**, γνωστές και ως χρωμοσωματικές πρωτεΐνες-επιβάτες, εντοπίζονται παροδικά στην περιοχή του κεντρομέρους κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων σταδίων του κυτταρικού κύκλου.

Η INCENP είναι μια έσω κεντρομερική πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους. Έχει μια μη-συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή που είναι σημαντική

για τη δέσμευση της πρωτεΐνης στα χρωμοσώματα και στα κεντρομερίδια, και μία άκρως συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, την λεγόμενη IN-box περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή της στην Aurora B κινάση (

Εικόνα 17).



Εικόνα 17: Σχηματική απεικόνιση της πρωτεΐνης INCENP

Η INCENP είναι και υπόστρωμα αλλά και θετικός ρυθμιστής της κινάσης. Η ενεργοποίηση της Aurora-B επιτυγχάνεται με αυτοφωσφορλίωση της μετά από αλληλεπίδραση της με το υπόστρωμα της, την πρωτεΐνη INCENP. Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με το IN-box τμήμα του καρβοξυτελικού άκρου της INCENP με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της. Αν και ο μηχανισμός δεν είναι ακόμη γνωστός, τα πρόσφατα αποτελέσματα δείχνουν ότι η φωσφορλίωση της INCENP από την Aurora B θα μπορούσε να αλλάξει την δομή της πρωτεΐνης στην IN-box περιοχή, και αυτό θα μπορούσε με κάποιο τρόπο να συμβάλει στην ενίσχυση της δραστηριότητας της κινάσης.

A.5.3 Πρωτεΐνη INCENP και κυτταρικός κύκλος

Κατά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου στη μετάφαση, συγκεκριμένα η INCENP συγκεντρώνεται στα κεντρομερή. Με τη μετάβαση στην Ανάφαση η πρωτεΐνη INCENP παραμένει εντός του ισημερινού πεδίου, ενώ τα αδελφά χρωματίδια μεταναστεύουν στους πόλους της ατράκτου. Στην τελόφαση εντοπίζεται στο ενδιάμεσο σώμα, ενώ αποικοδομείται μετά την κυτταροκίνηση.

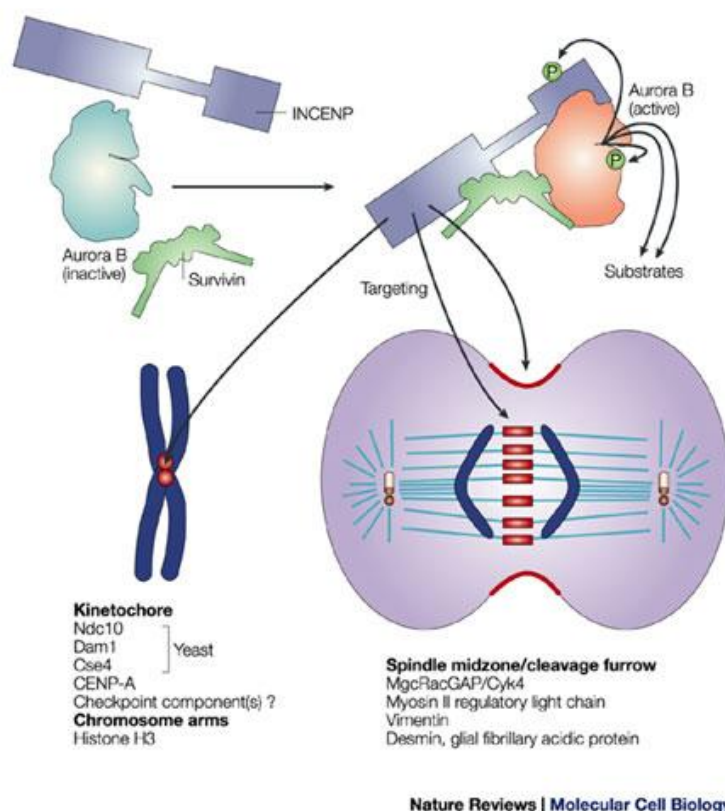
Συγκεκριμένα, οι INCENP περιορίζονται στον πυρήνα κατά τη μεσόφαση και είναι στενά συνδεδεμένες με τα χρωμοσώματα μέχρι την πρόιμη μετάφαση. Όμως, κατά τη

διάρκεια της μετάφασης, αφήνουν τα χρωμοσώματα για να συγκεντρωθούν σε γραμμικές συστοιχίες που τέμνουν κάθετα το ισημερινό επίπεδο ανάμεσα στα χρωμοσώματα. Καθώς η ανάφαση ξεκινά και τα αδελφά χρωματίδια κινούνται προς τους πόλους της μιτωτικής ατράκτου, οι INCENP παραμένουν στη μέση ζώνη της ατράκτου, όπου συνδέονται στενά με το δίκτυο των μικροσωληνίσκων στην περιοχή όπου αλληλεπικαλύπτονται οι δύο ημιάτρακτοι. Αργότερα στη Ανάφαση, ένας υποπληθυσμός INCENP συνδέεται στενά με τον κυτταροσκελετό στο σημείο όπου θα δημιουργηθεί στη συνέχεια η αύλακα της διάσπασης. Στην Τελόφαση οι INCENP συγκεντρώνονται σε κάθε πλευρά του ενδιάμεσου σώματος στην διακυτταρική γέφυρα, από την οποία και αποδομούνται μετά την κυτταροκίνηση (31).

Ο χρόνος έκφρασης και η κατανομή της INCENP μοιάζει μ' αυτή της Aurora A, μέλος της Aurora/Ipl1p οικογένειας κινασών σερίνης- θρεονίνης. Επιπλέον, υπερέκφραση της απενεργοποιημένης κινάσης Aurora A διασπά το σχηματισμό της αύλακας, συνεπάγοντας την αποτυχία της διαδικασίας της κυτταροκίνησης με παρόμοιο τρόπο μ' αυτόν της INCENP, όταν υπερεκφράζεται. Επομένως, η INCENP και η Aurora A ενδέχεται να έχουν παρόμοιους ρόλους κατά τη μίτωση (32).

A.5.4 Σύμπλοκο πρωτεϊνών-επιβατών

Η ανακάλυψη των πρωτεϊνών-επιβατών προσέφερε νέα στοιχεία για την κατανόηση της ρύθμισης της μιτωτικής διαδικασίας, αφού πρόκειται για πρωτεΐνες που μεταφέρονται από θέση σε θέση στα διαιρούμενα κύτταρα. Το σύμπλοκο πρωτεϊνών-επιβατών είναι διατηρημένο από τα σπονδυλωτά έως και τη ζύμη και απαρτίζεται από την Aurora-B και τρεις υπομονάδες που δεν εμφανίζουν ενζυμική δραστηριότητα, την πρωτεΐνη INCENP, την survivin και την Borealin (που αναφέρεται και ως Dasra-B). Οι τρεις αυτές πρωτεΐνες ελέγχουν τη θέση, την ενζυμική δραστηριότητα και τη σταθερότητα της Aurora-B κινάσης (33).



Εικόνα 18: Απεικόνιση του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών. Η Aurora B σχηματίζει ένα σύμπλοκο - συμπλοκο πρωτεϊνών-επιβατών – με την πρωτεΐνη INCENP και την survivin. Η φωσφορύλιωση της INCENP από την Aurora B ενισχύει την δράση της Aurora B. Η INCENP προσανατολίζει το σύμπλοκο προς τα κεντρομερίδια (κάτω αριστερά) νωρίς κατά τη μίτωση και προς το ενδιάμεσο σώμα αργότερα κατά τη μίτωση (κάτω δεξιά)

Η Aurora-B, η survivin και η INCENP αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν το σύμπλοκο πρωτεϊνών-επιβατών, το οποίο εντοπίζεται στους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση, στη μιτωτική άτρακτο κατά τη μετάφαση, μεταφέρεται στο κέντρο της ατράκτου κατά την ανάφαση και βρίσκεται στο ενδιάμεσο σώμα κατά την κυτταροκίνηση. (34) Για να εκπληρώσει αυτές τις κρίσιμες λειτουργίες, η κίνηση πρέπει να βρεθεί στην ενεργή μορφή της στο σωστό μέρος τη σωστή στιγμή. Είναι σαφές ότι η δραστηριότητα και ο εντοπισμός της Aurora-B ελέγχονται αυστηρά από τα υπόλοιπα μέλη του συμπλόκου των πρωτεϊνών-επιβατών, της INCENP, της Survivin και της Borealin. Η Borealin ενώ είναι

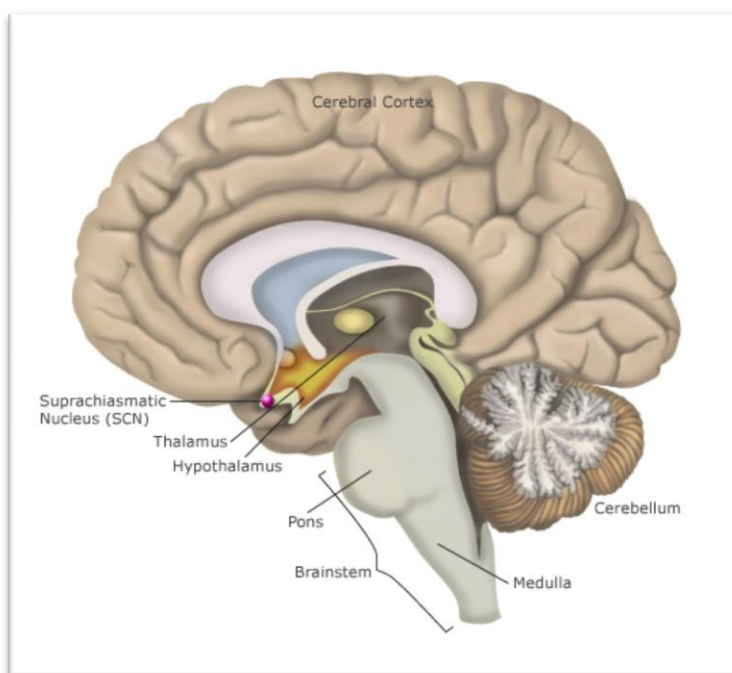
υπόστρωμά της δεν παίζει ρόλο στην ενεργοποίησή της. Επιπρόσθετα, η πρωτεΐνη survivin δεν αποτελεί υπόστρωμα της Aurora-B αλλά διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη διέγερση της (34). Η δράση της Aurora-B κινάσης, είναι απαραίτητη για τον πιστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και την εκτέλεση της κυτοκίνησης. Οι δραματικές αλλαγές που συμβαίνουν όσον αφορά στο σημείο εντοπισμού του, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να παίζει ρόλο στο συντονισμό γεγονότων κατά τον κυτταρικό κύκλο όσον αφορά στα χρωμοσώματα και στον κυτταροσκελετό (24).

Πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί και τρεις άλλες πρωτεΐνες-επιβάτες. Μία από αυτές είναι η TD-60, η οποία συνεντοπίζεται με την INCENP και την Aurora B. Η δεύτερη πρωτεΐνη-επιβάτης, ICIS (Inner Centromere Kinl Stimulator), είναι μία κεντρομερική πρωτεΐνη που φαίνεται να ρυθμίζει τη δράση της κινάσης MCAK (Mitotic Centromere-Associated Kinesin). Είναι πιθανό η ICIS να αποτελεί υπόστρωμα για την Aurora B (24). Η αλληλεπίδραση της Aurora B με την κεντρομερική κινεσίνη MCAK οδηγεί στον χρωμοσωματικό προσανατολισμό προς τους δύο πόλους. Η MCAK εντοπίζεται στην έσω περιοχή του κεντρομέρους κατά την Προμετάφαση, επικαλύπτοντας τη θέση εντοπισμού της Aurora B. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η Aurora B έχει ικανότητα πρόσδεσης στην MCAK, με αποτέλεσμα να επιφέρει και την έλευση της στο κεντρομέρος. Επιπρόσθετα, η Aurora B μπορεί απευθείας να φωσφορυλιώσει την MCAK σε πολλαπλά συντηρημένα κατάλοιπα, μειώνοντας την ικανότητα της MCAK να αποπολυμερίσει τους μικροσωληνίσκους (30).

A.6. Κιρκάδιοι Ρυθμοί

A.6.1 Εισαγωγή

Ο εγκέφαλος και κατ' επέκταση ο υπόλοιπος οργανισμός λειτουργεί με βάση κάποιες φυσιολογικές, βιοχημικές ή συμπεριφορικές διεργασίες, οι οποίες έχουν ημερήσια περιοδικότητα και ονομάζονται **κιρκάδιοι ρυθμοί** (circadian, από το λατινικό circa dies = περίπου ημέρα). Το βιολογικό ρολόι, το οποίο ελέγχει κεντρικά τους κιρκάδιους ρυθμούς στους περισσότερους ζωντανούς οργανισμούς όπως και στον άνθρωπο, εδράζεται στον *υπερχιασματικό πυρήνα* (suprachiasmatic nucleus - SCN), ένα αμφοτερόπλευρο συμμετρικό όργανο, το οποίο εντοπίζεται άνωθεν του οπτικού χιάσματος του προσθίου υποθαλάμου του εγκεφάλου σε απόσταση 2cm περίπου από τους οφθαλμικούς βολβούς. Ο πυρήνας λαμβάνει πληροφορίες μέσω της αμφιβληστροειδοϋποθαλαμικής οδού (retinohypothalamic tract) και στη συνέχεια τις επεξεργάζεται ώστε να δοθεί σήμα στα διάφορα συστήματα του οργανισμού (Εικόνα 19).



Εικόνα 19: σχηματική απεικόνιση της θέσης του υπερχιασματικού πυρήνα (καθώς και άλλων περιοχών) στον εγκέφαλο

Παρόλο που ο SCN συμπεριλαμβανόταν ήδη στις πρώτες περιγραφές του υποθαλάμου (35,36), η λειτουργία του αναγνωρίστηκε μόλις τη δεκαετία του '70, όταν και δημοσιεύτηκε μία σειρά μελετών που δικαιολογούσαν την απώλεια κirkάδιας λειτουργίας ως συνέπεια αλλοιώσεων στον SCN. (37,38,39,40,41). Χρησιμοποιώντας ραδιενεργά σημασμένα αμινοξέα οι ερευνητές κατάφεραν να ταυτοποιήσουν την ύπαρξη της αμφιβληστροειδο-υποθαλαμικής οδού (retinohypothalamic tract - RHT), η οποία προσεκβάλλει στον SCN (42). Έχει αποδειχθεί ότι ο κirkάδιος βηματοδότης των θηλαστικών είναι περισσότερο ευαίσθητος στο φως, συγκριτικά με οποιαδήποτε άλλη χρονική υπόδειξη (43). Οι πληροφορίες σχετικά με το φως καθίστανται αντιληπτές μέσω ειδικών φωτοευαίσθητων κυττάρων του αμφιβληστροειδούς, τα οποία έχουν άμεσες προσεκβολές στον SCN στη θέση εντόπισης του κirkάδιου βηματοδότη των θηλαστικών, μέσω της μονοσυναπτικής RHT.

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 (44). 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 (retina ganglion cells-RGCs) που προσεκβάλλουν στον SCN.

Οι κirkάδιοι ρυθμοί έχουν ενδογενή περίοδο περίπου 24 ωρών και είναι ανεξάρτητοι της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Ο υπερχιασματικός πυρήνας θεωρείται από μόνος του ένας αυτοσυντηρούμενος ταλαντωτής, έτσι ώστε σε περιπτώσεις απουσίας ενός ρυθμικού σήματος από το περιβάλλον (π.χ. σε συνεχές σκοτάδι), τα θηλαστικά να μπορούν να εκκρίνουν ορμόνες και να εκτελούν άλλες συμπεριφορικές διεργασίες, όμως με μια περιοδικότητα διαφορετική από τις 24 ώρες. (45)

A.6.2 Κιρκάδιο σύστημα

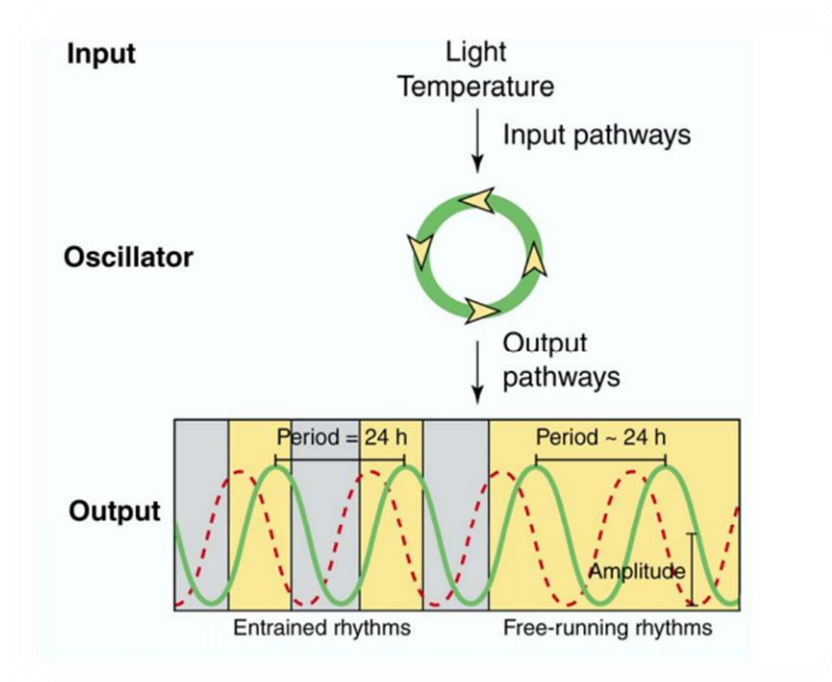
Το κιρκάδιο σύστημα των θηλαστικών απαρτίζεται από τρεις κύριες συνιστώσες, οι οποίες οδηγούν στην παραγωγή και το συντονισμό ενός βηματοδότη:

α) έναν ενδογενή κιρκάδιο 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. (Εικόνα 20)

(46).

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.



Εικόνα 20: Σχηματική αναπαράσταση του κιρκάδιου συστήματος των θηλαστικών

Τα κύτταρα του υπερχιασματικού πυρήνα έχουν ένα δικό τους αυτόνομο μοριακό ρολόι και τον δικό τους ρυθμό ταλάντωσης. Είναι οργανωμένα σε ένα πολύπλοκο

ετερογενές δίκτυο με ομάδες κυττάρων που έχουν διαφορετικές λειτουργίες. Το σύνολό τους όμως, συντονίζεται σε έναν κοινό ρυθμό, περιόδου 24 1/4 περίπου ωρών, ο οποίος επηρεάζει στη συνέχεια μεγάλο αριθμό οργανικών λειτουργιών και 'περιφερικών ταλαντωτών'. Αυτό εξασφαλίζεται χάρις στη διαρκή ροή σημάτων προς και από τα νευρικά κύτταρα του υπερχιασματικού πυρήνα στο υπόλοιπο σώμα διαμέσου χημικών και νευρικών οδών. Τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες (αργινίνη, βασοπρεσίνη, TGF-α και prokineticin-2) εκκρίνονται απευθείας στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό και ελέγχουν τα επίπεδα της θερμοκρασίας και την κινητική δραστηριότητα. (47). Οι νευρικές συνάψεις μεταξύ του υπερχιασματικού πυρήνα και των περιφερειακών στόχων είναι εκτεταμένες και περιλαμβάνουν πολύ-συναπτικά μονοπάτια τα οποία ελέγχουν την επίφυση (48), τα επινεφρίδια (49), το θυρεοειδή, την καρδιά (50), το συκώτι (51) και το πάγκρεας (52). Στον εγκέφαλο, οι προεκτάσεις του υπερχιασματικού πυρήνα στον μεγαλοκυτταρικό προοπτικό πυρήνα (magnocellular pre-optic nucleus - POMA) παρέχουν τον έλεγχο ως προς την απελευθέρωση της GnRH (gonadotrophin-releasing hormone).

A.6.3 Η δομή του μοριακού κερκάδιου ρολογιού

Σε υποκυτταρικό επίπεδο, τα συστατικά και η βασική δομή του κερκάδιου ρολογιού περιλαμβάνει μια ομάδα γονιδίων που αναφέρονται ως ωρολόγια γονίδια (clock genes), των οποίων η έκφραση αυτορυθμίζεται μέσω ενός αλληλεπιδραστικού δικτύου από βρόχους θετικής και αρνητικής ανάδρασης, που περιλαμβάνει μεταφραστικές, μεταγραφικές και μετα-μεταγραφικές ρυθμίσεις των προϊόντων αυτών των γονιδίων, και παράγει ταλαντώσεις με 24-ωρη κατά προσέγγιση περίοδο.

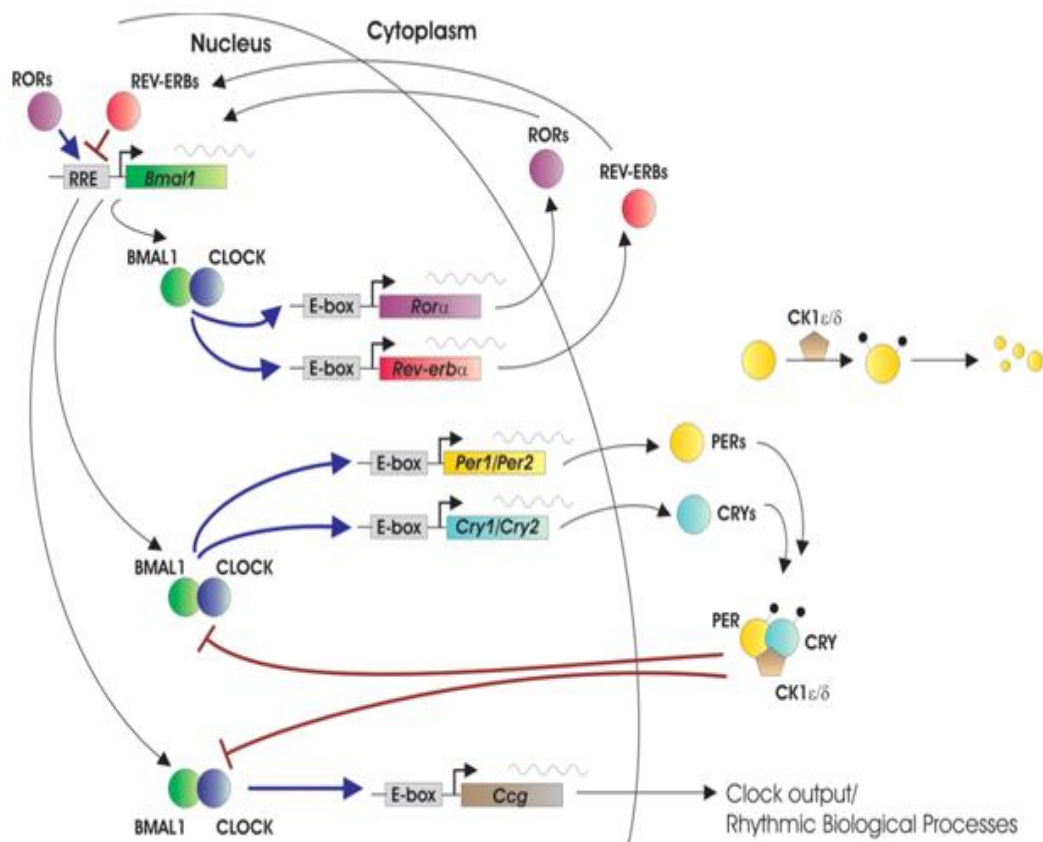
Στα ωρολόγια γονίδια περιλαμβάνονται τα:

- Clock, Npas2, και Arntl γονίδια (που αναφέρεται και ως Bmal1 ή Mor3 γονίδιο), που κωδικοποιούν τους basic helix-loop-helix (bHLH)-PAS μεταγραφικούς παράγοντες *,

** οι bHLH πρωτεΐνες που περιλαμβάνουν περιοχή PAS, είναι μεταγραφικοί παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η PAS περιοχή εντοπίζεται στην καρβοξυτελική περιοχή της bHLH και λειτουργεί ως μοτίβο διμερισμού. Επιτρέπει τη σύνδεση με άλλες PAS ή μη-PAS πρωτεΐνες και με μικρά μόρια όπως είναι η διοξίνη. Πήρε το όνομά της από τις τρεις πρωτεΐνες που την απαρτίζουν, την period της*

Drosophila (PER), την Arnt (human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) και την Single-minded της *Drosophila*. (53)

- period γονίδια (*per1* και *per2*),
- cryptochrome γονίδια (*Cry1* και *Cry2*),
- *Csnk1e* και *Csnk1d* γονίδια, που κωδικοποιούν τις casein kinase I epsilon και delta αντίστοιχα, και, τέλος, τα
- *Nr1d1* και *Rora*, γνωστά επίσης ως *RevErba* και *Rora*, αντίστοιχα, τα οποία κωδικοποιούν πυρηνικούς υποδοχείς (Εικόνα 21).



Εικόνα 21: Σχηματική απεικόνιση του μοριακού μηχανισμού του κιρκάδιου συστήματος που περιλαμβάνει όλα τα μονοπάτια και τους βρόγχους ανάδρασης.

Ο προσδιορισμός των μεταγραφικών κυκλωμάτων στο κirkάδιο ρολόι απεκάλυψε την σημασία του E-box, που αναφέρεται και ως 'πρωινό στοιχείο'. Ο βασικός βρόχος ανάδρασης (core loop) συνιστά ένα μηχανισμό αρνητικής ανατροφοδότησης, που αφορά στην αναστολή που ασκούν οι PER και CRY πρωτεΐνες στην ίδια την παραγωγή τους, αναστέλλοντας την επαγόμενη από τους μεταγραφικούς παράγοντες CLOCK και BMAL1 μεταγραφή των *per* και *cry* γονιδίων. Το αρνητικό feedback επιτυγχάνεται μέσω της μετατόπισης του PER:CRY ετεροδιμερούς πίσω στον πυρήνα για να καταστείλει την ίδια τους τη μεταγραφή, ενεργώντας πάνω στο σύμπλοκο CLOCK:BMAL1

Η παραγωγή των PER1,2 και CRY1,2 πρωτεϊνών ενεργοποιείται με την σύνδεση του ετεροδιμερούς συμπλέγματος των μεταγραφικών παραγόντων CLOCK-BMAL1 σε cis-ρυθμιστικές αλληλουχίες ενίσχυσης της μεταγραφής (enhancer) του E-box (CACGTG) των υποκινητών των *per* και *cry* γονιδίων. Σύμφωνα με την επικρατούσα άποψη, οι PER1,2 και CRY1,2 πρωτεΐνες αναστέλλουν τον σχηματισμό των ετεροδιμερών CLOCK-BMAL1 και μέσω αυτής της αρνητικής ανάδρασης, ελέγχουν και αυτορρυθμίζουν την ίδια την παραγωγή τους. (54)

Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτή η αρνητική ανατροφοδότηση λειτουργεί με χρονική υστέρηση και ασκείται μόνο στο δεύτερο ήμισυ της κirkάδιας ημέρας (στον άνθρωπο στη διάρκεια της νύκτας) διότι η αναστολή της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων CLOCK και BMAL1 στα *per* και *cry* γονίδια προϋποθέτει, μεταξύ άλλων, την μετατόπιση των ετεροδιμερών PER:CRY στον πυρήνα. Η οργάνωση στον χρόνο και ο χρονισμός αυτών των γεγονότων ελέγχεται στενά από μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των πρωτεϊνών του βρόχου ανάδρασης, οι οποίες επίσης υπόκεινται σε κirkάδια ρύθμιση. Η ύπαρξη αυτής της χρονικής υστέρησης είναι ουσιώδης για τη λειτουργία του βρόχου ανάδρασης ως κirkάδιου ταλαντωτή και όχι ως απλού ομοιοστατικού βρόχου.

Κατά συνέπεια, ως αποτέλεσμα του βασικού βρόχου ανάδρασης η μεταγραφή των *per* και *cry* γονιδίων εμφανίζει μια ταλάντωση με 24-ωρη περίπου περίοδο: στον άνθρωπο, στη διάρκεια της ημέρας το mRNA των PER και CRY πρωτεϊνών αυξάνεται συνεχώς, ενώ στη διάρκεια της νύκτας ελαττώνεται.

Ο κύριος βρόχος αρνητικής ανάδρασης πλαισιώνεται και σταθεροποιείται από άλλους ρυθμιστικούς βρόχους ανάδρασης (stabilizing loop) που αφορούν στην ρύθμιση της μεταγραφής του *bmal1* γονιδίου. Δύο κυκλώματα, ένα αρνητικής ανατροφοδότησης μέσω των REV-ERB πρωτεϊνών και ένα θετικής ανατροφοδότησης μέσω των RORs πρωτεϊνών

ρυθμίζουν την μεταγραφική ταλάντωση του *Bmal1* γονιδίου. Τα ετεροδιμερή CLOCK:BMAL1 επάγουν επίσης την μεταγραφή των *Rev-erba* and *Rora* γονιδίων που κωδικοποιούν τους ομώνυμους πυρηνικούς υποδοχείς REV-ERBa και RORa αντίστοιχα. Στον υποκινητή του *mbal1* γονιδίου υπάρχουν αλληλουχίες που ανταποκρίνονται σε αυτούς τους υποδοχείς, που αναφέρονται ως στοιχεία ανταπόκρισης στους σχετιζόμενους με τους ρετινοϊκό οξύ ορφανούς υποδοχείς (retinoic acid-related orphan receptor response elements, ROREs). Οι REV-ERBa και RORa πρωτεΐνες ανταγωνίζονται για σύνδεση σε αυτές τις ROREs αλληλουχίες του υποκινητή του *Bmal1* με αντίθετες επιδράσεις στη μεταγραφική δραστηριότητα του *Bmal1* γονιδίου: οι RORs πρωτεΐνες επάγουν ενώ οι REV-ERBs πρωτεΐνες καταστέλλουν την μεταγραφή. (55)

A.6.4 Κυτταρικός κύκλος και κirkάδιο σύστημα

Το κirkάδιο ρολόι το οποίο ρυθμίζει τους μεταβολικούς και φυσιολογικούς ρυθμούς σε διάφορους οργανισμούς μοιράζεται κοινά χαρακτηριστικά με τον κυτταρικό κύκλο. Τα δυο αυτά συστήματα φαίνεται να είναι τελείως ανεξάρτητα το ένα με το άλλο, ωστόσο πρόσφατες μελέτες αποκάλυψαν κοινά ρυθμιστικά στοιχεία. Και τα δυο αυτά συστήματα είναι ενδοκυτταρικά "ρολόγια", τα οποία είναι βασισμένα σε διαδοχικές φάσεις μεταγραφής-μετάφρασης, διαφοροποίησης και αποικοδόμησης πρωτεϊνών, οι οποίες ρυθμίζονται μέσω ενός αλληλεπιδραστικού δικτύου από βρόχους θετικής και αρνητικής ανάδρασης.

Το χρονοδιάγραμμα του πολλαπλασιασμού των κυττάρων ρυθμίζεται μέσω της έκφρασης βασικών γονιδίων του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες των ωρολόγιων γονιδίων (σύμπλοκο PER1/2 και CLOCK/BMAL), ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό μέσω γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, όπως είναι το Wee1, το c-Myc και το Ccnd1(56,57,58,59)

Διαφοροποίηση στην ρυθμική έκφραση της *per* πρωτεΐνης για παράδειγμα, διαταράσσει τον κirkάδιο κύκλο. Υπερέκφρασή της αυξάνει την ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων σε απόπτωση, λόγω καταστροφής του DNA, ενώ η αναστολή της έκφρασής της έχει ακριβώς τα αντίθετα αποτελέσματα, αναστολή της απόπτωσης. Το εύρημα αυτό αποκάλυψε κάποιες ανυποψίαστες συνδέσεις του *per1* με κυτταρικά συστατικά που λειτουργούν σαν βασικά στοιχεία στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και

της καταστροφής του DNA. Συγκεκριμένα, βρέθηκε να αλληλεπιδρά με την κινάση ATM (ataxia-telangiectasia mutated kinase), μια κινάση που εμπλέκεται στην κυτταρική απάντηση ενάντια σε ιονίζουσες ακτινοβολίες και σε άλλες καταστάσεις που προκαλούν ρήξη στην διπλή έλικα.

Δεδομένου ότι το κικκάδιο ρολόι ελέγχει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον κυτταρικό κύκλο, θεωρείται ότι διαταραχή της έκφραση του γονιδίου PER οδηγεί σε διαταραχή του ελέγχου του φυσιολογικού κικκάδιου ρολογιού, ωφελώντας έτσι την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων και προωθώντας την καρκινογένεση (60).

A.6.5 Κικκάδιοι Ρυθμοί και γονιμότητα

Είναι ευρέως γνωστό ότι το κικκάδιο ρολόι εμπλέκεται στη λειτουργία ενός μεγάλου εύρους συστημάτων της φυσιολογίας, συμπεριλαμβανομένου και του αναπαραγωγικού συστήματος (61). Ένας από τους πιο προφανείς ρόλους του κικκάδιου 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

Όσων αφορά στο αρσενικό αναπαραγωγικό σύστημα, 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 δεν παρουσιάζει καμία ρυθμικότητα. Ο Morse και συν. (62) εξέτασαν τη γονιδιακή έκφραση των clock γονιδίων στους όρχεις επίμυων με την παραδοχή ότι όλα τα αναπτυξιακά γεγονότα που συμβαίνουν στα σπερματογόνα, τα σπερματοζώαρια και τις σπερματίδες φαίνονται να είναι συντονισμένα. Παρατηρήθηκε έκφραση του *per1* γονιδίου χωρίς προφανή μεταβολή αυτής της έκφρασης σε ένα 24ωρο. Κατά τη διάρκεια της ημέρας, επομένως, μπορεί να μην παρατηρήθηκε μεταβολή της έκφρασης στα κικκάδια 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 *npas2* προστέθηκαν στη λίστα των clock γονιδίων που εκφράζονται στο αναπτυσσόμενο σπέρμα και στα κύτταρα Leydig χωρίς ρυθμικότητα.

Οι αποδείξεις για τη λειτουργία του κirkάδιου 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. Ο Johnson και οι συνεργάτες του (63) ήταν οι πρώτοι που περιέγραψαν την έκφραση κirkάδιων γονιδίων στη μήτρα. Η ρυθμικότητα στην έκφραση των κirkάδιων γονιδίων στην μήτρα φαίνεται να επηρεάζεται από τον αναπαραγωγικό κύκλο και από την διέγερση με ωοθηκικά στεροειδή.

Β. Πειραματικό Μέρος

B.1. Σκοπός της εργασίας

Ο ποντικός χρησιμοποιείται κατ' εξοχήν ως πειραματόζωο στον τομέα της έρευνας εδώ και χρόνια, καθώς θεωρείται πως αποτελεί οργανισμό πρότυπο, ο οποίος παρουσιάζει σημαντικές ομοιότητες με τον άνθρωπο. Το γονιδίωμα του ποντικού θεωρείται από τους ειδικούς ένα από τα «κλειδιά» για την κατανόηση της λειτουργίας των ανθρώπινων γονιδίων και το πώς τα γονίδια αυτά εμπλέκονται στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών.

Όλα τα ποντίκια μέχρι και την ημέρα του πειράματος, εκτρέφονται στο Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ σε συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας, συγκεκριμένων περιόδων εναλλαγής φωτός - σκότους και χωρίς περιορισμό στην πρόσληψη τροφής και νερού. Η μελέτη κατατέθηκε και εγκρίθηκε από το Επιστημονικό Συμβούλιο του Νοσοκομείου 'ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ' και από το Συμβούλιο Διαχείρισης των πειραματόζωων του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανίχνευση της ποσοτικής έκφρασης των γονιδίων *Per1* και *INCENP* στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης σε έμβρυα επίμυος. Τα έμβρυα καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε συνθήκες και πρωτόκολλα που προσομοιάζουν απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον της μήτρας. Για την αξιολόγηση της έκφρασης των γονιδίων ακολουθήσαμε μια πειραματική πορεία που περιλάμβανε την συλλογή των εμβρύων, την κατάταξή τους στις δυο κατηγορίες, την απομόνωση του mRNA, την παρασκευή της cDNA βιβλιοθήκης και την εφαρμογή της μεθόδου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο με σκοπό τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

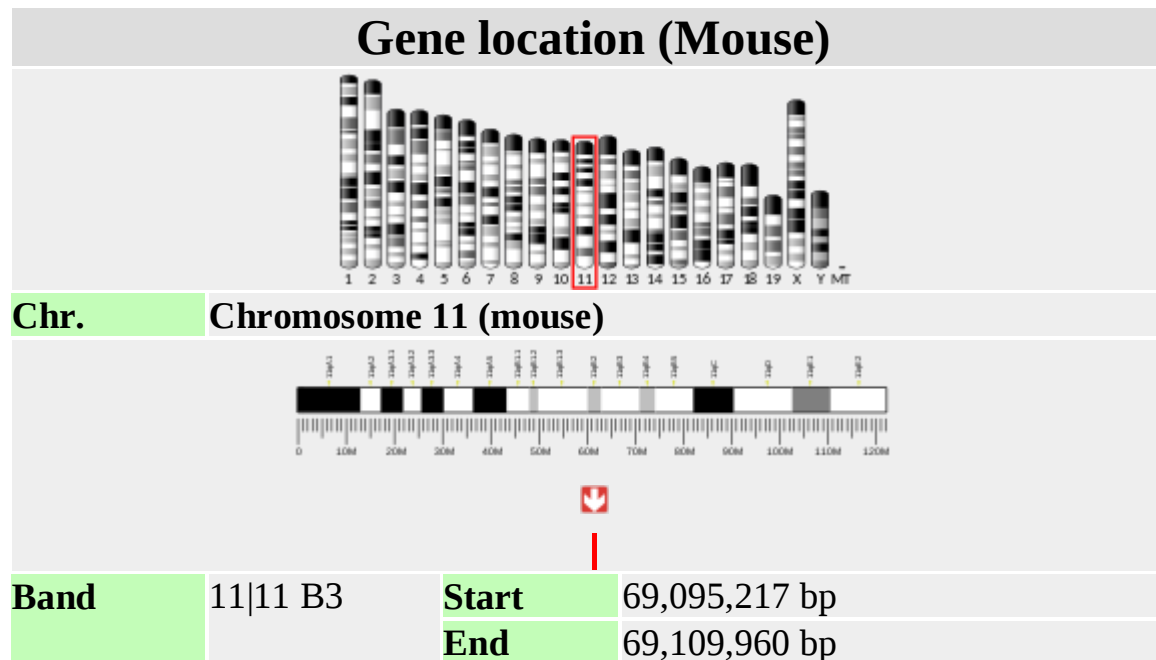
B.2. Γονίδια υπό μελέτη

B.2.1. G6PD gene (Glucose – 6 – Phosphate Dehydrogenase)

Το mG6PD είναι ένα housekeeping γονίδιο το οποίο απαιτείται για τη συντήρηση των βασικών κυτταρικών λειτουργιών και με βάση τη βιβλιογραφία εκφράζεται σε όλα τα κύτταρα του ποντικού υπό φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές συνθήκες.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς ούτως ώστε να ομαλοποιηθεί το ποσό του cDNA που χρησιμοποιεί η PCR ως υπόστρωμα και ως εκ τούτου να καταστεί δυνατός ο υπολογισμός της σχετικής συγκέντρωσης των επιθυμητών γονιδίων σε σχέση με αυτό.

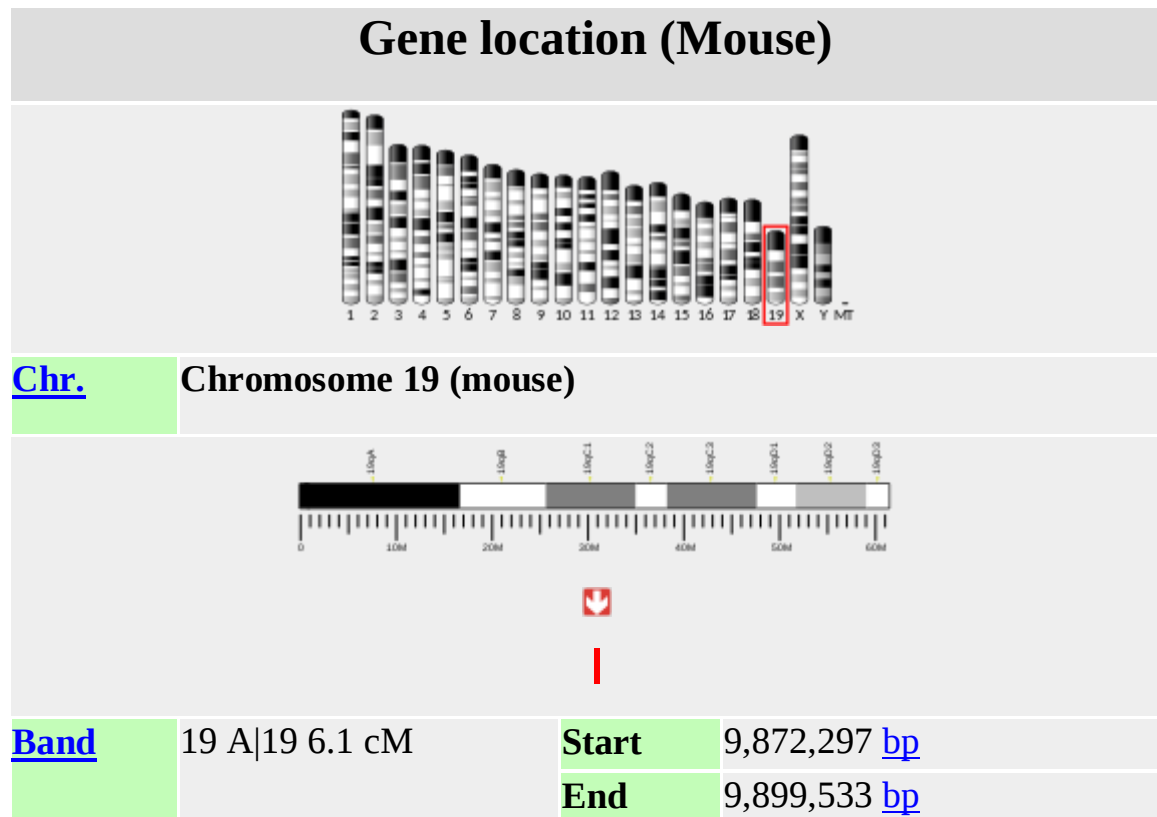
B.2.2. PER1 gene (Period 1)



Εικόνα 22: *PER1* γονίδιο

Το *PER1* γονίδιο αποτελεί μέλος της οικογένειας των *PERIOD* γονιδίων και εκφράζεται με βάση ένα κρκαδικό πρότυπο στον υπερχιασματικό πυρήνα, τον πρωτεύοντα κρκαδικό βηματοδότη στον εγκέφαλο των θηλαστικών. Τα γονίδια της οικογένειας αυτής κωδικοποιούν στοιχεία του κρκαδίου ρυθμού, της κινητικής δραστηριότητας, του μεταβολισμού και της συμπεριφοράς.

B.2.3. INCENP gene (inner centromere protein)



Εικόνα 23: *INCENP* γονίδιο

Η INCENP είναι μια έσω κεντρομερική πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους. Έχει μια μη-συντηρημένη αμινο-τελική περιοχή που είναι σημαντική για τη δέσμευση της πρωτεΐνης στα χρωμοσώματα και στα κεντρομερίδια, και μία άκρως συντηρημένη καρβοξυτελική περιοχή, την λεγόμενη IN-box περιοχή, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεσή της στην Aurora B κινάση.

B.3. Πειραματική Πορεία

1. Γονιμοποίηση των 20 επίμυων στελέχους *mus musculus*.

2. Συλλογή των εμβρύων.

3. Καλλιέργεια μέχρι το στάδιο του μοριδίου - Απομόνωση μερικών εμβρύων - Καλλιέργεια μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης - Απομόνωση υπολοίπων εμβρύων

4. Απομόνωση ολικού mRNA

5. Δημιουργία cDNA βιβλιοθήκης από το mRNA.

6. Χρήση της μεθόδου RT-PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου) για τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων **PER1** και **INCENP**.

B.3.1. ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΙΜΥΩΝ MUS MUSCULUS

Η πιο καθοριστική διαδικασία για την έναρξη της μελέτης μας είναι η επίτευξη της γονιμοποίησης και η μαζική παραγωγή εμβρύων μετά από διέγερση των ωοθηκών των θηλυκών ποντικών με τη χρήση φαρμάκων.

B.3.1α. Υλικά

- **PMSG** (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Chemical Co)

Παράγεται από τον πλακούντα των εγκύων φοράδων και έχει κυρίως δράση ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (σημειώνεται ότι παρουσιάζει και δράση ωχρινοτρόπου ορμόνης σε μικρό βαθμό). Συνεπώς η χορήγησή της κατά την άνοιστρον περίοδο ή κατά το τέλος της και λίγο πριν την έναρξη της οιστρικής περιόδου, είναι απαραίτητη για την επιτυχή πρόκληση και τον καλύτερο συγχρονισμό των οιστρικών κύκλων

- **HCG** (Human Chorionic Gonadotropin, Sigma Chemical Co)

Η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη συμβάλλει στη φυσιολογική ανάπτυξη και ωρίμανση των γεννητικών κυττάρων και την παραγωγή στεροειδών από τις γονάδες.

B.3.1β. Πειραματική Διαδικασία

Παραλάβαμε 10 θηλυκά ποντίκια στελέχους F1 (C57BL6 x CBA) 3-4 εβδομάδων από το ινστιτούτο Pasteur. Ξεκινήσαμε την πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας με τη χορήγηση 100μL PMSG. Έπειτα από 48 ώρες τους χορηγήσαμε 100μL hcG και τα βάλαμε να ζευγαρώσουν με 10 αρσενικά ποντίκια (ιδίου στελέχους και ηλικίας 9 εβδομάδων), σε ζευγάρια ξεχωριστά, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας. Θεωρητικά, η γονιμοποίηση επιτεύχθηκε.

B.3.2. Η ΣΥΛΛΟΓΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΥΩΝ

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

B.3.2α. Υλικά

- **DPBS pH 7,3** (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline 1x, Gibco)
Αποτελεί ένα αλατούχο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στο καλλιεργητικό μας υλικό ως θρεπτικό μέσο για τη ρύθμιση φωσφορικών, καθώς περιέχει φωσφορικά και ιόντα καλίου, σημαντικά για τη φυσιολογία του κυττάρου. Συμβάλλει στη διατήρηση φυσιολογικών επιπέδων pH καθώς και ενδοκυτταρικής και εξωκυτταρικής οσμωτικής ισορροπίας.
- **BSA** (Bovine Serum Albumin, παράγοντας V, Sigma-Aldrich)
Αλβουμίνη βόειου ορού χρησιμοποιήθηκε στο καλλιεργητικό μας υλικό ως θρεπτικό μέσο. Είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη η οποία προέρχεται από βοοειδή.
- **Υαλουρονιδάση** για την επίτευξη του καθαρισμού των γονιμοποιημένων ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρα μετά τη συλλογή τους.
- **Ham's καλλιεργητικό μέσο** (Ham's F10 Medium (-) Hypoxanthine, Gibco). Ειδικό διάλυμα για την ανάπτυξη των εμβρύων, καθώς περιέχει ψευδάργυρο, υποξανθίνη και θυμιδίνη.
- Διάλυμα wash/collection, **DPBS:BSA σε αναλογία 9:1** για την ενίσχυση της δράσης του DPBS.
- Διάλυμα καλλιέργειας **Ham's:BSA σε αναλογία 9:1**, χρησιμοποιεί το ρυθμιστικό σύστημα του διττανθρακικού νατρίου με σκοπό να διατηρήσει ένα σταθερό pH, απαιτεί αναγκαστικά ένα περιβάλλον με 5–10 % CO₂, το οποίο και εξασφαλίζεται από τις συνθήκες του κλιβάνου (Behr *et al.*, 1990).

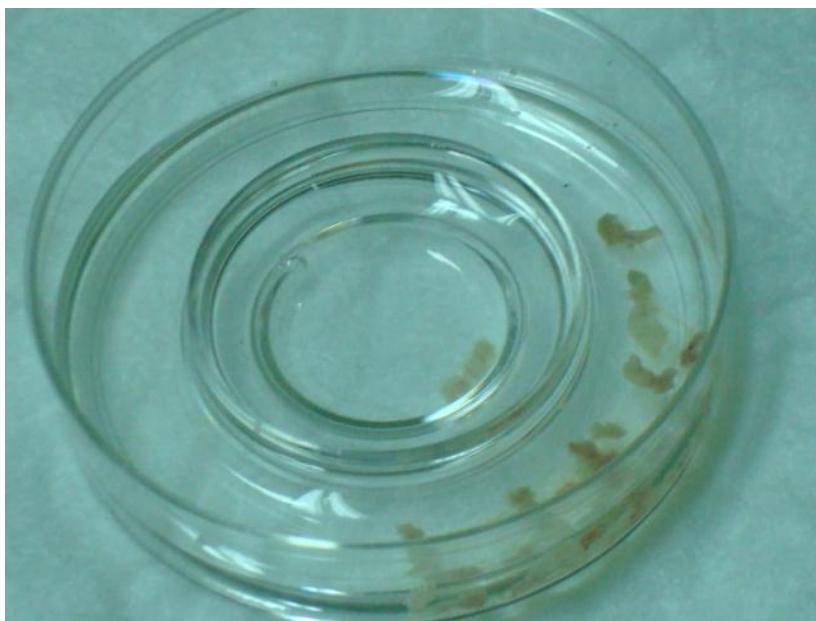
B.3.2β. Πειραματική Διαδικασία

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



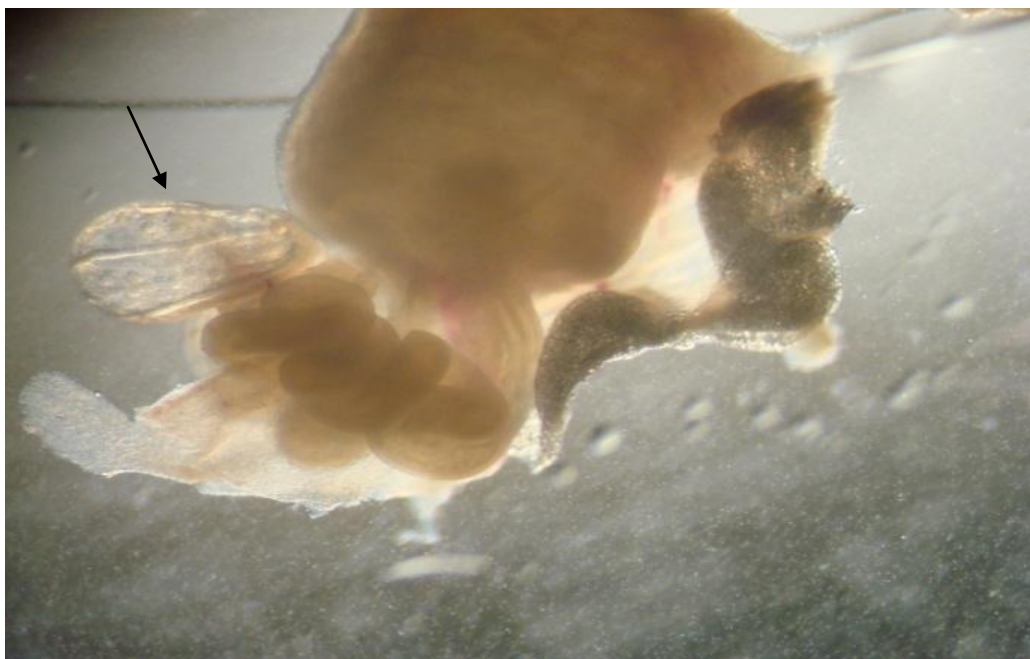
Εικόνα 24: Αφαίρεση σάλπιγγας

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



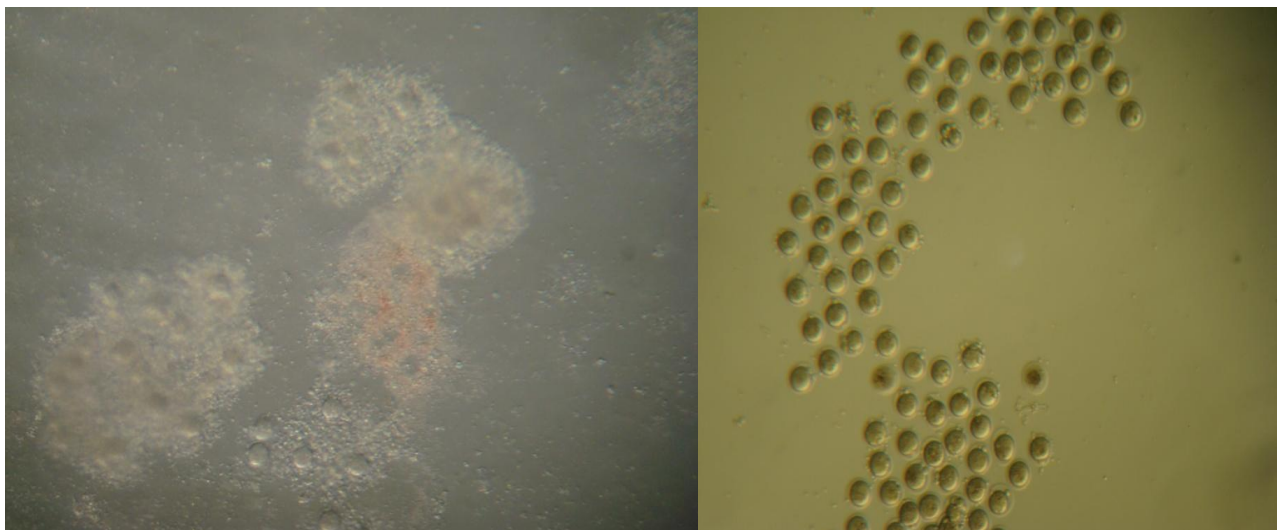
Εικόνα 25: petri dish με τις σάλπιγγες μετά την απομόνωσή τους από τους ποντικούς

Στο κεντρικό πηγάδι του πιάτου καλλιέργειας προστίθενται 10 μ L υαλουρονιδάσης, προκειμένου να επιτευχθεί ο καθαρισμός και η απομόνωση των γονιμοποιημένων ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν.



Εικόνα 26: Τμήμα της σάλπιγγας όπου φαίνονται τα γονιμοποιημένα ή μη ωάρια λίγο πριν την συλλογή τους

Τα γονιμοποιημένα ωάρια επωάζονται για 30 δευτερόλεπτα στην υαλουδονιδάση και αναρροφούνται με γυάλινη πιπέτα, απαλλαγμένα από τα κοκκώδη. Αρχικά, τοποθετούνται στην περιφέρεια του πιάτου καλλιέργειας και έπειτα αναρροφούνται και τοποθετούνται στο κεντρικό πηγάδι καινούργιου πιάτου καλλιέργειας που περιέχει μέσο απομόνωσης (DBPS: BSA, 9:1). Η διαδικασία των πλύσεων επαναλαμβάνεται 2-3 φορές έως ότου τα γονιμοποιημένα ωάρια απαλλαχθούν πλήρως από τα κοκκώδη κύτταρα στην περιφέρεια τους. Συνολικά στο πείραμα μας απομονώσαμε 245 ωάρια, τα οποία μοιράστηκαν τυχαία σε 10 τρυβλία. Το κάθε ένα περιέχει στο κέντρο 1mL καλλιεργητικού μέσου Ham's και BSA σε αναλογία 9:1. Στην περιφέρεια του τρυβλίου τοποθετούνται 4 mL καλλιεργητικού μέσου. Τα έμβρυα τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο με ρυθμισμένες συνθήκες: 37 °C, 5% CO₂ και 95% υγρασία.



Εικόνα 27: Ωάρια που περιβάλλονται από τα κοκκώδη κύτταρα (αριστερά)

Εικόνα 28: Ωάρια απαλλαγμένα από τα κοκκώδη κύτταρα (δεξιά)

B.3.3. ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΕΩΝ

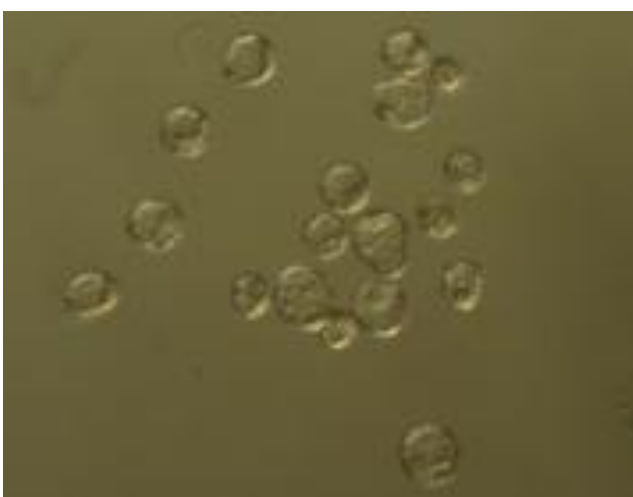
Την τέταρτη μέρα ανάπτυξης το έμβρυο έχει φτάσει στο στάδιο του μοριδίου και φαίνεται ως μια ομοιόμορφη μάζα, τα κύτταρα της οποίας δεν πρέπει να ξεχωρίζουν, λόγω των στενών κυτταρικών δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ τους.



Morula

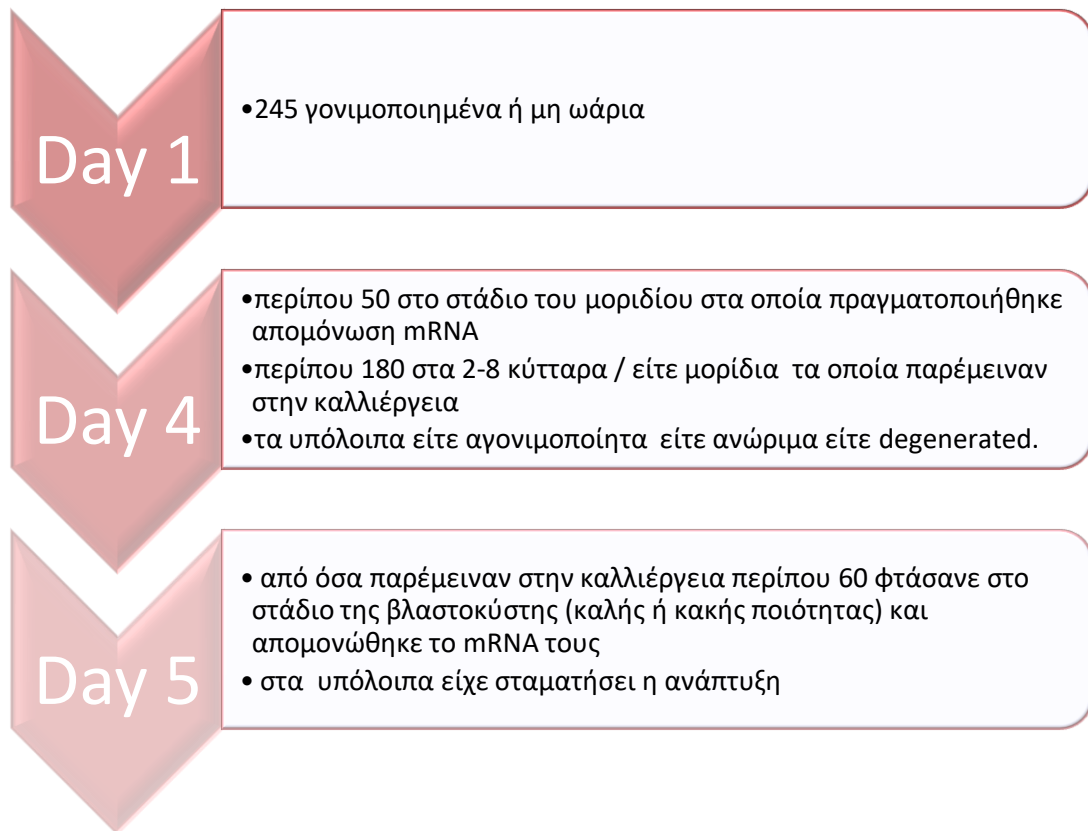
Εικόνα 29: *Η δομή του μοριδίου*

Το στάδιο της βλαστοκύστης είναι το τελευταίο εξελικτικό στάδιο του προεμφυτευμένου εμβρύου, πριν την εμφύτευση του στο ενδομήτριο και τη δημιουργία της κύησης. Χαρακτηρίζεται από ένα μεγάλο αριθμό κυττάρων, αύξηση του μεγέθους του εμβρύου και τη δημιουργία μίας κοιλότητας που ονομάζεται βλαστόκοιλος.



Εικόνα 30: *Η δομή της βλαστοκύστης*

Στο πείραμά μας από την πρώτη έως και την πέμπτη μέρα ανάπτυξης αξιολογήσαμε την ανάπτυξη των εμβρύων σε όλα τα τριβλύα και είχαμε τα εξής αποτελέσματα:



Εικόνα 31: Αξιολόγηση της πορείας των ωαρίων που συλλέξαμε από την πρώτη έως και την πέμπτη ημέρα γονιμοποίησης

B.3.4. Η ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΟΛΙΚΟΥ mRNA

Για την απομόνωση του mRNA 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 που διέθετε. Όλα τα στάδια της απομόνωσης του ολικού RNA έγιναν σε θερμοκρασία δωματίου 15-25ο C, ενώ όλα τα στάδια της φυγοκέντρωσης σε θερμοκρασία 20-25ο C.

B.3.4a. Υλικά

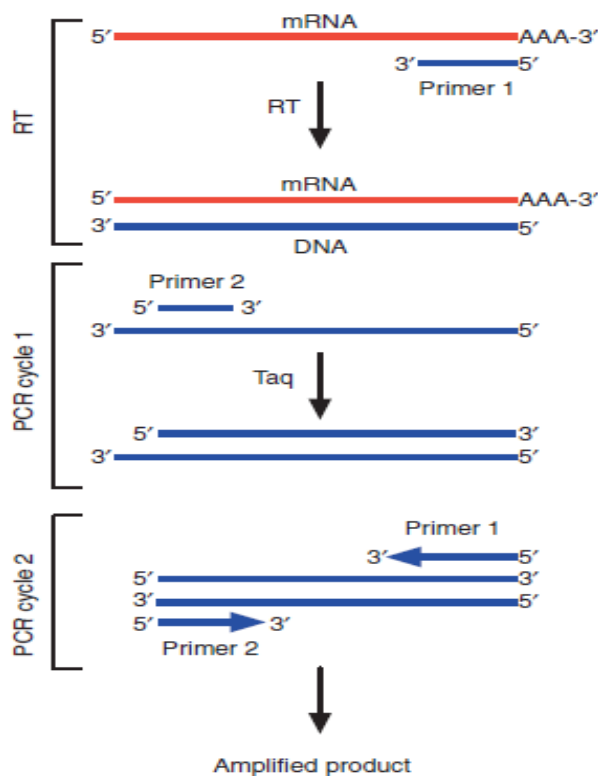
- **Buffer RLT** : προκαλεί λύση των κυττάρων πριν από την απομόνωση του RNA
- **b-Mercaptoethanol**: χρησιμοποιείται για να μειώσει τους δισουλφιδικούς δεσμούς και μπορεί να δράσει επίσης ως βιολογικό αντιοξειδωτικό με την απομάκρυνση ριζών
- **Carrier RNA working solution** : για τη λύση των κυττάρων και τη συλλογή ακόμη και μικρής ποσότητας RNA.
- **70% EtOH (αιθανόλη 70%)** για τη ρύθμιση των συνθηκών προσκόλλησης του RNA και την κατακρήμνισή του.
- **Buffer RW1**: για ξέπλυμα των μεμβρανών από προσδεδεμένο RNA
- **Buffer RPE** : για ξέπλυμα των μεμβρανών από προσδεδεμένο RNA

B.3.4β. Πρωτόκολλο

RNA – Extraction (micro-kit)
Φυγοκεντρούμε το δείγμα των κυττάρων στις 2500 rpm για 5 min
Ελέγχουμε το ίζημα στο μικροσκόπιο και αφαιρούμε προσεκτικά όσο από το υπερκείμενο μπορούμε
A) Προσθέτουμε 75λ buffer RTL + β Mercaptoethanol (για να σπάσω δισουλφιδικούς δεσμούς)
B) Προσθέτουμε 5λ carrier RNA (για να αυξήσω την ποσότητα του RNA που υπάρχει)
Κάνουμε vortex για 1 min
Προσθέτουμε 75λ 70% αιθανόλη και πιπετάρουμε (οι αλκοόλες συμπαρασύρουν ότι είναι πρωτεϊνικό. Επίσης, ενώνουν RNA μεταξύ τους).
Μεταφέρουμε το υλικό στη κόκκινη στήλη RNeasy Mini Elite και φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm
Πετάμε το flow – through και μετά προσθέτουμε 350λ Buffer RW1 και φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm (επαναλαμβάνουμε το βήμα δύο φορές).
Πετάμε το flow – through, μετά προσθέτουμε 500λ Buffer RPE και φυγοκεντρούμε για 1min στις 12.000 rpm
Πετάμε το flow – through και μετά προσθέτουμε 500λ 80% Αιθανόλη και φυγοκεντρούμε για 2min στις 12.000 rpm
Πετάμε το flow – through και μεταφέρουμε τη στήλη σε νέα βάση. Κλείνουμε το καπάκι και φυγοκεντρούμε για 5min στις 14.000 rpm
Μεταφέρουμε τη στήλη σε νέα βάση Eppendorf και στο κέντρο προσθέτουμε 14λ RNase Free Water , περιμένουμε 5min και φυγοκεντρούμε στις 14.000rpm για 1min
Στο eppendorf έχουμε το απομονωμένο RNA, πετάμε τη στήλη και το φυλάμε στους -80°

B.3.5. Η ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ ΑΠΟ ΤΟ mRNA

Για να κατασκευαστεί μία *cDNA βιβλιοθήκη*, απομονώνεται το ολικό «ώριμο» mRNA από κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο γονίδιο. Το mRNA χρησιμοποιείται σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA (cDNA: complementary DNA). Η σύνθεση του cDNA γίνεται από το ένζυμο *αντίστροφη μεταγραφάση*. Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-mRNA. Το mRNA διασπάται με κατάλληλες χημικές ουσίες ή αποδιατάσσεται με θέρμανση και τα cDNA χρησιμεύουν σαν καλούπι για τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας DNA. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA τα οποία μετά ενισχύονται με τη χρήση της PCR. Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA έγινε με την προσθήκη τυχαίων εξαμερών για να δράσουν ως εκκινητές στην αλληλουχία του PER1 γονιδίου και του INCENP γονιδίου.



Εικόνα 32: Σχηματική απεικόνιση της δημιουργίας μιας cDNA βιβλιοθήκης και της παραγωγής δίκλωνων μορίων DNA για την ενίσχυση της PCR

B.3.5α. Υλικά

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

3.5β. Πρωτόκολλο

cDNA (invitrogen)

1) Φτιάχνω ένα mix από:

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	x αριθμό δειγμάτων + 1
DNTP mix	1 μl	
Random Hexamers	2 μl	
H ₂ O	5 μl	

Από το mix παίρνω 8 μl και προσθέτω 2 μl RNA

→ επώση για 5' στους 60 °C και μετά κατευθείαν στον πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό

2) Φτιάχνω ένα mix από: (προσθέτω με τη σειρά)

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	x αριθμό δειγμάτων + 1
RT buffer	2 μl	
Mg Cl ₂	4 μl	
DTT	2 μl	
Rnase OUT	1 μl	

Προσθέτω 9μl από το 2^ο mix στα tubes με τα δείγματα

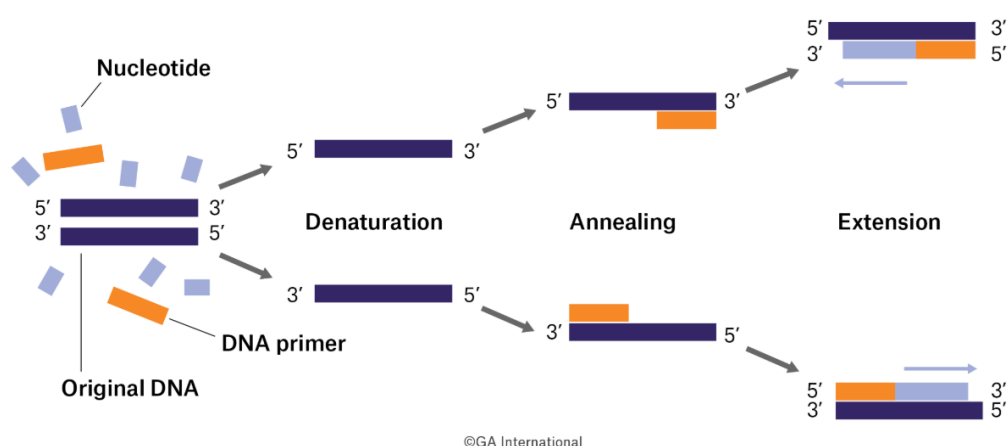
1. Ελαφριά ανάδευση
2. Επώση για 2' στους 25°C
3. Προσθέτω 1μl Superscript II RT σε κάθε tube
4. Επώση για 10' στους 25°C , 50' στους 12°C και 15' στους 70°C
(Πρόγραμμα cDNA INV)



Εικόνα 33: Θερμοκυκλοποιητής για την κατασκευή του cDNA

B.3.6. Η ΜΕΘΟΔΟΣ RT-PCR (ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟΥ ΧΡΟΝΟΥ) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ PER1 ΚΑΙ INCENP

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια τεχνική, η οποία επιτρέπει τη λογαριθμική ενζυμική ενίσχυση μικρών αλληλουχιών DNA (100-600 bp), χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα ένα μεγαλύτερο δίκλωνο μόριο DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται δύο εκκινητές (primers), καθένας από τους οποίους είναι συμπληρωματικός προς μια συγκεκριμένη αλληλουχία μιας εκ των δύο αλυσίδων του DNA. Η αλληλουχία των εκκινητών επιμηκύνεται μέσω της DNA πολυμεράσης, με τελικό αποτέλεσμα την παραγωγή αντιγράφων της επιθυμητής αλληλουχίας. Οι εκκινητές επαναχρησιμοποιούνται πολλές φορές για την περαιτέρω ενίσχυση της συγκεκριμένης αλληλουχίας από τα ήδη υπάρχοντα αντίγραφα, με αποτέλεσμα την λογαριθμική αύξηση των αντιγράφων. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας ενίσχυσης, οι δύο κλώνοι της αλληλουχίας του DNA αποδιατάσσονται μέσω αύξησης της θερμοκρασίας (denaturation). Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας για την προσδεση των εκκινητών (annealing) και σύνθεση της αλληλουχίας μέσω της DNA πολυμεράσης (extension).

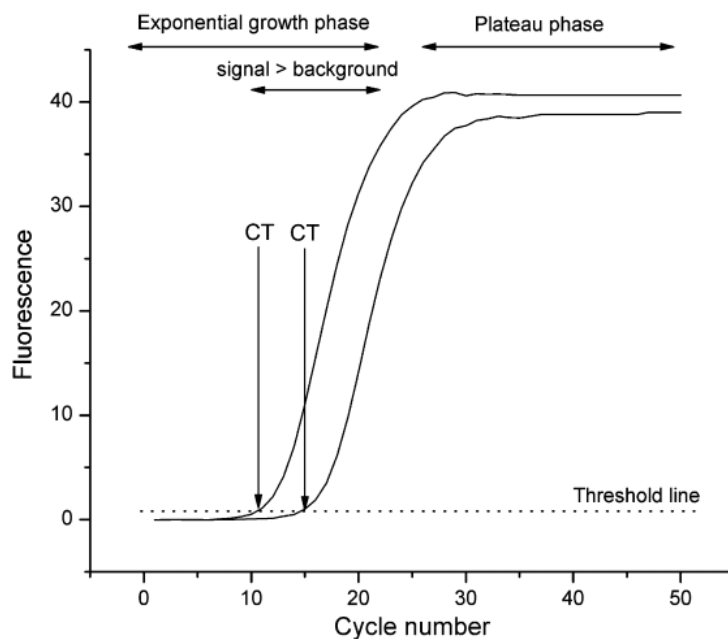


Εικόνα 34: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Τα τρία αυτά βήματα αποτελούν έναν κύκλο της PCR, στο τέλος του οποίου ο αριθμός των μορίων που φέρουν την αλληλουχία-στόχο έχει διπλασιαστεί. Στη συνέχεια η διαδικασία επαναλαμβάνεται με τα αντίγραφα σε κάθε επανάληψη να πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Η διαδικασία, συνήθως πραγματοποιείται σε 25 - 40 επαναλήψεις/κύκλους με κάθε στάδιο να διαρκεί περίπου 30 sec. Θεωρητικά μετά από n κύκλους τα αντίγραφα της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει θα είναι 2^n

Στη **Real-Time PCR**, η μέτρηση της ποσότητας του προϊόντος πραγματοποιείται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση ο φθορισμός μετριέται σε κάθε κύκλο της PCR, με αποτέλεσμα να προκύπτει μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot), γεγονός που επιτρέπει στον ερευνητή να παρακολουθεί όλη τη διαδικασία της αντίδρασης. Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.

Η καμπύλη ενίσχυσης διακρίνεται σε τρεις φάσεις: την εκθετική, τη γραμμική και τη φάση κορεσμού. Κατά την εκθετική φάση (exponential phase), σε κάθε κύκλο της αντίδρασης πραγματοποιείται ακριβής διπλασιασμός του προϊόντος, καθώς όλα τα απαραίτητα για την PCR συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) βρίσκονται σε περίσσεια (100% αποδοτικότητα). Καθώς συνεχίζεται η αντίδραση, επέρχεται η γραμμική φάση κατά την οποία κάποια από τα αντιδραστήρια αρχίζουν να εξαντλούνται, ενώ παράλληλα συσσωρεύονται, σταδιακά, αναστολείς. Στη συγκεκριμένη φάση, η αντίδραση της ενίσχυσης επιβραδύνεται, καθώς μειώνεται η αποδοτικότητα της και τελικά σταματάει εντελώς, οπότε η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε σημείο κορεσμού (plateau). Το σημείο κορεσμού διαφέρει μεταξύ των δειγμάτων και εξαρτάται από τις κινητικές των αντιδράσεών τους. Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης. Σημαντική παράμετρο για την ποσοτικοποίηση αποτελεί η τιμή C_t (threshold cycle). Πρόκειται για τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης ενίσχυσης που απαιτούνται ώστε η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold). Η τιμή του ορίου αυτού ορίζεται πάνω από την αντίστοιχη του μη-ειδικού σήματος (background). Η τιμή C_t είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας του υποστρώματος: όσο μικρότερη είναι η τιμή C_t τόσο υψηλότερη είναι η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος (64).

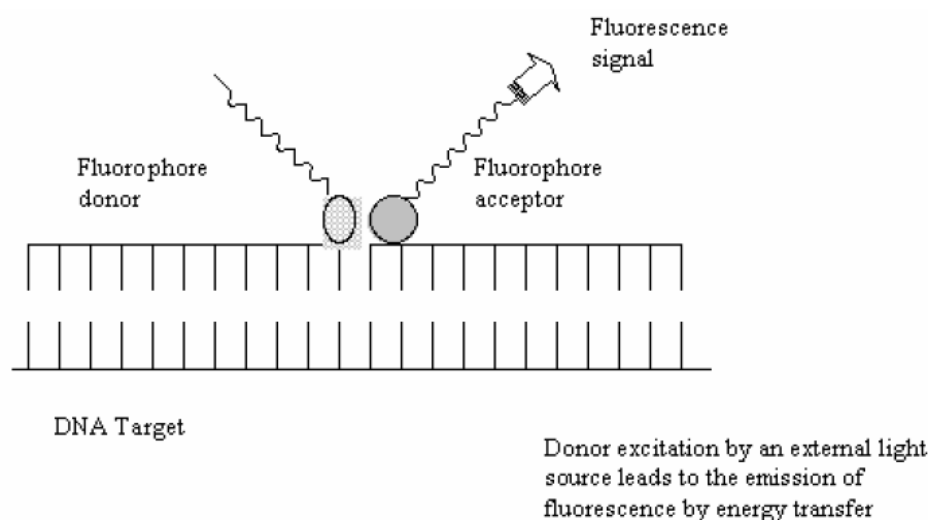


Εικόνα 35: Χαρακτηριστική καμπύλη ενίσχυσης, όπου διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση κορεσμού. Το όριο φθορισμού που τίθεται για τον προσδιορισμό της τιμής C_t , ορίζεται έτσι ώστε να βρίσκεται πάνω από το επίπεδο 'θορύβου' (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης. Στον οριζόντιο άξονα παριστάνεται ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης, ενώ στον κατακόρυφο η τιμή των επιπέδων φθορισμού.

Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real-Time PCR: τα μη ειδικά και τα ειδικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση, ενώ στη δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών (65, 66). Στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης γίνεται χρήση ανιχνευτή, ειδικού για την αλληλουχία-στόχο. Οι ανιχνευτές έχουν τη δυνατότητα σήμανσης με διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, των οποίων τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής επιτρέπουν τον σαφή διαχωρισμό τους.

Οι probes που χρησιμοποιήσαμε ανήκουν στην κατηγορία των **hybridization probes**. Στη περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια: δύο εκκινητές και δύο ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε να δεσμεύονται στο προϊόν της αντίδρασης σε παρακείμενες θέσεις. Επιπλέον, ο πρώτος ανιχνευτής φέρει στο 3' άκρο του

ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δότης ενέργειας, ενώ ο άλλος ανιχνευτής φέρει στο 5' άκρο του ένα φθορίζον μόριο που δρα ως δέκτης ενέργειας. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ενίσχυσης, οι δύο ανιχνευτές προσδένονται στο προϊόν, με αποτέλεσμα τη γειτνίαση των δύο φθορίζόντων μορίων και τη μεταξύ τους μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού (FRET). Η μεταφορά ενέργειας από την μια χρωστική (δότης) στην άλλη (δέκτης) οδηγεί στην παραγωγή φθορισμού σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η ένταση του παρατηρούμενου φθορισμού είναι ανάλογη του συνολικού DNA που παράγεται κατά την αντίδραση.



Εικόνα 36: Αρχή της μεθόδου *Hybridisation probes*. Οι δύο ανιχνευτές (δότης και δέκτης) δεσμεύονται σε παρακείμενες θέσεις πάνω στο προϊόν της αντίδρασης, οπότε επιτυγχάνεται η μεταφορά ενέργειας μέσω φθορισμού (FRET). Έτσι, η διέγερση του δότη, με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, οδηγεί στην εκπομπή φθορίζουσας ακτινοβολίας από το δέκτη, σε διαφορετικό μήκος κύματος. Η ένταση του παραγόμενου φθορισμού είναι ανάλογη της συνολικής ποσότητας DNA που παράγεται κατά την αντίδραση.

Ανεξάρτητα της μεθόδου που χρησιμοποιείται κάθε φορά η μέθοδος της RT-PCR ακολουθεί συγκεκριμένα βήματα, ελαφρώς παραλλαγμένα από την κλασική PCR:

- Αρχική αποδιάταξη (preincubation): ένας κύκλος στους 95 °C για 3'-10'
- Ενίσχυση (amplification): 35-45 κύκλοι με συνεχή επανάληψη τριών διαδοχικών σταδίων:

1. Αποδιάταξη (denaturation) στους 95 °C
 2. Υβριδισμός (annealing) στους 56 °C για το **PER1** και στους 51 °C για το **INCENP**
 3. Επιμήκυνση (extension) στους 72 °C
- Ψύξη (cooling): Ένας κύκλος στους 40 °C για 10-30sec

Preincubation							
Cycle N _o		Target °C		Hold		Ramp Rate (°C/s)	
1		95		0:10:00		4.4	
Amplification (PER1)				Amplification (INCENP)			
Cycle N _o	Target °C	Hold	Ramp Rate (°C/s)	Cycle N _o	Target °C	Hold	Ramp Rate (°C/s)
40	95	0:00:10	4.4	40	95	0:00:10	4.4
	56	0:00:20	2.2		51	0:00:20	2.2
	72	0:00:10	4.4		72	0:00:10	4.4
Cooling							
Cycle N _o		Target °C		Hold		Ramp Rate (°C/s)	
1		40		0:00:30		2.2	

Εικόνα 37: Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της RT-PCR

B.3.6.α Πρωτόκολλο

Σε σωληνάρια eppendorf των 0,5ml έγινε προσθήκη:

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

- 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.

mG6PD F	TAATgAgCTggTCATCCgTg
mG6PD R	CAggCTTCCCTgAgTTCATC
mG6PD FL	AgCTggATCTAACTTATggCAACAgATACA-FL
mG6PD LC	640-gAATgTgAAgCTCCCTgATgCCTATg p

- Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου G6PD

Per1 F	gTACATTCAAAGCCAAAGTCCTTC
Per1 R	TTgCTgACgACggATCTTTC
Per1 FL	TTACgCTTggTTgTACTgggAATgTT-FL
Per1 LC	640-CAgCTCTCCAAATACCTgAggATgCTg p

- Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου *per1*

Incenp F	CAGCCAACAAGgTggTAC
Incenp R	TTCACgCTTCAGCTTCAC
Incenp FL	TCCTCCTTCCgTCgCAggC-FL
Incenp LC	640-CTCTAaggCgCTggCgCTCCT

- Αλληλουχία εκκινητών και ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό του γονιδίου *Incenp*

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

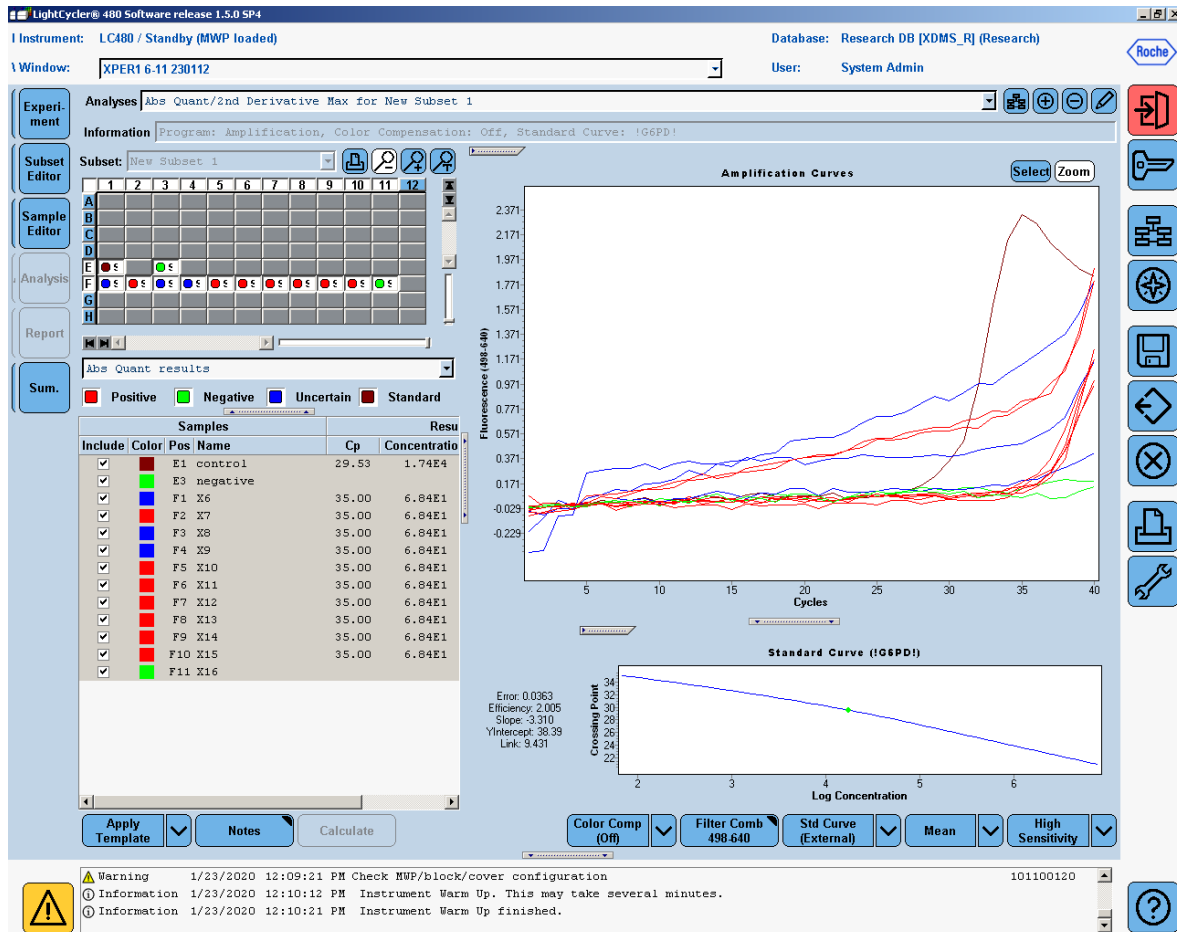
Γ.1α Έκφραση του γονιδίου G6PD

Όπως αναφέρθηκε το γονίδιο G6PD χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς ούτως ώστε να ομαλοποιηθεί το ποσό του cDNA που χρησιμοποιεί η PCR ως υπόστρωμα και ως εκ τούτου να καταστεί δυνατός ο υπολογισμός της σχετικής συγκέντρωσης των επιθυμητών γονιδίων σε σχέση με αυτό. Με τον τρόπο αυτό βεβαιώνουμε ότι πράγματι έχει απομονωθεί DNA στα δείγματά μας. Με την πραγματοποίηση των πειραμάτων παρατηρούμε ότι το γονίδιο G6PD παρουσιάζεται στα δείγματα μας.



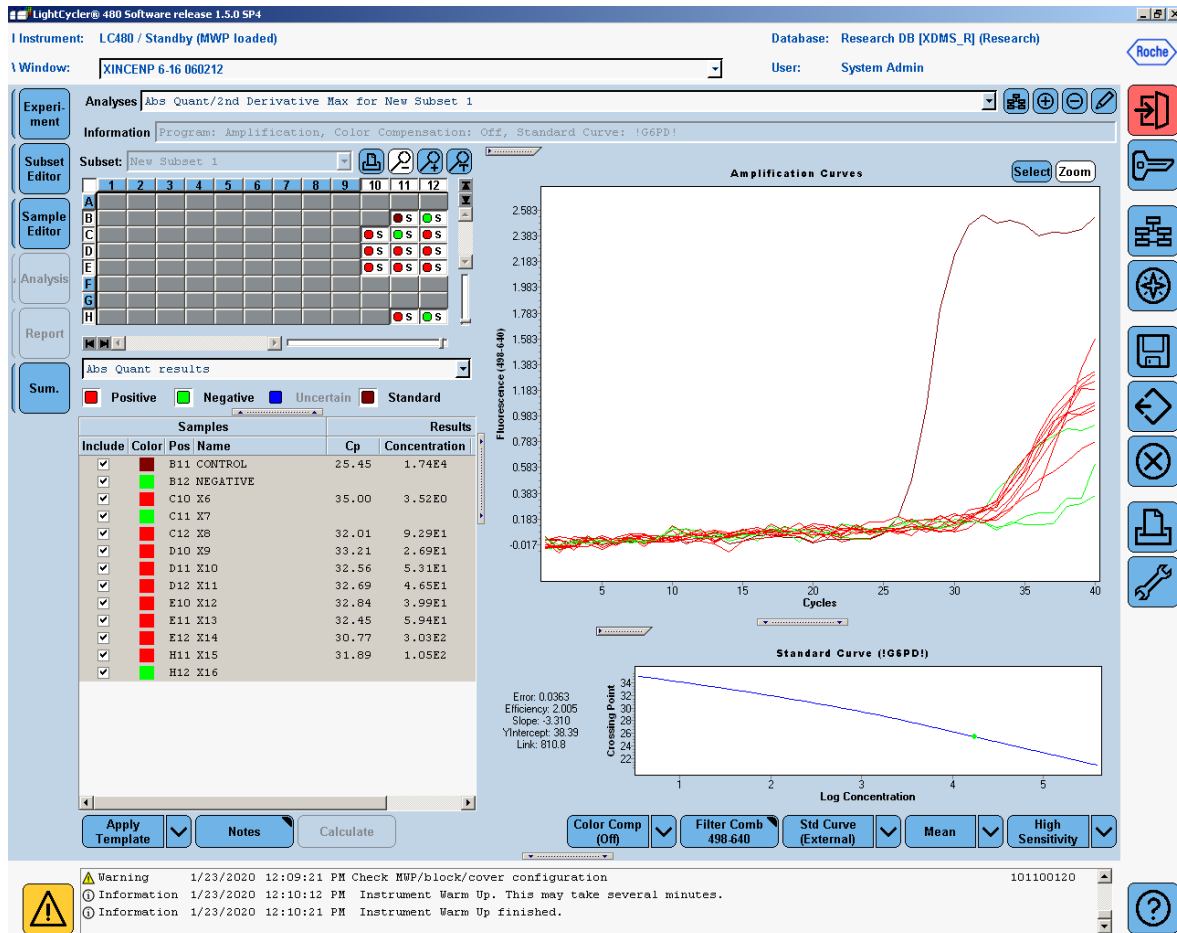
Γ.1β Έκφραση του γονιδίου per1

Το πρώτο υπο μελέτη γονίδιο ήταν το per1. Το συγκεκριμένο γονίδιο εκφράστηκε στα περισσότερα απο τα δείγματά μας.



Γ.1γ Έκφραση του γονιδίου INCENP

Το δεύτερο υπο μελέτη γονίδιο ήταν το INCENP. Επίσης εκφράστηκε στα περισσότερα δείγματά μας.



Γ. 2 Συγκεντρωτικά αποτελέσματα

Σε αυτήν την ενότητα θα παρουσιαστούν αναλυτικά τα αποτελέσματα από όλα τα δείγματα για το κάθε υπό μελέτη γονίδιο καθώς στην προηγούμενη ενότητα παρουσιάστηκαν ενδεικτικές φωτογραφίες από το πρόγραμμα της PCR για κάθε ένα από αυτά.

PER1 GENE					
α/α	Sample	Cp	Concentration	Concentration (G6PD)	Ratio (Sample/G6PDH)
1	X1	0	0	0	0
2	X2	0	0	0	0
3	X3	35	1.76E1	0	0
4	X4	35	1.76E1	0	0
5	X5	35	1.76E1	0	0
6	X6	35	6.84E1	0	0
7	X7	35	6.84E1	3.74E2	0,183
8	X8	35	6.84E1	2.13E2	0,321
9	X9	35	6.84E1	6.54E1	1,046
10	X10	35	6.84E1	1.20E2	0,57
11	X11	35	6.84E1	1.21E2	0,565
12	X12	35	6.84E1	3.61E1	1,895
13	X13	35	6.84E1	9.71E1	0,704
14	X14	35	6.84E1	1.40E1	4,886
15	X15	35	6.84E1	2.31E2	0,296
16	X16	0	0	0	0

Τα δείγματα X1 - X9 περιλαμβάνουν καλής και κακής ποιότητας μορίδια ενώ τα δείγματα X10 - X16 περιλαμβάνουν καλής και κακής ποιότητας βλαστοκύστες.

INCENP GENE					
α/α	Sample	Cp	Concentration	Concentration (G6PD)	Ratio (Sample/G6PDH)
1	X1		0	0	0
2	X2		0	0	0
3	X3	32.73	2.68E2	0	0
4	X4	32.92	2.19E2	0	0
5	X5	32.25	4.37E2	0	0
6	X6	35	3.52E0	0	0
7	X7	0	0	3.74E2	0
8	X8	32.01	9.29E1	2.13E2	0,436
9	X9	33.21	2.69E1	6.54E1	0,411
10	X10	32.56	5.31E1	1.20E2	0,443
11	X11	32.69	4.65E1	1.21E2	0,384
12	X12	32.84	3.99E1	3.61E1	1,105
13	X13	32.45	5.94E1	9.71E1	0,612
14	X14	30.77	3.03E2	1.40E1	21,643
15	X15	31.89	1.05E2	2.31E2	0,455
16	X16	0	0	0	0

Τα δείγματα X1 - X9 περιλαμβάνουν καλής και κακής ποιότητας μορίδια ενώ τα δείγματα X10 - X16 περιλαμβάνουν καλής και κακής ποιότητας βλαστοκύστες.

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

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι φυσιολογικές και οι ορμονικές διεργασίες καθώς και οι συμπεριφορικές αντιδράσεις ακολουθούν ένα κirkάδιο ρυθμό έκφρασης που συντονίζονται από ένα ενδογενές ρολόι. Το κύριο αυτό ρολόι εδράζεται στον υπερχιασματικό πυρήνα του υποθαλάμου στον εγκέφαλο και παράγει αυτοσυντηρούμενους κirkάδιους ρυθμούς συγχρονισμένους με περιφερειακούς ταλαντωτές. Οι κirkάδιοι 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.

Στα θηλαστικά εντοπίζεται μια ομάδα κirkάδιων γονιδίων που δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες (Clock, Bmal1, Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3, CK1e, TIM) 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. 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). 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.

Οι πρωτεΐνες CLOCK και BMAL1 που συσσωρεύονται στο κύτταρο, σχηματίζουν ένα σύμπλοκο χρησιμοποιώντας τους τομείς Per-Arnt-Sim (PAS) και επειδή το σύμπλοκο έχει μια βασική περιοχή έλικας-βρόχου-έλικας, συνδέεται σε ένα E-Box (με αλληλουχία CACGTG), και προάγει τη μεταγραφή πολυάριθμων CCGs (clock-controlled genes) που διαθέτουν αλληλουχία E-box στην περιοχή του εκκινητή τους. Τα CCK είναι η «μηχανή» του κirkάδιου μηχανισμού και η ρύθμιση των κirkάδιων ρυθμών σε μοριακό επίπεδο μεσολαβείται μέσω αντιγραφής και μετάφρασης θετικών και αρνητικών αυτορυθμιζόμενων βρόγχων μέσω των οποίων επιτυγχάνεται η περιοδικότητα. Ο ρόλος

των θετικών βρόγχων είναι να ενεργοποιούν τα clock genes και οι προκύπτουσες clock-πρωτεΐνες λειτουργούν ως αναστολείς της δράσης των θετικών βρόγχων.

Ένα από τα κύρια αντικείμενα μελέτης της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτέλεσε ο έλεγχος της έκφρασης του κirkάδιου γονιδίου *per1* σε προεμφυτευτικά στάδια σε έμβρυα επίμυων. Τα αποτελέσματα δείχνουν πως η έκφραση του γονιδίου είναι ενεργή στο στάδιο του μοριδίου και της βλαστοκύστης αλλά σε χαμηλά επίπεδα. Τα παραπάνω αποτελέσματα, βρίσκονται σχεδόν σε πλήρη συμφωνία με τη μελέτη των Johnson και Day (63), η οποία κατέδειξε πως η έκφραση του *per1* ήταν αισθητή σε ωοκύτταρα καθώς και σε όλα τα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια μελέτης (από το στάδιο 2 κυττάρων έως το στάδιο της βλαστοκύστης). Παρατηρήθηκε μια χαρακτηριστική πτώση της έκφρασης μετά το στάδιο των 2 κυττάρων, γεγονός που μοιάζει με το πρότυπο έκφρασης πολλών άλλων γονιδίων εξαιτίας της αποικοδόμησης του μητρικού RNA που συμβαίνει την περίοδο εκείνη στους επίμυες.

Σε επόμενη μελέτη από τους Amano και συν. (68) αναφέρεται, πως η μειωμένη μεταγραφική παρουσία των κirkάδιων γονιδίων σε όλα τα προεμφυτευτικά αναπτυξιακά στάδια εμβρύων έως και τη βλαστοκύστη, όπως παρατηρήθηκε και από τα αποτελέσματα των πειραμάτων μας, 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. Η έκφραση των κirkάδιων γονιδίων ενδεχομένως να μην σχετίζεται στη φάση αυτή απαραίτητα με τη ρύθμιση του κirkάδιου ρολογιού στα έμβρυα. Δεν έχει αξιολογηθεί η έκφραση των κirkάδιων γονιδίων σε 24ωρη διάρκεια και δεν είναι ξεκάθαρο εάν η έκφρασή τους διατηρείται σε επαναλαμβανόμενα χαμηλά επίπεδα ή αν παρουσιάζουν κάποια ρυθμικότητα. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν από τους ίδιους ερευνητές σε ωάρια και σε προεμφυτευτικά στάδια εμβρύων από βοοειδή και κουνέλια.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία μια πιθανή εξήγηση του παραπάνω φαινομένου 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.

Στον άνθρωπο από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχτεί ότι κirkάδια γονίδια και συγκεκριμένα τα Clock, Per1, Per2 και Per3 εκφράζονται στα έμβρυα σταδίου 8 κυττάρων (Ann A. Kiessling et al. 2009) (67), πράγμα που υποδηλώνει την κirkάδια ρύθμιση της εμβρυικής ανάπτυξης στα πρώτα στάδια.

Η σύνδεση μεταξύ του κirkάδιου συστήματος και της αναπαραγωγής αποσαφηνίζεται ολοένα και περισσότερο μετά απο μελέτες και πειράματα που δείχνουν ότι οποιαδήποτε επέμβαση στην έκφραση των κirkάδιων γονιδίων, οδηγεί σε μεταβολικές αλλαγές και αναπαραγωγικές δυσλειτουργίες. Σύμφωνα με τους Pilonis και Steinlechner (70) ποντίκια με διαταραχή στο per1 γονίδιο ήταν γόνιμα σε νεαρή ηλικία (2-6 μηνών), όμως σε πιο προχωρημένη ηλικία πάνω απο το 80% κυοφορούσαν όμως ο τοκετός και ο αριθμός των απογόνων ήταν μειωμένος. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι διαταραχές στο γονίδιο οδηγούσε σε επιταχυνόμενη αναπαραγωγική γήρανση.

Φαίνεται έτσι ότι το κirkάδιο σύστημα επηρεάζει ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών της φυσιολογίας μέσω νευρικών και ορμονικών οδών. Οι πολυμορφισμοί στα ανθρώπινα κirkάδια γονίδια έχουν εντοπιστεί και συσχετίζεται με αλλαγές στο χρονοδιάγραμμα του ύπνου και δυσλειτουργίες στη συμπεριφορά του ύπνου, ως εκ τούτου ο ισχυρισμός ότι πολλοί απο αυτούς τους πολυμορφισμούς πιθανότατα να επηρεάζουν και τη γονιμότητα είναι βάσιμος. Σε μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να αποσαφηνιστεί ποιός είναι ακριβώς ο ρόλος των κirkάδιων γονιδίων όσον αφορά στην αναπαραγωγή καθώς θα αποτελέσει μια σημαντική παράμετρο στον τομέα της Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής. 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.

Το δεύτερο γονίδιο που μελετήθηκε σε προεμφυτευτικά στάδια σε έμβρυα επίμυων στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το INCENP. Η πρωτεΐνη INCENP είναι μια έσω κεντρομερική πρωτεΐνη, η οποία δεσμεύεται στους μικροσωληνίσκους, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τον κινητοχώρο των χρωμοσωμάτων κατά τον αποχωρισμό τους στους

αντίθετους πόλους. Είναι μια από τις τρεις υπομονάδες που συνδέονται στην πρωτεΐνη Aurora B και αποτελεί μέρος του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών, το οποίο εντοπίζεται στους κινητοχώρους κατά την προμετάφαση, στη μιτωτική άτρακτο κατά τη μετάφαση, μεταφέρεται στο κέντρο της ατράκτου κατά την ανάφαση και βρίσκεται στο ενδιάμεσο σώμα κατά την κυτταροκίνηση (34). Οι δραματικές αλλαγές που συμβαίνουν όσον αφορά στο σημείο εντοπισμού του συμπλόκου, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι μπορεί να παίζει ρόλο στο συντονισμό γεγονότων κατά τον κυτταρικό κύκλο όσων αφορά στα χρωμοσώματα και στον κυτταροσκελετό.

Η Margarida Avo Santos και οι συνεργάτες (69) της μελέτησαν την έκφραση των μελών του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών σε ανθρώπινα ωάρια, σε ζυγώτες με τριπλοειδία και στα επιμέρους στάδια των 2, 4, 8 κυττάρων που προέκυψαν καθώς και σε κρυσυντηρημένα έμβρυα 8 κυττάρων, μορίδια και βλαστοκύστες καλής ποιότητας που είχαν σταματήσει στα στάδια της προμετάφασης. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πρωτεΐνη INCENP ανιχνεύτηκε σε όλα τα υπό μελέτη στάδια. Η ποσότητα των μεταγράφων ήταν χαμηλή στα ωάρια και στα έμβρυα μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων, ενώ μετέπειτα παρουσιάστηκε μια αύξηση των μεταγραφών από το στάδιο των 12-16 κυττάρων με μια πιο σημαντική αύξηση στο στάδιο της βλαστοκύστης.

Ο διαχωρισμός των χρωμοσωμάτων είναι κομβικό γεγονός της μιτωτικής διαίρεσης. Λόγω του ρόλου που διαδραματίζει η INCENP κατά τη διάρκεια της μίτωσης, οποιαδήποτε διατάραξη της λειτουργίας της επηρεάζει τόσο τον διαχωρισμό χρωμοσωμάτων όσο και την ολοκλήρωση της κυτταροκίνησης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι η Aurora B και η INCENP είναι συστατικά μέρη του συμπλόκου πρωτεϊνών-επιβατών, θα ήταν ενδιαφέρον να διερευνήσουμε τη συμμετοχή και τον ρόλο τους στην καρκινογένεση. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρον να διευκρινίσουμε έτι περαιτέρω τον ρόλο τους στη ρύθμιση των μιτωτικών σημείων ελέγχου της κυτταροκίνησης και κατ' επέκταση τον ρόλο τους στην καρκινογένεση.

E. Βιβλιογραφία

1. **Allen E.** The oestrous cycle in the mouse. *American Journal of Anatomy*. 1922;30:297–371.
2. **Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA** (2012), Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* 7(4): e35538. doi:10.1371/ journal.pone.0035538
3. **Caligioni CS.** Assessing reproductive status/stages in mice. 2009 *Curr Protoc Neurosci*. Jul;Appendix 4:Appendix 4I. doi: 10.1002/0471142301.nsa04is48.
4. **Bleil JD, Wassarman PM.** Sperm-egg interactions in the mouse: sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein. *Dev Biol*. 1983 Feb;95(2):317-24.
5. **Scott F Gilbert** 2006 *Developmental Biology*. 8th edition. Chapter 19:620-622
6. **Austin, C.R. 1957.** Fate of spermatozoa in the uterus of the mouse and rat. *J. Endocrinol*. 14: 335-342.
7. **Braden, A. W. H., and Austin, C. R.** (1954) The number of sperms about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. *Aust. J. Biol. Sci.* 7,543
8. **Merton, H.** (1939) Studies on reproduction in the albino mouse. III. The duration of life of spermatozoa in the female reproductive tract. *Proc. R. Soc. Edinb.* 59, 207.
9. **Edwards R. G. & J. L. Sirlin,** Labelled Pronuclei in Mouse Eggs fertilized by Labelled Sperm. *Nature* 177, 429
10. **Swann K1, Parrington J.** Mechanism of Ca²⁺ release at fertilization in mammals. *J Exp Zool*. 1999 Oct 15;285(3):267-75.
11. **Ciemerych , M., & Sicinski, P. (2005).** “Cell cycle in mouse development.” *Oncogene*, 2877-2892.
12. **Artus , J., & Cohen-Tannoudji , M. (2008).** Cell cycle regulation during early mouse embryogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, σσ. 78-86.
13. **Latham E. Keith, Schultz M. Richard** "Embryonic genome activation" *Frontiers in Bioscience* 6, d748-759, June 1, 2001
14. **Flach et al., 1982** The transition from maternal to embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *The EMBO Journal* 1(6):681-6 · February 1982
15. **FanyiZengaDon A.BaldwinbRichard M.Schultz.** Transcript profiling during preimplantation mouse development. *Developmental Biology* Volume 272, Issue 2, 15 August 2004, Pages 483-496

- 16. Μαρμάρας Βασίλης, Λαμπροπούλου-Μαρμάρα Μαρία (2005)** Βιολογία Κυττάρου, μοριακή προσέγγιση. 5η έκδοση.
- 17. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., (1994)** Molecular Biology of the cell. Garland Publishing Inc
- 18. Rusan NM1, Peifer M.** A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J Cell Biol.* 2007 Apr 9;177(1):13-20. Epub 2007 Apr 2.
- 19. Lenore Urbani Tim Stearns** The centrosome . *Current Biology* VOLUME 9, ISSUE 9, PR315-R317, MAY 06, 1999
- 20. Bettencourt-Dias M1, Glover DM.** Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jun;8(6):451-63.
- 21. Doxsey S.** Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Sep;2(9):688-98.
- 22. Walczak CE1, Heald R.** Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int Rev Cytol.* 2008;265:111-58. doi: 10.1016/S0074-7696(07)65003-7.
- 23. Helder Maiato Conly L. Rieder Alexey Khodjakov** Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis *J Cell Biol* (2004) 167 (5): 831–840.
- 24. Carmena M. & W. C. Earnshaw (2003).** The cellular geography of Aurora kinases. *Nature Reviews Mol. Biol. Cell* 4: 842-854
- 25. Ferrari S.** Protein kinases controlling the onset of mitosis. (2006) *Cell Mol. Life Sci.* 63, 580-584.
- 26. Kara B. Lukasiewicz Wilma L. Lingle** Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. (2009) *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50(8):602-19
- 27. Brown JR1, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR.** Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol.* 2004 Oct 12;4:39.
- 28. Giet R., Petretti C. & Prigent C.,** Aurora kinases,aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends in Cell Biology* (2005) 15(5): 241-250.
- 29. Carnero A., (2006)** Cell cycle and checkpoints. *Clinical and Translational Oncology* 2 (1): 12-22. Centrosome Cycle, *Environmental and Molecular Mutagenesis* (2009) 50:602
- 30. Ducat D., Zheng Y., (2004)** Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation, *Experimental Cell Research* 301:60– 67.

31. **Earnshaw W. C. & Cooke C. A.**, Analysis of the distribution of the INCENPs throughout mitosis reveals the existence of three distinct substages of metaphase and early events in cleavage furrow formation. *J. Cell Sci.* (1991) 98, 443-361.
32. **Uren, A. G. et al. (2000)** Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.* 10, 1319–1328
33. **Ruchaud S., Carmena M. & W. C. Earnshaw (2007).** Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Reviews Mol. Biol. Cell* 8: 798-812
34. **Bolton A.M., Lan W., Powers E.S., McClelland L. M., Kuang J., Stukenberg T.P. (2002).** Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 13: 3064-3077.
35. **E. S. Gurdjian** The diencephalon of the albino rat†. Studies on the brain of the rat. (1927) JCN Volume43, Issue1 Pages 1-114
36. **Wendell J. S. Krieg** The hypothalamus of the albino rat. (1932) JCN Volume55, Issue1 Pages 19-89
37. **Ethan Buhr1 and Russell N Van Gelder.** The making of the master clock. (2014) eLife. 3: e04014.
38. **Moore RY, Eichler VB.** Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972 Jul 13;42(1):201-6.
39. **Stephan FK, Zucker I.** Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Jun;69(6):1583-6.
40. **K. Brown-Grant Geoffrey Raisman** Abnormalities in reproductive function associated with the destruction of the suprachiasmatic nuclei in female rats. *The Royal Society* (1977) Volume 198 Issue 1132
41. **Van den Pol AN, Powley T.** A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. *Brain Res.* 1979 Jan 12;160(2):307-26.
42. **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
43. **Hastings MH, Mead SM, Vindlacheruvu RR, Ebling FJ, Maywood ES, Grosse J.** Non-photoc phase shifting of the circadian activity rhythm of Syrian hamsters: the relative potency of arousal and melatonin. *Brain Res* 1992; 591:20-26.

44. **Hao H, Allen DL, Hardin PE.** Acircadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1997; 17(7):3687-3693.
45. **Schibler and Sassone-Corsi (2002)** *A web of circadian pacemakers*. *Cell*, 111 (2002), pp. 919–922
46. **Roenneberg T, Morse D. (1993)** Two circadian oscillators in one cell. *Nature*; 62:362-364.
47. **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.
48. **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.
49. **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.
50. **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.
51. **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.
52. **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.
53. **Jones Suzan (2004)** An overview of the basic helix-loop-helix proteins *Genome Biology* 5:226
54. **Dunlap JC.** Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 1999; 96:271-290.
55. **Rana S., Mahmood S. (2010)** *Circadian rhythm and its role in malignancy*. *Journal of Circadian Rhythms* 2010, 8:3
56. **Gery, S., Komatsu, N., Baldjvan, L., Yu, A., Koo, D. and Koeffler, H. P. (2006).** The circadian gene *per1* plays an important role in cell growth and DNA damage control in human cancer cells. *Mol. Cell.* 22, 375-382.

57. **Khapre, R. V., Samsa, W. E. and Kondratov, R. V. (2010).** Circadian regulation of cell cycle: Molecular connections between aging and the circadian clock. *Ann. Med.* 42, 404-415.
58. **Rana, S. and Mahmood, S. (2010).** Circadian rhythm and its role in malignancy. *J. Circadian Rhythms* 8, 3.
59. **Sahar, S. and Sassone-Corsi, P. (2007).** Circadian clock and breast cancer. *Cell Cycle* 6, 1329-1331.
60. **Shifeng Chen, Kong-bung Choo, Ming-Feng Hou, Kun-Tu Yeh, Shou-Jen Kuo, Jan-Gowth Chang** Deregulated expression of the PER1, PER2 and PER3 genes in breast cancers. (2005) *Carcinogenesis Biology, Medicine*
61. **Michael J Boden and David J Kennaway.** Circadian rhythms and reproduction. *Reproduction*. 2006 Sep;132(3):379-92.
62. **Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P.** No circadian rhythms in testis: Period1 expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol Endocrinol.* 2003;17:141.
63. **Johnson MH, Lim A, Fernando D, Day ML.** Circadian clockwork genes are expressed in the reproductive tract and conceptus of the early pregnant mouse. *Reprod Biomed Online.* 2002;4:140.
64. **Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M. W. (2005).** Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol* 34, 597-601.
65. **Bustin, S. A. (2000).** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 25, 169-193.
66. **Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C. (2001).** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* 25, 386-401.
67. **Ann A. Kiessling et al (2009)** Evidence that human blastomere cleavage is under unique cell cycle control. *Journal of Assisted Reproduction and genetics* volume 26, pages187–195
68. **Amano, T., Matsushita, A., et al (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.

69. Margarida Avo Santos et al (2011) A role for Aurora C in the chromosomal passenger complex during human preimplantation embryo development. Hum Reprod. Jul;26(7):1868-81.

70. Pilorz Violetta , Steinlechner Stephan (2008) Low reproductive success in Per1 and Per2 mutant mouse females due to accelerated ageing? Hum Reprod Apr;135(4):559-68.