



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

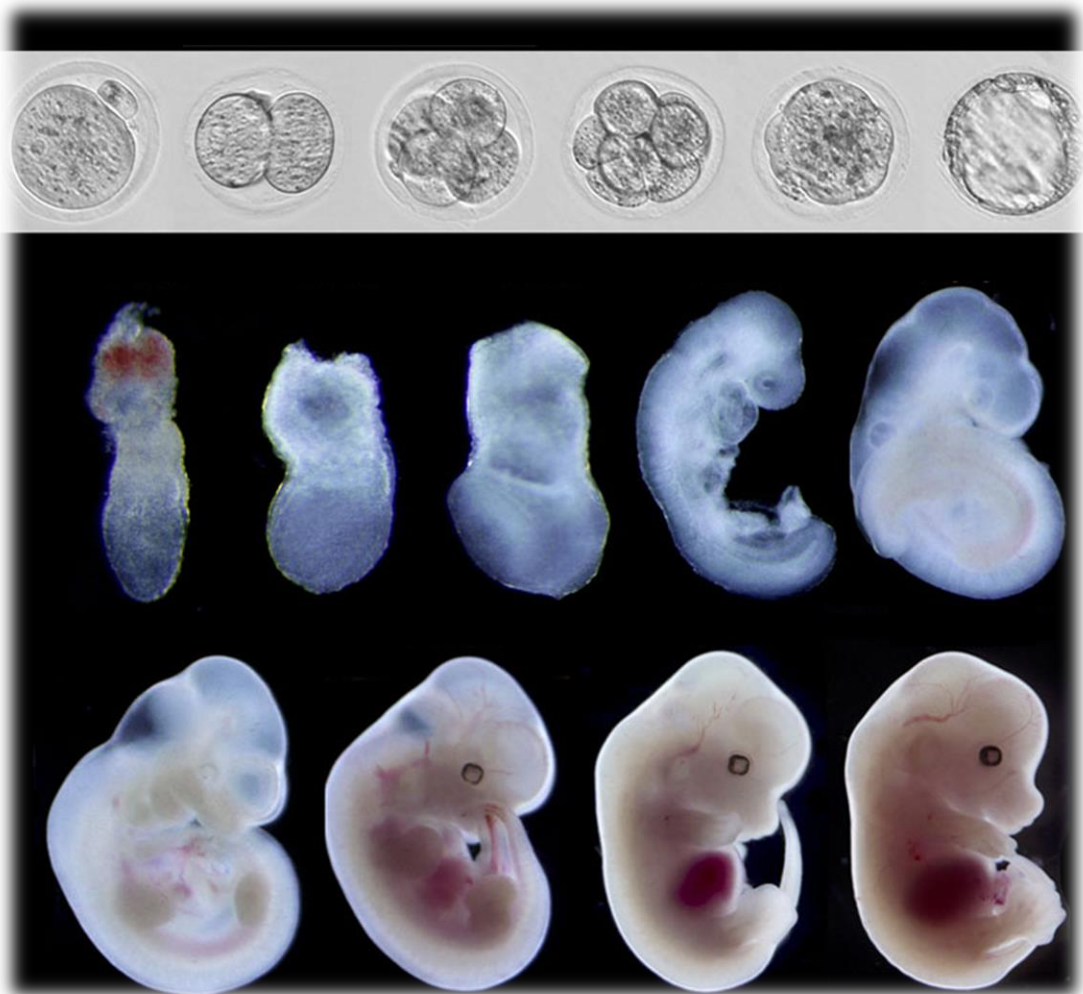
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΗ – ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ  
ΙΑΤΡΙΚΗ»

## Διπλωματική Εργασία

«Αναζήτηση της έκφρασης των κικκάδιων γονιδίων *Per1* και *Per2* σε  
έμβρυα επίμυων ως του σταδίου της βλαστοκύστης»

Αννέτα Σώζου



Υπεύθυνος Καθηγητής: Δημήτριος Λουτράδης

Αθήνα 2018

# Περιεχόμενα

---

Περίληψη.....	4
---------------	---

## Κεφάλαιο 1

1.1. Το ποντίκι (House mouse) ως οργανισμός μοντέλο .....	5
1.2. Ωογένεση - ωοθυλακιογένεση – ωοθυλακιορρηξία στον ποντικό.....	6
1.2.1. Ορμονική ρύθμιση του οιστρικού κύκλου του ποντικού .....	10
1.3. Σπερματογένεση στον ποντικό .....	12
1.4. Γονιμοποίηση .....	15
1.5. Ενεργοποίηση γονιδίων εμβρύου .....	19
1.6. Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύου ποντικού .....	21

## Κεφάλαιο 2

2.1. Κιρκάδιοι ρυθμοί .....	24
2.1.1. Κεντρικοί και περιφερικοί κιρκάδιοι βηματοδότες .....	25
2.1.1.1. Ο μηχανισμός των κιρκάδιων ρυθμών στα θηλαστικά ..	27
2.1.2. Κιρκάδιοι ρυθμοί σε μοριακό επίπεδο .....	30
2.2. Κιρκάδιοι ρυθμοί και αναπαραγωγή .....	32
2.2.1. Ο ρόλος της μελατονίνης .....	32
2.2.2. Στοιχεία για την επίδραση στην αναπαραγωγή.....	35
2.3. Τα κιρκάδια γονίδια Per1 και Per2 .....	38

## Κεφάλαιο 3

3.1. Σκοπός .....	41
-------------------	----

## Κεφάλαιο 4

4.1. Υλικά και μέθοδοι .....	42
4.1.1. Πρόκληση ωθηλακιορρηξίας .....	42
4.1.2. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών .....	42
4.1.3. Συλλογή εμβρύων .....	43
4.1.4. Ανάπτυξη και απομόνωση εμβρύων .....	44
4.1.5. Απομόνωση mRNA .....	45
4.1.6. Δημιουργία cDNA.....	48
4.1.7. Real – Time PCR .....	50

## Κεφάλαιο 5

5.1. Αποτελέσματα .....	53
5.2. Συζήτηση.....	55
5.3. Σύνοψη .....	58

Βιβλιογραφία.....	59
-------------------	----

# Περίληψη

Στα θηλαστικά, η ωογένεση στα θηλυκά άτομα και η σπερματογένεση στα αρσενικά άτομα, οδηγεί στη δημιουργία των απλοειδών γαμετικών κυττάρων τους, τα ωάρια και τα σπερματοζωάρια αντίστοιχα. Ο σχηματισμός του ζυγωτού είναι αποτέλεσμα της συνένωσης του θηλυκού και του αρσενικού γαμέτη στη λήκυθο της σάλπιγγας. Το γονιμοποιημένο ωάριο μεταφέρεται στη συνέχεια στη μήτρα όπου και εμφυτεύεται. Κατά τη μεταφορά αυτή, το προεμφυτευτικό έμβρυο υφίσταται πολλές δομικές αλλαγές, καθώς διαιρείται διαδοχικά. Συγκεκριμένα, το γονιμοποιημένο ωάριο διαιρείται σε 2, 4 και 8 κύτταρα, εν συνεχεία, σχηματίζει το μορίδιο και έπειτα τη βλαστοκύστη.

Θέμα της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η αναζήτηση της έκφρασης των κικκάδιων γονιδίων *Per1* και *Per2* σε έμβρυα επίμυων έως του σταδίου της βλαστοκύστης. Σκοπός, είναι να διαπιστώσουμε κατά πόσο τα κικκάδια γονίδια συμμετέχουν στις διαιρέσεις του προεμφυτευτικού εμβρύου.

Γενικά, τα κικκάδια γονίδια, μεταγράφονται και μεταφράζονται μέσω αγκυλών παλίνδρομης ρύθμισης, οι οποίες απαρτίζονται από θετικές και αρνητικές συνιστώσες με σκοπό την πραγματοποίηση μιας περιοδικής μεταβολής. Όλα αυτά οδηγούν σε αλλαγές στη βιοχημεία, φυσιολογία και συμπεριφορά του οργανισμού.

Η συλλογή εμβρύων έγινε από θηλυκά ποντίκια, ηλικίας 3 - 4 εβδομάδων, τα οποία καλλιεργήθηκαν *in vitro* έως του σταδίου της βλαστοκύστης. Έπειτα, απομονώθηκε το ολικό mRNA από τα εμβρυικά κύτταρα και ακολούθησε η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA). Τέλος, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *Per1* και *Per2* στα διάφορα προεμφυτευτικά στάδια με τη μέθοδο της Real - Time PCR.

Τα αποτελέσματα της παρούσης διπλωματικής εργασίας έδειξαν έκφραση του γονιδίου *Per1* μόνο στο στάδιο των 8 κυττάρων, ενώ παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *Per2* σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια. Τα αποτελέσματα αυτά δεν αποδεικνύουν απαραίτητα την ύπαρξη κικκάδιας ρυθμικότητας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου και θα πρέπει να υπάρξει επιπλέον έρευνα για την εξαγωγή συμπεράσματος.

# Κεφάλαιο Ι

## 1.1. Το ποντίκι ως οργανισμός μοντέλο

Το ποντίκι (house mouse) αποτελεί έναν οργανισμό μοντέλο που χρησιμοποιείται ευρέως για ερευνητικές μελέτες και έχει γίνει πλέον το προτιμητέο θηλαστικό για την διεξαγωγή γενετικών πειραμάτων. Συγκεκριμένα, καθώς το ποντίκι και ο άνθρωπος μοιράζονται πολλά κοινά γενετικά χαρακτηριστικά, εξετάζοντας τη φυσιολογία, την ανατομία και τον μεταβολισμό ενός ποντικού, οι επιστήμονες μπορούν να αποκτήσουν μια πολύτιμη εικόνα για το πως λειτουργούν οι άνθρωποι.

Η χρήση του ποντικού ως πειραματόζωο έχει πολλά πλεονεκτήματα. Καταρχάς, η καλλιέργειά του είναι σχετικά φτηνή και εύκολη, ενώ ταυτόχρονα τα ενήλικα ποντίκια μπορούν να αναπαράγονται γρήγορα (κάθε τρεις εβδομάδες) με αποτέλεσμα να δίνεται η δυνατότητα στους ερευνητές να πραγματοποιούν πειράματα με μεγάλο αριθμό πειραματόζωων. Ένα ακόμα πλεονέκτημα είναι ότι τα ποντίκια μπορούν να παράγουν απογόνους μόλις δέκα εβδομάδες μετά τη γέννησή τους, πράγμα που σημαίνει ότι πολλές γενιές μπορούν να παρατηρούνται ταυτόχρονα. Παράλληλα, ένα ποντίκι έχει μικρό κύκλο ζωής (ένα έτος ζωής ποντικού αντιστοιχεί σε τριάντα ανθρώπινα) δίνοντας έτσι στους ερευνητές τη δυνατότητα να μελετήσουν τις συνέπειες της γήρανσης.

Όσον αφορά το γενετικό υλικό των ποντικών, είναι παρόμοιο με το ανθρώπινο. Έτσι, οι επιστήμονες έχουν τη δυνατότητα με τη χρήση της γενετικής μηχανικής να προσθέσουν ή να αφαιρέσουν γονίδια από το γονιδίωμά τους και με αυτόν τον τρόπο να εξακριβώσουν τον ρόλο των συγκεκριμένων γονιδίων στο ποντίκι και κατ' επέκταση στον



Εικόνα 1.1.1. Image credit: Taichi Suzuki.

άνθρωπο. Τέλος, τα ποντίκια είναι οι κατάλληλοι οργανισμοί για τη μελέτη των

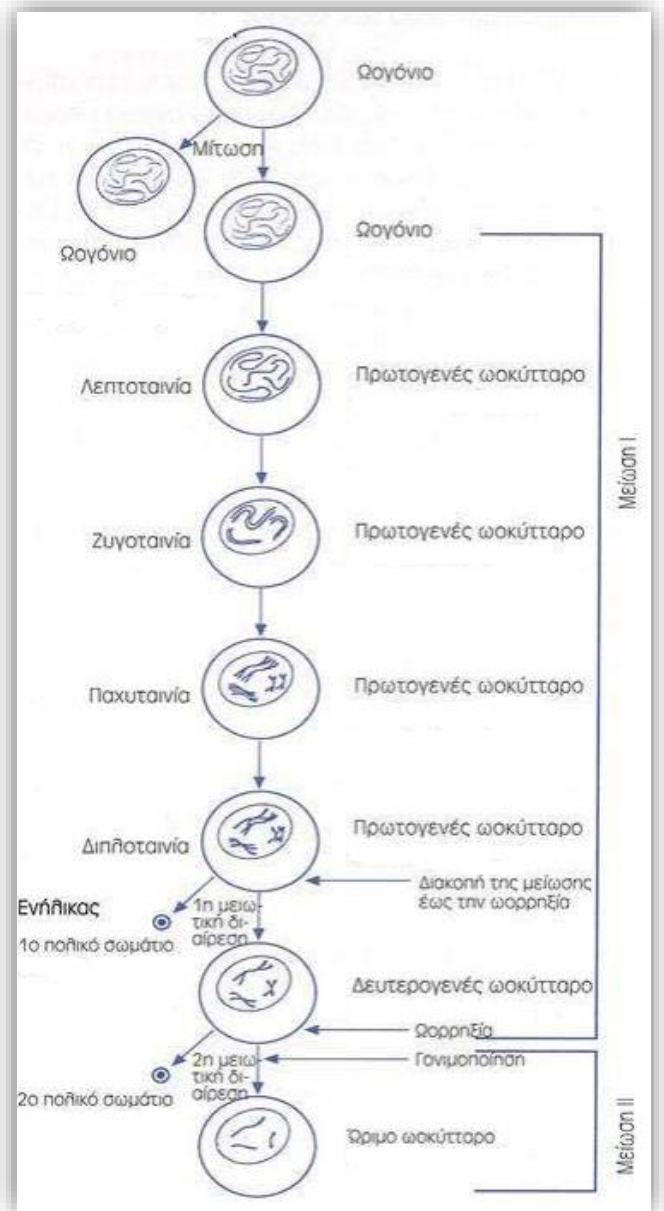
πολύπλοκων βιολογικών συστημάτων που υπάρχουν στον άνθρωπο, όπως το ανοσοποιητικό, το ενδοκρινικό, το νευρικό, το καρδιαγγειακό και το σκελετικό σύστημα. Όπως και οι άνθρωποι έτσι και αυτά αναπτύσσουν ασθένειες που επηρεάζουν αυτά τα συστήματα, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου και τον διαβήτη.

## 1.2. Ωογένεση - Ωοθυλακιογένεση - Ωοθυλακιορρηξία ΣΤΟΝ ΠΟΝΤΙΚΟ

Η ωοθυλακιογένεση αποτελεί ένα φυσικό μοντέλο το οποίο αποδεικνύει ξεκάθαρα την πολυπλοκότητα της ανάπτυξης και εξέλιξης αρχηγόνων κυττάρων σε ώριμα και πλήρως διαφοροποιημένα κυτταρικά συστήματα. Η διαδικασία αυτή γίνεται μέσα στο μικροπεριβάλλον των ωοθηκών όπου ξεκινά από το αρχέγονο γοναδικό κύτταρο και φτάνει στο ώριμο ωοθυλάκιο.

Συγκεκριμένα στον ποντικό, το ωάριο είναι το τελικό προϊόν μιας διαδικασίας η οποία ξεκινά κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης και τελειώνει μήνες έως και χρόνια αργότερα στο αναπαραγωγικά ώριμο ενήλικο ποντίκι.

Η ωογένεση ξεκινά με την εμφάνιση αρχέγονων γεννητικών κυττάρων (ημέρα 7 – 9 εμβρύου) τα οποία γίνονται ωογόνα που καλύπτουν τις ωοθήκες του

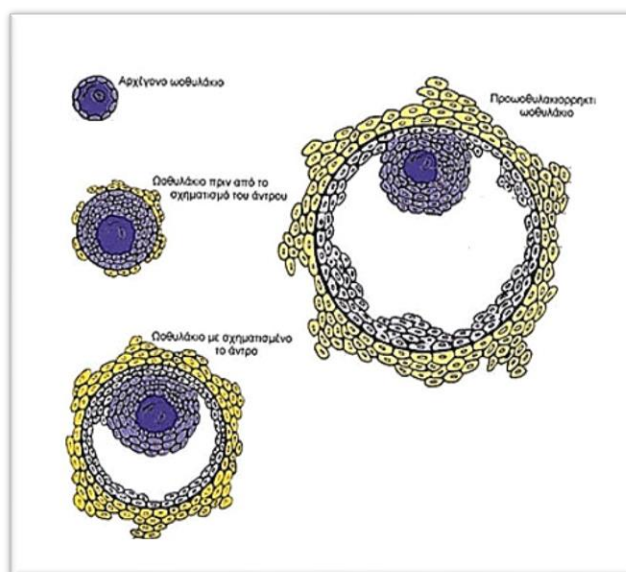


Εικόνα 1.2.1.

εμβρύου (ημέρα 11 – 12). Τα ωογόνια διαιρούνται μιτωτικά για κάποιο χρονικό διάστημα. Ύστερα από τη τελευταία μιτωτική διαίρεση, ξεκινά η μειωτική διαίρεσή τους με αποτέλεσμα να προκύψουν τα *πρωτογενή ωοκύτταρα* (ημέρα 12 – 14) τα οποία παραμένουν στη πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Η πρόφαση της μείωσης I περιλαμβάνει τα στάδια της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας και της διπλοταινίας. Στα στάδια της λεπτοταινίας, της ζυγοταινίας και της παχυταινίας παρατηρείται σύναψη ομόλογων χρωμοσωμάτων προς σχηματισμό συναπτονηματικών συμπλεγμάτων. Τα τελευταία χαλαρώνουν στο στάδιο της διπλοταινίας όπου πραγματοποιείται μερικός διαχωρισμός κάθε ζεύγους των αδελφών χρωματίδων από το ομόλογό τους ζεύγος και παρατηρούνται χρωματίδες τετράδας που συνδέονται στο κεντρομερίδιο.

Λίγο μετά τη γέννηση, σχεδόν όλα τα ωοκύτταρα βρίσκονται στο στάδιο της διπλοταινίας, όπου και παραμένουν μέχρι την στιγμή που θα πραγματοποιηθεί η επανέναρξη της μείωσης στη φάση της ωορρηξίας. Αυτή η δεξαμενή ωοκυττάρων είναι η μόνη πηγή μη γονιμοποιημένων ωαρίων στο αναπαραγωγικά ώριμο ποντίκι (6 εβδομάδων). Αξίζει να σημειωθεί ότι ένα ποσοστό της τάξης του 50% του πληθυσμού των ωαρίων που υπάρχουν στις ωοθήκες κατά τη γέννηση, χάνεται στη πρώτη βδομάδα της νεογνικής ζωής.

Στο αναπαραγωγικά ώριμο ποντίκι κάθε ωοθήκη περιέχει περίπου 8.000 ωοκύτταρα τα οποία είναι σταματημένα στη πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (στάδιο όψιμης διπλοταινίας). Καθένα από αυτά τα ωοκύτταρα (διαμέτρου 12 – 15 μm) περιέχεται σε ένα κυτταρικό θυλάκιο που αυξάνεται ταυτόχρονα με το ωάριο και αποτελείται από ένα μονό στρώμα επιθηλιακού τύπου κυττάρων (*αρχέγονο ωοθυλάκιο*). Όσα από τα αρχέγονα ωοθυλάκια συνεχίσουν να εξελίσσονται μετατρέπονται αρχικά στα πρωτογενή και αργότερα στα δευτερογενή ωοθυλάκια. Το



Εικόνα 1.2.2.

πρωτογενές ωοθυλάκιο αποτελείται από ένα ωάριο γύρω από το οποίο υπάρχει η διαφανής ζώνη, από μία ή δύο στοιβάδες κυβοειδών κοκκωδών κυττάρων και από μία βασική μεμβράνη γύρω από τα κοκκώδη κύτταρα που ονομάζεται μεμβράνη κοκκωδών κυττάρων. Η επιπλέον ανάπτυξη του πρωτογενούς ωοθυλακίου οδηγεί στην ανάπτυξη του δευτερογενούς ωοθυλακίου. Στο ωοθυλάκιο αυτό τα κοκκώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σε δύο υποπληθυσμούς, στα κύτταρα της κοκκώδους στοιβάδας, που βρίσκονται εσωτερικά της βασικής μεμβράνης και στα κύτταρα της έξω και έξω θήκης του ωοθυλακίου. Επιπλέον ανάπτυξη έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία του τριτογενούς ωοθυλακίου το οποίο έχει στο κέντρο του το άντρο. Το άντρο περιέχει το ωοθυλακικό υγρό, το οποίο διαχωρίζει τα κύτταρα που περιβάλλουν το ωοκύτταρο από τα υπόλοιπα κοκκώδη κύτταρα. Μετά την πάροδο κάποιων ημερών, τα ωοθυλάκικα κύτταρα υπόκεινται σε γρήγορη διαίρεση και οδηγούν στη δημιουργία του γραφιανού ωοθυλακίου (διαμέτρου 600 μm) το οποίο αποτελεί το προωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο.

Τα γραφιανά ωοθυλάκια αναγνωρίζονται από την ύπαρξη του ωοφόρου δίσκου, μια επένδυση πολλαπλών στρώσεων του ωοκυττάρου, αποτελούμενη από κοκκώδη κύτταρα.

1: άντρο

2: βασική μεμβράνη

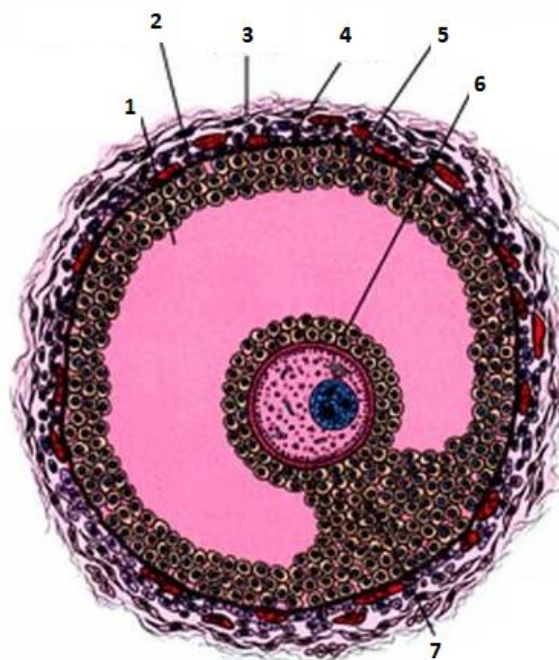
3: έξω θήκη

4: έσω θήκη

5: κοκκώδη κύτταρα

6: ακτινωτός στέφανος

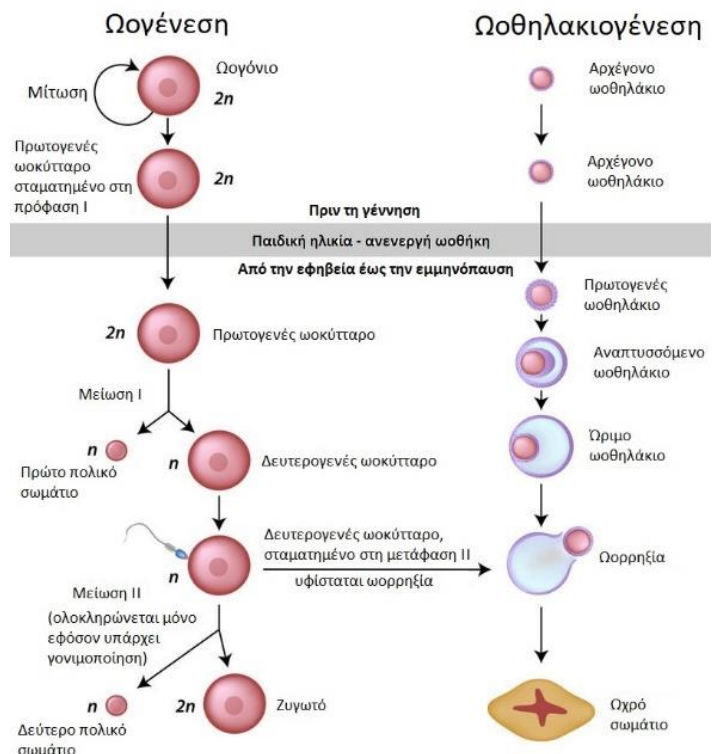
7: ωοφόρος δίσκος



Εικόνα 1.2.3.



Τα πλήρως, πλέον, ανεπτυγμένα ωκύτταρα τα όποια βρίσκονται εντός των γραφιανών ωοθυλακίων επιτελούν επανέναρξη της μείωσης και ολοκληρώνουν τη πρώτη μειωτική διαίρεση ακριβώς πριν την ωορρηξία, η οποία επιτελείται στα ποντικά ηλικίας 30 – 40 ημερών. Η μειωτική ωρίμανση διαρκεί 12 – 14 ώρες και περιλαμβάνει τη μετάβαση από τη πρόφαση της πρώτης μειωτικής στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης.



Εικόνα 1.2.4.

Τα ωκύτταρα αυτά περιλαμβάνουν 20 χρωμοσώματα, που το καθένα αποτελείται από δύο χρωματίδες ευθυγραμμισμένα στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, και ένα μικρό πολικό σωματίο που περιέχει 20 ομόλογα χρωμοσώματα.

Μετά την ωορρηξία ενός και μόνο ωαρίου - η οποία ελέγχεται ορμονικά και θα αναφερθεί στην επόμενη ενότητα - και αφού γονιμοποιηθεί, το ωάριο θα ολοκληρώσει τη δεύτερη μειωτική του διαίρεση με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό των χρωματίδων και τη δημιουργία ενός δεύτερου πολικού σωματίου.

Σημειώνεται, ότι σε κάθε οιστρικό κύκλο ένας αριθμός ωοθυλακίων αρχίζει να αναπτύσσεται, αλλά μόνο ένα από αυτά θα καταλήξει σε ωρίμανση. Τα υπόλοιπα γίνονται ατρητικά. Η ατρησία αποτελεί μια εκφυλιστική διαδικασία η οποία πραγματοποιείται σε οποιοδήποτε στάδιο της ωρίμανσης του ωοθυλακίου. Όταν συμβεί στα αρχικά στάδια ωρίμανσης των ωοθυλακίων, παρατηρείται εκφύλιση και λύση τόσο του ωοκυττάρου όσο και της στιβάδας κοκκωδών κυττάρων που το περιβάλλουν, ενώ όταν η ατρησία συμβεί μετά τον σχηματισμό του άντρου η εκφύλιση αφορά μόνο στο ωκύτταρο. Τελικά, ο αριθμός των ωοθυλακίων που

απομένουν είναι πολύ μικρός συγκριτικά με αυτόν που υπήρχε κατά την έναρξη της ωοθυλακιογένεσης.

### 1.2.1. Ορμονική ρύθμιση του οιστρικού κύκλου του ποντικού

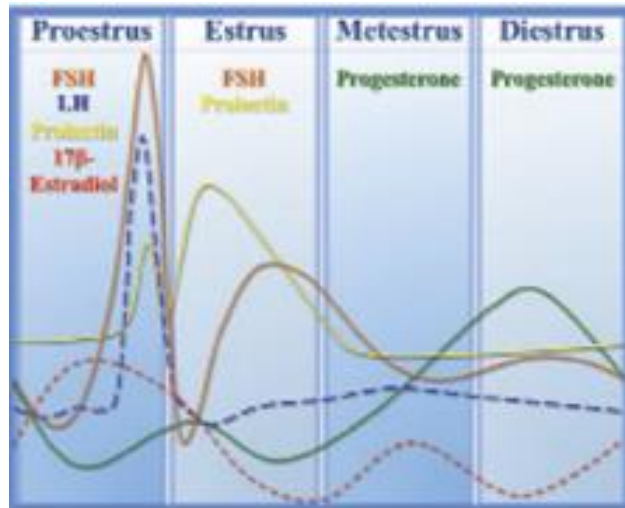
Ο συγχρονισμός του άξονα υποθαλάμου – υπόφυσης – γονάδων είναι πολύ σημαντικός για τη ρύθμιση του κύκλου και για την επιτυχία της αναπαραγωγής. Παρόλο που ο οιστρικός κύκλος είναι συνεχής, μπορούμε να διακρίνουμε τα εξής στάδια: πρόοιστρος, οίστρος, μετοίστρος, δίοιστρος. Συγκεκριμένες ορμόνες συντελούν στις αλλαγές που πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια κάθε φάσης του κύκλου και οδηγούν σε αλλαγές της ανατομίας του ποντικού.

Η ορμόνη GnRH (gonadotropin – releasing hormone) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο και επιδρά στην υπόφυση, διεγείροντας την έκκριση της ορμόνης FSH (follicle – stimulating hormone) και της ορμόνης LH (luteinizing hormone). Όταν αυτές οι δύο ορμόνες φτάσουν στις ωοθήκες, τα ωοθυλάκια με άντρο ανταποκρίνονται σε αυτές. Η FSH δρα κυρίως για να προάγει την ανάπτυξη των ωοθυλακίων, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, την αρωματοποίηση των ανδρογόνων σε οιστρογόνα και την έκφραση του υποδοχέα της LH. Από την άλλη πλευρά, η LH είναι επίσης απαραίτητη για την ωοθυλακική ανάπτυξη, ειδικά στα τελευταία στάδιά της, ενώ παράλληλα επάγει την ωορρηξία. Αμφότερες οι γοναδοτροπίνες (FSH και LH) επάγουν την έκκριση των ωοθηκικών ορμονών, πιο συγκεκριμένα των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, ορμόνες απαραίτητες για τη σωστή εκτέλεση του προγράμματος ανάπτυξης των ωοθυλακίων καθώς και για τη διατήρηση των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου. Οι μητρικές και κολπικές εκδηλώσεις του οιστρικού κύκλου του ποντικού είναι προϊόν στεροειδικών επιδράσεων που προκύπτουν από τις κυκλικές μεταβολές στις ωοθήκες.

Ανάλογα με τη φάση του οιστρικού κύκλου, υπάρχουν οι αντίστοιχες ορμονικές μεταβολές.

- › Κατά τη διάρκεια του **πρόοιστρου** τα ωοθυλάκια με άντρο αναπτύσσονται με εκθετικό ρυθμό κάτω από την επίδραση της FSH και καθίστανται φανερά τα

τελευταία στάδια της ανάπτυξης των προωθλακιόρρηκτικών ωοθυλακίων. Εκτενείς έρευνες έχουν δείξει ότι το συγκεκριμένο στάδιο της ωοθυλακικής ωρίμανσης, το οποίο ρυθμίζεται από την FSH αρχικά και στη συνέχεια από την LH, οδηγεί σε μια σχετικά μεγάλης κλίμακας μετατροπή



Εικόνα 1.2.1.1.

των ανδρογόνων των κυττάρων θήκης, σε οιστρογόνα, κυρίως 17β – οιστραδιόλης ( $E_2$ ). Το στάδιο του πρόοιστρου χαρακτηρίζεται από την επίδραση της οιστραδιόλης στον υποθάλαμο με έναν μηχανισμό θετικής ανάδρασης· επομένως, όταν η  $E_2$  αυξάνεται, η έκκριση της LH κορυφώνεται, ενώ ακόμα ο οιστρικός κύκλος βρίσκεται στο στάδιο του πρόοιστρου.

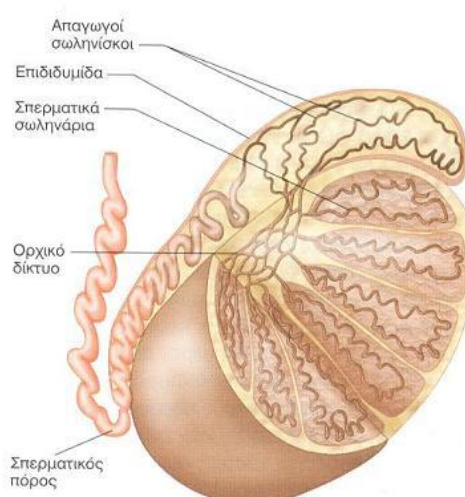
- › Η ωορρηξία στο ποντίκι συμβαίνει περίπου 12 με 14 ώρες μετά την κορύφωση της LH, και σηματοδοτεί το στάδιο του **οίστρου**, ενώ συμπίπτει με τη περίοδο κατά την οποία το θηλυκό θα επιτρέψει το ζευγάρωμα. Η ωορρηξία, λόγω της αναδιαμόρφωσης των προωθλακιόρρηκτικών ωοθυλακίων σε ωχρά σωματίδια, προκαλεί τη μετάβαση από τα οιστρογόνα στη προγεστερόνη ως κύριο εκκριτικό προϊόν. Αυτό συμβαίνει κατά τη διάρκεια του μετοίστρου και του δίοιστρου, την ωχρινική φάση του κύκλου του ποντικού. Η οξεία αύξηση των οιστρογόνων έχει πολλαπλές συνέπειες, πέρα από την επαγωγή θετικής ανάδρασης που οδηγεί στη κορύφωση της LH. Αυτές περιλαμβάνουν την επαγωγή της πρωτεϊνικής σύνθεσης, την συσσώρευση υγρών στη μήτρα, την επιμήκυνση της μήτρας και τη κερατινοποίηση του κολπικού επιθηλίου. Η τοπική αύξηση της συγκέντρωσης των οιστρογόνων και της προγεστερόνης, που προέρχονται από τη κυκλοφορία, αλλάζουν τη μορφολογία του ενδομητρίου της μήτρας του θηλυκού ποντικού.

- γ) Κατά τη διάρκεια του **μετοίστρου** και του **δίοιστρου**, η προγεστερόνη αναστέλλει την έκκριση της LH και συνεπώς προλαμβάνει μια περεταίρω ωορρηξία. Το λειτουργικό τέλος του ωχρού σωματίου κατά τη λήξη του σταδίου του μετοίστρου, οδηγεί σε μείωση της σύνθεσης της προγεστερόνης λόγω της μετατροπής της σε ένα λιγότερο ισχυρό προγεσταγόνο, την 20α – OH – προγεστερόνη. Η μείωση της προγεστερόνης οδηγεί στη μείωση της έκκρισης της LH, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο να επανέλθει ο πρόοιστρος.

Το ωχρο σωματίο, μετά το λειτουργικό του τέλος, παραμένει δομικά για δύο με τέσσερις κύκλους και μάλιστα πολλαπλές γενιές αυτών των δομών μπορεί να υπάρχουν στην ωοθήκη σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή κατά τη διάρκεια του κύκλου. Το γεγονός αυτό καθιστά τις *in vivo* μελέτες, που αφορούν την ωορρηξία και την πρώιμη ανάπτυξη του ωχρού σωματίου, δύσκολες. Έτσι, λοιπόν, τα πειραματόζωα που χρησιμοποιούνται είναι ανώριμα ποντίκια, στα οποία η ωοθυλακική ωρίμανση επάγεται ορμονικά πριν τη πρώτη ωορρηξία.

### 1.3. Σπερματογένεση στον ποντικό

Οι όρχεις των ποντικών, όπως και των υπόλοιπων θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, διαθέτουν δομές - με κυριότερες τα σπερματικά σωληνάκια και την επιδιδυμίδα - καθώς και κυτταρικές ομάδες - όπως τα κύτταρα Leydig και Sertoli - απαραίτητες για τη σπερματογένεση. Η διαφοροποίηση των αρσενικών αρχέγονων γενετικών κυττάρων πραγματοποιείται συνεχώς εντός των σπερματικών σωληναρίων των όρχεων, κατά τη διάρκεια της ζωής του ποντικού.



Εικόνα 1.3.1.

Παράλληλα, με την εξωκρινή τους λειτουργία (παραγωγή σπερματοζωαρίων) οι

όρχεις έχουν και ενδοκρινή λειτουργία. Συγκεκριμένα από τους όρχεις παράγονται αναπαραγωγικές ορμόνες και κατά κύριο λόγο τεστοστερόνη.

Οι δομές του όρχεος που παίζουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη σπερματογένεση είναι τα σπερματικά σωληνάκια, η επιδιδυμίδα και το διάμεσο διαμέρισμα.

Όταν ένα αρσενικό ποντίκι γεννηθεί, οι όρχεις περιέχουν μόνο αδιαφοροποίητα σπερματογόνια, τα οποία θα λειτουργήσουν ως ένας αυτό-ανανεούμενος πληθυσμός βλαστικών κυττάρων καθ' όλη τη διάρκεια ζωής ενός αρσενικού ποντικού. Η σπερματογένεση στον ποντικό και στα άλλα θηλαστικά ξεκινάει κατά την εφηβεία μέσω του πολλαπλασιασμού των μεσοφασικών γεννητικών κυττάρων, συνεχίζει κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής και πραγματοποιείται εντός των σπερματικών σωληναρίων των όρχεων. Τα αρσενικά ποντίκια, τα οποία εκτρέφονται για πειραματικούς σκοπούς, εισέρχονται στην εφηβεία περίπου 34 με 38 ημέρες μετά τη γέννησή τους.

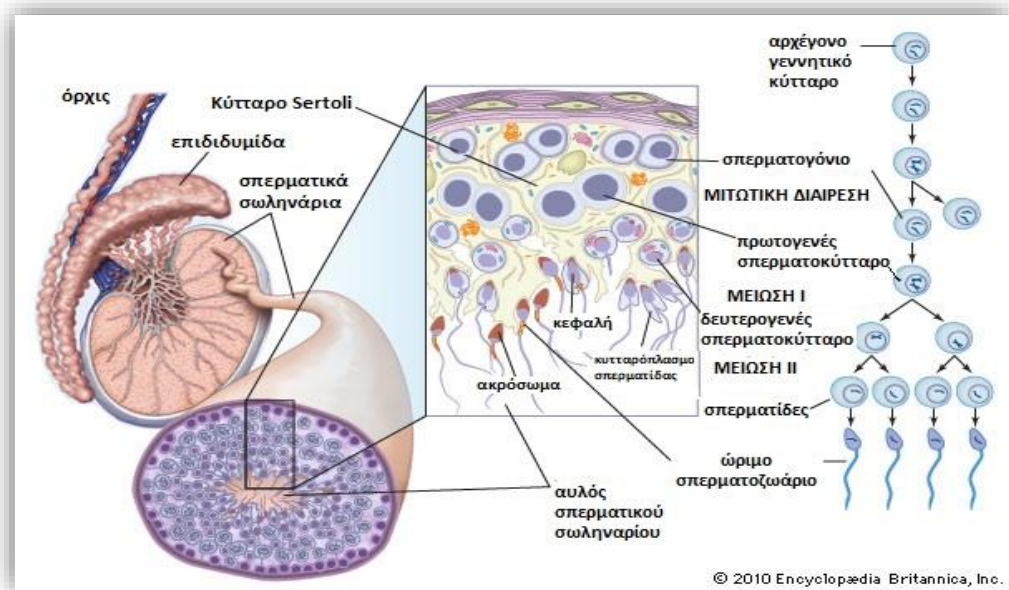
Τα σπερματικά κύτταρα διαφορετικών σταδίων ταξινομούνται σε τέσσερις κατηγορίες: τα σπερματογόνια, τα σπερματοκύτταρα, τις σπερματίδες και τα σπερματοζωάρια, με υποκατηγορίες να ορίζονται σε κάθε κατηγορία.

Η διαδικασία της *σπερματογένεσης* οδηγεί στον σχηματισμό των απλοειδών αρσενικών γαμετών που απαιτούνται για τη γονιμοποίηση ενός ωαρίου. Η διαδικασία αυτή είναι συνεχής και ιδιαίτερος πολύπλοκη και περιλαμβάνει 3 σημαντικά στάδια:

- α. Τον πολλαπλασιασμό. Σε αυτό το στάδιο τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται με μίτωση (σπερματοκυτταρογένεση).
- β. Την μείωση. Σε αυτό το στάδιο πραγματοποιούνται μειωτικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα ο αριθμός των χρωμοσωμάτων να γίνεται από διπλοειδής απλοειδής.
- γ. Την διαφοροποίηση. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τη μετατροπή των στρογγυλών σπερματίδων σε σπερματοζωάρια (σπερμιογένεση).

Η τελική ωρίμανση των σπερματοζωαρίων πραγματοποιείται στην επιδιδυμίδα, όπου και καθίστανται κινητά. Εκεί, τα σπερματοζωάρια αποθηκεύονται μέχρι την εκσπερμάτιση.

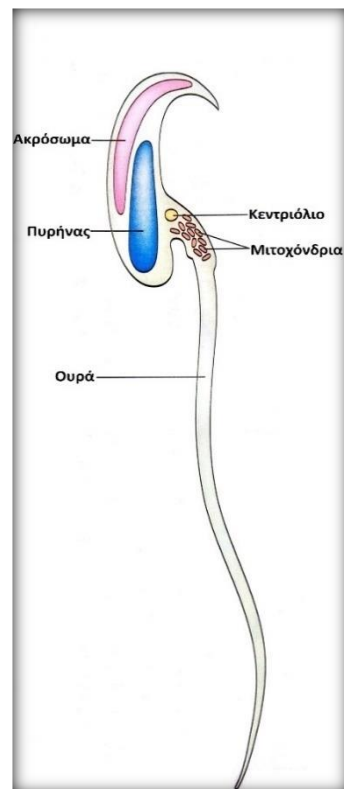
## Σπερματογένεση:



Εικόνα 1.3.2

Τελικά, το ώριμο κινητό σπερματοζωάριο του ποντικού αποτελείται από:

1. Τη κεφαλή: συμπυκνωμένος, απλοειδής πυρήνας καλυμμένος από την ακροσωματική καλύπτρα.
2. Τον αυχένα: αποτελεί το βραχύ τμήμα της ουράς που συνδέει την κεφαλή με την ουρά. Περιέχει ένα κεντριόλιο.
3. Το μέσο τμήμα ουράς: αποτελεί τμήμα πλούσιο σε μιτοχόνδρια.
4. Το κυρίως τμήμα ουράς.
5. Το τελικό τμήμα ουράς.



Εικόνα 1.3.3 Σπερματοζωάριο ποντικού

Η ουρά αποτελεί ένα ενισχυμένο μαστίγιο με τη χαρακτηριστική του οργάνωση από δέσμες μικροσωληνίσκων (9+2).

Η μετακίνηση του σπερματοζωαρίου εξαρτάται από το ATP και συντελείται με τη χρήση βραχιόνων δυνεΐνης που είναι προσδεμένοι στους μικροσωληνίσκους.

## 1.4. Γονιμοποίηση

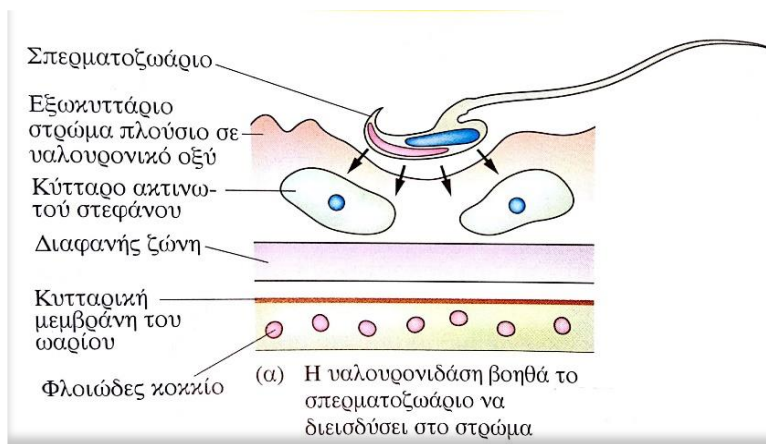
Η σύντηξη του αρσενικού με τον θηλυκό γαμέτη εξασφαλίζεται με τη διαδικασία της γονιμοποίησης, ενώ παράλληλα εμποδίζεται η ένωση γαμετών διαφορετικών ειδών και η είσοδος παραπάνω του ενός σπερματοζωαρίων στο ωάριο.

Τόσο στον ποντικό, όσο και στα περισσότερα θηλαστικά, τα σπερματοζωάρια τα οποία ελευθερώνονται κατά τη σύζευξη δεν είναι ικανά να γονιμοποιήσουν κάποιο ωάριο. Τα σπερματοζωάρια καθίστανται ικανά έπειτα από ένα τελικό στάδιο ωρίμανσης, το οποίο καλείται **ενεργοποίηση** και πραγματοποιείται στην αναπαραγωγική οδό του θηλυκού. Παρόλο που η διαδικασία της ενεργοποίησης δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, μπορεί να πραγματοποιηθεί in vitro σε απλά θρεπτικά μέσα που περιέχουν αλβουμίνη, ασβέστιο και διττανθρακικά ανιόντα. Επιπλέον, ένα από τα γεγονότα που πραγματοποιούνται κατά την ενεργοποίηση είναι η απώλεια της χοληστερόλης από την κυτταρική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου. Με την απώλεια αυτή η μεμβράνη των σπερματοζωαρίων καθίσταται διαπερατή σε ιόντα  $Ca^{2+}$  και  $HCO_3^-$ , τα οποία ενεργοποιούν την αδενυλική κυκλάση με αποτέλεσμα τη παραγωγή cAMP και την ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης A. Το γεγονός αυτό μεταβάλλει το δυναμικό της μεμβράνης από -30 σε -50 mV και έτσι διευκολύνεται το άνοιγμα διαύλων  $Ca^{2+}$ . Τέλος, κατά την ενεργοποίηση παρατηρείται απώλεια γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες εμποδίζουν την αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη.

Από την άλλη πλευρά, το ωοκύτταρο, το οποίο είναι σταματημένο στη μετάφαση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, απελευθερώνεται από την ωοθήκη προς τις σάλπιγγες μαζί με τα ωοθυλακικά κύτταρα (κύτταρα ακτινωτού στεφάνου). Γύρω από το ωοκύτταρο υπάρχει η διαφανής ζώνη, μια διαφανής στιβάδα εξωκυττάρου υλικού

που εκκρίνεται από τα ωθυλακικά κύτταρα. Τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου εντοπίζονται εξωτερικά της διαφανούς ζώνης και είναι βυθισμένα σε εξωκυττάριο στρώμα πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ.

Τα σπερματοζωάρια φτάνουν στις σάλπιγγες του θηλυκού, χάρη στη κινητικότητά τους αλλά και στις μυϊκές συσπάσεις της αναπαραγωγικής οδού του θηλυκού οι

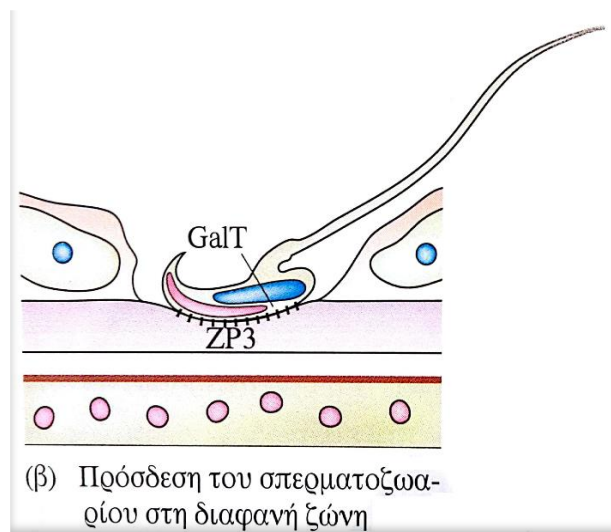


Εικόνα 1.4.1α

οποίες υποβοηθούν τη μετακίνησή τους από τον κόλπο στις σάλπιγγες, μέσω της μήτρας. Κατά τη πρώτη επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, το σπερματοζωάριο

καταφέρνει να διεισδύσει στο εξωκυττάριο στρώμα του συμπλέγματος ωοκυττάρου – ακτινωτού στεφάνου, χάρη στο ένζυμο με δράση υαλουρονιδάσης που φέρει στη

μεμβράνη του (εικόνα 1.4.1α). Ακολουθεί η πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη (εικόνα 1.4.1β). Στο στάδιο αυτό διασφαλίζεται ότι και οι δύο γαμέτες ανήκουν στο ίδιο είδος. Συγκεκριμένα, η διαφανής ζώνη του ωαρίου αποτελείται από τρεις γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται ZP1, ZP2 και ZP3, Από αυτές, η ZP3 αποτελεί τον υποδοχέα του σπερματοζωαρίου και συντελεί στην πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη. Η πρωτεΐνη του

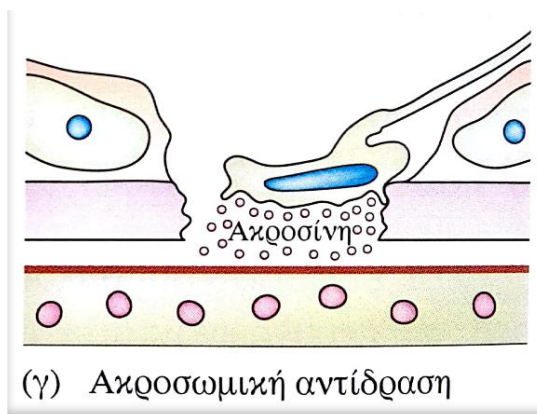


Εικόνα 1.4.1β

σπερματοζωαρίου που αναγνωρίζει η ZP3 είναι μια επιφανειακή β – 1,4 – γαλακτοζυλομεταφοράση (GalT) που προσδέεται ισχυρά σ αυτή. Η αλληλεπίδραση της ZP3 με τη GalT οδηγεί στην ακροσωμική αντίδραση.

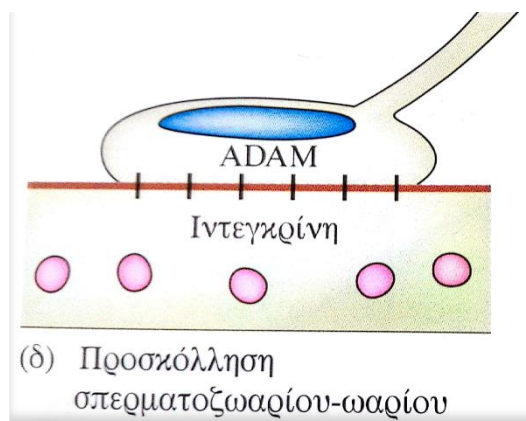


Η ακροσωμική αντίδραση (εικόνα 1.4.1γ) συντελεί σε ταχεία εξωκυττάρωση του ακροσωμικού κυστιδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση προϊόντων που είναι απαραίτητα για μετέπειτα στάδια της γονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, απελευθερώνονται υδρολυτικά ένζυμα, όπως η πρωτεάση σερίνης ακροσίνη, που βοηθούν στην υδρόλυση της διαφανούς ζώνης. Έτσι, συντελείται η διάνοιξη ενός μονοπατιού το οποίο επιτρέπει στο σπερματοζώαριο να εισέλθει στο ωάριο.



Εικόνα 1.4.1γ

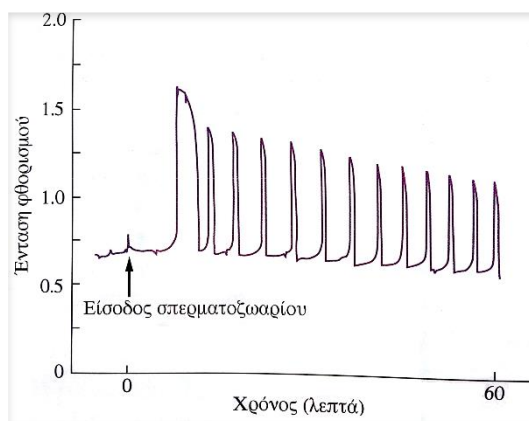
Στο σημείο αυτό πραγματοποιείται μια δεύτερη διαδικασία, που διασφαλίζει πως το ωάριο θα αναγνωρίσει το σπερματοζώαριο. Η αναγνώριση αυτή εξασφαλίζεται μέσω της ισχυρής πρόσδεσης των ιντεγκρινών του ωαρίου με τις πρωτεΐνες ADAM του σπερματοζωαρίου (εικόνα 1.4.1δ). Το σπερματοζώαριο φέρει τρεις τέτοιες πρωτεΐνες: τη φερτιλίνη α, τη φερτιλίνη β και την κυριτεστίνη, οι οποίες συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση ωαρίου – σπερματοζωαρίου.



Εικόνα 1.4.1δ

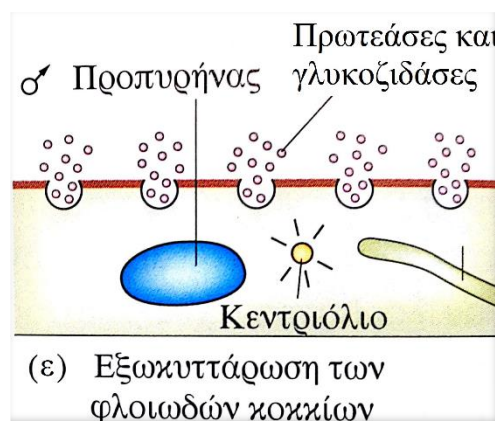
Η πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο αποτελεί το πρώτο στάδιο της μεμβρανικής σύντηξης που λαμβάνει χώρα στη περιοχή του ωαρίου η οποία εφάπτεται στη πλευρική επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Για τη σύντηξη αυτή απαραίτητη είναι η πρωτεΐνη τετρασπανίνη (CD9) η οποία φέρει 4 διαμεμβρανικά τμήματα. Η σύντηξη ωαρίου – σπερματοζωαρίου προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης των ιόντων  $Ca^{2+}$ , η οποία είναι υπεύθυνη για όλα τα γεγονότα που ακολουθούν. Για αρκετές, λοιπόν, ώρες παρατηρούνται παροδικές αυξομειώσεις της συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου, οι οποίες όταν παρασταθούν γραφικά σχηματίζουν ένα πρότυπο ταλάντωσης (εικόνα 1.4.2.). Πιστεύεται ότι η

απελευθέρωση ιόντων ασβεστίου προκαλείται μέσω ειδικής ενεργοποίησης του μονοπατιού της φωσφορικής ινοσιτόλης ( $IP_3$ ) από μια φωσφολιπάση C, η οποία μεταφέρεται από το σπερματοζωάριο.



Εικόνα 1.4.2.

Η απελευθέρωση αυτή των ιόντων ασβεστίου οδηγεί στην εξωκυττάρωση των φλοιωδών κοκκίων, ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, σύνθεση DNA και γενική ενεργοποίηση του μεταβολισμού (εικόνα 1.4.1ε). Τα φλοιώδη κοκκία εντοπίζονται εσωτερικά της κυτταρικής μεμβράνης και μεταξύ άλλων περιέχουν πρωτεάσες και γλυκοζιδάσες οι οποίες έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τους υποδοχείς της διαφανούς ζώνης έτσι ώστε να μην δύναται σε άλλο σπερματοζωάριο να προσδεθεί σε αυτή. Στον ποντικό, η

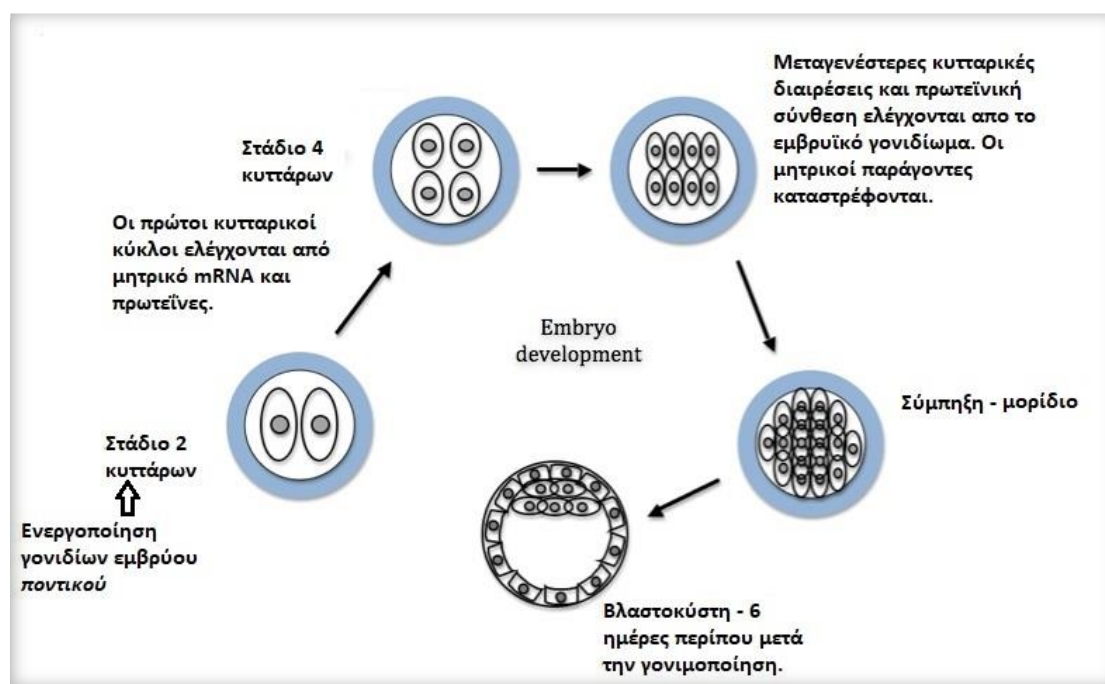


Εικόνα 1.4.1ε

τροποποίηση αυτή είναι ο κύριος παράγοντας που αποτρέπει την πολυσπερμία. Μετά το πέρας της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης σχηματίζεται το δεύτερο πολικό σωματίο, που περιέχει επιπλέον χρωμοσώματα. Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται, ενώ τα μιτοχόνδρια εκφυλίζονται και δεν συμμετέχουν στη περαιτέρω ανάπτυξη. Από την άλλη πλευρά το κεντριόλιο αρχικά αποτελεί το κέντρο οργάνωσης των μικροσωληνίσκων του σπερματικού αστέρα, ενώ αργότερα διαιρείται προκειμένου να σχηματιστεί στο ζυγωτό η πρώτη αυλακωτική άτρακτος. Οι δύο προπυρήνες μεταναστεύουν ο ένας προς τον άλλον και παράλληλα συμβαίνει αντιγραφή του DNA. Στο σημείο αυτό, δεν έχουμε σύντηξη των δύο προπυρήνων αλλά αποσυγκρότηση των πυρηνικών φακέλων και ευθυγράμμιση των χρωμοσωμάτων με τη μιτωτική άτρακτο, έτοιμα για τη πρώτη αυλάκωση.

## 1.5. Ενεργοποίηση γονιδίων εμβρύου

Η ενεργοποίηση των εμβρυικών γονιδίων είναι η διαδικασία με την οποία ένα έμβρυο ξεκινά να μεταγράφει το νεοσχηματισμένο γονιδίωμά του. Αρχικά, ένα έμβρυο είναι μεταγραφικά αδρανές και οι πρώτοι κυτταρικοί κύκλοι ελέγχονται από το μητρικό mRNA και τις μητρικές πρωτεΐνες που είχαν εναποτεθεί στο ώριμο ωοκύτταρο κατά τη διάρκεια της ωοθυλοακιογένεσης. Η ενεργοποίηση των εμβρυικών γονιδίων είναι απαραίτητη προκειμένου να πραγματοποιηθεί η σύνθεση νέων πρωτεϊνών και η περαιτέρω διαίρεση. Στον ποντικό, το γεγονός της ενεργοποίησης του εμβρυικού DNA πραγματοποιείται στο στάδιο των 2 κυττάρων (στον άνθρωπο στο στάδιο των 4 κυττάρων).



Εικόνα 1.5.1.

Πολλοί μητρικοί μεταγραφικοί παράγοντες επιτρέπουν την έκφραση εμβρυικών πρωτεϊνών που είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση του εμβρυικού DNA. Παρόλα αυτά, αυτοί οι μητρικοί παράγοντες απαιτούν μετά – μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως φωσφορυλίωση, προκειμένου να γίνουν λειτουργικές.

Ένας μικρός αριθμός εμβρυικών γονιδίων είναι ενεργός πριν το στάδιο των δύο κυττάρων. Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στον έλεγχο της ενεργότητας του μητρικού mRNA και των μητρικών πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, τα

εμβρυικά αυτά γονίδια αυξάνουν την σταθερότητα και τη μεταφραστική ικανότητα του mRNA με πολυαδενυλίωση του 3' αμετάφραστου άκρου του. Επιπλέον, τα ιόντα ασβεστίου, που απελευθερώνονται κατά τη γονιμοποίηση όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, σχετίζονται με τη μετάφραση του μητρικού mRNA πράγμα που αποδεικνύεται σε πειράματα που αναστέλλεται η απελευθέρωση  $Ca^{2+}$  με αποτέλεσμα τη μη έκφραση του μητρικού mRNA. Πιο συγκεκριμένα, τα ιόντα ασβεστίου δεσμεύουν ένα ανασταλτικό σύμπλοκο της έκφρασης του μητρικού mRNA, φωσφορυλιώνοντάς το. Έτσι, καθίσταται δυνατή η πολυαδενυλίωση και η μετάφραση. Επιτελείται, λοιπόν, ενεργοποίηση και απενεργοποίηση συγκεκριμένων μητρικών πρωτεϊνών και mRNA με σκοπό τη τελική ενεργοποίηση του εμβρυικού DNA.

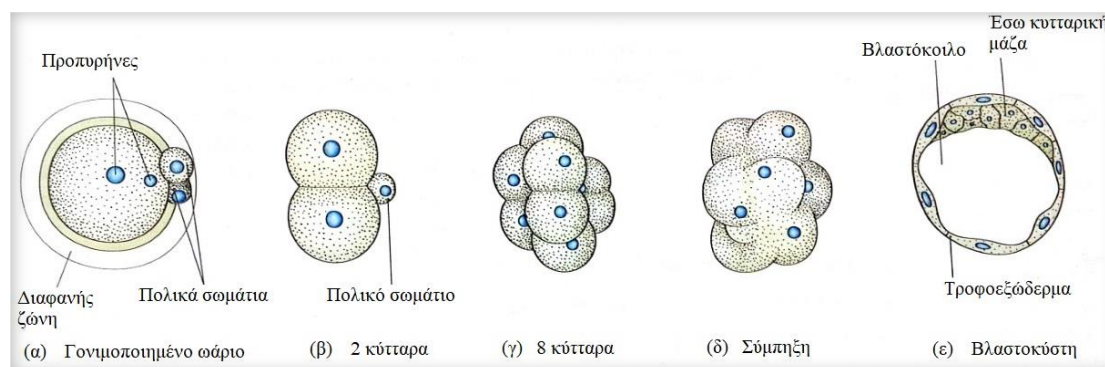
Για να γίνει αυτό θα πρέπει το έμβρυο να απελευθερωθεί από το μεταφραστικά αδρανές περιβάλλον του και να συνθέσει τον δικό του μεταγραφικό και μεταφραστικό μηχανισμό.

Το περιορισμένο μέγεθος του σπέρματος υποδεικνύει γιατί το πατρικό DNA πρέπει να είναι υπερσυμπυκνωμένο προκειμένου να χωρέσει στον μικροσκοπικό του πυρήνα. Αυτό καθίσταται δυνατόν με τη βοήθεια μικρών πρωτεϊνών, των πρωταμινών. Όπως είναι εύκολα κατανοητό, η υπερσυμπυκνωμένη δομή του πατρικού DNA το καθιστά δυσπρόσιτο για μεταγραφή. Στο σημείο αυτό, οι μητρικές πρωτεΐνες αντικαθιστούν τις πρωταμίνες με ιστόνες και έτσι τα χρωμοσώματα μπορούν πλέον να μεταγραφούν.

Στο στάδιο των 2 κυττάρων, η χρωματίνη του εμβρύου του ποντικού έχει διαμορφωθεί με τέτοιο τρόπο προκειμένου να μπορέσει να μεταγραφεί και τελικά το έμβρυο να αποκτήσει δικούς του μηχανισμούς μεταγραφής και μετάφρασης. Το εμβρυικό γονιδίωμα είναι πλέον πλήρως ενεργό. Το μητρικό mRNA και οι μητρικές πρωτεΐνες αποσυντίθενται.

## 1.6. Προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύου ποντικού

Κατά τη προεμφυτευτική ανάπτυξη του εμβρύου του ποντικού, οι πρώτες αυλακώσεις πραγματοποιούνται σχετικά αργά και η έκφραση του γονιδιώματος του ζυγωτού ξεκινά στο στάδιο των δύο κυττάρων, όπως αναφέρθηκε. Η πρώτη αυλάκωση γίνεται 24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση, ενώ η δεύτερη και η τρίτη δεν είναι συγχρονισμένες και ακολουθούν ανά διάστημα 12 ωρών. Η μήτρα, λοιπόν, χρειάζεται ένα εύλογο διάστημα προκειμένου να ετοιμαστεί και να είναι έτοιμη για να υποδεχτεί το έμβρυο προς εμφύτευση. Στην εικόνα 1.6.1. παρουσιάζεται η ανάπτυξη του εμβρύου του ποντικού κατά τη διάρκεια της προεμφυτευτικής περιόδου.



Εικόνα 1.6.1.

Όπως φαίνεται και στην παραπάνω εικόνα, μέχρι το στάδιο των 8 κυττάρων το σχήμα των βλαστομεριδίων είναι ευδιάκριτο (γ). Αργότερα όμως, είναι διακριτή η συμπίεση των βλαστομεριδίων ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται μεγιστοποίηση των διακυτταρικών τους επαφών. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σύμπληξη και σημαντικό ρόλο σε αυτό παίζει η καδερίνη E, μια πρωτεΐνη συνάφειας που εξαρτάται από το ασβέστιο και είναι γνωστή και ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης των λευκοκυττάρων. Αμέσως μετά τη σύμπληξη τα κύτταρα εμφανίζονται πολωμένα. Η αλλαγή αυτή καθίσταται ορατή λόγω της παρουσίας μικρολαχνών στις εξωτερικές επιφάνειες των κυττάρων, ενώ παρατηρούνται αλλαγές και στο εσωτερικό τους. Στο στάδιο αυτό δημιουργούνται και οι χασμοσύνδεσμοι, οι οποίοι επιτρέπουν την μεταφορά ουσιών χαμηλού μοριακού βάρους, μέσω διάχυσης.

Από τη σύμπτυξη μέχρι το στάδιο των 32 κυττάρων περίπου, το έμβρυο ονομάζεται μορίδιο. Στο διάστημα αυτό σχηματίζονται δεσμοσώματα και στενοσυνδέσμοι που σχηματίζουν έναν αδιαπέραστο φραγμό ανάμεσα στο εσωτερικό και στο εξωτερικό του εμβρύου. Στο εσωτερικό του εμβρύου ξεκινά να σχηματίζεται μια κοιλότητα γεμάτη με υγρό, το βλαστόκοιλο. Αυτό συμβαίνει περίπου την τρίτη ημέρα μετά τη γονιμοποίηση. Σε αυτό το διάστημα το έμβρυο κατέρχεται από τη σάλπιγγα προς τη μήτρα. Μετά τον σχηματισμό του βλαστόκοιλου το έμβρυο λέγεται βλαστοκύστη και αποτελείται από δύο τμήματα: το τροφοεξώδερμα και την έσω κυτταρική μάζα. Το τροφοεξώδερμα είναι μια εξωτερική στιβάδα κυττάρων με επιθηλιακή μορφολογία ενώ η έσω κυτταρική μάζα, που περιβάλλεται από το τροφοεξώδερμα, είναι ένα συσσωμάτωμα κυττάρων στο εσωτερικό του εμβρύου. Όταν το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο των 60 κυττάρων τα  $\frac{3}{4}$  του κυτταρικού πληθυσμού εντοπίζονται στο τροφοεξώδερμα ενώ το  $\frac{1}{4}$  εντοπίζεται στην έσω κυτταρική μάζα. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας εκκρίνουν FGF4 και εκφράζουν τον παράγοντα μεταγραφής Oct4. Από την άλλη πλευρά, τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος εκφράζουν τον FGFR2, έναν υποδοχέα των παραγόντων FGF.

Πριν την εμφύτευση στη μήτρα, τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος και της έσω κυτταρικής μάζας διαφοροποιούνται (εικόνα 1.6.1.2.). Συγκεκριμένα, στην έσω κυτταρική μάζα πραγματοποιούνται κυτταρικές μεταβολές που οδηγούν στον σχηματισμό του πρωτογενούς ενδόδερματος, στην επιφάνεια του βλαστόκοιλου. Η στιβάδα αυτή συμβάλλει στους εξωεμβρυικούς αλλά όχι στο οριστικό ενδόδερμα του ίδιου του εμβρύου. Τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος που έρχονται σε επαφή με



Εικόνα 1.6.2.

την έσω κυτταρική μάζα σχηματίζουν το πολικό τροφοεξώδερμα, ενώ τα υπόλοιπα κύτταρα σχηματίζουν το τοιχωματικό τροφοεξώδερμα. Στα κύτταρα αυτού συνεχίζεται η αντιγραφή του DNA απουσία μιτωτικής διαίρεσης, με αποτέλεσμα τον μετασχηματισμό τους σε τεράστια πολυπλοειδή κύτταρα. Από την άλλη, το πολικό τροφοεξώδερμα συνεχίζει να αναπτύσσεται. Περίπου σε αυτό το σημείο το έμβρυο εκκολάπτεται από τη διαφανή ζώνη και εμφυτεύεται στη μήτρα.

# Κεφάλαιο 2

## 2.1. Κιρκάδιοι Ρυθμοί

Τα ζωντανά συστήματα διαθέτουν ένα ακριβές εσωτερικό βιολογικό ρολόι το οποίο συγχρονίζει καθημερινά γεγονότα, που κυμαίνονται από τον ύπνο και την αγρυπνία στον άνθρωπο μέχρι τη φωτοσύνθεση στα φυτά. Πρόκειται για τους κιρκάδιους ρυθμούς οι οποίοι αντιπροσωπεύουν μια εξελικτικά διατηρημένη προσαρμογή και είναι δυνατόν να ανιχνευτούν και στις πιο πρώιμες μορφές ζωής.

Ο όρος «κιρκάδιος» προέρχεται από τις λατινικές λέξεις “circa” που σημαίνει «περίπου» και “dies” που σημαίνει «ημέρα». Οι κιρκάδιοι ρυθμοί είναι αυτοσυντηρούμενοι, σχεδόν 24ωροι και ρυθμίζονται ανάλογα με τον κύκλο φωτός – σκοταδιού. Τα κριτήρια ορισμού των κιρκάδιων ρυθμών είναι τρία. Καταρχάς, η ενδογενής κιρκαδιανή τους περίοδος είναι σταθερά 24 περίπου ώρες. Επιπλέον, είναι ρυθμοί ανεξάρτητοι της θερμοκρασίας, έτσι ώστε να εκτυλίσσονται πάντα με την ίδια περιοδικότητα ανεξάρτητα με τις θερμοκρασιακές μεταβολές του περιβάλλοντος. Τέλος, λειτουργούν βάσει φωτοπεριοδικότητας, δηλαδή εξαρτώνται από την παρουσία ή απουσία φωτός.

Προκειμένου αυτό το ενδογενές ρολόι να μπορέσει να λειτουργήσει σωστά, υπάρχουν τρεις συνιστώσες οι οποίες κρίνονται απαραίτητες.

- Ένας ενδογενής κιρκάδιος βηματοδότης (pacemaker).
- Ένα μονοπάτι εισροής δεδομένων (input pathway) για την ανίχνευση περιβαλλοντικών παραμέτρων.
- Ένα μονοπάτι εξαγωγής δεδομένων (output pathway) για την εξωτερική έκφραση ρυθμών περιοδικότητας.

Πιο συγκεκριμένα, ο κύριος βηματοδότης που είναι υπεύθυνος για τη παραγωγή των κιρκάδιων ρυθμών στα θηλαστικά είναι ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN). Παράλληλα, η «μηχανή» του κιρκάδιου μηχανισμού είναι τα κιρκάδια γονίδια, που



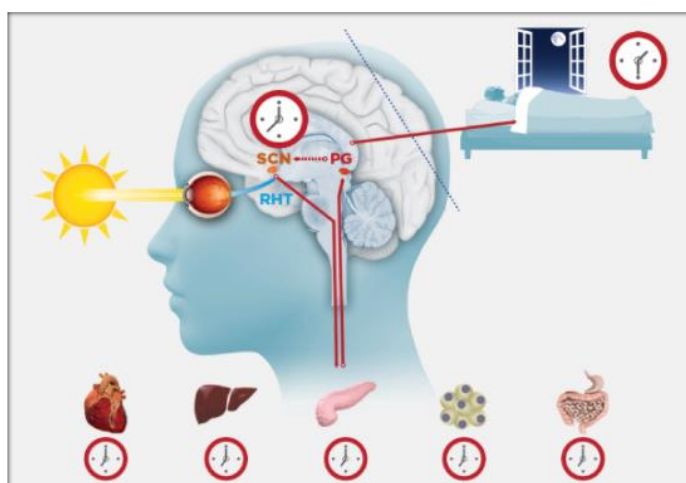
μεταγράφονται και μεταφράζονται μέσω αγκυλών παλίνδρομης ρύθμισης, οι οποίες απαρτίζονται από θετικές και αρνητικές συνιστώσες με σκοπό την πραγματοποίηση μιας περιοδικής μεταβολής. Αποτέλεσμα, λοιπόν, αυτών των γεγονότων είναι αλλαγές στη βιοχημεία, φυσιολογία και συμπεριφορά του οργανισμού. Όλα τα παραπάνω θα αναλυθούν στη συνέχεια.

## 2.1.1. Κεντρικοί και περιφερικοί κιρκάδιοι βηματοδότες

### > Κεντρικοί κιρκάδιοι βηματοδότες

Ο υποθαλαμικός **υπερχιασματικός πυρήνας (SCN)** δρα ως ο κύριος βηματοδότης για την παραγωγή των κιρκάδιων ρυθμών στα θηλαστικά. Πρόκειται για ένα αμφοτερόπλευρο συμμετρικό όργανο, το οποίο εντοπίζεται άνωθεν του οπτικού χιάσματος του πρόσθιου υποθαλάμου και επί τα εκτός της τρίτης κοιλίας. Ο SCN λαμβάνει δεδομένα φωτός από τον αμφιβληστροειδή, μέσω των αμφιβληστροειδικών γαγγλιακών κυττάρων (ipRGCs). Τα κύτταρα αυτά είναι οι φωτοϋποδοχείς συντονισμού και εκβάλλουν στον SCN, ενώ παράλληλα παράγουν τη μελανοψίνη - μια πρωτεΐνη δίκην-οψίνης - η οποία τα καθιστά εγγενώς φωτοευαίσθητα σε ακτινοβολία μικρού μήκους κύματος. Το ενδιαφέρον με τα ipRGCs είναι ότι εκπολώνουν φωτοϋποδοχείς που χρησιμοποιούν μηχανισμούς φωτομετατροπής οι οποίοι ομοιάζουν με αυτούς των ασπόνδυλων. Τα αμφιβληστροειδικά γαγγλιακά κύτταρα είναι ιδανικοί κιρκάδιοι φωτοϋποδοχείς οι οποίοι πρέπει να αφομοιώνουν την πληροφορία του φωτός για σχετικά μεγάλες χρονικές περιόδους, ενώ παράλληλα δεν θα πρέπει να είναι ευαίσθητοι σε προσωρινά σήματα φωτός τα οποία δεν σχετίζονται με τον ηλιακό κύκλο φωτός. Παρά το γεγονός ότι τα ipRGCs φαίνεται να είναι άριστοι φωτοϋποδοχείς, δεν δρουν μόνα· τα κωνία και τα ραβδία δρουν συμπληρωματικά και εισάγουν δεδομένα φωτός στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN).

Παλαιότερα υπήρχε η αντίληψη ότι τα κινκάρδια ρολόγια του ανθρώπινου οργανισμού συγχρονίζονται βάσει των κοινωνικών επαφών. Σήμερα η αντίληψη αυτή έχει ανατραπεί και πλέον είναι γνωστό ότι συντονιστής του κινκάρδιου βηματοδότη στους ανθρώπους είναι το φως. Έτσι, λοιπόν, το φως του ηλίου που εμφανίζεται κάθε πρωί διεγείρει τα ipRGCs να μεταφέρουν σήματα στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN) δια μέσου μιας αμφιβληστροειδό – υποθαλαμικής οδού (RHT), η οποία προεκβάλλει στον SCN.



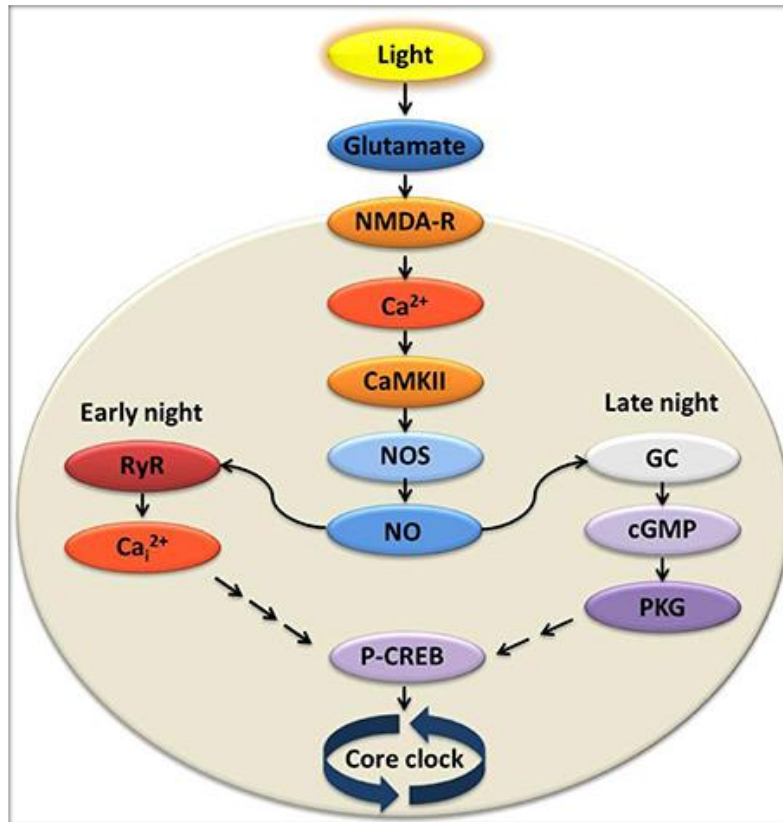
Εικόνα 2.1.1.1

Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση γλουταμινικού οξέος. Η γλουταμινεργική ενεργοποίηση του υποδοχέα NMDA είναι απαραίτητη και επαρκής για την έναρξη σημαντικών μεταβολών και οδηγεί σε εισροή εξωκυττάριου  $Ca^{2+}$ . Η  $Ca^{2+}$ /καλμοδουλίνο – εξαρτώμενη κινάση II (CaMKII) και η συνθετάση του νιτρικού οξειδίου (NOS) ενεργοποιούνται και προκαλούν αύξηση στα επίπεδα του νιτρικού οξειδίου (NO).

Νωρίς τη νύχτα, η αύξηση του νιτρικού οξειδίου ενεργοποιεί τους υποδοχείς ρυανοδίνης (RyR) στο ενδοκυτταρικό ενδοπλασματικό δίκτυο όπου αποθηκεύεται το  $Ca^{2+}$ . Το ενδοκυτταρικό  $Ca^{2+}$  ( $Ca_i^{2+}$ ) απελευθερώνεται μέσω των ενεργοποιημένων RyR και, μέσω ενός άγνωστου προς το παρόν μηχανισμού, οδηγεί σε φωσφορυλίωση της pCREB πρωτεΐνης και εν συνεχεία αυξημένη έκφραση των κινκάρδιων γονιδίων.

Από την άλλη πλευρά, αργά τη νύχτα η αύξηση του νιτρικού οξειδίου ενεργοποιεί την γουανυλο – κυκλάση (GC), τη σύνθεση cGMP και την αυξημένη δραστηριότητα της

εξαρτώμενης από cGMP κινάσης (PKG). Η ενεργοποίηση της κινάσης αυτής, αλλά και άλλων κινασών οδηγεί στην αύξηση της pCREB πρωτεΐνης και στη μεταγραφή συγκεκριμένων κιρκάδιων γονιδίων.



Εικόνα 2.1.1.2

Ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) χρησιμοποιεί νευροενδοκρινικά και αυτόνομα σήματα προκειμένου να συγχρονίσει κιρκάδιους ρυθμούς σε όλα τα άλλα συστήματα: καρδιαγγειακό, ηπατικό, παγκρεατικό, λιπώδες, γαστρεντερικό αλλά και σε άλλα. Καθώς το φως της ημέρας μειώνεται στο τέλος της μέρας, εκκρίνεται η μελατονίνη και ακολουθεί ο ύπνος (εικόνα 2.1.1.1).

### 2.1.1.1. Ο μηχανισμός των κιρκάδιων ρυθμών στα θηλαστικά

Οι κιρκάδιοι ρυθμοί στα θηλαστικά αφορούν έναν 24ωρο περιοδικό μηχανισμό που εξαρτάται στενά και καθοριστικά από την έκφραση συγκεκριμένων κιρκάδιων γονιδίων. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των γονιδίων αυτών συμμετέχουν στους

κινκάρδιους ρυθμούς, αναστέλλοντας τους εκκινητές τους μέσω του αρνητικού σκέλους της ακκύλης παλίνδρομης ρύθμισης.

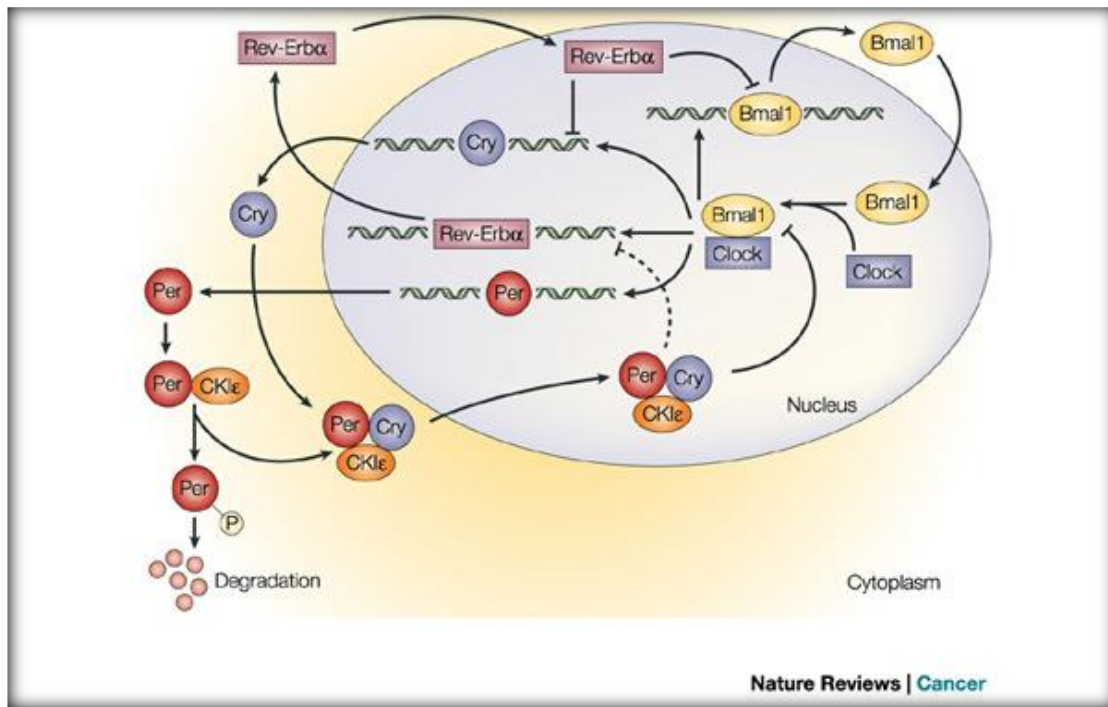
Στην αρχή μιας επικείμενης ημέρας τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου *Bmal1* αυξάνονται κατά πολύ με αποτέλεσμα να προωθείται ο σχηματισμός των πρωτεϊνικών ετεροδιμερών συμπλόκων *BMAL1/CLOCK*. Τα σύμπλοκα αυτά συνδέονται σε ειδικές ακολουθίες βάσεων (E-boxes) στους εκκινητές των γονιδίων *Cry*, *Per* και *Rev – Erb* κι έτσι επάγουν την έκφρασή τους. Παράλληλα, το σύμπλοκο *BMAL1/CLOCK* είναι ικανό να αναστείλει τη μεταγραφή του *Bmal1* γονιδίου.

Μετά τη μεταγραφή και τη μετάφραση του γονιδίου *Rev – Erb*, η πρωτεΐνη *REV – ERB* εισέρχεται στον πυρήνα προκειμένου να καταστείλει την μεταγραφή των *Bmal1* και *Cry* γονιδίων. Ταυτόχρονα, με την μεταγραφή και μετάφραση των *Per* γονιδίων συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα *PER* πρωτεΐνες, όπως η *PER2*, και φωσφορυλιώνονται από την ενζυμική κινάση *CKIε*. Οι φωσφορυλιωμένες *PER* πρωτεΐνες είναι ασταθείς και αποδομούνται με ουβικιτινίωση.

Αργότερα κατά τη διάρκεια της ημέρας, οι πρωτεΐνες *CRY* συσσωρεύονται στο κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να σχηματιστεί το σύμπλοκο *PER/CKIε/CRY*, το οποίο είναι ιδιαιτέρως σταθερό. Το σύμπλοκο αυτό εισέρχεται στον πυρήνα, στην αρχή της επικείμενης νύχτας και ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλέγματος *BMAL1/CLOCK*, ελαττώνοντας έτσι τα επίπεδα των mRNA των γονιδίων *Per* και *Cry*.

Η αναστολή αυτή οδηγεί σταδιακά σε μείωση των επιπέδων των πρωτεϊνών *PER* και *CRY*, που θα εξαφανιστούν πλήρως εντός των επόμενων 12 ωρών. Αυτό, λοιπόν, έχει ως αποτέλεσμα να μην υφίσταται πλέον το σύμπλοκο *PER/CKIε/CRY*, που προκαλούσε την αναστολή του *BMAL1/CLOCK* συμπλόκου. Ο κύκλος έτσι ξεκινά από την αρχή.

Όλα τα παραπάνω αναπαρίστανται σχηματικά στην εικόνα 2.1.3.1.



Εικόνα 2.1.3.1

### > Περιφερικοί κινκάρδιοι βηματοδότες

Ρυθμοί κινκάρδιων γονιδίων και/ή έκφραση πρωτεϊνών έχουν παρατηρηθεί σε κύτταρα και ιστούς σε όλο το σώμα των θηλαστικών – ρυθμοί οι οποίοι παραμένουν και σε συνθήκες καλλιέργειας – αποδεικνύοντας ότι τα μη υπερχιασματικά (SCN) κύτταρα περιέχουν και αυτά ενδογενείς κινκάρδιους ταλαντωτές. Παρόλο που ο πυρήνας του μηχανισμού του κινκάρδιου ρολογιού συντίθεται από αυτά τα διαφορετικά κυτταρικά ρολόγια, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στο πόσο συνεισφέρει κάθε «εξάρτημα» του ρολογιού, στον τρόπο με τον οποίο αυτά τα περιφερικά ρολόγια επαναφέρονται αλλά και στις οδούς «εκροής» πληροφοριών που υπόκεινται στον έλεγχό τους. Αυτοί οι ενδογενείς κινκάρδιοι βηματοδότες ωθούν εκτεταμένους ρυθμούς μεταγραφής γονιδίων, με 3-10% όλου του mRNA σε έναν δεδομένο ιστό να τους εμφανίζει σταθερά. Παρόλα αυτά, τα γονίδια που είναι κάτω από κινκάρδιο έλεγχο δεν επικαλύπτονται σε μεγάλο βαθμό σε κάθε ιστό, αντανακλώντας έτσι την ανάγκη για χρονικό έλεγχο της κυτταρικής φυσιολογίας η οποία είναι σχετική με τον κάθε μοναδικό κυτταρικό τύπο. Έτσι, το κινκάρδιο ρολόι ασκεί ευρέως τον έλεγχο πολλών βιολογικών διαδικασιών, όπως η ομοίωση της γλυκόζης και η γλυκονεογένεση.

## 2.1.2. Κιρκάδιοι ρυθμοί σε μοριακό επίπεδο

Τα τελευταία δέκα χρόνια έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες για την μελέτη των κιρκάδιων ρυθμών σε μοριακό επίπεδο. Με το πέρας των ερευνών αυτών οι επιστήμονες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι κιρκάδιοι ρυθμοί ελέγχονται από συγκεκριμένα γονίδια. Πρόκειται για τα “clock genes” τα οποία μεταγράφονται και μεταφράζονται με αγκύλες παλίνδρομης ρύθμισης, που διαθέτουν αρνητικές και θετικές συνιστώσες. Τα κιρκάδια γονίδια μεταγράφονται με ενεργοποίησή τους από τις θετικές συνιστώσες και οι πρωτεΐνες οι οποίες προκύπτουν αποτελούν τις αρνητικές συνιστώσες που αναστέλλουν τη δράση των θετικών.

Τα μέχρι τώρα γνωστά πυρηνικά κιρκάδια γονίδια είναι τα: Clock, Per 1, Per 2, Per 3, Cry 1, Cry 2, Bmal1/Mop3, Bmal2/Mop9, Npas2/Mop4, Tim, CK1ε και Rev-Erba. Πιο συγκεκριμένα:

### **Period genes (Per1, Per2, Per3)**

Τα γονίδια αυτά αποτελούν μέλη της οικογένειας PAS (Per aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator single minded protein). Τα πρωτεϊνικά προϊόντα αυτών των γονιδίων δρουν ως αρνητικές συνιστώσες που ρυθμίζουν τη μεταγραφή των ίδιων τους των γονιδίων. Πειράματα με πειραματόζωα που ήταν φορείς μηδενικών μεταλλάξεων (μεταλλάξεις σε γονίδια που οδηγούν σε μη μεταγραφή τους ή/και μετάφρασή τους) των γονιδίων Per1 και Per2 έδειξαν ότι υπάρχουν αλλαγές στους κιρκάδιους ρυθμούς τους, ενώ μηδενικές μεταλλάξεις στο γονίδιο Per3 δεν οδήγησαν σε αλλαγές στη κιρκάδια συμπεριφορά.

### **Cryptochrome genes (Cry1, Cry2)**

Τα γονίδια αυτά αποτελούν μέλη της οικογένειας των φλαβοπρωτεϊνών, που κωδικοποιούν συνιστώσες με αρνητική δράση. Αφού αλληλοεπιδράσουν με τις PER πρωτεΐνες, τις μετατοπίζουν στον πυρήνα από το κυτταρόπλασμα και αναστέλλουν τη δράση των θετικών συνιστωσών. Πειράματα με πειραματόζωα που ήταν φορείς

μηδενικών μεταλλάξεων για τα γονίδια *Cry1* και *Cry2*, έδειξαν ότι υπάρχουν αλλαγές στους ρυθμούς περιοδικότητάς τους.

### **Clock gene**

Το προϊόν που κωδικοποιεί το γονίδιο *Clock* αποτελεί μια πρωτεΐνη που είναι μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας – αγκύλης – έλικας. Η πρωτεΐνη αυτή αποτελεί θετική συνιστώσα για τη μεταγραφή κερκάδιων γονιδίων. Πειράματα με πειραματόζωα που ήταν φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το γονίδιο αυτό εμφάνιζαν αλλαγή στους ρυθμούς περιοδικότητας.

### **Bmal1/Mop3 gene**

Το γονίδιο αυτό είναι επίσης μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας – αγκύλης – έλικας, όπως και το *clock gene* και εμφανίζει τα ίδια χαρακτηριστικά. Μάλιστα, δρα ως το ετεροδιμερές ζεύγος του. Πειράματα με πειραματόζωα που ήταν φορείς μηδενικών μεταλλάξεων για το γονίδιο αυτό εμφάνιζαν αλλαγή στους ρυθμούς περιοδικότητας.

### **Bmal2/Mop9 gene**

Αποτελεί μια παραλλαγή του παραπάνω γονιδίου.

### **Npas2/Mop4 gene**

Αποτελεί και αυτό μέλος της οικογένειας των μεταγραφικών παραγόντων βασικής έλικας – αγκύλης – έλικας. Αλληλοεπιδρά με το γονίδιο *Bmal1/Mop3* και ενεργοποιεί τη μεταγραφή των *Per1*, *Per2* και *Cry1* γονιδίων.

### **Timeless gene (Tim)**

Το γονίδιο αυτό αποτελεί μια συνιστώσα που αλληλοεπιδρά με τα γονίδια *Per*.

## CKIε

Πρόκειται για μέλος των κινασών σερίνης/θρεονίνης και ο κύριος ρόλος του είναι η φωσφορυλίωση των PER πρωτεϊνών.

## Rev – erb – alpha gene (Rev – Erba)

Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί έναν υποδοχέα ο ρόλος του οποίου είναι να συνδέει τις θετικές συνιστώσες με τις αρνητικές συνιστώσες της αγκύλης παλίνδρομης ρύθμισης. Παράλληλα, ρυθμίζει τη κυκλική μεταγραφή του Bmal1. Παρόλα αυτά, το Rev – Erba δεν αποτελεί απαραίτητο γονίδιο για τον κερκάδιο ρυθμό.

## 2.2. Κιρκάδιοι ρυθμοί και αναπαραγωγή

### 2.2.1 Ο ρόλος της μελατονίνης

Πολλά ζώα, μεταξύ των οποίων και τα θηλαστικά, έχουν αναπτύξει μια σειρά από στρατηγικές οι οποίες εξασφαλίζουν άριστες πιθανότητες για επιβίωση και αναπαραγωγή. Μεταξύ αυτών των στρατηγικών περιλαμβάνονται και διαδικασίες οι οποίες διασφαλίζουν την κατάλληλη χρονική στιγμή που οι οργανισμοί γίνονται αναπαραγωγικά ενεργοί. Έτσι, παρουσιάζουν δραματικές εποχικές αλλαγές στην αναπαραγωγική τους δραστηριότητα. Αυτές οι αλλαγές είναι προγραμματισμένες



ώστε τόσο η γέννηση όσο και η γαλουχία των νεογνών να επιτελείται στις πιο ευνοϊκές περιόδους του έτους, όπου η τροφή είναι άφθονη και επαρκής σε ποσότητα ώστε να καλύψει όλες τις ενεργειακές τους ανάγκες. Για παράδειγμα, στα ζώα που η χρονική διάρκεια της κύησης είναι μικρή, όπως στα ποντίκια, η αναπαραγωγική ωρίμανση πυροδοτείται από αλλαγές στο περιβάλλον που υποδεικνύουν την άφιξη της άνοιξης, ώστε ο τοκετός να πραγματοποιηθεί σε ευνοϊκές καιρικές συνθήκες.

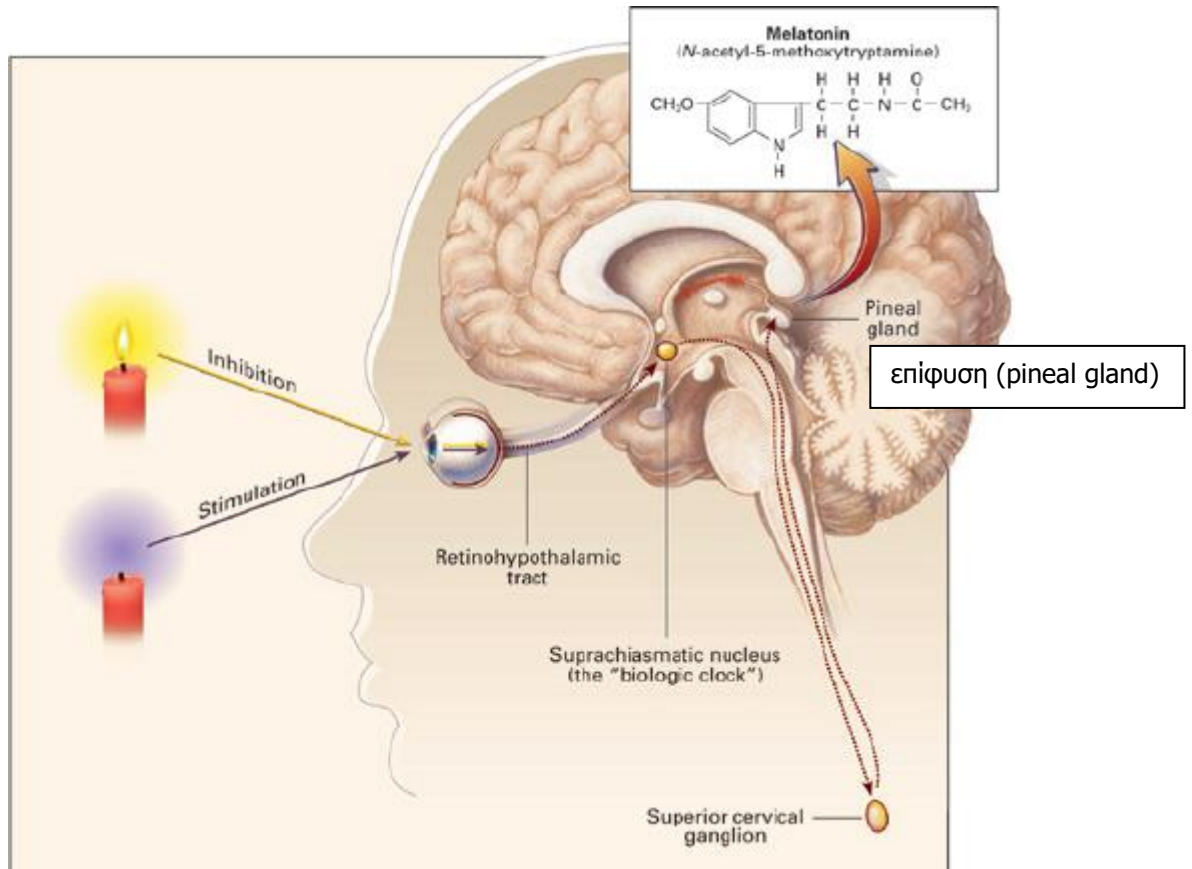
Υπάρχουν πολλές περιβαλλοντικές ενδείξεις τις οποίες τα ζώα λαμβάνουν προκειμένου να οδηγηθούν σε αναπαραγωγική ωρίμανση, όπως η θερμοκρασία και η βροχή. Παρόλα αυτά, αυτές οι περιβαλλοντικές συνιστώσες μπορεί να είναι στη πραγματικότητα αναξιόπιστες για την εξακρίβωση της εποχής του έτους. Έτσι, οι αλλαγές στη διάρκεια της ημέρας καθώς οι εποχές περνούν, παρέχουν έναν πολύ πιο αξιόπιστο δείκτη και έχει βρεθεί πως αυτές αποτελούν το κυρίαρχο σύνθημα για τον χρονισμό της εποχικής αναπαραγωγής.

Η φωτοπεριοδικότητα, λοιπόν, αποτελεί την ικανότητα των οργανισμών να χρησιμοποιούν την ετήσια εξέλιξη του μήκους της ημέρας ως στοιχείο για να εξακριβώσουν την χρονική στιγμή του έτους, με σκοπό να ρυθμίσουν τους ετήσιους βιολογικούς ρυθμούς τους. Έτσι, η διαφοροποίηση της χρονικής στιγμής της ανατολής και της δύσης κατά τη διάρκεια του έτους σε συνδυασμό με ένα ενδογενές σύστημα χρονισμού, ελέγχει την ημερήσια έκκριση της ορμόνης *μελατονίνη* από την επίφυση\*, που είναι η ορμόνη κλειδί για αυτά τα γεγονότα. Ο ημερήσιος ρυθμός της παραγωγής μελατονίνης, σε συνδυασμό με άλλα κινκάρδια και ορμονικά σήματα, ρυθμίζει την έναρξη της εποχικής γονιμότητας με αποτέλεσμα την κύηση και ακολούθως τον τοκετό σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή του έτους.

Δεν είναι ξεκάθαρο πως η μελατονίνη δρα προκειμένου να προωθήσει τις εποχικές αλλαγές στην αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, είναι άγνωστο αν δρα εμμέσως ή απευθείας στην υπόφυση. Φαίνεται πάντως πως τα κύρια αποτελέσματά της στο αναπαραγωγικό σύστημα οφείλονται σε αλλαγές που προκαλεί στην έκκριση των υποφυσιακών γοναδατροπινών και όχι στην άμεση δράση της στις γονάδες.

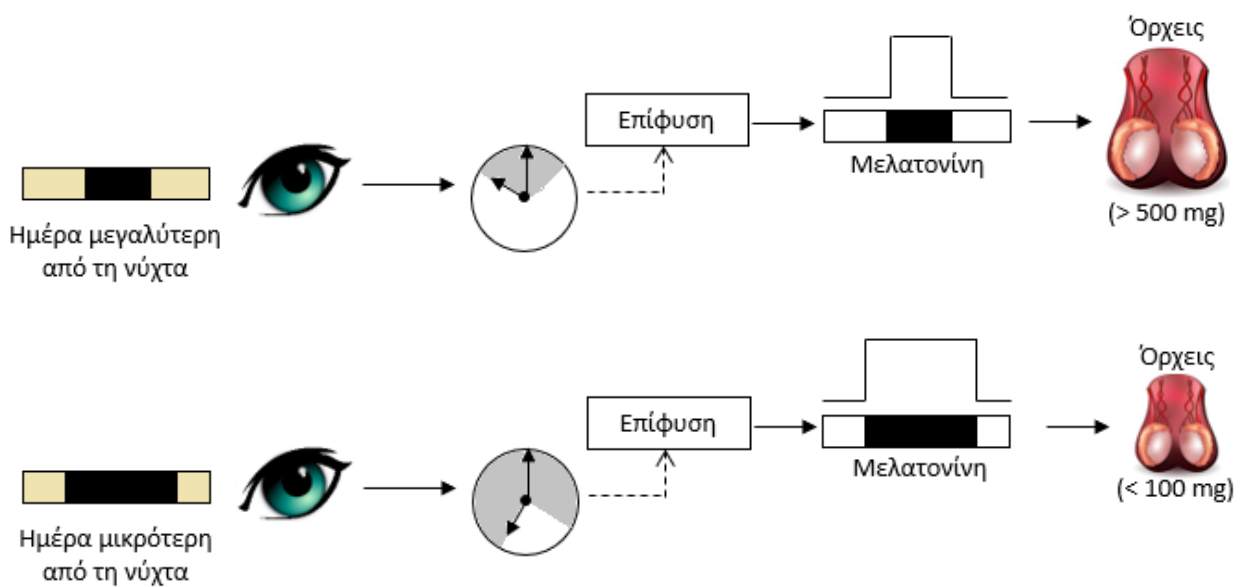
---

\* ενδοκρινής αδένας του εγκεφάλου με φωτοευαίσθητα κύτταρα (εικόνα 2.2.2.1)



Εικόνα 2.2.2.1

Όπως φαίνεται στην εικόνα 2.2.2.2, η επίφυση είναι ικανή να μετρήσει τη χρονική διάρκεια της ημέρας κατά την εξέλιξη του έτους και να προσαρμόσει την έκκριση μελατονίνης αναλόγως.



Εικόνα 2.2.2.2

Η μελατονίνη παράγεται κατά τις νυχτερινές ώρες. Έτσι, τους μήνες του έτους που η ημέρα έχει μεγαλύτερη διάρκεια από τη νύχτα η ποσότητα της μελατονίνης που παράγεται είναι ανάλογη της διάρκειας της νύχτας, δηλαδή μικρή. Οι οργανισμοί, λοιπόν, είναι αναπαραγωγικά ενεργοί. Αντίστοιχα, κατά τους μήνες του έτους που η ημέρα έχει μικρότερη διάρκεια από τη νύχτα η ποσότητα της μελατονίνης που παράγεται είναι ανάλογη της διάρκειας της νύχτας, δηλαδή μεγάλη καθιστώντας τους οργανισμούς αναπαραγωγικά ανενεργούς.

Η επίδραση της μελατονίνης στα αναπαραγωγικά συστήματα μπορεί να συνοψιστεί λέγοντας ότι είναι αντι – γοναδοτροπική. Με άλλα λόγια, η μελατονίνη αναστέλλει την έκκριση των γοναδοτροπινών, δηλαδή της LH και της FSH. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην συντελείται η αναπαραγωγική ωριμότητα των οργανισμών και κατ' επέκταση η δημιουργία απογόνων.

Μία πρακτική εφαρμογή του ρόλου της μελατονίνης στον έλεγχο της εποχικής αναπαραγωγής βρίσκεται στη χρήση της για τον τεχνητό χειρισμό κύκλων σε εποχικούς κτηνοτρόφους. Για παράδειγμα, στα πρόβατα που κανονικά εκτρέφονται μόνο μία φορά το χρόνο μπορούν να επιφέρουν αναπαραγωγική ενεργότητα για δύο εποχές, με θεραπεία μελατονίνης.

## 2.2.2. Στοιχεία για την επίδραση στην αναπαραγωγή

Όλα τα παραπάνω σε συνδυασμό με στοιχεία που υπάρχουν για την επίδραση των κερκάδιων ρυθμών στην αναπαραγωγή, ολοκληρώνουν το πορτραίτο της συσχέτισης των κερκάδιων γονιδίων με το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών. Τα στοιχεία για την επίδραση των κερκάδιων ρυθμών στην αναπαραγωγική λειτουργία σχετίζονται με:

### Την έκκριση της ορμόνης LH (luteinizing hormone)

Εκτενής έρευνα, που αφορά στον κερκάδιο έλεγχο του προ – οίστρου κύματος της LH, έχει διεξαχθεί σε πειραματόζωα. Κατά τη διάρκεια της θυλακικής φάσης του ωοθηκικού κύκλου, η οιστραδιόλη αυξάνεται σταδιακά σε ένα περιβάλλον

αυξημένης έκκρισης LH. Καθώς το επικρατές ωοθυλάκιο συνεχίζει να αυξάνεται και να αναπτύσσεται, λόγω της αυξημένης οιστραδιόλης αυξάνονται οι υποδοχείς της GnRH στην υπόφυση με σκοπό τη παραγωγή LH και ακολούθως την ωορρηξία. Στα ποντίκια και στους αρουραίους, η αιχμή της LH ξεκινά περίπου στις 16:00 το απόγευμα, ενώ η ωορρηξία πραγματοποιείται περίπου τα μεσάνυχτα. Φαίνεται, λοιπόν, να υπάρχει ένα σύστημα χρονοισμού της ωορρηξίας ο ρόλος του οποίου αποδείχτηκε με τη χορήγηση φαινοβαρβιτάλης σε ποντίκια και αρουραίους το απόγευμα του πρό – οίστρου. Η αναμενόμενη αιχμή της LH και η ωορρηξία δεν διεκόπησαν οριστικά, αλλά καθυστέρησαν 24 ώρες, αφού το επόμενο απόγευμα τα επίπεδα της LH ήταν φυσιολογικά (Everett and Sawyer, 1950).

Ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN) προεκβάλλει σε GnRH θετικούς νευρώνες στον υποθάλαμο, ενώ παράλληλα η περιοχή αυτή εκφράζει οιστρογονικούς υποδοχείς (Van der Beek et al. 1993, 1997, de la Iglesia et al. 1995, Watson et al. 1995) παρέχοντας έτσι ένα πιθανό μονοπάτι για τις ορμόνες να επηρεάσουν τη χρονική στιγμή της ωορρηξίας. Μετέπειτα έρευνες (Mosko and Moore, 1979) επιβεβαίωσαν τη συσχέτιση των κιρκάδιων ρυθμών με την έκκριση της LH, αποδεικνύοντας πως βλάβες στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN) των ποντικών οδηγούν σε απώλεια της απόκρισης στα αυξημένα επίπεδα οιστρογόνων κι έτσι την παύση της ωορρηξίας.

Στον άνθρωπο, στοιχεία για έναν ουσιαστικό ρόλο των κιρκάδιων ρυθμών στην χρονική στιγμή της αιχμής της LH, είναι σπάνια. Παρόλα αυτά, βάσει δεδομένων που προκύπτουν από τυχαίες δειγματοληψίες αίματος, έχει υπολογιστεί πως η αιχμή της LH στις γυναίκες πραγματοποιείται στο χρονικό διάστημα μεσάνυχτα και 8:00 το πρωί, ενώ η ωορρηξία συμβαίνει 24 ή 36 – 48 ώρες αργότερα (Wilcox et al. 1995, Khattab et al. 2005).

### **β Την χρονική στιγμή της επαφής**

Στα ποντίκια η χρονική στιγμή της σεξουαλικής επαφής καθορίζεται από κιρκάδιες συνιστώσες. Συγκεκριμένα, η κιρκάδια ρύθμιση της έκκρισης της LH και της ωορρηξίας στα θηλαστικά που αναφέρθηκε προηγουμένως, φαίνεται να είναι στη πραγματικότητα μια προσαρμογή η οποία διασφαλίζει ότι η ωορρηξία θα πραγματοποιηθεί τη χρονική στιγμή που είναι πιο πιθανό να ζευγαρώσει το θηλυκό.

Τα νυχτόβια θηλυκά τρωκτικά κατά το χρονικό διάστημα της ωορρηξίας, δηλαδή περίπου τα μεσάνυχτα, εκδηλώνουν φανερή συμπεριφορά η οποία παρακινούν τα αρσενικά στο να ζευγαρώσουν. Σε περίπτωση καθυστέρησης της γονιμοποίησης για 4 με 6 ώρες μετά την ωορρηξία, είναι πολύ πιθανό να καταστραφεί η βιωσιμότητα των εμβρύων.

Στους ανθρώπους, υπάρχει μια ισχυρή κirkάδια συνιστώσα που καθορίζει τη στιγμή της επαφής, με κορύφωση σεξουαλικής δραστηριότητας αργά τη νύχτα (Palmer et al. 1982, Refinetti 2005) και σημαντική μείωση νωρίς το πρωί κυρίως τα σαββατοκύριακα (Palmer et al. 1982). Παρόλα αυτά, δεν έχουν διεξαχθεί έρευνες προκειμένου να διασαφηνιστεί αν η χρονική στιγμή της σεξουαλικής επαφής σε σχέση με τη χρονική στιγμή της ωορρηξίας είναι δυνατόν να αλλάξει τη γονιμότητα.

#### **γ Το ωάριο και το έμβρυο στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης**

Το αναπτυσσόμενο έμβρυο είναι δυνατόν να περάσει 4 ημέρες στη σάλπιγγα του θηλυκού ποντικού πριν φτάσει στη μήτρα όπου και θα εμφυτευτεί. Παρόλα αυτά, η επίδραση της κirkάδιας ρυθμικότητας κατά της διάρκειας της περιόδου ανάπτυξης του εμβρύου είναι ελάχιστα κατανοητή.

Στο ποντίκι έχει περιγραφεί πιθανή έκφραση μητρικών κirkάδιων γονιδίων μέχρι και το στάδιο των δύο κυττάρων (Hamatani 2004), ενώ ημι – ποσοτικές μετρήσεις της έκφρασης κirkάδιων γονιδίων υποδεικνύουν ότι από εκεί κι έπειτα η έκφραση μειώνεται έως ότου πραγματοποιηθεί συμπύκνωση (Johnson et al. 2002). Καμία από τις μελέτες αυτές παρόλα αυτά δεν εκτίμησε την έκφραση των κirkάδιων γονιδίων σε ένα εικοσιτετράωρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, ενώ παράλληλα δεν είναι ξεκάθαρο αν εκφράζονται σταθερά σε χαμηλά επίπεδα όπως στους όρχεις ή εκφράζονται με κάποια ρυθμικότητα. Ωστόσο, αποδεδειγμένο είναι το γεγονός ότι η σάλπιγγα των αρουραίων εκφράζει κirkάδια γονίδια αλλά και γονίδια που ελέγχονται από τα κirkάδια (Kennaway et al. 2003). Ανάμεσα στα γονίδια που αποδείχτηκε ότι εκφράζονται ρυθμικά, περιλαμβάνεται ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου – 1 (Pai – 1), το οποίο σχετίζεται με τη προστασία του εμβρύου κατά τη μεταφορά του από τη σάλπιγγα στην μήτρα (Kouba et al. 2000).

Στον άνθρωπο από την άλλη πλευρά, έχει αποδειχτεί ότι κιρκάδια γονίδια και συγκεκριμένα τα Clock, Per1, Per2 και Per3 εκφράζονται στα έμβρυα σταδίου 8 κυττάρων (Ann A. Kiessling et al. 2009), πράγμα που υποδηλώνει την κιρκάδια ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης στα πρώτα στάδια. Βέβαια, η έκφραση των Per σε σχέση με αυτή του Clock είναι πολύ μικρή, ενώ υπήρχε διαφορά στην έκφραση της πρώτης και δεύτερης σειράς δειγμάτων.

### Τη προετοιμασία της μήτρας για εμφύτευση

Είναι αποδεδειγμένο πως η μήτρα εκφράζει κιρκάδια γονίδια ρυθμικά (Johnshon et al. 2002, Horard et al. 2004, Dolatshad et al. 2006).

Σε μια από τις μελέτες του παρελθόντος, μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της συνεχούς χορήγησης οιστραδιόλης στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *Per1* και *Per2* σε ποντίκια που είχαν υποστεί ωθηκεκτομή (Nakamura et al. 2005). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ενώ τα επίπεδα mRNA των *Per1* και *Per2* αυξήθηκαν στη μήτρα των ποντικών, στα οποία δεν είχε χορηγηθεί οιστραδιόλη, αργά τη νύχτα, στα ποντίκια που χορηγήθηκε οιστραδιόλη παρατηρήθηκε ένα διφασικό μοτίβο έκφρασης. Συγκεκριμένα, η χορήγηση οιστραδιόλης δεν είχε καμία επίδραση στη ρυθμικότητα του *Per1* στον SCN, ενώ προκάλεσε μικρή αλλά στατιστικά σημαντική αύξηση στην έκφραση του *Per2*. Οι μηχανισμοί και ο φυσιολογικός ρόλος των αυτών των αλληλεπιδράσεων δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως, αλλά φαίνεται πως συμμετέχουν στην προετοιμασία της μήτρας για εμφύτευση.

## 2.3. Τα κιρκάδια γονίδια *Per1* και *Per2*

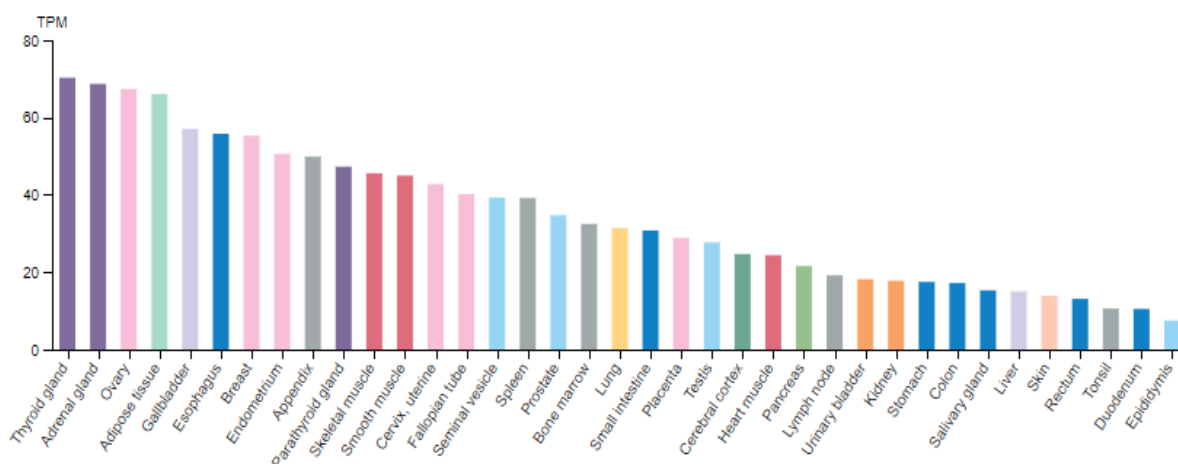
Το αντικείμενο μελέτης της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η ποσοτική έκφραση των γονιδίων *Per1* και *Per2* σε έμβρυα επίμυων, έως του σταδίου της βλαστοκύστης. Παρακάτω παρουσιάζονται μερικά από τα βασικά χαρακτηριστικά των δύο αυτών γονιδίων, που αφορούν τόσο στην έκφραση όσο και στη λειτουργία τους.

## Γονίδιο Per1

Το γονίδιο Per1 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 17, στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στο χρωμόσωμα 11 σε αυτό του ποντικού, ενώ κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PER1.

Η πρωτεΐνη PER1 είναι πολύ σημαντική για τη διατήρηση των κιρκάδιων ρυθμών στα κύτταρα. Συγκεκριμένα, σε πειράματα με ποντίκια knockout στα γονίδια Per1 και Per2, παρατηρήθηκε πως δεν εμφανίζουν καμία κιρκάδια ρυθμικότητα. Παράλληλα, η έκφραση της PER1 μπορεί να έχει σημαντικές επιδράσεις στον κυτταρικό κύκλο. Μπορεί, λοιπόν, να διαδραματίσει κάποιο ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου, ο οποίος όπως είναι γνωστό είναι συχνά αποτέλεσμα της μη ρυθμιζόμενης κυτταρικής ανάπτυξης και διαίρεσης. Έχει βρεθεί πως οι ασθενείς με καρκίνο έχουν μειωμένη έκφραση του Per1 και σύμφωνα με πειραματικές μελέτες (Gery et al) η ρύθμιση της έκφρασης Per1 μπορεί να είναι χρήσιμη για την αντιμετώπιση του καρκίνου στο μέλλον.

Όσον αφορά την έκφραση του Per1, παρατηρείται αυξημένη στον υπερχιασματικό πυρήνα (SCN), αλλά και σε άλλους ιστούς (εικόνα 2.3.1).



Εικόνα 2.3.1

Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται η έκφραση του Per1 στους διάφορους ιστούς, με πηγή δεδομένων από την βάση «Internally generated Human Protein Atlas (HPA)». Η βάση αυτή χρησιμοποιεί ως τιμή αναφοράς τα μετάγραφα ανά εκατομμύριο (TPM = transcripts per million). Για παράδειγμα σύμφωνα με το γράφημα, στην περίπτωση

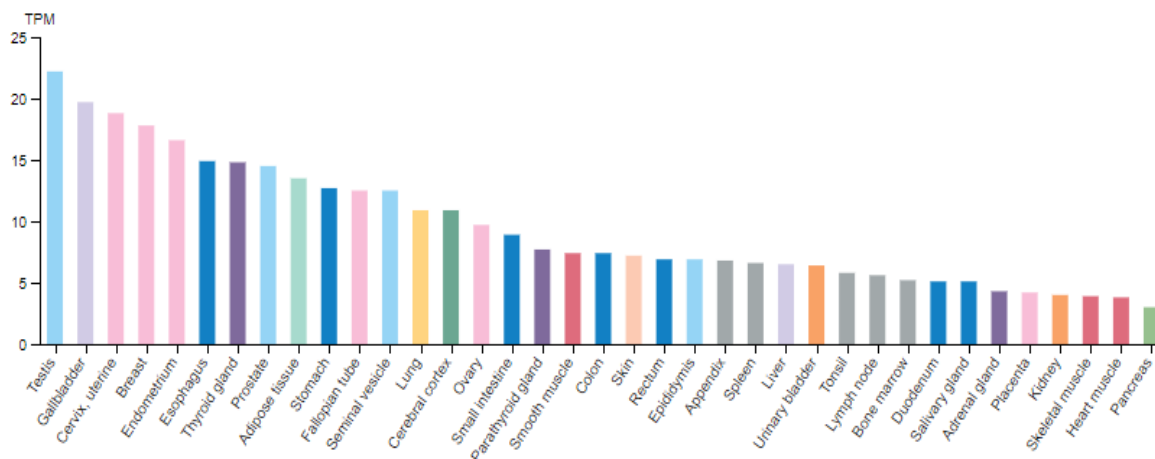
της ωοθήκης, παρατηρούνται 70.000 μετάγραφα RNA Per1 για κάθε 1.000.000 μόρια RNA στο δείγμα RNA sequencing.

## Γονίδιο Per2

Το γονίδιο Per2 εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2, στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στο χρωμόσωμα 1 σε αυτό του ποντικού, ενώ κωδικοποιεί την πρωτεΐνη PER2.

Η πρωτεΐνη PER2 στον άνθρωπο σχετίζεται με διαταραχές του ύπνου καθώς και με τον σχηματισμό του καρκίνου. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης της PER2 παρατηρούνται συχνά σε πολλά καρκινικά κύτταρα, υποδεικνύοντας πως η πρωτεΐνη PER2 είναι απαραίτητη για τη σωστή λειτουργία των κυττάρων και πως χαμηλά επίπεδα οδηγούν στην ανάπτυξη όγκων. Ακόμη, η πρωτεΐνη PER2 φαίνεται να είναι σημαντική για τον πολλαπλασιασμό των οστεοβλαστών, που βοηθούν στην αύξηση της πυκνότητας του οστού μέσω μιας οδού που χρησιμοποιεί Myc και Ccnd1.

Παρακάτω παρουσιάζεται η έκφραση του Per2 σε διάφορους ιστούς (εικόνα 2.3.2).



Εικόνα 2.3.2

Όμοια με πριν, τα δεδομένα προέρχονται από την βάση «Internally generated Human Protein Atlas (HPA)».



# Κεφάλαιο 3

## 1.1. Σκοπός

Θέμα της παρούσης διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της έκφρασης των κικκάδιων γονιδίων Per1 και Per2 στα αναπτυξιακά στάδια του προ - εμφυτευτικού εμβρύου επίμυων, έως και το στάδιο της βλαστοκύστης.

**Σκοπός** είναι να διαπιστώσουμε αν τα κικκάδια γονίδια Per1 και Per2 παίζουν κάποιο ρόλο στην κυτταρική διαίρεση στα αρχικά στάδια της εμβρυικής ανάπτυξης ή αν η δράση τους ξεκινά αργότερα, μετά τη δημιουργία του υπερχιασματικού πυρήνα.

Για τον σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε μια σειρά περαμάτων που περιλαμβάνουν την πρόκληση ωθηλακιορρυξίας σε θηλυκά ποντίκια, την γονιμοποίηση τους από αρσενικά, την καλλιέργεια in vitro των εμβρύων που παραλήφθηκαν σε συνθήκες και πρωτόκολλα που προσομοιάζουν απόλυτα το φυσιολογικό περιβάλλον εντός της μήτρας, την απομόνωση του mRNA από κάθε αναπτυξιακό στάδιο και την παρασκευή του cDNA και τελικά τον προσδιορισμό της έκφρασης των γονιδίων στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια.

# Κεφάλαιο 4

## 4.1. Υλικά και μέθοδοι

### 4.1.1. Πρόκληση ωοθηλακιορρηξίας

Το πειραματικό στάδιο της παρούσης διπλωματικής εργασίας έχει ως αφετηρία την πρόκληση ωοθηλακιορρηξίας σε θηλυκούς επίμυες ηλικίας 3 – 4 εβδομάδων. Για τον σκοπό αυτό, χορηγήθηκαν στα θηλυκά 5 IU γοναδοτροπίνης που έχει προέλθει από ορό εγκύου φοράδας (PMSG, Sigma Chemical Co). 48 ώρες μετά, χορηγούνται 5 IU ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (Sigma Chemical Co). Η πρώτη ένεση προκαλεί την ωοθηλακική ωρίμανση (μιας και τα θηλυκά είναι μικρής ηλικίας και μη αναπαραγωγικά ενεργά), ενώ η δεύτερη ένεση προκαλεί την ωοθηλακιορρηξία. Στη συνέχεια οι θηλυκοί επίμυες τοποθετούνται μεμονωμένα σε κλουβιά με ένα αρσενικό ηλικίας 9 εβδομάδων, καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας.

### 4.1.2. Προετοιμασία θρεπτικών υλικών

Το επόμενο βήμα του πειράματός μας αφορά στην προετοιμασία των θρεπτικών υλικών τα οποία θα χρησιμοποιηθούν παρακάτω για την πλύση και την καλλιέργεια των εμβρύων.

Για την παρασκευή του διαλύματος συλλογής [Collection Wash]: Σε φλασκί προστίθενται 36 mL DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) και 9 mL BSA 10% (Αλβουμίνη, παράγοντας V από ορό βοοειδούς, Sigma-Aldrich), δηλαδή σε αναλογία 9:1. Το διάλυμα DPBS χρησιμοποιείται προκειμένου να εξασφαλιστεί στη καλλιέργεια ένα ρυθμιστικό περιβάλλον για τη διατήρηση ενός φυσιολογικού pH, αλλά και η καλύτερη δυνατή βιωσιμότητα των κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, το BSA χρησιμοποιείται συμπληρωματικά με το DPBS, καθώς ενισχύει τη δράση του τελευταίου. Στη συνέχεια, το διάλυμα που δημιουργήθηκε διαμοιράζεται σε 7

τρυβλία καλλιέργειας petri 60x15mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) – 4 mL στη περιφέρεια κάθε τρυβλίου, 1 mL στο κέντρο.

<b>Collection Wash</b>	DPBS : BSA 9 : 1
------------------------	---------------------

Για την παρασκευή του διαλύματος καλλιέργειας [Growth Wash]: Σε φλασκί προστίθενται 36 mL του μέσου Ham's (Ham's F10 Medium) - ένα διάλυμα που περιέχει ψευδάργυρο, υποξανθίνη και θυμιδίνη - και 4 mL BSA - το οποίο είναι πρωτεϊνικής φύσης και αποτελεί πηγή θρεπτικών συστατικών για τη καλλιέργεια, δηλαδή σε αναλογία 9:1. Στη συνέχεια, το διάλυμα που δημιουργήθηκε διαμοιράζεται σε 7 τρυβλία καλλιέργειας petri 60x15mm (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ) – 5 mL στο κέντρο κάθε τρυβλίου.

<b>Growth Wash</b>	Ham's : BSA 9 : 1
--------------------	----------------------

### 4.1.3. Συλλογή εμβρύων

Το πρωί που ακολουθεί, οι θηλυκοί επίμυες παραλαμβάνονται και θυσιάζονται με αυχενική μετατόπιση. Ακολουθεί η απομόνωση των σαλπγγων με τη βοήθεια χειρουργικών εργαλείων.



Εικόνα 4.1.1

Στη συνέχεια, οι σάλπιγγες που έχουν συλλεχθεί, οι οποίες περιέχουν τα γονιμοποιημένα ωάρια, τοποθετούνται σε πιάτο καλλιέργειας *Collection wash*.

Το επόμενο βήμα είναι η απελευθέρωση των γονιμοποιημένων ωαρίων μέσα από τις σάλπιγγες. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται στερεοσκόπιο, λαβίδα και υποδερμική βελόνα. Το τρυβλίο που περιέχει τις σάλπιγγες, εντός των οποίων βρίσκονται τα γονιμοποιημένα ωάρια, τοποθετείται στο στερεοσκόπιο. Με τη βοήθεια της λαβίδας και της βελόνας γίνεται η διάνοιξη των σαλπίγγων, και τα γονιμοποιημένα ωάρια απελευθερώνονται στο τρυβλίο.

Έπειτα, τα γονιμοποιημένα ωάρια υφίστανται διαδοχικές πλύσεις σε τρυβλία Collection wash, προκειμένου να απομακρυνθούν τα κοκκώδη κύτταρα. Η μεταφορά των εμβρύων γίνεται με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας, η οποία έχει επεξεργαστεί προκειμένου να έχει πολύ λεπτό στόμιο.

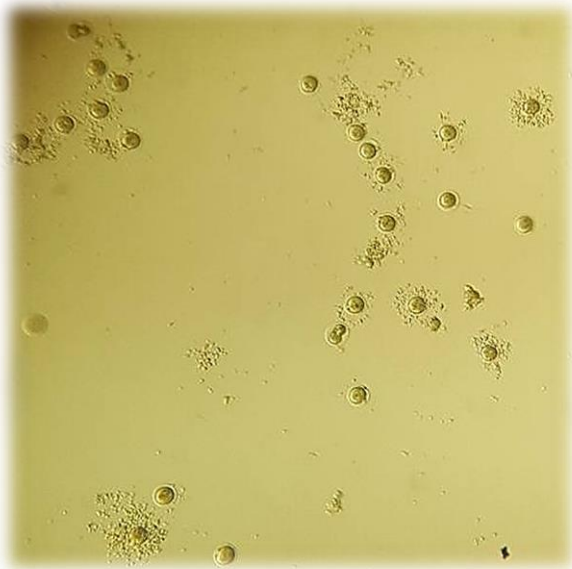
Μετά το πέρας των διαδοχικών πλύσεων, τα έμβρυα μεταφέρονται σε τρυβλία Growth wash. Από το στάδιο των 2 κυττάρων απομονώθηκαν 12 έμβρυα, από το στάδιο των 4 κυττάρων 8 έμβρυα, από το στάδιο των 8 κυττάρων 10 έμβρυα, από το στάδιο morula 10 έμβρυα και από το στάδιο της βλαστοκύστης 3 έμβρυα. Πάνω από το καλλιεργητικό υλικό προστίθεται υαλουρονιδάση, προκειμένου να δημιουργηθεί κάτι σαν προστατευτικό φιλμ. Τα τρυβλία αυτά τοποθετούνται σε επωαστικό κλίβανο, όπου και θα γίνει η καλλιέργεια των κυττάρων. Οι συνθήκες καλλιέργειας είναι: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> και 95% υγρασία.

#### 4.1.4. Ανάπτυξη και απομόνωση εμβρύων

Μετά την τοποθέτηση των εμβρύων στον κλίβανο επώασης, ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα γίνονται έλεγχοι προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι τα έμβρυα διαιρούνται με τον κατάλληλο ρυθμό, αλλά και για την απομόνωση των εμβρύων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Τα στάδια που παρατηρήθηκαν ήταν τα εξής:

Χρονική στιγμή (ώρες)	Στάδιο
0	γονιμοποιημένο ωάριο (εικόνα 4.1.4.1)
24	2 κυττάρων (εικόνα 4.1.4.2)
36	4 κυττάρων (εικόνα 4.1.4.3)

48	8 κυττάρων
72	μορίδιο
96	βλαστοκύστη (εικόνα 4.1.4.4)



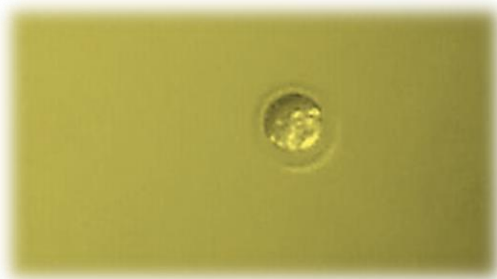
Εικόνα 4.1.4.1



Εικόνα 4.1.4.2



Εικόνα 4.1.4.3



Εικόνα 4.1.4.4

Έμβρυα από κάθε στάδιο απομονώνονται με τη βοήθεια της γυάλινης πιπέτας και φυλάσσονται σε eppendorfs στους - 20° C.

#### 4.1.5. Απομόνωση mRNA

Μετά την απομόνωση των εμβρύων του κάθε αναπτυξιακού σταδίου, ακολουθεί η απομόνωση του mRNA τους. Στη παρούσα διπλωματική εργασία, η απομόνωση του mRNA έγινε με kit, κατάλληλο για απομόνωση mRNA από μικρό αριθμό κυττάρων,

μιας και τα έμβρυα ήταν λίγα σε αριθμό. Πρόκειται για το RNesay Plus Micro kit της εταιρείας Qiagen (Valencia, CA), του οποίου το πρωτόκολλο αναφέρεται παρακάτω.

Για την απομόνωση του mRNA από έμβρυα επίμυων με το συγκεκριμένο kit, έχουμε στα υπόψιν μας τα εξής:

- Είναι απαραίτητη η προσθήκη αιθανόλης (96 – 100%) στο Buffer RPE, προκειμένου να ενεργοποιηθεί.
- Όταν η απομόνωση του mRNA γίνεται σε δείγματα όπου τα κύτταρα είναι λιγότερα από 500 (όπως στη περίπτωση του δικού μας πειράματος που τα έμβρυα είναι λίγα σε αριθμό), το Carrier RNA μπορεί να προστεθεί στο δείγμα πριν την ομογενοποίηση.

Η διαδικασία της απομόνωσης του mRNA ακολουθεί τα εξής βήματα:

Ενέργεια	Σκοπός
Προσθήκη <b>350 μl</b> Buffer RLT Plus	λύση κυττάρων
Προσθήκη <b>5 μl</b> Carrier RNA	συγκέντρωση του RNA πάνω στη στήλη
Vortex για <b>1 min</b>	ομογενοποίηση μείγματος
Μεταφορά του μείγματος στη <b>στήλη gDNA Eliminator</b>	κατακράτηση όλων των συστατικών πέραν του RNA
Φυγοκέντρηση για <b>1 min</b> στις 11.000 rpm	
Απόρριψη στήλης	
Προσθήκη <b>350 μl</b> αιθανόλης 70%	κατακρήμνιση RNA
Μεταφορά του δείγματος στη <b>στήλη RNeasy MinElute</b>	κατακράτηση του RNA
Φυγοκέντρηση για <b>1 min</b> στις 11.000 rpm	

Απόρριψη εκλούματος	
Προσθήκη <b>700 μl</b> Buffer RW1 στη στήλη	απομάκρυνση βιομορίων όπως οι υδατάνθρακες, οι πρωτεΐνες, τα λιπαρά οξέα κ.ά.
Φυγοκέντρηση για <b>1 min</b> στις 11.000 rpm	
Απόρριψη εκλούματος	
Προσθήκη <b>500 μl Buffer RPE</b>	απομάκρυνση ιχνών αλάτων τα οποία υπάρχουν στη στήλη λόγω των buffers που χρησιμοποιηθήκαν προηγουμένως
Φυγοκέντρηση για <b>1 min</b> στις 11.000 rpm	
Απόρριψη εκλούματος	
Προσθήκη <b>500 μl</b> αιθανόλης 80% στη στήλη	πλύση μεμβράνης στήλης
Φυγοκέντρηση για <b>2 min</b> στις 11.000 rpm	
Απόρριψη εκλούματος	
Μεταφορά της <b>στήλης RNeasy MinElute</b> σε καθαρό σωλήνα συλλογής	
Φυγοκέντρηση για <b>5 min</b> στις 14.000 rpm	
Απόρριψη εκλούματος	
Μεταφορά της <b>στήλης RNeasy MinElute</b> σε eppendorf	
Προσθήκη <b>14 μl</b> νερού RNase – free στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης	
Επώαση για <b>5 min</b> σε θερμοκρασία δωματίου	
Φυγοκέντρηση για <b>2 min</b> στις 11.000 rpm	
Απόρριψη στήλης	

Στο eppendorf, λοιπόν, έχουμε πλέον συλλέξει το mRNA το οποίο αποθηκεύουμε στους  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.1.6. Δημιουργία συμπληρωματικού DNA

Το mRNA το οποίο απομονώθηκε στο προηγούμενο βήμα, λειτουργεί ως καλούπι για τη σύνθεση ενός συμπληρωματικού DNA (cDNA, complementary DNA), με σκοπό να χρησιμοποιηθεί για την ενίσχυση και την ποσοτικοποίηση των γονιδίων Per1 και Per2 που αποτελούν το αντικείμενο μελέτης της παρούσης διπλωματικής εργασίας.

Η τεχνική με την οποία επιτυγχάνεται η σύνθεση του cDNA είναι η αντίστροφη μεταγραφή (RT). Στην τεχνική αυτή, το mRNA μεταγράφεται in vitro σε cDNA, με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Στη παρούσα εργασία, ως εκκινήτες για την αντίδραση RT χρησιμοποιήθηκαν τυχαίες αλληλουχίες εξανουκλεοτιδίων (random hexamers). Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε το kit Superscript II First Strand Synthesis System for RT-PCR, της εταιρίας Invitrogen, το οποίο ενδείκνυται για μικρές συγκεντρώσεις mRNA.

Η διαδικασία της δημιουργίας cDNA με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής είναι η εξής:

Αρχικά τα δείγματα mRNA που είχαν αποθηκευτεί στους  $-80^{\circ}\text{C}$ , μεταφέρονται σε cooler. Στη συνέχεια, προετοιμάζουμε eppendorfs των 0,5 mL, ένα για κάθε δείγμα mRNA που θα χρησιμοποιήσουμε. Σε κάθε eppendorf προσθέτουμε: 4  $\mu\text{l}$  random examers, 1  $\mu\text{l}$  dNTPs και 4  $\mu\text{l}$  από το αντίστοιχο δείγμα mRNA.

Τα eppendorfs αυτά τοποθετούνται στον θερμικό κυκλοποιητή (PCR) (εικόνα 4.1.6.1.).



Εικόνα 4.1.6.1.



Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

Θερμοκρασία (°C)	65	5
Χρόνος (min)	4	10

Παράλληλα, όσο τα δείγματα είναι εντός του μηχανήματος της PCR, ετοιμάζουμε σε ένα eppendorf των 1,5 mL το master mix το οποίο περιέχει τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	μl	Ιδιότητα
RT- Buffer	2	Ρυθμιστικό διάλυμα που εξασφαλίζει βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας.
Mg-Cl <sub>2</sub>	4	Απαραίτητο για τη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης και για την ενσωμάτωση των εκκινητών αλλά και των dNTPs στην αναπτυσσόμενη αλυσίδα DNA.
DTT	2	Αποδυναμώνει την δευτεροταγή δομή του RNA.
RNase Out	1	Προστατεύει το mRNA από αποσύνθεση.
Superscript II Reverse Transcriptase	1	Ένζυμο που εκτελεί την αντίστροφη μεταγραφή.

Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε ένα δείγμα mRNA. Για παράδειγμα αν θέλουμε να δημιουργήσουμε cDNA για 5 δείγματα mRNA, στο eppendorf των 1,5 mL προσθέτουμε τις παραπάνω ποσότητες επί 6.

Στη συνέχεια, σε κάθε ένα eppendorf από αυτά που βρίσκονται στον θερμικό κυκλοποιητή προσθέτουμε 10 μl από το master mix που έχουμε παρασκευάσει.

Το πρωτόκολλο που ακολουθείται είναι το εξής:

Θερμοκρασία (°C)	42	50
Χρόνος (min)	70	15

#### 4.1.7. Real – Time PCR

Η PCR σε πραγματικό χρόνο (Real – Time PCR) αποτελεί τη τελευταία πειραματική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα διπλωματική εργασία, προκειμένου να βρεθεί η ποσοτική έκφραση των γονιδίων Per1 και Per2 στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων επίμυων.

Η Real – Time PCR, γνωστή επίσης και ως ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR, quantitative PCR), είναι μια εργαστηριακή τεχνική που βασίζεται στην κλασική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Παρακολουθεί σε πραγματικό χρόνο την ενίσχυση ενός σημασμένου μορίου DNA, κατά τη διάρκεια της PCR. Η τεχνική αυτή είναι πολύ ταχύτερη από τις άλλες τεχνικές PCR, αφού παρέχει πληροφορία καθώς η ενίσχυση βρίσκεται σε εξέλιξη. Έτσι, η ενίσχυση του DNA στόχου και η ανίχνευση του προϊόντος γίνονται ταυτόχρονα, καθώς το προϊόν που παράγεται είναι συνδεδεμένο με φθορίζουσα χρωστική, της οποίας το σήμα ανιχνεύεται από το οπτικό σύστημα του ειδικού κυκλοποιητή που χρησιμοποιείται στη Real – Time PCR.

Οι δύο πιο κοινές μέθοδοι για τον εντοπισμό των προϊόντων PCR στη Real – Time PCR είναι:

1. Η μη ειδική Real – Time PCR, κατά την οποία μια χρωστική, που έχει την ιδιότητα να συνδέεται σε μόρια DNA, προσδένεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA προκαλώντας τον φθορισμό της. Έτσι, καθώς προχωρά η αντίδραση και αυξάνεται το προϊόν της PCR, αυξάνεται και η ένταση του φθορισμού που μετράται σε κάθε κύκλο. Το μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι η χρωστική δεν είναι ειδική για τα τμήματα DNA που μας ενδιαφέρουν, με αποτέλεσμα συχνά να συνδέεται και σε άλλα δίκλινα μόρια DNA (όπως τα διμερή των εκκινητών), αποτρέποντας έτσι δυνητικά την ακριβή παρακολούθηση της επιθυμητής αλληλουχίας.
2. Η ειδική Real – Time PCR, κατά την οποία χρησιμοποιούνται ειδικοί φθορίζοντες εκκινητές (probes), οι οποίοι ανιχνεύουν μόνο το DNA που περιέχει την αλληλουχία συμπληρωματική προς τον ανιχνευτή. Έτσι, η χρήση των ειδικών ανιχνευτών αυξάνει σημαντικά την εξειδίκευση και καθιστά δυνατή την εκτέλεση

της τεχνικής ακόμη και παρουσία άλλου δίκλωνου μορίου DNA. Χρησιμοποιώντας ετικέτες διαφορετικού χρώματος, οι φθορίζοντες ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πολλαπλές αναλύσεις για την παρακολούθηση πολλών ακολουθιών στόχων στο ίδιο διάλυμα. Η εξειδίκευση αυτή, αποτρέπει επίσης τα λανθασμένα αποτελέσματα λόγω των διμερών των εκκινητών, τα οποία είναι ανεπιθύμητα υποπροϊόντα στην αντίδραση της PCR.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ειδικής Real – Time PCR. Πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του μηχανήματος Light Cyclor 480 Real-Time PCR Instrument, της εταιρίας Roche και πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε είναι το εξής:

Σε ένα Eppendorf των 1,5 mL προετοιμάζουμε το master mix της αντίδρασης προσθέτοντας τα παρακάτω αντιδραστήρια:

Αντιδραστήρια	μl
One Step Reaction Mix	10
F - Primer	0,8
R - Primer	0,8
Probe 1	0,4
Probe 2	0,4
Nuclease-free Water	2,6
Δείγμα cDNA	0,5

Οι ποσότητες αυτές αντιστοιχούν σε ένα δείγμα cRNA. Για παράδειγμα αν θέλουμε να ενισχύσουμε 5 δείγματα cDNA, στο eppendorf των 1,5 mL προσθέτουμε τις παραπάνω ποσότητες επί 6.

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

Στη συνέχεια, σε διαφορετικές θέσεις της μικροπλακέτας τοποθετούνται 20 μl από διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο και για ένα μόνο γονίδιο τη φορά. Έπειτα, η μικροπλακέτα φυγοκεντρείται για 1min στις 1000rpm και τέλος τοποθετείται στο μηχάνημα προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση.

Οι αλληλουχίες των ανιχνευτών και εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των γονιδίων Per1 και Per2 είναι οι εξής:

### *Per1*

Primers / Probes	Αλληλουχία
Per1 F	5' – gTACATTCAAAGCCAAAgTCCTTC
Per1 R	5' – TTgCTgACCGACggATCTTTC
Per1 S	5' – ACCCCgAACTggAggTg
Per1 A	5' – ACgACggATCTTTCTTggC
Per1 FL	5' – TTACgCTTggTTgTACTgggAATgTT -- FL
Per1 LC	5' – LC640 – CAgCTCTCCAAATACCTgAggATgCTg -- PH

### *Per2*

Primers / Probes	Αλληλουχία
Per2 F	5' – CTgggAAgATCCTgTACATCTCTAAC
Per2 R	5' - gggCTggTAgCgAATCTCATT
Per2 S	5' – CAAgTggCCTCCATCTTTTAC
Per2 A	5' – TgACACggCAgAAAAAATTT
Per2 FL	5' – gTggAgTTCCTggCTCCTCATgAC -- FL
Per2 LC	5' – LC640 – TCAgTgTgTTCCACAgCTACACCACCC -- PH

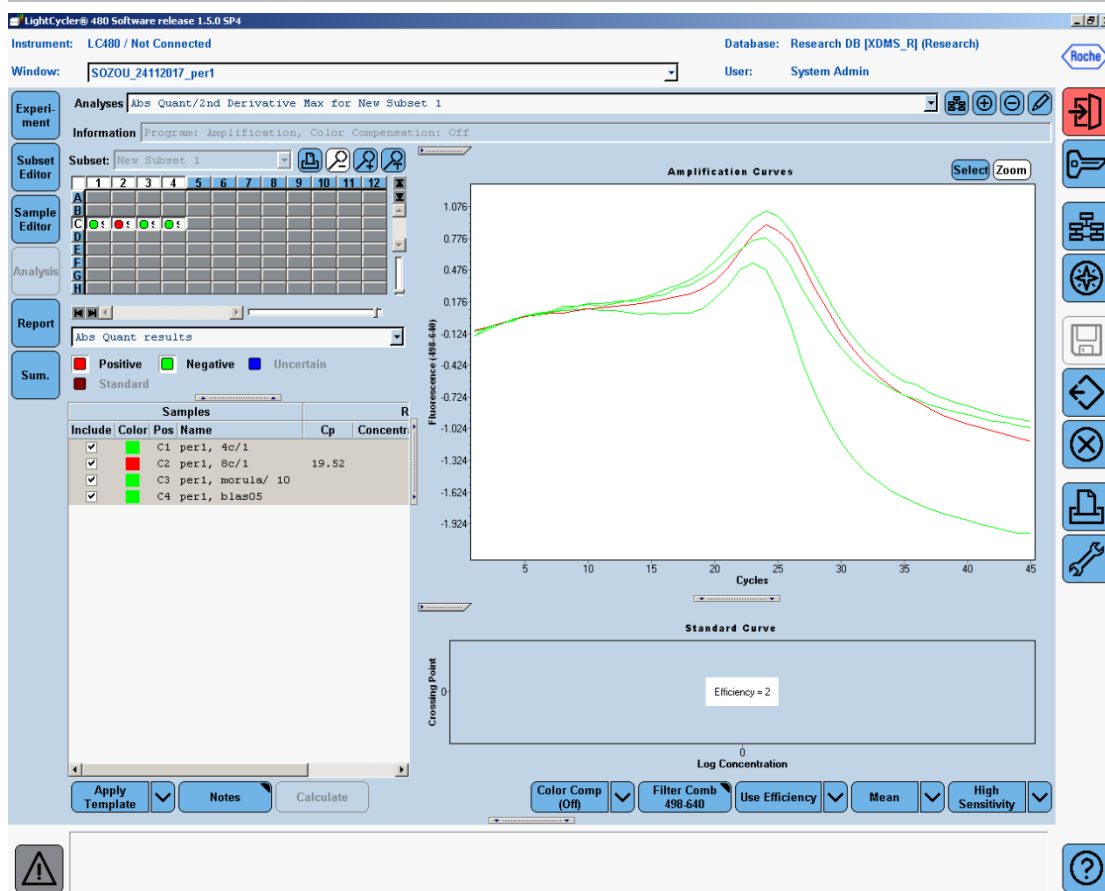
# Κεφάλαιο 5

## 5.1. Αποτελέσματα

Στη παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η έκφραση των κικκάδιων γονιδίων Per1 και Per2 στα αναπτυξιακά στάδια του προ - εμφυτευτικού εμβρύου επίμυων, έως και το στάδιο της βλαστοκύστης. Απομονώθηκαν συνολικά 43 έμβρυα από τις σάλπιγγες 12 θηλυκών ποντικών.

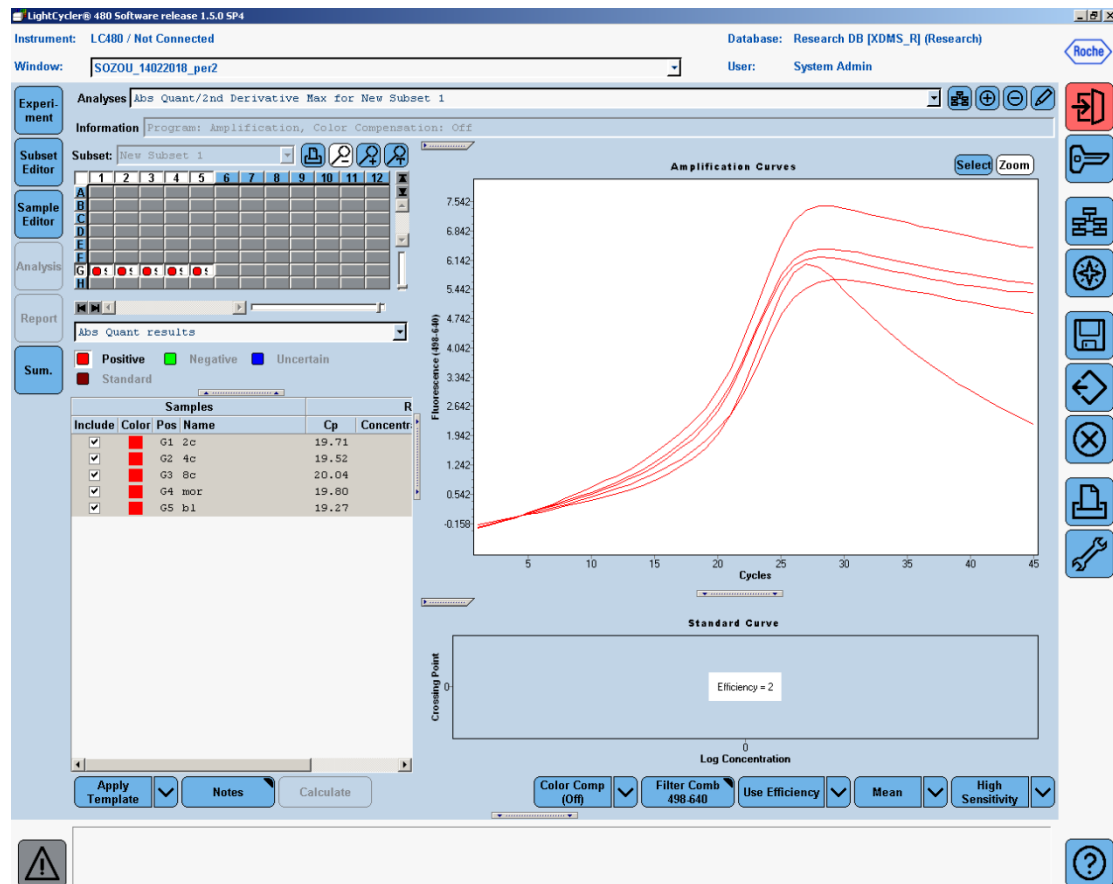
Με την εφαρμογή των πειραματικών τεχνικών και πρωτοκόλλων που αναλύθηκαν παραπάνω, προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα:

	Στάδιο 2 κυττάρων	Στάδιο 4 κυττάρων	Στάδιο 8 κυττάρων	Στάδιο morula	Στάδιο blastocyst
Per1	αρνητικό	αρνητικό	Cp = 19,52	αρνητικό	αρνητικό
Per2	Cp = 19,71	Cp = 19,52	Cp = 20,04	Cp = 19,80	Cp = 19,27



Εικόνα 5.1.1.

Η εικόνα 5.1.1. αναπαριστά τα αποτελέσματα για το γονίδιο Per1, όπως αυτά φαίνονται μετά το πέρας του πειράματος της Real – Time PCR, στο λογισμικό του LightCycler480. Η κόκκινη καμπύλη δείχνει την έκφραση του γονιδίου στο στάδιο των 8 κυττάρων.



Εικόνα 5.1.2.

Η εικόνα 5.1.2. αναπαριστά αντίστοιχα τα αποτελέσματα για το γονίδιο Per2. Και εδώ, οι κόκκινες καμπύλες δείχνουν την έκφραση του γονιδίου σε όλα αναπτυξιακά στάδια.

## 5.2. Συζήτηση

Στα θηλαστικά, όπως και σε άλλα ζωντανά συστήματα, υπάρχει ένα ακριβές εσωτερικό βιολογικό ρολόι, το οποίο ρυθμίζει διάφορες συνιστώσες της φυσιολογίας, της βιοχημείας και της συμπεριφοράς του εκάστοτε οργανισμού. Πρόκειται για τους κιρκάδιους ρυθμούς, που είναι αυτοσυντηρούμενοι, σχεδόν 24ωροι και ρυθμίζονται ανάλογα με τον κύκλο φωτός – σκοταδιού.

Τα εργαλεία που καθορίζουν αυτή τη κιρκάδια ρυθμικότητα, είναι τα κιρκάδια γονίδια. Συγκεκριμένα, τα γονίδια Clock, Per1, Per2, Per3, Cry1, Cry2, Bmal1/Mop3, Bmal2/Mop9, Npas2/Mop4, Tim, CK1ε και Rev-Erba, δρουν ως μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζοντας πολλά φαινόμενα, όπως για παράδειγμα ο ύπνος. Από τα παραπάνω γονίδια τα Clock και Bmal1, αφορούν παράγοντες που επάγουν τη μεταγραφή, ενώ τα Cry1, Cry2, Per1, Per2, Per3 παράγοντες που τη καταστέλλουν.

Οι μοριακός μηχανισμός των κιρκάδιων ρυθμών έχει ως αφετηρία τη σύνδεση του συμπλόκου των πρωτεϊνών CLOCK και BMAL1 σε ένα E – Box. Η σύνδεση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μεταγραφή των γονιδίων Per και Cry. Κατά την εξέλιξη της μέρας οι πρωτεΐνες PER και CRY που έχουν προκύψει, ενώνονται και δημιουργούν ένα σύμπλοκο το οποίο ρυθμίζει αρνητικά τη μεταγραφική δραστηριότητα του συμπλέγματος BMAL1/CLOCK. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των επιπέδων mRNA των Per και Cry και κατ' επέκταση των πρωτεϊνών PER και CRY. Τελικά, ξεκινά εκ νέου η μεταγραφική δραστηριότητα των μεταγραφικών ενεργοποιητών BMAL1 και CLOCK κι έτσι ο κύκλος ξεκινά από την αρχή.

Το αντικείμενο μελέτης της παρούσης διπλωματικής εργασίας είναι η αναζήτηση της έκφρασης των κιρκάδιων γονιδίων Per1 και Per2 σε προεμφυτευτικά στάδια εμβρύου ποντικού, έως του σταδίου της βλαστοκύστης. Τόσο τα γονίδια που μελετήθηκαν στην εργασία, όσο και το σύνολο των κιρκάδιων γονιδίων, παίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε πληθώρα φυσιολογικών μηχανισμών. Έτσι παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ο ρόλος τους στην αναπαραγωγή.

Σκοπός, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι να διαπιστώσουμε αν τα κικκάδια γονίδια συμμετέχουν με κάποιο τρόπο στην εμβρυική διαίρεση ή αν η δράση τους ξεκινά αργότερα, μετά τη δημιουργία του υπερχιασματικού πυρήνα.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δείχνουν, για το γονίδιο **Per1**, έκφραση μόνο στο στάδιο των 8 κυττάρων και σε κανένα άλλο αναπτυξιακό στάδιο. Αντίθετα, για το **Per2** βρέθηκε έκφραση σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια (στάδιο 2 κυττάρων – στάδιο βλαστοκύστης).

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν συμφωνούν πλήρως με τα αποτελέσματα άλλων ανάλογων μελετών. Συγκεκριμένα:

- Όσον αφορά το Per1, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε έμβρυα ποντικών (Amano et al., 2009) βρέθηκε ότι η ποσότητα των μεταγράφων του είναι σταθερή σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, ενώ υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά στις ποσότητες των μεταγράφων του Per1 μεταξύ των εμβρύων 6 και 90 ωρών μετά τη γονιμοποίηση.

Από την άλλη πλευρά, σε μελέτη σε ανθρώπινα έμβρυα (Ann. Kiessling et al., 2009) βρέθηκε ότι υπάρχει μια μικρή έκφραση του Per1 στο στάδιο των 8 κυττάρων, όπως βρέθηκε και στη δική μας μελέτη με έμβρυα επίμυων. Είναι πιθανό η έκφραση αυτή να μην εμπλέκεται με κικκάδιους ρυθμούς αλλά να συμβάλλει στη κυτταρική διαίρεση. Το γεγονός ότι η έκφραση σταματά στο στάδιο αυτό και δεν συνεχίζεται στα στάδια των morula και blastocyst, δεν μπορεί προς το παρόν να ερμηνευτεί με κάποιο τρόπο και χρήζει επιπλέον διερεύνησης.

- Όσον αφορά το Per2, το γεγονός ότι στη δική μας μελέτη υπήρχε έκφραση σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, είναι κάτι που δεν συνάδει με τα αποτελέσματα κάποιας έως τώρα δημοσιευμένης μελέτης. Στην μελέτη των Amano et al. (σε έμβρυα ποντικών) δεν βρέθηκε έκφραση του Per2 σε κανένα προεμφυτευτικό στάδιο. Παράλληλα, στη μελέτη των Ann. Kiessling et al., που αναφέρθηκε και για το Per1, έχει βρεθεί μια μικρή έκφραση του Per2 στο στάδιο των 8 κυττάρων, όμως υπήρχε διαφορά στην έκφραση της πρώτης και δεύτερης σειράς δειγμάτων. Συνεπώς και αυτή η περίπτωση πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.



Σύμφωνα με τη μελέτη των Amano et al. ο μειωμένος ή μηδενικός αριθμός μεταγράφων των γονιδίων Per1 και Per2, στα έμβρυα που βρίσκονται στα στάδια 1 έως 4 κυττάρων, μπορεί να εξηγηθεί. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι οι πρωτεΐνες BMAL1 και CLOCK εντοπίζονται στον πυρήνα των εμβρύων που βρίσκονται στα στάδια 1 έως 4 κυττάρων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το σύμπλοκο BMAL1/CLOCK αναστέλλεται από τις πρωτεΐνες PER, μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι τα μετάγραφα των Per γονιδίων είναι λογικό να εντοπίζονται σε μειωμένα επίπεδα στα στάδια αυτά.

Παράλληλα, η μηδενική ή μειωμένη έκφραση των κικκάδιων γονιδίων Per1 και Per2 είναι πιθανό να οφείλεται στη δράση σε αυτά των miRNAs (Cheng et al. 2007). Τα miRNAs είναι μικρά μη κωδικοποιούντα μονόκλιωνα μόρια RNA, μεγέθους 19-25 νουκλεοτιδίων τα οποία συμμετέχουν στην μεταμεταφραστική ρύθμιση των γονιδίων και έχουν ως στόχους συγκεκριμένα μόρια mRNA. Έτσι, σύμφωνα με τη μελέτη των Cheng et al. είναι δυνατόν τα miRNAs να επιδρούν στα κικκάδια γονίδια και να προκαλούν αναστολή της έκφρασής τους.

Ένας ακόμη πιθανός λόγος που δεν υπάρχει σημαντική έκφραση των κικκάδιων γονιδίων στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, είναι η μεθυλίωση. Η μεθυλίωση του DNA προκαλεί αντικατάσταση ενός υδρογόνου από μια μεθυλομάδα στις βάσεις κυτοσίνη και αδενίνη. Συνεπώς, πιθανή μεθυλίωση στα κικκάδια γονίδια, αναστέλλει την έκφρασή τους.

Παρά, λοιπόν, το γεγονός ότι τα μετάγραφα ορισμένων κικκάδιων γονιδίων καθώς και των παραγόμενων από αυτά πρωτεϊνών, είναι παρόντα σε μερικά στάδια ανάπτυξης των προεμφυτευτικών εμβρύων, δεν φαίνεται να εμπλέκονται στη ρύθμιση του κικκάδιου μηχανισμού, αλλά εμπλέκονται πιθανά στη μείωση (Amano et al., 2009). Συνεπώς, η ύπαρξη των μεταγράφων δεν επιβεβαιώνει αυτόματα την ύπαρξη κικκάδιου εικοσιτετράωρου ρυθμού στα προεμφυτευτικά έμβρυα.

Η εξακρίβωση της συσχέτισης της έκφρασης των κικκάδιων γονιδίων με την εμβρυική ανάπτυξη παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η έκφραση των κικκάδιων γονιδίων επηρεάζει πληθώρα μηχανισμών, μέσω ορμονικών και νευρικών οδών, συμπεριλαμβανομένων και αυτών της αναπαραγωγής.

Όσον αφορά τις διάφορες αναπαραγωγικές διεργασίες, έχει αποδειχτεί σε πειραματόζωα η άμεση επίδραση σε αυτές της κερκάδιας ρυθμικότητας. Μένει, λοιπόν, να διασαφηνιστεί πλήρως και πως οι ρυθμοί αυτοί επηρεάζουν την εμβρυική διαίρεση και ανάπτυξη. Πιθανά οι γνώσεις αυτές να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τις μεθόδους της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, με σκοπό την επίτευξη της κύησης και την ομαλή έκβασή της.

### 5.3. Σύνοψη

- ❖ Οι διάφορες συνιστώσες της φυσιολογίας, της βιοχημείας και της συμπεριφοράς των οργανισμών ρυθμίζονται από εσωτερικά συστήματα, τα οποία επηρεάζονται από ερεθίσματα του περιβάλλοντος, όπως το φως και το σκοτάδι.
- ❖ Το κirkάδιο ρολόι είναι ένα ακριβές εσωτερικό βιολογικό ρολόι το οποίο συγχρονίζει καθημερινά γεγονότα.
- ❖ Οι κirkάδιοι ρυθμοί είναι αυτοσυντηρούμενοι, σχεδόν 24ωροι και ρυθμίζονται ανάλογα με τον κύκλο φωτός – σκοταδιού.
- ❖ ο κύριος βηματοδότης που είναι υπεύθυνος για τη παραγωγή των κirkάδιων ρυθμών στα θηλαστικά είναι ο υπερχιασματικός πυρήνας (SCN).
- ❖ Η «μηχανή» του κirkάδιου μηχανισμού είναι τα κirkάδια γονίδια.
- ❖ Οι κirkάδιοι ρυθμοί εμπλέκονται μεταξύ άλλων και στη ρύθμιση της λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος.
- ❖ Αναζήτηση της έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων Per1 και Per2 σε έμβρυα επίμυων ως του σταδίου της βλαστοκύστης.
- ❖ Απομόνωση των εμβρύων επίμυων στα στάδια 2, 4, 8 κυττάρων, morula και βλαστοκύστης.
- ❖ Απομόνωση του mRNA και παρασκευή cDNA από τα προεμφυτευτικά στάδια.
- ❖ Μελέτη της έκφρασης των κirkάδιων γονιδίων Per1 και Per2 με Real - Time PCR.
- ❖ Εντοπισμός του γονιδίου Per1 στο στάδιο των 8 κυττάρων.
- ❖ Εντοπισμός του γονιδίου Per2 σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, χωρίς διακυμάνσεις.
- ❖ Η παρουσία μεταγράφων του Per1 στο στάδιο των 8 κυττάρων δεν αποδεικνύει την ύπαρξη κirkάδιας ρυθμικότητας στο στάδιο αυτό, καθώς πιθανά σχετίζεται με τη κυτταρική διαίρεση.
- ❖ Η παρουσία μεταγράφων του Per2 σε όλα τα προεμφυτευτικά στάδια δεν μπορεί να εξηγηθεί.
- ❖ Οι γνώσεις που αφορούν τη συσχέτιση των κirkάδιων ρυθμών με την αναπαραγωγή, πιθανά να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

"Entrez Gene: PER2 period homolog 2 (Drosophila)".

"OMIM Entry - \* 603426 - PERIOD, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 2; PER2".  
www.omim.org. Retrieved 2015-04-20.

Abnormal morphology of bovine spermatozoa [1989] Barth, A.D. Oko, R.J.

Alberio, R., Zakhartchenko, V., Motlik, J. & Wolf, E. (2001) Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implication for nuclear transfer

Amano, T., Matsushita, A., Hatanaka, Y., Watanabe, T., Oishi, K., Ishida, N., ... & Saeki, K. (2009). Expression and functional analyses of circadian genes in mouse oocytes and preimplantation embryos: Cry1 is involved in the meiotic process independently of circadian clock regulation. *Biology of reproduction*, 80(3), 473-483.

Arendt J. Melatonin and the mammalian pineal gland. London: Chapman and Hall, 1995.

Asher G, Gatfield D, Stratmann M, Reinke H, Dibner C, et al. 2008. SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134:317–28

Asher G, Reinke H, Altmeyer M, Gutierrez-Arcelus M, Hottiger MO, Schibler U. 2010. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 participates in the phase entrainment of circadian clocks to feeding. *Cell* 142:943–53

Austin, C. R., and Short, R. V., eds., 1983, *Reproduction in Mammals: 1. Germ Cells and Fertilization*, Vol. I,

Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, et al. 2000. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289:2344–47

Balsalobre A, Damiola F, Schibler U. 1998. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* 93:929–37

Barkley MS, Bradford GE, Geschwind H . The pattern of plasma prolactin concentration during the first half of mouse gestation. *Biol Reprod* 1978;19(2):291–296.

Bass J, Takahashi JS. 2010. Circadian integration of metabolism and energetics. *Science* 330:1349–54

Bellvé, A. R., Cavicchia, J. C., Millette, C. F., O'Brien, D. A., Bhatnagar, Y. M., and Dym, M. (1977).

Benegiamo G, Mazzoccoli G, Cappello F, Rappa F, Scibetta N, Oben J, Greco A, Williams R, Andriulli A, Vinciguerra M, Paziienza V (2013). "Mutual antagonism between circadian protein period 2 and hepatitis C virus replication in hepatocytes". *PLOS ONE*. 8(4): e60527. doi:10.1371/journal.pone.0060527. PMC 3620463 . PMID 23593233.

Biggers, I. D., and Schuetz, A. W., eds., 1972, *Oogenesis*, University Park Press, Baltimore.

Bleil, I. D., and Wassarman, P. M., 1988, Galactose at the nonreducing terminus of O-linked oligosaccharides of mouse egg zona pellucida glycoprotein ZP3 is essential for the glycoprotein's sperm receptor activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:6778-6782.

Bleil, I. D., and Wassarman, P. M., 1980a, Structure and function of the zona pellucida: Identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida, *Dev. Biol.* 76:185-203.

Bleil, I. D., and Wassarman, P. M., 1980b, Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm, *Cell* 20:873-882.

Bleil, I. D., and Wassarman, P.M., 1983, Sperm-egg interactions in the mouse: Sequence of events and induction of the acrosome reaction by a zona pellucida glycoprotein, *Dev. Biol.* 95:317-324.

Bleil, I. D., Beall, C. E, and Wassarman, P.M., 1981, Mammalian sperm-egg interaction: Fertilization of mouse eggs triggers modification of the major zona pellucida glycoprotein, *Dev. Biol.* 86:189-197.

Bleil, I. D., Greve, I. M., and Wassarman, P.M., 1988, Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: Role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm, *Dev. Biol.* 128:376-385.

Bleil, J. D., and Wassarman, P. M., 1986, Autoradiographic visualization of the mouse egg's sperm receptor bound to sperm, *J Cell Biol.* 102:1363-1371.

Bristol-Gould SK, Kreeger PK, Selkirk CG, Kilen SM, Mayo KE, Shea LD, et al. Fate of the initial follicle pool: empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Dev Biol* 2006;298(1):149–154.

Bronson FH, Dagg CP, Snell GD. *Reproduction*. New York: Dover Publications, Inc.; 1966.

Brown SA, Zimbrunn G, Fleury-Olela F, Preitner N, Schibler U. 2002. Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. *Curr. Biol.* 12:1574–83

Buhr ED, Takahashi JS (2013). "Molecular components of the Mammalian circadian clock". *Handbook of Experimental Pharmacology* (217): 3–27. doi:10.1007/978-3-642-25950-0\_1. PMC 3762864 . PMID 23604473.

Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS. 2010. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. *Science* 330:379–85

Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, Feenstra MG, Ter Horst GJ, et al. 1999. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur. J. Neurosci.*

Burlti, K., 1986, *Experimental Embryology of the Mouse*, S. Karger, Basel.

Bustin, SA (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays". *J Mol Endocrinol.* 25 (2): 169–93. doi:10.1677/jme.0.0250169. PMID 11013345.

Cailotto C, La Fleur SE, Van Heijningen C, Wortel J, Kalsbeek A, et al. 2005. The suprachiasmatic nucleus controls the daily variation of plasma glucose via the autonomic output to the liver: Are the clock genes involved? *Eur. J. Neurosci.* 22:2531–40

Cailotto C, Lei J, van der Vliet J, van Heijningen C, van Eden CG, et al. 2009. Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver.

Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci* 2009:(editorial board, Jacqueline N Crawley [et al]. Appendix 4: Appendix 4I). Cambridge University Press, Cambridge.

#### Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals

Circadian gating of neuronal functionality: a basis for iterative metaplasticity  
Rajashekar Iyer, Tongfei A. Wang and Martha U. Gillette Department of Cell and Developmental Biology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

Circadian rhythms and reproduction, Michael J Boden and David J Kennaway, Research Centre for Reproductive Health, Discipline of Obstetrics and Gynaecology, School of Paediatrics and Reproductive Health, University of Adelaide, Adelaide, South Australia 5005, Australia

Czeisler CA, Kronauer RE, Allan JS, Duffy JF, Jewett ME, Brown EN, et al. Bright light induction of strong (Type O) resetting of the human circadian pacemaker. *Science* 1989; 244:1328-1333.

Czeisler CA, Richardson GS, Zimmerman JC, Moore-Ede MC, Weitzman ED. Entrainment of human circadian rhythms by light-dark cycles: a reassessment. *Photochem Photobiol* 1981; 34:239-247.

Czeisler CA. The effect of light on the human circadian pacemaker. *CIBA Found Symp* 1995; 183:254-90; discussion 290-302.

Daniel, I. C., ed., 1971, *Methods in Mammalian Embryology*, Vol. 1, Academic Press, New York.

Daniel, I. C., ed., 1978, *Methods in Mammalian Embryology*, Vol. 2, Academic Press, New York.

Dean, J. (2004) Reassessing the molecular biology of sperm – egg recognition with mouse genetics. Department of Molecular and Integrative Physiology, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, IL, USA

Dietl, I., ed., 1989, *The Mammalian Egg Coat: Structure and Function*, Springer-Verlag, Berlin.

Ducibella, T., 1990, Mammalian egg cortical granules and the cortical reaction, in: *Elements of Mammalian*

Dunlap JC, Sunderland JJ. *Chronobiology: biological timekeeping*. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004.

Eckle T, Hartmann K, Bonney S, Reithel S, Mittelbronn M, Walker LA, Lowes BD, Han J, Borchers CH, Buttrick PM, Kominsky DJ, Colgan SP, Eltzschig HK (May 2012). "Adora2b-elicited Per2 stabilization promotes a HIF-dependent metabolic switch crucial for myocardial adaptation to ischemia". *Nature Medicine*. 18 (5): 774–82. doi:10.1038/nm.2728. PMID 22504483. Lay summary – Medical Daily.

Edwards RG, Fowler RE, Gore-Langton RE, Gosden RG, Jones EC, Readhead C, et al. Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. *J Reprod Fertil* 1977;51(1):237–263.

Elder K. and Dale B. *In Vitro Fertilization*. Second Edition. (2000)

Elyse; Houde, Alain (2002). "La PCR en temps réel: principes et applications" (PDF). *Reviews in Biology and Biotechnology*. 2 (2): 2–11. Archived from the original (PDF) on 2009-06-12.

Erskine MS. Prolactin release after mating and genitosensory stimulation in females. *Endocr Rev* 1995;16(4):508–528.

*Essential Developmental Biology*, 2nd Edition. Jonathan M. W. Slack (2009)



Evidence that human blastomere cleavage is under unique cell cycle control Ann A. Kiessling & Ritsa Bletsas & Bryan Desmarais & Christina Mara & Kostas Kallianidis & Dimitris Loutradis

fastbleep, (2017). Copyright information. [online] Available at: <https://www.fastbleep.com/biology-notes/32/865> [Accessed 12/10/2017].

Fertilization Vol. I, (P. M. Wassarman, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 205-232.

Filion, M. (2012). Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology Caister Academic Press. ISBN 978-1-908230-01-0

Florman, H. M., and Storey, B. T., 1982, Mouse gamete interactions: The zona pellucida is the site of the acrosome reaction leading to fertilization in vitro, Dev. Biol. 91:121-130.

Florman, H. M., and Wassarman, P. M., 1985, O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity, Cell 41:313-324.

Florman, H. M., Bechtol, K. B., and Wassarman, P.M., 1984, Enzymatic dissection of the functions of the mouse egg's receptor for sperm, Dev. Biol. 106:243-255.

Freissmuth, M., Casey, P. J., and Gilman, A. G., 1989, G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling, FASEB J 3:2125-2131.

Gaddum-Rosse, P., 1985, Mammalian gamete interactions: What can be gained from observations on living eggs? Am. J Anat. 174:347-356.

Gaddum-Rosse, P., Blandau, R.I., Langley, L. B., and Sato, K., 1982, Sperm tail entry into the mouse egg in vitro, Gamete Res. 6:215-223.

Griffin EA, Staknis D, Weitz CJ (Oct 1999). "Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock". Science. 286 (5440): 768–71. doi:10.1126/science.286.5440.768. PMID 10531061.

Gulyas, B., 1980, Cortical granules of mammalian eggs, Int. Rev. Cytol. 63:357-392.

Guraya, S. S., 1982, Recent progress in the structure, origin, composition, and function of cortical granules in animal eggs, *Int. Rev. Cytol.* 78:257-282.

Gwatkin, R. B. L., 1977, *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals*, Plenum Press, New York.

Hartmann, I. E, ed., 1983, *Mechanism and Control of Animal Fertilization*, Academic Press, New York.

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences". *Bio-Technology.* 10 (4): 413–417. doi:10.1038/nbt0492-413. PMID 1368485.

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993). "Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions". *Biotechnology.* 11: 1026–1030. doi:10.1038/nbt0993-1026.

Hogan, B., Costantini, E, and Lacy, E., 1986, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Holland, P.M.; Abramson, R.D.; Watson, R.; Gelfand, D.H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 (16): 7276–7280. doi:10.1073/pnas.88.16.7276. JSTOR 2357665. PMC 52277 Freely accessible. PMID 1871133.

Jones, R., ed., 1978, *The Vertebrate Ovary*, Plenum Press, New York.

Jump up to: a b c GRCm38: Ensembl release 89: ENSMUSG00000055866 - Ensembl, May 2017

Jungnickel, M.K. , Sutton, K.A. & Florman, H.M. (2003) Cell adhesion and fertilization: steps in oocyte transport , sperm – zona pellucida interactions, and sperm egg fusion.

Kerr JB, Duckett R, Myers M, Britt KL, Mladenovska T, Findlay JK. Quantification of healthy follicles in the neonatal and adult mouse ovary: evidence for maintenance of primordial follicle supply. *Reproduction* 2006;132(1):95–109.

Khalsa SS, Jewett ME, Cajochen C, Czeisler CA. A phase response curve to single bright light pulses in human subjects. *J Physiol* 2003; 549.3:945-952. Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB.

Klein DC, Moore RY, Reppert SM. In: *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. New York: Oxford UP, 1991.

Knippschild U, Krüger M, Richter J, Xu P, García-Reyes B, Peifer C, Halekotte J, Bakulev V, Bischof J (2014). "The CK1 Family: Contribution to Cellular Stress Response and Its Role in Carcinogenesis". *Frontiers in Oncology*. 4: 96. doi:10.3389/fonc.2014.00096. PMC 4032983 . PMID 24904820.

Knobil, E., and Neill, I. D., eds., 1988, *The Physiology of Reproduction*, Vols. I and 2, Raven Press, New York.

Ko CH, Takahashi JS (Oct 2006). "Molecular components of the mammalian circadian clock". *Human Molecular Genetics*. 15 Spec No 2 (suppl 2): R271–R277. doi:10.1093/hmg/ddl207. PMID 16987893.

Kopf, G. S., and Gerton, G. L., 1990, *The mammalian sperm acrosome and the acrosome reaction*, in: *Elements of Mammalian Fertilization Vol. I* (P. M. Wassarman, ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 153-204.

Kubista, M; Andrade, JM; Bengtsson, M; Forootan, A; Jonak, J; Lind, K; Sindelka, R; Sjoback, R; Sjogreen, B; Strombom, L; Stahlberg, A; Zoric, N (2006). "The real-time polymerase chain reaction". *Mol Aspects Med*. 27 (2-3): 95–125. doi:10.1016/j.mam.2005.12.007. PMID 16460794.

Leyton, L. and Saling, P., 1989, Evidence that aggregation of mouse sperm receptors by ZP3 triggers the acrosome reaction, *J Cell Biol*. 108:2163-2168.

Liu B, Xu K, Jiang Y, Li X (2014-10-15). "Aberrant expression of Per1, Per2 and Per3 and their prognostic relevance in non-small cell lung cancer". *International Journal of*

Clinical and Experimental Pathology. 7 (11): 7863–7871. PMC 4270614 . PMID 25550826.

Lockley SW, Skene DJ, Buttlar LJ, Arendt J. Sleep and activity rhythms are related to circadian phase in the blind. *Sleep* 1999; 22:616-623.

Logan J, Edwards K, Saunders N (editors) (2009). *Real-Time PCR: Current Technology and Applications*. Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-39-4.

Longo, E I., 1985, Fine structure of the mammalian egg cortex, *Am. J Anat.* 174:303-316.

Mammalian sperm development in vivo and in vitro. In *Elements of Mammalian Fertilization*, Vol. 1, Wassarman, P. M., eds. (CRC Press, Boston), pp. 1-28.

Mastroianni, L., and Biggers, I. D., eds., 1981, *Fertilization and Embryonic Development*, Plenum Press, New York.

Mednick DL, Barkley MS, Geschwind H . Regulation of progesterone secretion by LH and prolactin during the first half of pregnancy in the mouse. *J Reprod Fertil* 1980;60(1):201–207.

Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci* 2001; 4:1165.

Metz, C. B., and Monroy, A., eds., 1985, *Biology of Fertilization*, Vols. 1-3, Academic Press, New York.

microRNA Modulation of Circadian-Clock Period and Entrainment

Author links open overlay panel Hai-Ying M.Cheng<sup>1</sup> Joseph W.Papp<sup>1</sup> Olga Varlamova<sup>2</sup> Heather Dziema<sup>1</sup> Brandon Russell<sup>1</sup> John P.Curfman<sup>1</sup> Takanobu Nakazawa<sup>3</sup> Kimiko Shimizu<sup>4</sup> Hitoshi Okamura<sup>5</sup> Soren Impey<sup>2</sup> Karlo brietan

Miyazaki K, Mesaki M, Ishida N (Oct 2001). "Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein". *Molecular and Cellular Biology*. 21 (19): 6651–9. doi:10.1128/MCB.21.19.6651-6659.2001. PMC 99810 . PMID 11533252.

Moller, C. C., and Wassarman, P. M., 1989, Characterization of a proteinase that cleaves zona pellucida glycoprotein ZP2 following activation of mouse eggs, *Dev. Biol.* 103:103-112.

Moore RY, Eichler VB. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* 1972; 42:201-206.

Moore RY, Silver R. Suprachiasmatic nucleus organization. *Chronobiol Int* 1998; 15:475-487.

Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction* 2004;127(5):569–580.

Nebel, B. R., Amarose, A. P., and Hackett, E. M. (1961).

Njus D, McMurry L, Hastings JW. Conditionality of circadian rhythmicity: synergistic action of light and temperature. *J Comp Physiol* 1977; 117:335-344.

Pedersen T. Follicle kinetics in the ovary of the cyclic mouse. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1970;64(2):304–323.

QIAGEN official website

Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. Follicular development: mouse, sheep, and human models. *Knobil and Neils's – Physiology of Reproduction* 2006;1(3):383–423.  
Regulation of zygotic gene activation in the mouse. Richard M. Schultz (1993)

Reppert SM, Weaver DR (Aug 2002). "Coordination of circadian timing in mammals". *Nature*. 418 (6901): 935–941. doi:10.1038/nature00965. PMID 12198538.

Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994;15(6):725–751.

Roenneberg T, Morse D. Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 1993; 362:362-364.

Roger Highfield (2008-06-06). "Swab test to tell if you're a late sleeper or early riser". Telegraph. Retrieved 2008-06-07.

Runft, L.L., Jaffe, L.A. & Melhmann, L. M. (2002) Egg activation at fertilization: where it all begins.

Sarraj MA, Drummond AE. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction* 2012;143(2):151–163.

Saunders , C.M., Larman, M.G., Parrington, J et al. (2002) PLC $\zeta$ : a sperm specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development.

Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Reppert SM (Dec 1997). "Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei". *Neuron*. 19 (6): 1261–9. doi:10.1016/S0896-6273(00)80417-1. PMID 9427249.

Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Reppert SM (Dec 1997). "Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei". *Neuron*. 19 (6): 1261–1269. doi:10.1016/s0896-6273(00)80417-1. PMID 9427249.

So AY, Bernal TU, Pillsbury ML, Yamamoto KR, Feldman BJ (Oct 2009). "Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106 (41): 17582–7. doi:10.1073/pnas.0909733106. PMC 2757402 . PMID 19805059.

Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74: 68-85.

Stephan FK, Zucker I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972; 69:1583-1586. Wright Jr PK, Hughes RJ, Kronauer RE, Dijk D-J, Czeisler

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL (Oct 2008). "The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease".

Nature Reviews Genetics. 9 (10): 764–775. doi:10.1038/nrg2430. PMC 3758473 . PMID 18802415.

Takehashi M, Kanatsu-Shinohara M, Shinohara T. Generation of genetically modified animals using spermatogonial stem cells. Dev Growth Differ 2010;52(3):303–310.

The circadian timing system and reproduction in mammals Bruce D. Goldman\*  
Department of Physiology and Neurobiology, University of Connecticut, U-154, Storrs, CT 06269, USA

The house mouse. Atlas of embryonic development. Karl Theiler. Springer – Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo (1989)

Tilmann C, Capel B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. Recent Prog Horm Res 2002;57:1–18.

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptáček LJ, Fu YH (Feb 2001). "An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome". Science. 291 (5506): 1040–1043. doi:10.1126/science.1057499. PMID 11232563.

Wasserman, P.M., Jovine, L. & Litscher, E. S. (2001) A profile of fertilization in mammals

Wawrik, B; Paul, JH; Tabita, FR (2002). "Real-time PCR quantification of rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes". Appl. Environ. Microbiol. 68: 3771–3779. doi:10.1128/aem.68.8.3771-3779.2002.

Wever RA, Polasek J, Wildgruber CM. Bright light affects human circadian rhythms. Plufgers Arch 1983;

Winter SL, Bosnoyan-Collins L, Pinnaduwaage D, Andrulis IL (Oct 2007). "Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors". *Neoplasia*. 9 (10): 797–800. doi:10.1593/neo.07595. PMC 2040206 . PMID 17971899.

Xu Y, Toh KL, Jones CR, Shin JY, Fu YH, Ptácek LJ (Jan 2007). "Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2". *Cell*. 128 (1): 59–70. doi:10.1016/j.cell.2006.11.043. PMC 1828903 . PMID 17218255.

Yan Z, Sun X, Engelhardt JF. Progress and prospects: techniques for site-directed mutagenesis in animal models. *Gene Ther* 2009;16(5):581–588.

yourgenome, (2017). Copyright information. [online] Available at: <http://www.yourgenome.org/copyright> [Accessed 19/09/2017].

Zhong L, Parmer TG, Robertson MC, Gibori G. Prolactin-mediated inhibition of 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase gene expression and the tyrosine kinase system. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(3):587–592.

Αρχές κλινικής χημείας και μοριακής διαγνωστικής, Ανδρέας Σκορίλας. Εκδόσεις συμμετρία