



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΗΝ  
ΥΠΕΡΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ**

**ΚΙΤΣΟΥ Κ. ΧΡΥΣΟΥΛΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015**









**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ - ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΡΟΛΟΥ ΤΩΝ ΠΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΗΝ  
ΥΠΕΡΔΙΕΓΕΡΣΗ ΤΩΝ ΩΟΘΗΚΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ**

**ΚΙΤΣΟΥ Κ. ΧΡΥΣΟΥΛΑ  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015**



«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».





Ημερομηνία αίτησης της κ. Κίτσου Χρυσούλας: 12-1-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 655<sup>α</sup>/10-3-2009

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μέλη

Γεωργίου Ιωάννης Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

**Ημερομηνία ορισμού θέματος:** 8-4-2009

*«Μελέτη του ρόλου των Ρετρομεταθετών Στοιχείων στην Υπερδιέγερση των Ωοθηκών και την Εμβρυογένεση»*

**ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ** 781<sup>α</sup>/29-9-2015

<b>Γεωργίου Ιωάννης</b>	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής –Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος</b>	Καθηγητής Μαιευτικής Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Σοφικίτης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Ναυρόζογλου Ιορδάνης</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στην Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Τζαβάρας Θεόδωρος</b>	Αναπληρωτής Καθηγητής Γενικής Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
<b>Βρεκούσης Θωμάς</b>	Επίκουρος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 29-10-2015

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**Μηνάς Πασχόπουλος**

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

**Η Γραμματέας του Τμήματος**



**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**

*Μαρία Καπιτοπούλου*



Η παρούσα έρευνα έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-ΕΚΤ) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ)–Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: Ηράκλειτος ΙΙ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου.



Ευρωπαϊκή Ένωση  
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



Στις επόμενες μνήμες



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Ιατρικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Μαιευτικής και Γυναικολογίας κ.Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές μου, τους επιστημονικούς συνεργάτες και τους φίλους μου για τη στήριξη που μου προσέφεραν σ' όλη τη διάρκεια αυτής της πορείας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο, για την επιστημονική καθοδήγηση, τη βοήθεια και την άπογη συνεργασία που μου προσέφερε. Ευχαριστώ τον κ. Θεόδωρο Τζαβάρα, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την πολύτιμη επιστημονική βοήθειά του και για τον χρόνο που διέθεσε να με κατευθύνει στην ερευνητική μου πορεία. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κ. Άννα Μπατιστάτου, τον κ. Νικόλαο Σοφικίτη, τον κ. Θωμά Βρεκούση και τον κ. Ιορδάνη Ναυρόζογλου για την επιστημονική στήριξη και τις συμβουλές τους, καθώς και για την άριστη συνεργασία, που κατέστησαν δυνατή την ολοκλήρωση και τη παρουσίαση της διατριβής μου.

Με ιδιαίτερη συγκίνηση θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καλούς φίλους και συνεργάτες μου, που υπήρξαν δίπλα μου σε αυτή τη πορεία και πάντα με βοηθούσαν να συνεχίζω τη προσπάθειά μου, με μελέτη και υπομονή. Ευχαριστώ πολύ την κ. Ιωάννα Μπούμπα, ΕΕΔΥΠ του εργαστηρίου, για τη σημαντική επιστημονική και εργαστηριακή καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και για τη φιλική της στάση, η οποία με βοήθησε να προσαρμοστώ στο χώρο του εργαστηρίου. Ευχαριστώ πολύ την Άννα Γκαλίδη, την Άρτεμις Μητσιώνη, τη Κατερίνα Γκιάκα, τον Πρόδρομο Σακάλογλου, τον Χαρίλαο Κωστούλα και τον Πάρη Λαδιά, για τα όμορφα χρόνια που περάσαμε μαζί ως υποψήφιοι διδάκτορες, χρόνια γεμάτα συζητήσεις και αναζητήσεις. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον κ. Λέανδρο Λάζαρο, πρωτίστως για τη φιλία που μου χάρισε, και έπειτα για την επιστημονική του στήριξη, για το χρόνο που διέθεσε να με καθοδηγεί και για την πολύτιμη βοήθειά του, η οποία υπήρξε καταλυτική για την εξέλιξη και την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Θέλω να ευχαριστήσω την κ. Ελισάβετ Χατζή, βιολόγο στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για την επιστημονική της βοήθεια, τις πολύτιμες συζητήσεις μας και τις συμβουλές της. Επίσης, θέλω να ευχαριστήσω την κ. Αλεξάνδρα Μπέλλου,

παρασκευάστρια στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη φιλική της συμπαράσταση και για τη βοήθεια που μου χάρισε όλα τα χρόνια. Θέλω να ευχαριστήσω την Αθανασία Σαμαρά, την Αλεξία Καρακίτσιου, τον Θοδωρή Λυκοβαρδάκη, την Κέλλυ Μαυράκη, την Παρασκευή Μιχελή, την Βασιλική Παπαχριστοφή, την Μαρία Σούκια, την Βάλια Αντωνοπούλου και την Δήμητρα Καραγεώργου, για την άριστη συνεργασία που είχα μαζί τους, στα πλαίσια εκπόνησης της πτυχιακής τους εργασίας, στο εργαστήριο Ιατρικής Γενετικής .

Ευχαριστώ πολύ την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας του Ιατρικού Τμήματος, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, με υπεύθυνο καθηγητή τον κ. Τζαβάρα Θεόδωρο, για την άψογη επιστημονική συνεργασία μας και τη φιλική τους στάση. Ευχαριστώ πολύ τον κ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, πολύτιμο συνεργάτη από το Αιματολογικό Εργαστήριο του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη βοήθειά του, για τις επιστημονικές και φιλικές συμβουλές του και για την πάντα καλή διάθεσή του απέναντι στο πρόσωπό μου. Ευχαριστώ επίσης, την κ. Σοφία Μπέλλου, συνεργάτιδα από το Ινστιτούτο Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας Ιωαννίνων, για τη βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές της. Ευχαριστώ τον κ Ιωάννη Κοσμά, Ιατρό Γυναικολόγο, για τη συνεργασία μας και τη βοήθειά του. Ευχαριστώ επίσης την κ. Αλεξάνδρα Παπούδου-Μπάι, Ειδικευόμενη Ιατρό στο τμήμα Παθολογοανατομίας, του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, για τη βοήθεια της και την πολύ καλή συνεργασία μας. Θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εκτροφείου πειραματόζωων, τον κ. Θανάση, τον Τόλη και τον Αποστόλη για τη φιλική τους στάση, τη βοήθεια και την άριστη συνεργασία μας. Ευχαριστώ επίσης το διοικητικό προσωπικό του ερευνητικού προγράμματος Ηράκλειτος II και κυρίως την κ. Λευκοθέα Ντόβα, για την καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου Κύρκο και Λαμπρινή, για την αγάπη και τη συμπαράσταση που δείχνουν σε κάθε μου προσπάθεια. Η παρουσία τους στάθηκε πολύτιμη σε όλα τα βήματα της ζωής μου. Ευχαριστώ τα αδέρφια μου Χρήστο, Ράνια και Αλέκα, για όλα όσα μου δίνουν με τόση αγάπη. Ευχαριστώ επίσης τις αδερφικές μου φίλες Όλγα Π., Χριστίνα Σ., Μαρία Κ, Μαρία Ν. και Βάνα Γ. για την αγάπη, τη στήριξη και τη φιλία που μου χαρίζουν.



Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πρώτο άνθρωπο που συνάντησα σε αυτή τη διαδρομή, τον άνθρωπο που μου άνοιξε την πόρτα και με βοήθησε να χαράξω αυτή τη πορεία. Ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή μου, τον κ Γεωργίου Ιωάννη, για την αποδοχή που έδειξε στο πρόσωπό μου, για την αμέριστη επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια, για την βοήθειά του, τη συμπαράσταση και τις χρήσιμες ανθρώπινες συμβουλές του. Τον ευχαριστώ, γιατί με βοήθησε να εργαστώ με έμπνευση.

Κίτσου Χρυσούλα



## Πίνακας Περιεχομένων

	<b>Σελίδα</b>	
<b>1</b>	<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>9</b>
1.1	<b>Αναπαραγωγικά Κύτταρα</b>	11-12
1.1.1	Ωογένεση	12-16
1.1.2	Κύκλος οίστρου του μυός	16-17
1.1.3	Εξέταση κολπικού επιχρίσματος του μυός	17-18
1.1.4	Παρατήρηση των εξωτερικών οργάνων του μυός	19-20
1.1.5	Σπερματογένεση	20-22
1.1.6	Κύτταρα Sertoli	22-23
1.1.7	Δομή Σπερματοζωαρίου	24-27
1.1.8	Απόκτηση γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων	27-28
1.1.9	Κίνηση υπερ-ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων	28-29
1.1.10	Γονιμοποίηση	29-32
<b>1.2</b>	<b>Μηχανισμοί μεθυλίωσης του DNA των γαμετών</b>	<b>32-33</b>
1.2.1	Επιγενετική τροποποίηση των γαμετών και του εμβρύου	33-35
<b>1.3</b>	<b>DNA επαναλαμβανόμενες ακολουθίες</b>	<b>35-36</b>
1.3.1	Παράλληλες επαναλήψεις DNA	37
1.3.2	Μεταθετά στοιχεία	37-38
1.3.3	RNA τρανσποζόνια	38-39
1.3.3.1	LTR ρετροτρανσποζόνια	39-40
1.3.3.2	YR ρετροτρανσποζόνια	40
1.3.3.3	Non LTR ρετροτρανσποζόνια	40-42
1.3.3.4	Penelope-like elements	42-43
1.3.4	DNA τρανσποζόνια	44
1.3.5	Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γένωμα	45
1.3.6	Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στη δομή του γενώματος	45-47
1.3.7	Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή ρύθμιση	47-52
1.3.8	Έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων	52-55

1.3.9	Κυτταρικοί μηχανισμοί ελέγχου της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων	55-58
1.4	<b>Ανάστροφη Μεταγραφάση</b>	58-59
1.5	<b>Δημιουργία Διαγονιδιακών Οργανισμών</b>	59-60
1.5.1	Sperm-Mediated Gene Transfer	60-65
<b>2</b>	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ</b>	<b>67-69</b>
<b>3</b>	<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>71</b>
3.1	<b>Μελέτη γεγονότων ρετρομετάθεσης</b>	73
3.1.1	Πειραματικό εργαλείο για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης	73-74
3.1.2	Πειραματόζωα	74
3.1.3	Απομόνωση σπερματοζωαρίων από αρσενικούς μύες	75
3.1.4	Υπολογισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων	75-76
3.1.5	Επεξεργασία του σπέρματος για τα πειράματα μελέτης γεγονότων ρετρομετάθεσης στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων	77
3.1.6	Επεξεργασία του σπέρματος για τα πειράματα in vitro γονιμοποίησης	78
3.1.7	Απομόνωση ωαρίων από θηλυκούς μύες, μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας	78-79
3.1.8	In vitro γονιμοποίηση	79
3.1.9	Συνεστιακή μικροσκοπία	79-80
3.1.10	Ανάλυση με κυτταρομετρία ροής	80
3.1.11	Εξαγωγή DNA από σπερματοζωάρια	80-81
3.1.12	Λύση εμβρύων	81
3.1.13	Ανάλυση PCR	81-83
3.2	<b>Πειράματα αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης</b>	83
3.2.1	Πειραματόζωα	83
3.2.2	Πρωτόκολλο χορήγησης των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης	83-85
3.2.3	Ιστολογική εξέταση	85
3.2.4	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων	85
3.2.5	Παρατήρηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων	85-86
3.2.6	Τεστ ανάλυσης της δομής της χρωματίνης σπέρματος	86-87

3.2.7	Παρατήρηση της <i>in vitro</i> προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός, παρουσία των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης	87
<b>4</b>	<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>89</b>
4.1	<b>Αποτελέσματα μέτρησης γεγονότων ρετρομετάθεσης</b>	91
4.1.1	Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζωάρια μυός	91-92
4.1.1.2	Μείωση του ποσοστού των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια με τη χρήση του αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine	93-94
4.1.1.3	Ταυτοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζωάρια μυός με ανάλυση PCR	94-95
4.1.1.4	Παρατήρηση της έκφρασης EGFP σε σπερματοζωάρια μυός με συνεστιακό μικροσκόπιο	95-96
4.1.2	Υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων σε έμβρυα μυός	97-101
4.2	<b>Αποτελέσματα πειραμάτων αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης</b>	101
4.2.1	Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση	101-102
4.2.2	Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης	102
4.2.2.1	Τομές όρχεων	102-105
4.2.2.2	Τομές ωοθηκών	105-107
4.2.3	Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη μορφολογία σπερματοζωαρίων μυός	108-109
4.2.4	Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη δομή της χρωματίνης σπερματοζωαρίων μυός	110
4.2.5	Αποτελέσματα της <i>in vitro</i> προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός παρουσία αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης	110-112
<b>5</b>	<b>ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	<b>113-116</b>
5.1	Μελέτη γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζωάρια μυός	116-118
5.2	Η υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων επηρεάζει τη προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μυός	118-120

5.3	Ο ρόλος του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση και στα αρχικά στάδια ανάπτυξης εμβρύων μυός	120-122
<b>6</b>	<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>123-125</b>
<b>7</b>	<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	<b>127-130</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>131-133</b>
<b>9</b>	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>135-160</b>

## **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**





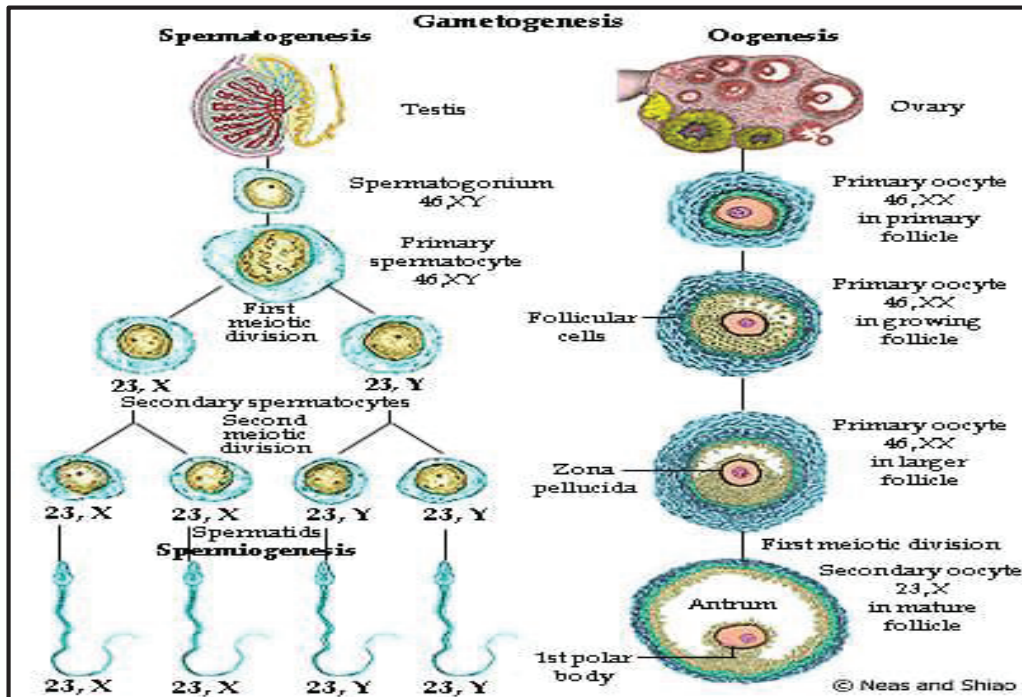
# 1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Αναπαραγωγικά κύτταρα

Τα κύρια όργανα φυλετικής αναπαραγωγής των οργανισμών και παραγωγής των αναπαραγωγικών κυττάρων είναι οι γονάδες, όρχις στους άρρενες και ωθήκη στα θήλεα. Εκεί παράγονται, αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται τα αναπαραγωγικά κύτταρα και εκκρίνονται οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου -τεστοστερόνη, οιστραδιόλη, προγεστερόνη - οι οποίες υποστηρίζουν τη φυσιολογική λειτουργία του αναπαραγωγικού συστήματος.

Ο έλεγχος της αναπαραγωγικής λειτουργίας των γονάδων, πραγματοποιείται από μια αλυσιδωτή σειρά ορμονών του κεντρικού νευρικού συστήματος και αυτών καθεαυτών των γονάδων. Η πρώτη ορμόνη σε αυτή την αλυσίδα είναι η γοναδοεκλυτίνη (GnRH). Η GnRH εκκρίνεται από τα νευροενδοκρινή κύτταρα του υποθαλάμου και καταλήγει στην πρόσθια υπόφυση μέσω των υποθαλαμοϋποφυσιακών πυλαίων αιμοφόρων αγγείων. Στη πρόσθια υπόφυση η GnRH διεγείρει την απελευθέρωση των υποφυσιακών γοναδοτροπικών, τη θυλακιοτροπίνη (FSH) και την ωχρινοτροπίνη (LH). Η FSH και η LH δρουν πάνω στις γονάδες επιφέροντας γαμετογένεση και έκκριση των στεροειδών ορμονών του φύλου. Οι στεροειδείς ορμόνες φύλου που παράγονται στις γονάδες ασκούν ανατροφοδοτική επίδραση στην έκκριση της GnRH, της FSH και της LH. Ανατροφοδοτική επίδραση στη πρόσθια υπόφυση, ασκεί επίσης η γοναδιακή ορμόνη ανασταλτίνη.

Κατά τη γαμετογένεση, παρατηρείται ανάπτυξη και διαφοροποίηση των αρσενικών και θηλυκών γαμετών. Τα βασικά της στάδια είναι κοινά για τα δύο φύλα. Το πρώτο στάδιο αφορά τον πολλαπλασιασμό των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων με μιτωτικές διαιρέσεις, κατά το οποίο όλα τα θυγατρικά κύτταρα που προκύπτουν έχουν συνολικά 46 χρωμοσώματα, με δύο αδελφές χρωματίδες το καθένα. Το δεύτερο στάδιο αφορά την παραγωγή ώριμων γαμετών μετά από δύο αλληπάλληλες μειωτικές διαιρέσεις και τα κύτταρα που προκύπτουν έχουν 23 χρωμοσώματα, μονής χρωματίδης. Οι μιτωτικές διαιρέσεις στα θήλεα αρχίζουν κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, ενώ στους άρρενες παρατηρείται αρχικά ένας μικρός αριθμός διαιρέσεων κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και στη συνέχεια αρχίζουν κατά την εφηβεία και συνεχίζονται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής.



Εικόνα 1.1: Βασικά στάδια της γαμετογένεσης.

### 1.1.1 Ωογένεση

Η ωογένεση είναι η διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης των θηλυκών γαμετών. Ακολουθεί μία κυκλική πορεία σε όλα τα είδη, η οποία στον άνθρωπο ονομάζεται έμμηνος κύκλος και στο μυ κύκλος οίστρου. Πραγματοποιείται στις ωοθήκες, οι οποίες μαζί με τους ωαγωγούς και τη μήτρα, συνιστούν το αναπαραγωγικό σύστημα στα θήλεα. Οι ωοθήκες πέραν της λειτουργίας ως όργανα παραγωγής των θηλυκών γαμετών, εξυπηρετούν την έκκριση των στεροειδών ορμονών του φύλου (οιστρογόνα και προγεστερόνη), τη ρύθμιση της μεταγεννητική αύξησης των αναπαραγωγικών οργάνων και της ανάπτυξης των δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου.

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου στη μήτρα, τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, τα ωογόνια, υπόκεινται σε πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις παράγοντας ένα μεγάλο αριθμό θυγατρικών κυττάρων. Οι διαιρέσεις αυτές σταματούν σε κάποιο στάδιο της ανάπτυξης (στον άνθρωπο μετά το 1<sup>ο</sup> τρίμηνο) και έπειτα δεν παράγονται νέα ωογόνια. Όλα τα ωογόνια μπαίνουν στη φάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και αναπτύσσονται σε πρωτογενή ωοκύτταρα. Η πρώτη μειωτική διαίρεση δεν ολοκληρώνεται και αναστέλλεται στο στάδιο της πρόφασης. Κατά τη γέννηση οι ωοθήκες ενός θήλεος περιέχουν ένα

συγκεκριμένο αριθμό πρωτογενών ωοκυττάρων, ο οποίος δεν μεταβάλλεται περαιτέρω. Από την εφηβεία και μετά, ένα μέρος από αυτά ολοκληρώνουν τη πρώτη μειωτική διαίρεση, μετατρέπονται σε δευτερογενή ωοκύτταρα και προορίζονται για ωοθυλακιορρηξία. Τα δευτερογενή ωοκύτταρα ολοκληρώνουν τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και παράγουν τον ώριμο θηλυκό γαμέτη μόνο μετά τη γονιμοποίηση, μέσα στη μήτρα του θηλυκού ατόμου.

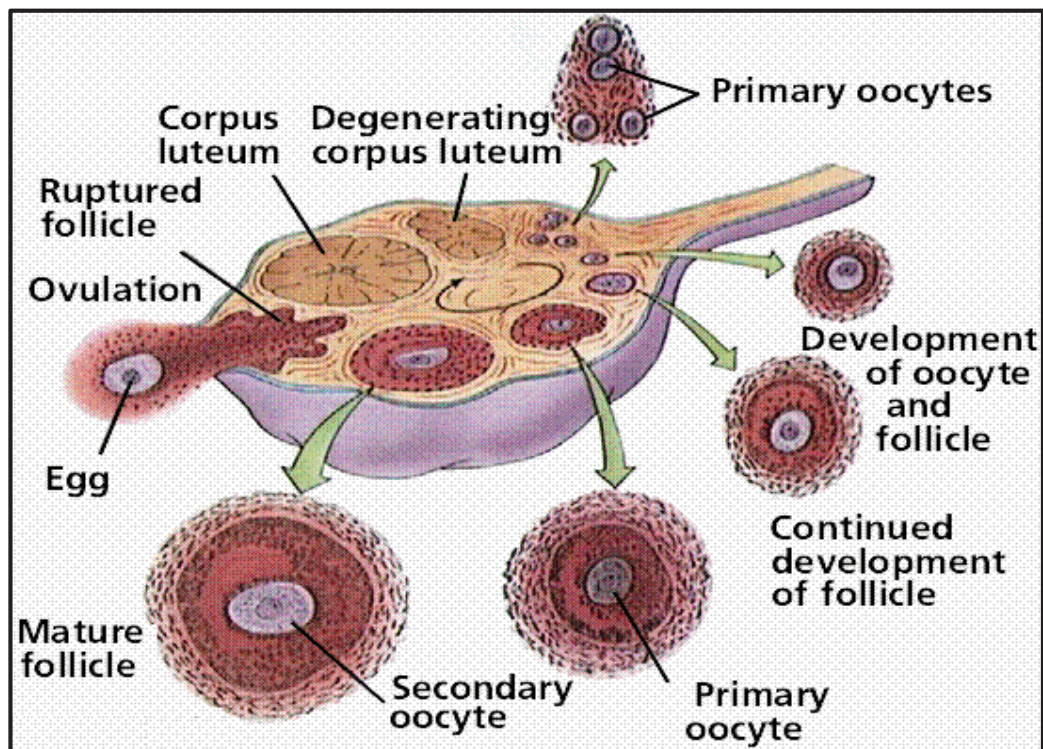
Τα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των ωοκυττάρων συνιστούν τον ωοθηκικό κύκλο, ο οποίος χωρίζεται σε τρεις φάσεις, τη θυλακική (follicular phase), την ωορρηκτική (ovulatory phase) και την ωχρινική φάση (luteal phase). Καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής τους, τα ωοκύτταρα περιβάλλονται από ένα είδος σωματικών κυττάρων, των κοκκωδών κυττάρων, σχηματίζοντας μία ανατομική δομή γνωστή ως θυλάκιο ή ωοθυλάκιο. Η μορφολογία των ωοθυλακίων μεταβάλλεται με την πορεία του ωοθηκικού κύκλου.

Στη θυλακική φάση αρχίζει να αναπτύσσεται μία ομάδα ωοθυλακίων, τα αρχέγονα ωοθυλάκια, τα οποία περιέχουν το πρωτογενές ωοκύτταρο, επενδυμένο με μια μονήρη στρώδα κοκκωδών κυττάρων. Η περαιτέρω ανάπτυξη χαρακτηρίζεται από την αύξηση του μεγέθους των ωοκυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων σε πολλαπλές στοιβάδες και το διαχωρισμό του ωοκυττάρου από τα έσω κοκκώδη κύτταρα με ένα παχύ στρώμα υλικού, τη διαφανή ζώνη. Τα αρχέγονα ωοθυλάκια μετατρέπονται σε πρωτογενή ωοθυλάκια. Το ωοθυλάκιο αυξάνεται περισσότερο καθώς τα κοκκώδη κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται με μιτωτικές διαιρέσεις, ενώ αρχίζει να συσσωρεύεται υγρό μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων, για το σχηματισμό του άντρου. Τα κύτταρα συνδετικού ιστού που περιβάλλουν τα κοκκώδη κύτταρα αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε στοιβάδες, σχηματίζοντας τα κύτταρα της θήκης. Τα κύτταρα της θήκης οργανώνονται σε δύο διακριτές στοιβάδες, την έσω και την έξω θήκη. Τα ωοθυλάκια στο στάδιο αυτό ονομάζονται, ωοθυλάκια χωρίς άντρο. Σύντομα μετά από αυτό αρχίζει ο σχηματισμός του άντρου, ένα «σπήλαιο» γεμάτο εκκριτικά υγρά, που προέρχονται από τα κοκκώδη κύτταρα. Τα ωοθυλάκια καλούνται πρώιμα ή ωοθυλάκια με άντρο. Το ωοθυλάκιο που επιλέγεται για να ωριμάσει πλήρως ονομάζεται κυρίαρχο και χαρακτηρίζεται από τη παρουσία ενός μεγάλου αριθμού κοκκωδών κυττάρων, κυττάρων θήκης και ενός διογκωμένου άντρου. Λόγω της αύξησης του μεγέθους του άντρου, τα στρώματα των κοκκωδών κυττάρων, τα οποία περιβάλλουν τα ωοκύτταρα, σχηματίζουν ένα γήλοφο που

προβάλλει μέσα στο άντρο και ονομάζεται ωοφόρος δίσκος. Σε αυτό το στάδιο το ώριμο ωοθυλάκιο (ή γραφιανό ωοθυλάκιο) περιέχει ένα δευτερογενές ωοκύτταρο έτοιμο για ωορρηξία.

Κατά την ωορρηκτική φάση, το λεπτό τοίχωμα του θυλακίου και της ωοθήκης διαρρηγνύεται με ενζυμική πέψη, ο ωοφόρος δίσκος αποκόπτεται από το τοίχωμα του θυλακίου και το ωοκύτταρο που επιπλέει μέσα στο υγρό του άντρου, μεταφέρεται έξω από την ωοθήκη, προς την επιφάνειά της.

Μετά την ωορρηξία, κατά την ωχρινική φάση, το εναπομείναν θυλάκιο αρχίζει να συρρικνώνεται γύρω από το άντρο και τα κοκκώδη κύτταρα αρχίζουν να μεγεθύνονται. Αυτή η δομή του θυλακίου ονομάζεται ωχρό σωματίο και αρχίζει να εκκρίνει οιστρογόνα, προγεστερόνη και ανασταλίνη. Η ανάπτυξή του συνεχίζεται και το μέγεθός του αυξάνει, ωστόσο εάν δεν επέλθει γονιμοποίηση εκφυλίζεται με απόπτωση.



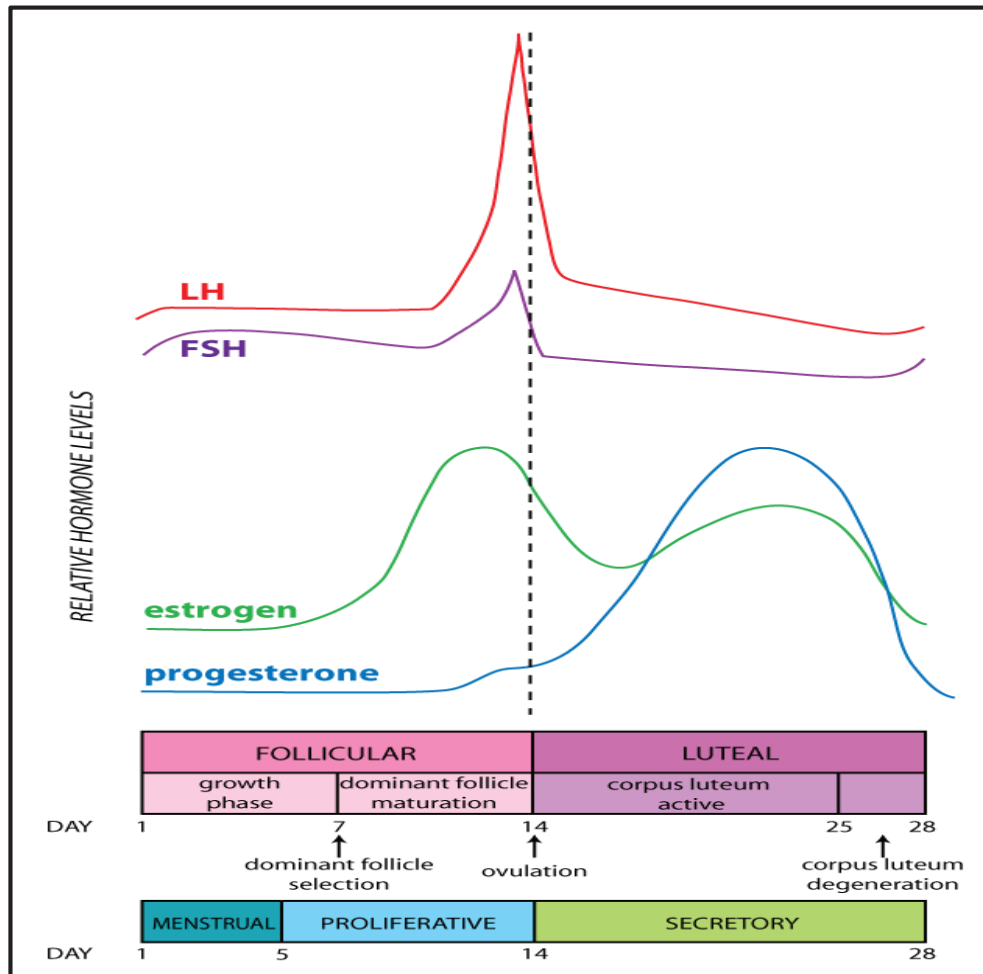
Εικόνα1.2: Βασικά στάδια ανάπτυξης των ωοθυλακίων κατά την ωογένεση.

Οι βασικοί παράγοντες ελέγχου του ωοθηκικού κύκλου, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί η συνδυασμένη δράση των ορμονών GnRH, των προσθιοϋποφυσιακών ορμονών FSH και

LH και των γοναδικών ορμονών του φύλου, οιστρογόνων και προγεστερόνης. Η ανάπτυξη και η ωρίμανση του θυλακίου απαιτεί τη δράση των παραπάνω ορμονών.

Στα πρώιμα στάδια της θυλακικής φάσης η έκκριση της FSH είναι υψηλή, γιατί είναι απαραίτητη για την έναρξη της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Δρα πάνω στα κοκκώδη κύτταρα προκαλώντας την ανάπτυξή τους και την έκκριση οιστρογόνων από αυτά. Η δράση της FSH σε συνδυασμό με τα οιστρογόνα διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και την αύξηση του ωοθυλακικού μεγέθους. Η LH ενισχύει την ανάπτυξη και την ωρίμανση του ωοθυλακίου δρώντας πάνω στα κύτταρα της θήκης και διεγείροντας τον πολλαπλασιασμό τους. Τα κύτταρα της θήκης παράγουν ανδρογόνα που διαχέονται στα κοκκώδη κύτταρα και εκεί μετατρέπονται σε οιστρογόνα. Από το μέσο περίπου της θυλακικής φάσης, αρχίζουν να εμφανίζονται LH υποδοχείς και στα κοκκώδη κύτταρα. Τα κοκκώδη κύτταρα μειώνουν την έκκρισή τους σε οιστρογόνα και αρχίζουν να εκκρίνουν προγεστερόνη. Ταυτόχρονα εκκρίνουν ανασταλτίνη, η οποία αναστέλλει την έκκριση της FSH από την υπόφυση. Η χαμηλή συγκέντρωση οιστρογόνων προκαλεί επίσης αρνητική ανατροφοδοτική αναστολή στην έκκριση των γοναδοτροπινών, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση της FSH. Η πτώση της FSH αποτελεί κρίσιμο παράγοντα που οδηγεί στον εκφυλισμό των αναπτυσσόμενων ωοθυλακίων και την επιλογή ενός μόνο κυρίαρχου ωοθυλακίου, που συνεχίζει την ανάπτυξή του μέχρι να ωριμάσει. Το κυρίαρχο ωοθυλάκιο εμφανίζει υποδοχείς LH και αυξημένο αριθμό υποδοχέων της FSH, με αποτέλεσμα ακόμη και μικρή συγκέντρωση της FSH να είναι αποτελεσματική. Αρχίζει να εκκρίνει μεγάλες ποσότητες οιστρογόνων, τα οποία ασκούν θετική ανατροφοδοτική αναστολή στη πρόσθια υπόφυση και προκαλούν μία μικρή αύξηση των επιπέδων της FSH και ένα παλιρροιακό κύμα έκκρισης της LH, που οδηγεί στην ωρίμανση του ωοθυλακίου και την απελευθέρωση του δευτερογενούς ωαρίου.

Τα κύτταρα του ωχρού σωματίου αρχίζουν να εκκρίνουν προγεστερόνη και οιστρογόνα, προκαλώντας αρνητική ανατροφοδοτική αναστολή στην έκκριση της GnRH. Τα επίπεδά της FSH και της LH μειώνονται. Με τον εκφυλισμό του ωχρού σωματίου, οι συγκεντρώσεις των οιστρογόνων και της προγεστερόνης μειώνονται και αρχίζει πάλι ένας νέος ωοθηκικός κύκλος με την αύξηση των επιπέδων της FSH και της LH (1).



Εικόνα1.3: Ορμονικές αλλαγές κατά τη διάρκεια του ωοθηκικού κύκλου στον άνθρωπο.

### 1.1.2 Κύκλος οίστρου του μύος

Ο κύκλος του κύκλου στους μύες διαιρείται σε τέσσερις φάσεις (προοίστρος, οίστρος, μετοίστρος, διοίστρος) και επαναλαμβάνεται κάθε 4 με 5 ημέρες, εκτός αν διακοπεί από κύηση, ψευδοκύηση ή από ανοίστρο. Η χρονική διάρκεια του κάθε σταδίου είναι διαφορετική. Είναι πιθανό, ωστόσο, να παρατηρηθούν και ανωμαλίες στον κύκλο (π.χ. παρατεταμένος διοίστρος ή οίστρος), κάτι το οποίο συχνά οφείλεται σε περιβαλλοντικούς παράγοντες.

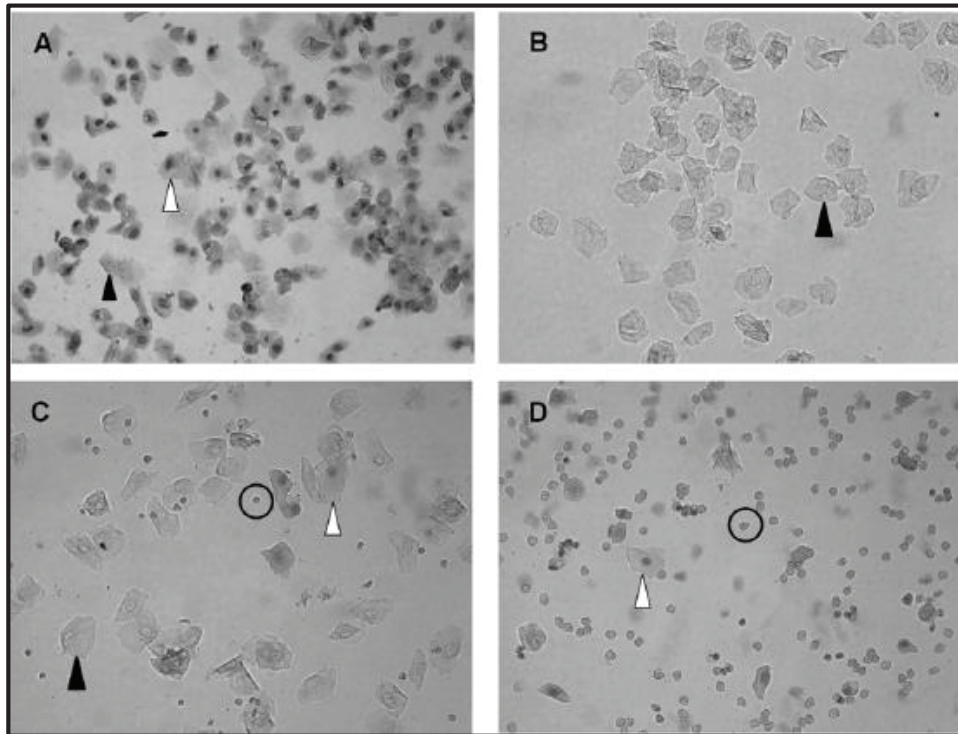
Ο προοίστρος αποτελεί το προ-ωοθυλακιωρηκτικό στάδιο κατά το οποίο αρχίζει να αυξάνει η συγκέντρωση των οιστρογόνων. Κατά τη διάρκεια της νύχτας αυξάνουν τα επίπεδα της FSH και της LH και έπεται η απελευθέρωση του ωαρίου, συνήθως, νωρίς το

πρωί. Ο οίστρος αποτελεί τη περίοδο «σεξουαλικής δεκτικότητας» του μύος. Σε αυτό το στάδιο τα επίπεδα των οιστρογόνων είναι υψηλά το πρωί και αρχίζουν να πέφτουν από το απόγευμα. Διαρκεί μία μέρα σ' έναν κύκλο 4 ημερών και 2 μέρες σ' ένα κύκλο 5 ημερών. Κατά τον μετοίστρο τα επίπεδα των οιστρογόνων εξακολουθούν να παραμένουν χαμηλά. Το στάδιο αυτό περιγράφει τη μετάβαση από τον οίστρο στη πρόιμη φάση του διοίστρου κατά τη πρώτη μέρα. Στο στάδιο του διοίστρου αρχίζουν πάλι να αυξάνουν τα επίπεδα των οιστρογόνων, ενώ οι τιμές των FSH και LH εξακολουθούν να είναι χαμηλές. Ο διοίστρος διαρκεί συνήθως 2 μέρες (2, 3).

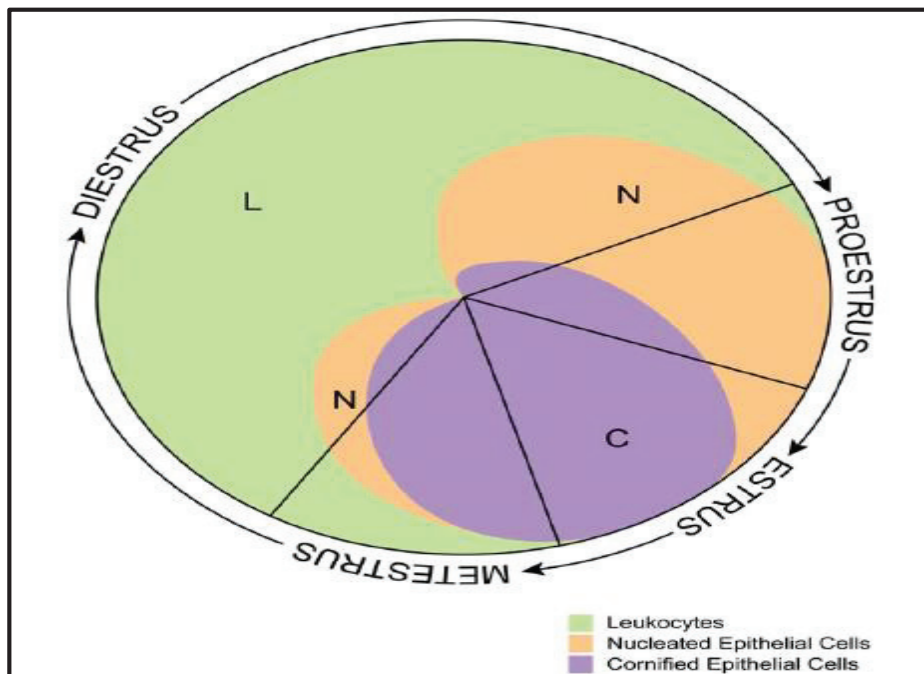
Ο προσδιορισμός της φάσης του αναπαραγωγικού κύκλου μπορεί να επιτευχθεί με κυτταρολογική εξέταση κοιλιακού επιχρίσματος (4), με προσδιορισμό της ηλεκτρικής αντίστασης (5), με βιοχημική ανάλυση των ούρων (6) και με παρατήρηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων (7).

### **1.1.3 Εξέταση κοιλιακού επιχρίσματος του μύος**

Η εξέταση της μορφολογίας των κυττάρων του κόλπου θεωρείται η πιο κατάλληλη μέθοδος για να προσδιοριστεί με ακρίβεια το στάδιο του αναπαραγωγικού κύκλου στους μύες. Σε κάθε φάση του κύκλου κυριαρχεί συνήθως ένας συγκεκριμένος τύπος κυττάρου, ενώ δεν αποκλείεται να υπάρχει και δεύτερος ή τρίτος σε μικρότερη αναλογία. Κατά τον προοίστρο, παρατηρούνται κυρίως εμπύρηννα επιθηλιακά κύτταρα, τα οποία βρίσκονται μεμονωμένα ή σε ομάδες, και λίγα κερατινοποιημένα κύτταρα. Στο στάδιο του οίστρου παρατηρούνται μόνο ομάδες απύρηννων κερατινοποιημένων πλακωδών επιθηλιακών κυττάρων. Στο μετοίστρο επικρατούν τα λευκοκύτταρα, ενώ είναι δυνατό να υπάρχουν και λίγα εμπύρηννα ή και κερατινοποιημένα κύτταρα. Κατά τον διοίστρο υπάρχουν μόνο λευκοκύτταρα (4, 8).



Εικόνα1.4: Προσδιορισμός του οίστρου στους μύες με τη παρατήρηση των κυττάρων του κολπικού επιχρίσματος μύος. Λευκοκύτταρα (στρόγγυλα), απύρρηνα κερατινοειδή κύτταρα (μαύρο) και εμπύρρηνα επιθηλιακά κύτταρα (άσπρο) Α. Προοίστρος Β. Οίστρος C. Μετοίστρος D. Διοίστρος.



Εικόνα1.5: Προσδιορισμός του οίστρου στους μύες, με βάση την αναλογία των τριών κυτταρικών τύπων, των εμπύρρηγων επιθηλιακών κυττάρων (Nucleated Epithelial Cells), των κερατινοποιημένων επιθηλιακών κυττάρων (Cornified Epithelial Cells) και των λευκοκυττάρων (Leukocytes), στο κολπικό επίχρισμα.



#### 1.1.4 Παρατήρηση των εξωτερικών γεννητικών οργάνων του μύδς

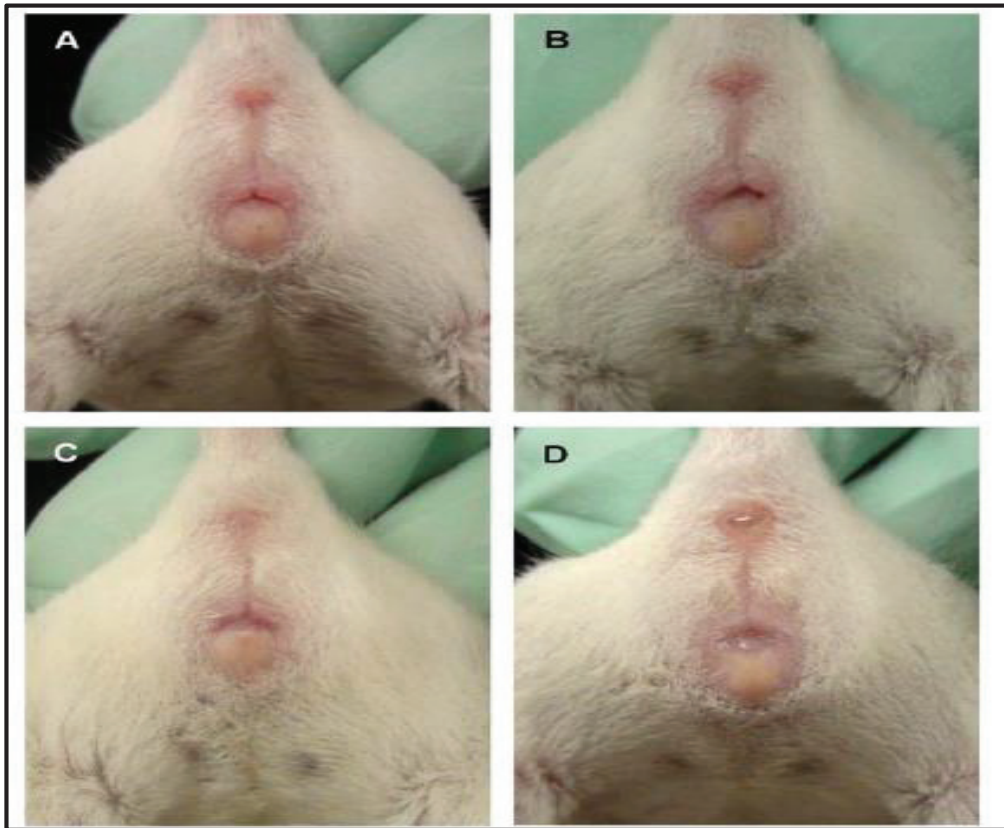
Η μέθοδος αυτή θεωρείται αρκετά πιο γρήγορη καθώς επιτρέπει τον άμεσο προσδιορισμό του σταδίου του κύκλου αναπαραγωγής του μύδς, με απλή παρατήρηση και χωρίς καμία μηχανική επέμβαση. Τα χαρακτηριστικά του κόλπου των μύδς στα διάφορα στάδια του κύκλου είναι τα εξής.

A. Προοίστρος: Ο κόλπος είναι ανοιχτός. Οι ιστοί γύρω του έχουν κόκκινο–ροζ χρώμα και είναι υγροί. Πολλές επιμήκεις πτυχές και ραβδώσεις είναι ορατές στο ραχιαίο και στο κοιλιακό χείλος του κόλπου.

B. Οίστρος: Το άνοιγμα του κόλπου είναι παρόμοιο με αυτό που παρατηρείται στον προοίστρο. Το χρώμα των ιστών είναι πιο έντονο ροζ και είναι λιγότερο υγροί. Οι ραβδώσεις στο ραχιαίο και στο κοιλιακό χείλος είναι πιο έντονες.

Γ. Μετοίστρος: Ο κόλπος είναι κλειστός. Οι ιστοί γύρω του είναι ωχροί και υγροί. Το ραχιαίο χείλος δεν εμφανίζει το «πρήξιμο» που παρατηρείται στον οίστρο.

Δ. Διοίστρος: Ο κόλπος έχει ένα μικρό άνοιγμα. Το χρώμα των ιστών είναι αχνό- μωβ και είναι υγροί.



Εικόνα1.6: Προσδιορισμός του οίστρου στους μύες με εξέταση των εξωτερικών αναπαραγωγικών οργάνων. Α. προοίστρος Β. οίστρος C. Μετοίστρος D. Διοίστρος.

### 1.1.5 Σπερματογένεση

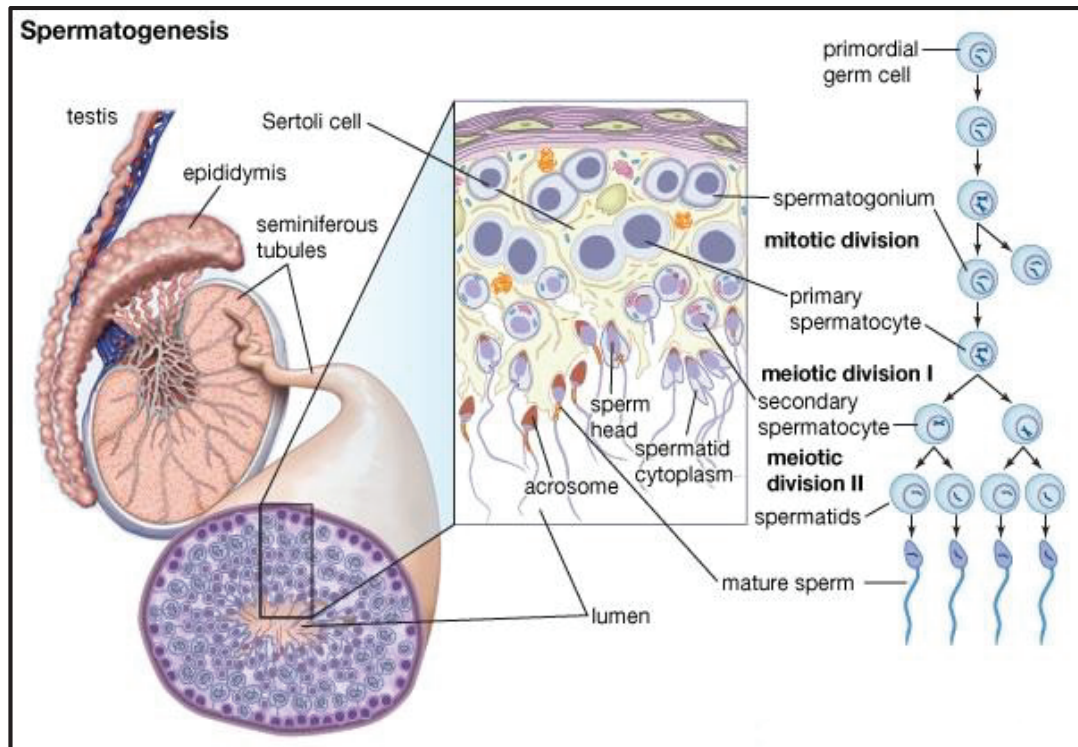
Η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται απλοειδή, λειτουργικά και ευκίνητα σπερματοζώαρια, από διπλοειδή σπερματογόνια, ονομάζεται σπερματογένεση. Το στάδιο της σπερματογένεσης κατά το οποίο οι απλοειδείς σπερματίδες διαφοροποιούνται σε ευκίνητα σπερματοζώαρια χαρακτηρίζεται ως σπερμιογένεση. Το σπέρμα έχει δύο κύριες λειτουργίες α. να επιδώσει το γένωμά του στο ωάριο για γενετικό ανασυνδυασμό και να β. να ενεργοποιήσει το αναπτυξιακό πρόγραμμα του ωαρίου. Η σπερματογένεση είναι μία συνεχής διαδικασία και επιτελείται στα πολυάριθμα σπερματικά σωληνάρια των όρχεων. Τα σπερματικά σωληνάρια διαφορετικών περιοχών του όρχεος ενοποιούνται και σχηματίζουν ένα πλέγμα αλληλοσυνδεδεμένων σωλήνων, το ορχικό δίκτυο. Μικροί αγωγοί, οι απαγωγοί σωληνίσκοι, τρυπούν το ινώδες περίβλημα των όρχεων και εκβάλλουν σ' έναν μικρό αγωγό εντός της επιδιδυμίδας.

Κάθε σπερματικό σωληνάριο οριοθετείται από μια βασική μεμβράνη και ένα στρώμα κυττάρων λείου μυός, τα οποία είναι υπεύθυνα για τις περισταλτικές κινήσεις των σωληναρίων. Στο κέντρο κάθε σωληναρίου βρίσκεται ένα υδροφόρος αυλός που περιέχει σπερματοζώαρια. Το σωληναριακό επιθήλιο αποτελείται από δύο διακριτούς τύπους κυττάρων, τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα και τα σωματικά κύτταρα Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli αποτελούν «μόνιμα» κύτταρα του σπερματοφόρου σωληναρίου και διατηρούν μια στενή σχέση με τους γαμέτες καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησής τους. Μεταξύ των σπερματικών σωληναρίων είναι τοποθετημένα τα κύτταρα Leydig ή διάμεσα κύτταρα, τα οποία παράγουν την τεστοστερόνη. Τα κύτταρα Leydig βρίσκονται σε στενή επαφή με τα αιμοφόρα αγγεία και με τους λεμφικούς διαύλους, τα οποία περικυκλώνουν επίσης και τα σπερματικά σωληνάκια.

Η σπερματογένεση αρχίζει με τις μιτωτικές διαιρέσεις των πρωτογενών βλαστικών κυττάρων ή διπλοειδών σπερματογόνιων, τα οποία βρίσκονται στη βάση των σπερματοφόρων σωληναρίων, τοποθετημένα μεταξύ των κυττάρων Sertoli και της υποκείμενης βασικής μεμβράνης. Τα διπλοειδή σπερματογόνια παραμένουν στη θέση αυτή και λειτουργούν ως στελεχιαία κύτταρα, συνεχίζοντας τις κυτταρικές διαιρέσεις. Κάποια από τα παραχθέντα θυγατρικά κύτταρα βγαίνουν από τον κύκλο των μιτωτικών διαιρέσεων, υπόκεινται μια μικρή διαφοροποίηση, μετατρέπονται σε πρωτογενή σπερματοκύτταρα και αρχίζουν τις μειωτικές διαιρέσεις. Κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο διαιρείται αρχικά σε δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα και έπειτα σε τέσσερις σπερματίδες, με απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων. Είναι ενδιαφέρον ότι τα αναπτυσσόμενα βλαστικά κύτταρα αποτυγχάνουν να ολοκληρώσουν τις κυτταροπλασματικές τους διαιρέσεις (κυτοκίνηση) κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης, με αποτέλεσμα όλα τα θυγατρικά κύτταρα να παραμένουν συνδεδεμένα με κυτταροπλασματικές γέφυρες και να αποτελούν ένα συγκύτιο. Οι κυτταροπλασματικές γέφυρες επιτρέπουν τη διέλευση ιόντων και μορίων μεταξύ των κυττάρων. Η επικοινωνία αυτή ανάμεσα στα αναπτυσσόμενα σπερματοζώαρια διατηρείται μέχρι τη πλήρη και ταυτόχρονη διαφοροποίησή τους. Κατά τη διάρκεια των μειωτικών διαιρέσεων, κύτταρα που βρίσκονται σε πιο προχωρημένα στάδια της σπερματογένεσης, τοποθετούνται διαδοχικά σε υψηλότερες θέσεις στα σπερματοφόρα σωληνάκια.

Η τελική φάση της σπερματογένεσης είναι η διαφοροποίηση των σπερματίδων σε ώριμα σπερματοζώαρια. Περιλαμβάνει τη διαδικασία της σπερμιογένεσης, κατά την οποία

παρατηρείται κυτταρική αναδόμηση και εκτεταμένη επιμήκυνση των σπερματίδων και τη διαδικασία της σπερμίας, κατά την οποία αποβάλλονται τα υπολειπόμενα σωματίδια από τις επιμήκεις σπερματίδες, αποκόπτονται οι κυτταροπλασματικές γέφυρες και σχηματίζονται τα ώριμα σπερματοζώρια, που απελευθερώνονται στον αυλό (1).



Εικόνα 1.7: Βασικά στάδια της σπερματογένεσης.

### 1.1.6 Κύτταρα Sertoli

Τα κύτταρα Sertoli αντιπροσωπεύουν το κύριο τύπο κυττάρων των σπερματοφόρων σωληναρίων μέχρι την εφηβεία. Μετά την εφηβεία αντιπροσωπεύουν το 10% αυτών, ενώ σε προχωρημένη ηλικία το ποσοστό αυξάνεται ξανά, και τα κύτταρα Sertoli συνιστούν και πάλι το μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων που επενδύουν τα σπερματοφόρα σωληνάρια.

Είναι κυλινδροειδή κύτταρα, εκτείνονται από τη βασική μεμβράνη μέχρι τον αυλό των σπερματοζωαρίων και συνδέονται μεταξύ τους στη βασική μεμβράνη με στεγανές συνδέσεις. Σ' όλα τα στάδια της σπερματογένεσης τα Sertoli σχετίζονται στενά με τα αναπτυσσόμενα σπερματοζώρια. Στη βάση των σπερματοφόρων σωληναρίων, ενσωματώνουν στο κυτταρόπλασμά τους τα βλαστικά γαμετικά κύτταρα, δημιουργούν

μεταξύ τους «φωλιές», στις οποίες περικλείουν σπερματοκύτταρα και πρώιμες σπερματίδες, και τέλος σχηματίζουν «κρύπτες» στην επιφάνεια του αυλού, με τις οποίες περιβάλλουν τις ώριμες σπερματίδες.

Η διάταξη των στενά αλληλοσυνδεόμενων κυττάρων Sertoli εξυπηρετεί τη δημιουργία του αιματορχικού φραγμού, ο οποίος εμποδίζει τη μεταφορά χημικών ουσιών από το αίμα στον αυλό των σπερματοφόρων σωληναρίων, διασφαλίζοντας με αυτόν τον τρόπο τις κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, επιτρέπει την διαίρεση των σπερματοφόρων σωληναρίων σε δύο διαμερίσματα, το βασικό και το κεντρικό διαμέρισμα, εξασφαλίζοντας την ύπαρξη διαφορετικού περιβάλλοντος, για τα διαφορετικά στάδια της σπερματογένεσης. Στο βασικό διαμέρισμα λαμβάνουν χώρα οι μιτωτικές διαιρέσεις των σπερματογονίων και η διαφοροποίηση των πρωτογενών σπερματοκυττάρων, ενώ στο κεντρικό διαμέρισμα πραγματοποιούνται οι μειωτικές διαιρέσεις, η παραγωγή και η ωρίμανση των σπερματίδων.

Τα κύτταρα Sertoli υποστηρίζουν, προστατεύουν και θρέφουν τους αναπτυσσόμενους γαμέτες. Μέσω φαγοκυττάρωσης απομακρύνουν τα «ελαττωματικά» σπερματοζωάρια και τα υπολειπόμενα σώματα και βοηθούν την απελευθέρωση των ώριμων σπερματοζωαρίων στον αυλό των σωληναρίων. Εκκρίνουν το περισσότερο από το υγρό που βρίσκεται μέσα σε αυτόν. Το υγρό αυτό φέρει ειδικά χαρακτηριστικά όσο αφορά την ιονική του σύσταση. Περιέχει επίσης άφθονη ανδρογόνου-δεσμευτική πρωτεΐνη, με την οποία ενώνεται η τεστοστερόνη που εκκρίνεται από τα κύτταρα Leydig. Δρουν ως το ενδιάμεσο σημείο μεταξύ των γαμετικών κυττάρων και των ορμονών, οι οποίες διεγείρουν τη σπερματογένεση (FSH, LH). Η FSH δρα πάνω στα κύτταρα Sertoli διεγείροντας τη παραγωγή παρακρινών παραγόντων, οι οποίοι εγείρουν τη σπερματογένεση και άλλες λειτουργίες των ίδιων κυττάρων (Sertoli). Η LH δρα στα κύτταρα Leydig για να διεγείρει την έκκριση τεστοστερόνης, η οποία κινείται από το διάμεσο χώρο στα σπερματοφόρα σωληνάκια, εισέρχεται στα κύτταρα Sertoli και διευκολύνει τη σπερματογένεση. Τα Sertoli ελέγχουν τη λειτουργία των κυττάρων Leydig μέσω της έκκρισης της ανασταλτίνης και άλλων παρακρινών παραγόντων, που αναστέλλουν τη παραγωγή της FSH. Οι ορμόνες, λοιπόν, δεν δρουν απευθείας πάνω στους γαμέτες, αλλά πάνω στα κύτταρα Sertoli, τα οποία εκκρίνουν μια ποικιλία χημικών μορίων και ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό και την διαφοροποίηση των γαμετών (1).

### 1.1.7 Δομή Σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζωάριο δομείται από το κεφάλι και την ουρά (ή μαστίγιο), τα οποία περιβάλλονται από πλασματική μεμβράνη. Η κεφαλή του σπερματοζωαρίου των τρωκτικών έχει μορφή άγκιστρου (hook-shaped), ενώ των οπληφόρων, των σαρκοφάγων και των πρωτευόντων έχει σπαθοειδή μορφή (spatula-shaped). Το σπερματοζωάριο των τρωκτικών χαρακτηρίζεται από τη πλήρη απουσία κεντροσώματος και κεντριολίων, ενώ των οπληφόρων έχει μειωμένο κεντρόσωμα, με ένα μόνο πρόσθιο κεντριόλιο. Τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά της κεφαλής και της ουράς των σπερματοζωαρίων είναι κοινά μεταξύ των ευθέριων θηλαστικών (9).

#### Κεφαλή σπερματοζωαρίου

Το DNA στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων βρίσκεται συνδεδεμένο με πρωταμίνες. Οι πρωταμίνες είναι θετικά φορτισμένες DNA πρωτεΐνες, πλούσιες στο αμινοξύ Arg και συμμετέχουν στη υπερσυμπύκνωση του πυρήνα, της κεφαλής του σπέρματος. Δημιουργείται έτσι μια συμπαγής, υδροδυναμική δομή, ικανή να προσδίδει στο σπέρμα ικανότητα κίνησης και διείσδυσης στη μεμβράνη του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση. Ο πυρήνας περιβάλλεται από έναν στοιχειώδη πυρηνικό φάκελο ή πυρηνική μεμβράνη. Ο πυρηνικός φάκελος περιβάλλει τον πυρήνα των κυττάρων και αποτελείται από δύο επιμέρους μεμβράνες, μία εσωτερική και μία εξωτερική. Κατά διαστήματα στη πυρηνική μεμβράνη εμφανίζονται πόροι, οι οποίοι σχηματίζονται από τη συνένωση των δύο στοιχειωδών μεμβρανών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην επικοινωνία του πυρήνα με το κυτταροπλασματικό χώρο, καθώς ελέγχουν την μεταφορά μορίων από και προς τον πυρήνα. Κατά τη σπερμιόγνεση, οι πυρηνικοί πόροι συνήθως αφαιρούνται. Ωστόσο, σε ορισμένα είδη (άνθρωπος, μυς, χάμστερ, χιμπατζής, ταύρος), έχουν διατηρηθεί στον στοιχειώδη πυρηνικό φάκελο, στη βάση του πυρήνα του σπέρματος (10).

Το περιπυρηνικό στρώμα, (καλούπι, μήτρα, PT) λειτουργεί προστατευτικά για το DNA της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, αποτελώντας ένα άκαμπτο κέλυφος, το οποίο περιέχει δομικές πρωτεΐνες, οι οποίες σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς και δημιουργούν σύμπλοκα με άλλα παρόντα πρωτεϊνικά μόρια. Κάποια από αυτά τα πρωτεϊνικά μόρια, πιθανά να συμμετέχουν στη διαδικασία της κυτταρικής επικοινωνίας, μιας και απελευθερώνονται από το περιπυρηνικό στρώμα στο εσωτερικό του ωαρίου κατά

τη γονιμοποίηση. Χωρίζεται σε τρία επιμέρους τμήματα, τα οποία αντανακλούν ουσιαστικά τα τρία τμήματα της κεφαλής του σπερματοζωαρίου και τα οποία εξυπηρετούν μοναδικές λειτουργίες κατά τη γονιμοποίηση του ωαρίου. Τα τμήματα αυτά είναι τα εξής:

1.Υποακροσωματική περιοχή (subacrosomal segment): Το υπο-ακροσωματικό τμήμα αποτελεί το κάλυμμα ή το καπάκι της κεφαλής, βρίσκεται στο πάνω μπροστινό ημισφαίριο της κεφαλής των σπερματοζωαρίων και συνιστά τη βάση του ακροσώματος. Αποτελεί «πόλειμμα» της συσκευής Golgi και περιέχει πρωτεάσες και υποδοχείς, απαραίτητους για την αλληλεπίδραση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη των ωαρίων.

2.Ισημερινή περιοχή (Equatorial Segment): Η περιοχή αυτή συνίσταται από ένα σύμπλοκο που σχηματίζει η περιουκλεϊκή περιοχή με την εσωτερική και την εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη. Περιέχει υποδοχείς που συμμετέχουν στην αρχική πρόσδεση του σπερματοζωαρίου με την πλασματική μεμβράνη του ωαρίου, αφότου το σπερματοζωάριο τρυπήσει τη διαφανή ζώνη και φτάσει στο χώρο μεταξύ της διαφανούς ζώνης και της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου.

3.Μετακροσωμική περιοχή (Postacrosomal seath, PAS): Στη περιοχή αυτή είναι παρών ένα σύνολο από πρωτεϊνικά σηματοδοτικά μόρια, που φαίνεται να συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του ωαρίου και τη περαιτέρω ανάπτυξη του ζυγωτού. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλα μόρια που φαίνεται να συμμετέχουν στη διαδικασία μετατροπής του αρσενικού πυρήνα σε προπυρήνα κατά το στάδιο σχηματισμού του ζυγώτη (9).

### **Ουρά σπερματοζωαρίου**

Αξονήμιο: Η δομή που είναι υπεύθυνη για τη μαστιγοειδή κίνηση που προωθεί το σπέρμα προς το ωάριο είναι το αξονήμιο. Το αξονήμιο αποτελείται από δύο κεντρικά μικροσωληνάρια, τα οποία περιβάλλονται από 9 ζεύγη μικροσωληναρίων. Τα εξωτερικά 9 ζεύγη μικροσωληναρίων περιβάλλονται επίσης από 9 εξωτερικές πυκνές ίνες, προσδίδοντας μια διευθέτηση 9+9+2. Κάθε εξωτερική ίνα είναι παράλληλη με ένα ζευγάρι μικροσωληναρίων, το πάχος τους είναι μεγαλύτερο στο πρόσθιο τμήμα της ουράς και ελαττώνεται σταδιακά προς το οπίσθιο άκρο. Η ουρά διακρίνεται σε τέσσερα επιμέρους τμήματα, το εσωτερικό των οποίων είναι κοινό με τη δομή των μικροσωληναρίων και των πυκνών ινών, ενώ το εξωτερικό τους διαφέρει.

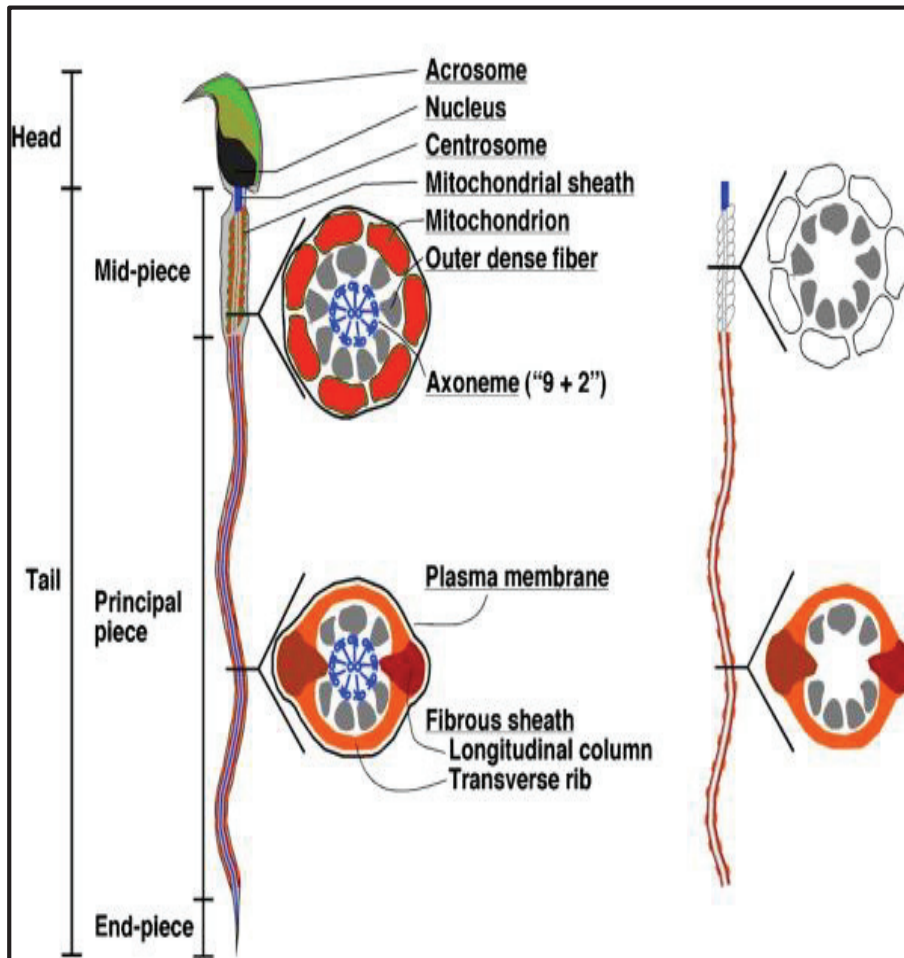
1.Τμήμα σύνδεσης: Αποτελείται από 9 τμηματικές ή ραβδωτές, γραμμωτές, λεπτές ίνες που αποτελούν συνέχεια των 9 πυκνών ινών του αξονημίου και θεωρούνται υπεύθυνες για τη σύνδεση με τα άκρα των πυκνών ινών. Μέσα σε αυτές είναι παρούσα μία πυκνή μάζα (caritulum), η οποία σε όλα τα θηλαστικά, πέραν των τρωκτικών, περιέχει το πρόσθιο κεντριόλιο. Το δεύτερο ή μακρινό κεντριόλιο αποικοδομείται κατά την ανάπτυξη του μεσαίου τμήματος. Η πλήρης αποικοδόμηση των δύο κεντριολίων κατά την σπερμιόγενεση αποτελεί στοιχείο διάκρισης μεταξύ των σπερματοζωαρίων στα τρωκτικά, στα οπληφόρα (ungulate), στα των σαρκοφάγα (carnivore) και στα πρωτεύοντα. Η βασική πλάκα παρέχει τη σύνδεση μεταξύ του πρόσθιου τμήματος και της κοιλότητας, που σχηματίζει η βάση του κεφαλιού του σπέρματος.

2.Μεσαίο Τμήμα: Το μεσαίο τμήμα περιβάλλεται από ένα μιτοχονδριακό περίβλημα, το οποίο αποτελείται από 70-100 μιτοχόνδρια, που παράγουν την απαραίτητη ενέργεια, για την κίνηση των σπερματοζωαρίων. Διευθετούνται το ένα πίσω από το άλλο και σχηματίζουν μία έλικα η οποία περιβάλλει το αξονήμιο του μεσαίου τμήματος. Κάθε μιτοχόνδριο περιέχει πολλαπλά αντίγραφα του πατρικού μιτοχονδριακού γενώματος. Τα μιτοχόνδρια που μεταφέρουν το πατρικό μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) αποδομούνται ή αποβάλλονται, από πρωτεολυτικά ένζυμα παρόντα στο εσωτερικό του ωαρίου, πιθανά γιατί φέρουν μεταλλάξεις, λόγω του οξειδωτικού στρες, που υφίστανται κατά τη διαδικασία ωρίμανσης.

3.Κύριο τμήμα: Το κύριο τμήμα χωρίζεται από το μεσαίο τμήμα από μία δομή γνωστή ως δακτύλιος (Annulus or Jensen's ring). Περιβάλλεται από μια ιώδη κάψα, η οποία περιβάλλει και παρέχει υποστήριξη στο αξονήμιο. Επίσης, φαίνεται πως πρωτεΐνες εντός αυτής της κάψας απομακρύνουν πρωτεϊνικές κινάσες, απαραίτητες για τη διαδικασία απόκτησης ικανότητας για γονιμοποίηση και τη διαδικασία της υπερενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων.

4.Τελικό ή ακραίο τμήμα (End Piece):Το τελικό τμήμα, περιέχει το αξονήμιο, τα τελικά τμήματα της ιώδους κάψας και τα τελικά τμήματα του εξωτερικού πυκνού στρώματος ινών (9).





Εικόνα 1.8: Δομή σπερματοζωαρίου μύος.

### 1.1.8 Απόκτηση γονιμοποιητικής ικανότητας των σπερματοζωαρίων

Η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων αρχίζει στις γονάδες, συνεχίζεται στην επιδιδυμίδα και ολοκληρώνεται στο εσωτερικό του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Τα σπερματοζώαρια μετά την απελευθέρωση τους στον αυλό των σπερματοφόρων σωληνάρων, αν και περιέχουν την κατάλληλη ποσότητα γενετικού υλικού και είναι μορφολογικά ώριμα, δεν έχουν αποκτήσει ικανότητα κίνησης και γονιμοποίησης. Ένας πλήρως ώριμος αρσενικός γαμέτης χαρακτηρίζεται από την ικανότητα αύξησης και μεταβολής του προτύπου της κίνησής του (hyperactivation) και από την ικανότητα της γονιμοποίησης (capacitation) και της σύντηξης του με το θηλυκό γαμέτη.

Στην επιδιδυμίδα αρχίζει η μετά-γοναδική ωρίμανση των σπερματοζωαρίων. Σε αυτό το στάδιο παρατηρούνται κάποιες τροποποιήσεις της μορφολογίας και της πρωτεϊνικής σύστασης των σπερματοζωαρίων, ωστόσο η σημαντικότερη αλλαγή αποτελεί η σταδιακή αύξηση των επιπέδων του cAMP και της κίνησής τους (11). Κατά την εκσπερμάτωση τα σπερματοζωάρια εμφανίζουν κινητικότητα, αλλά δεν έχουν ικανότητα γονιμοποίησης. Η απόκτηση ικανότητας για γονιμοποίηση (capacitation) των σπερματοζωαρίων, πραγματοποιείται μετά την είσοδό τους στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα και περιλαμβάνει μια σειρά μορφολογικών και βιοχημικών τροποποιήσεων, όπως αύξηση της μεμβρανικής ρευστότητας, μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης, αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων του cAMP, του  $Ca^{+2}$  και μία σημαντική μεταβολή στα φυσικά χαρακτηριστικά της κίνησής τους, που καλείται υπερενεργοποίηση (hyperactivation) (12).

### **1.1.9 Κίνηση υπερ-ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων**

Είναι δύσκολη η διατύπωση ενός ακριβούς όρου για τη περιγραφή των φυσικών χαρακτηριστικών της κίνησης των σπερματοζωαρίων κατά την υπερενεργοποίησή τους. Η κίνηση των σπερματοζωαρίων διαφέρει μεταξύ των ειδών και επηρεάζεται από τη σύσταση του περιβάλλοντος, στο οποίο βρίσκονται. Ο Yanagimachi το 1994 τη περιέγραψε ως εξής: τα σπερματοζωάρια μέσα στην επιδιδυμίδα είναι μη-ενεργά και σχεδόν ακίνητα (13). Όταν απελευθερώνονται στο σπερματικό υγρό *in vivo*, ή σε κάποιο καλλιεργητικό μέσο *in vitro*, αρχίζουν να «κολυμπούν» πολύ γρήγορα και με δύναμη ακολουθώντας σχεδόν μια ευθεία κατεύθυνση. Η κίνηση υπερενεργοποίησης, ορίζεται ως η κίνηση που παρατηρείται στα περισσότερα σπερματοζωάρια, όταν συλλέγονται από τον ωαγωγό κατά τη γονιμοποίηση. Η κίνηση του μαστιγίου χαρακτηρίζεται από έντονες, μη συμμετρικές αναδιπλώσεις και το σπερματοζωάριο κινείται σχεδόν κυκλικά. Η υπερενεργοποίηση θα πρέπει να συμβεί τη σωστή στιγμή και στο κατάλληλο σημείο για να πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση. Είναι πιθανή η ύπαρξη μηχανισμών και σηματοδοτικών μορίων, προερχόμενων από το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα που ελέγχουν αυτή τη διαδικασία. Το ανθρώπινο ωοθυλακικό υγρό φαίνεται να επηρεάζει κατά ένα δοσο-εξαρτώμενο τρόπο τη συχνότητα κάμψης του μαστιγίου και την υπερενεργοποίηση του σπερματοζωαρίου (14). Η ανίχνευση σπερματοζωαρίων με χαρακτηριστική κίνηση υπερενεργοποίησης στον ωαγωγό κουνελιών και μυών (13, 15), υποδεικνύουν επίσης, τη

πιθανή συμμετοχή του ωοθυλακικού υγρού και τα κοκκιωδών κυττάρων στον έλεγχο της διαδικασίας.

Για την έναρξη και τη διατήρηση της υπερενεργοποίησης *in vitro*, είναι απαραίτητοι παράγοντες όπως το  $Ca^{+2}$ , το cAMP και οι διττανθρακικοί μεταβολίτες. Το  $Ca^{+2}$  παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της κινητικότητας. Έχει δειχθεί, σε *in vitro* μελέτη, πως το εξωκυτταρικό  $Ca^{+2}$  είναι απαραίτητο για να διατηρείται η υπερενεργοποίηση των σπερματοζωαρίων στα χαμστερ (13). Αυξημένα επίπεδα cAMP έχουν συσχετιστεί με την κίνηση των σπερματοζωαρίων κατά την υπερενεργοποίηση (16). Ο Aoki και οι συνεργάτες του (1999) πρότειναν πως το cAMP, πιθανά εμπλέκεται στη ρύθμιση της κυματοειδής κίνησης του μαστίγιου μέσω διατήρησης της συγκέντρωσης του  $Ca^{+2}$  σε κατάλληλα επίπεδα (17). Οι διττανθρακικοί μεταβολίτες υποστηρίζουν την υπερενεργοποίηση σε σπερματοζωάρια μυός (18), πιθανά μέσω ρύθμισης της δράσης της αδενυλικής κυκλάσης του μαστίγιου (19). Η αδενυλική κυκλάση, η οποία απομονώθηκε πρόσφατα στα θηλαστικά σε διαλυτή μορφή, μπορεί να ενεργοποιηθεί από τους διττανθρακικούς μεταβολίτες (20).

### 1.1.10 Γονιμοποίηση

Η γονιμοποίηση ορίζεται ως η σύντηξη ενός αρσενικού και ενός θηλυκού γαμέτη, η οποία συνοδεύεται από τη συνένωση των πυρήνων τους. Τα κύρια χαρακτηριστικά της διαδικασίας είναι τα εξής:

1. Αναγνώριση γαμετών, έλξη, επαφή και συνένωση
2. Σύντηξη γαμετών και φραγμός στη πολυσπερμία
3. Μεταβολική ενεργοποίηση του ωαρίου
4. Ανακατατάξεις κυτταροπλασματικών ουσιών
5. Σύντηξη γενετικού υλικού

Τα σπερματοζωάρια κινούμενα στον ωαγωγό του θηλυκού ατόμου αποκτούν ικανότητα γονιμοποίησης, περνούν το στρώμα των κοκκιωδών κυττάρων που περιβάλλουν το ωάριο και προσδένονται στη διαφανή ζώνη. Η πρόσδεση πραγματοποιείται μεταξύ πρωτεϊνών της κεφαλής των σπερματοζωαρίων και γλυκοπρωτεϊνών (ZP3) στην επιφάνεια της διαφανούς ζώνης των ωαρίων. Την πρόσδεση ακολουθεί η αντίδραση ακροσώματος, κατά

την οποία η πλασματική μεμβράνη της κεφαλής του σπέρματος μεταβάλλεται κατά τέτοιον τρόπο, ώστε τα υποκείμενα προσδεμένα μεμβρανικά ένζυμα του ακροσώματος εκτίθενται προς τη διαφανή ζώνη. Τα ένζυμα αυτά διασπών τη διαφανή ζώνη και σχηματίζουν ένα άνοιγμα για τη δίοδο των σπερματοζωαρίων. Το σπερματοζωάριο, το οποίο διατρυπά ολόκληρη τη διαφανή ζώνη και φθάνει στη πλασματική μεμβράνη του ωαρίου, υπόκειται τήξη με αυτή και ακολούθως εισέρχεται σταδιακά στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου.

Η σύντηξη του ωαρίου μ' ένα και μόνο σπερματοζωάριο ενεργοποιεί μηχανισμούς, οι οποίοι εμποδίζουν τη σύντηξη πρόσθετων σπερματοζωαρίων με το ίδιο ωάριο. Εκκριτικοί θύλακες, τοποθετημένοι στην έξω περιφερική επιφάνεια του ωαρίου, εκχύνουν το περιεχόμενό τους στο στενό χώρο που χωρίζει τη μεμβράνη του ωαρίου και τη διαφανή ζώνη. Κάποια από τα συστατικά που εκκρίνονται είναι ένζυμα που εισέρχονται στη διαφανή ζώνη και προκαλούν απενεργοποίηση των υποδοχέων του σπέρματος και γενική σκλήρυνση ολόκληρης της ζώνης. Αποφεύγεται έτσι, η πρόσδεση νέων σπερματοζωαρίων, διακόπτεται η πορεία των ήδη προσδεμένων σπερματοζωαρίων και εμποδίζεται η πολυσπερμία, η οποία συνήθως οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη.

Το γονιμοποίητο ωάριο χαρακτηρίζεται από περιορισμένες μεταβολικές δραστηριότητες. Το έναυσμα για την έναρξη των μεταβολικών λειτουργιών θεωρείται ότι το παρέχει η γονιμοποίηση. Η μεταβολική ενεργοποίηση περιλαμβάνει αύξηση της δραστηριότητας ορισμένων ενζύμων και έναρξη της μακρομοριακής σύνθεσης, ώστε να διασφαλιστεί η κυτταρική διαίρεση και η εμβρυογένεση. Η γονιμοποίηση επιφέρει επίσης ουσιαστική αναδιοργάνωση των κυτταροπλασματικών συστατικών. Το γονιμοποιημένο ωάριο συμπληρώνει τη δεύτερη μειωτική του διαίρεση, αποβάλλεται το δεύτερο πολικό σωματίο και σχηματίζεται ο θηλυκός απλοειδής γαμέτης. Οι δύο απλοειδείς γαμέτες, περιβαλλόμενοι από ειδικές μεμβράνες (θηλυκός και αρσενικός προπυρήνας) μεταναστεύουν προς το κέντρο του κυττάρου, αντιγράφουν το DNA τους, οι προπυρηνικές μεμβράνες διαλύονται και ο μονοκύτταρος ζυγώτης είναι έτοιμος για να διαιρεθεί μιτωτικά.

Στο μυ, σχεδόν  $58 \times 10^6$  σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στο εσωτερικό του αναπαραγωγικού συστήματος του θηλυκού. Μέσα σε 5 λεπτά, ένα μέρος από αυτά φθάνει στον ωαγωγό και σχεδόν σε μία ώρα αποκτούν ικανότητα γονιμοποίησης. Σ' ένα διάστημα 24 ωρών στο μονοκύτταρο ζυγώτη ο αρσενικός και ο θηλυκός προπυρήνας αντιγράφουν το

γενετικό τους υλικό και είναι έτοιμοι να διαιρεθούν μιτωτικά, ώστε να σχηματιστεί το έμβρυο στο στάδιο των δύο κυττάρων. Η πρώτη και η δεύτερη μιτωτική διαίρεση πραγματοποιούνται ανά 12 ώρες και τα βλαστομερίδια που προκύπτουν έχουν το ίδιο μέγεθος. Η διαίρεση που έπεται του σταδίου των 8 κυττάρων οδηγεί στη μετατροπή του εμβρύου σε μία συμπαγή δομή το μορίδιο, όπου τα βλαστομερίδια αυξάνουν την μεταξύ τους επιφάνεια επαφής (21). Τα εξωτερικά κύτταρα του μοριδίου εκκρίνουν υγρό στο εσωτερικό της μάζας του μοριδίου και δημιουργείται μια κοιλότητα, το βλαστόκοιλο. Ακολουθούν ασύμμετρες μιτωτικές διαιρέσεις των βλαστομεριδίων, η κοιλότητα μετατοπίζεται στο ένα άκρο του εμβρύου στο στάδιο των 32 κυττάρων και το έμβρυο ονομάζεται βλαστοκύστη. Σε αυτό το στάδιο διακρίνονται δύο διακριτοί πληθυσμοί κυττάρων, η ομάδα των κυττάρων που συγκεντρώνονται στο ένα άκρο και σχηματίζουν την εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner cell mass) και η εξωτερική στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλουν την κοιλότητα της βλαστοκύστης. Η εσωτερική κυτταρική μάζα θα αποτελέσει το μελλοντικό έμβρυο και θα δώσει γένεση σε εξωεμβρυϊκές δομές, όπως το άμνιο. Από τους απογόνους της εξωτερικής μάζας κυττάρων θα σχηματιστεί ο τροφοβλάστης, που σχηματίζει το χόριο και το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα (22, 23). Ο σχηματισμός της βλαστοκύστης ολοκληρώνεται σε 3.5 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Σε *in vitro* μελέτες προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μύος, ο χρόνος αυτός συνήθως αυξάνεται κατά 24 ώρες (24).

Η πορεία της πρώιμης εμβρυϊκής ανάπτυξης και της μετέπειτα εμφύτευσης εξαρτάται από την επιτυχή εκτέλεση του γενετικού και αναπτυξιακού προγράμματος του εμβρύου, καθώς και την αλληλεπίδραση του εμβρύου με το περιβάλλον χώρο του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος. Στις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις χρησιμοποιούνται πρωτεΐνες και RNA που έχουν συντεθεί κατά την ωογένεση και έχουν αποθηκευτεί στο ωάριο. Ωστόσο, πολλά από αυτά τα συστατικά αποικοδομούνται με αποτέλεσμα στο στάδιο των δύο κυττάρων να υπάρχει μόνο το 25% των polyA<sup>+</sup>RNA και το 50% των πρωτεϊνών μητρικής προέλευσης (25-27).

Το γενετικό πρόγραμμα και η πορεία ανάπτυξης του εμβρύου ελέγχεται περαιτέρω από την ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γενώματος που παρατηρείται μετά το στάδιο των δύο κυττάρων και στο στάδιο μεταξύ 4-8 κυττάρων (28-30). Έχει αναφερθεί και μία πρώτη ενεργοποίηση του γενώματος του αρσενικού προπυρήνα κατά το στάδιο του μονοκύτταρου ζυγώτη, αλλά είναι μικρής κλίμακας (31). Για τη φυσιολογική πορεία ανάπτυξης του

εμβρύου ως το σχηματισμό της βλαστοκύστης, ενεργοποιούνται κυρίως γονίδια που κωδικοποιούν αυξητικούς παράγοντες, συστατικά σύνδεσης των κυττάρων και μεταφορείς ιόντων διαμέσου των πλασματικών μεμβρανών. Το ποια γονίδια θα εκφραστούν εξαρτάται κυρίως από τη γονιδιακή αποτύπωση και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες του θηλυκού αναπαραγωγικού συστήματος.

## 1.2 Μηχανισμοί μεθυλίωσης του DNA των γαμετών

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους κύριους επιγενετικούς μηχανισμούς ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης. Συνδέεται με τη διαδικασία της αποσιώπησης των γονιδίων (gene silencing), της γονιδιακής αποτύπωσης (genomic imprinting), της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X (X inactivation) και της διαμόρφωσης της δομής της χρωματίνης (32-34). Ταυτόχρονα, φαίνεται πως συμμετέχει στη διαδικασία ελέγχου της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων συνιστώντας έναν μηχανισμό άμυνας του κυττάρου, ο οποίος συμβάλλει στη διατήρηση της ακεραιότητας και της σταθερότητας του γενώματος (35). Το πρότυπο μεθυλίωσης των πλήρως διαφοροποιημένων σωματικών κυττάρων είναι σταθερό και κληρονομήσιμο. Ωστόσο, στα θηλαστικά υπάρχουν τουλάχιστον δύο αναπτυξιακά στάδια, το στάδιο της γαμετογένεσης και το στάδιο της εμβρυϊκής προεμφυτευτικής ανάπτυξης, στα οποία παρατηρείται μία νέα σειρά επιγενετικών τροποποιήσεων, που οδηγεί στην εγκαθίδρυση και τη διατήρηση ενός νέου προφίλ μεθυλίωσης των κυττάρων (34).

Η μεθυλίωση συνιστά μια χημική τροποποίηση της δομής του DNA μετά από προσθήκη μιας μεθυλομάδας (-CH<sub>3</sub>) στον C-5 των καταλοίπων της κυτοσίνης, στα δινουκλεοτίδια CpG (5-CpG-3') (36). Αυτή η προσθήκη αποτελεί τη πιο συχνή μορφή μεθυλίωσης μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA, καθώς έχει επίσης παρατηρηθεί, μεθυλίωση της αδερίνης στη θέση N-6 και της κυτοσίνης στη θέση N-4 (37-39).

Τα CpG δινουκλεοτίδια απαντώνται τόσο σε χαμηλή όσο και σε υψηλή συχνότητα σε διάφορες περιοχές του γενώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών. Συνήθως μεθυλιώνται μόνο στις περιοχές που είναι παρόντα σε χαμηλή συχνότητα. Οι περιοχές υψηλής συχνότητας, όπου το ποσοστό των CpG δινουκλεοτιδίων είναι περίπου 60%, ονομάζονται CpG νησίδες (CpG islands). Το μέγεθός τους είναι περίπου 1-2Kb, εντοπίζονται κοντά ή και μέσα στους υποκινητές των γονιδίων και είναι συνήθως υπομεθυλιωμένες (40). Ο

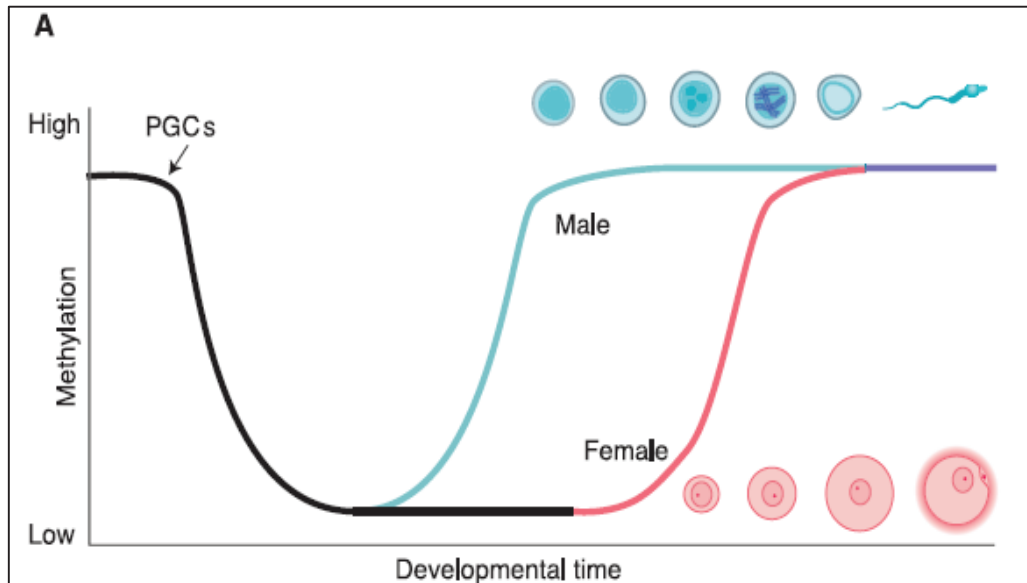
έλεγχος του προτύπου μεθυλίωσης των περιοχών αυτών είναι ιδιαίτερα σημαντικός και έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων γενετικών νοσημάτων, καθώς επηρεάζει την έκφραση και τη φυσιολογική λειτουργία των γονιδίων. Έχει δειχθεί ότι η υπερμεθυλίωση των υποκινητών οδηγεί στην εμφάνιση διάφορων μορφών καρκίνου, λόγω αποσιώπησης ογκοκατασταλτικών γονιδίων, ενώ η υπομεθυλίωση είναι δυνατό να οδηγήσει στη μη φυσιολογική έκφραση πρωτο-ογκογονιδίων και σε γενωμική αστάθεια (36).

Η προσθήκη της μεθυλομάδας καταλύεται από μια οικογένεια ενζύμων, τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς έχουν χαρακτηριστεί πέντε μέλη αυτής της οικογένειας (Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3L), τα οποία χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες ανάλογα με τον τρόπο δράσης τους. Στην πρώτη ομάδα ανήκουν οι μεθυλοτρανσφεράσες που εμπλέκονται στη *de novo* μεθυλίωση του DNA και στη δεύτερη ομάδα οι μεθυλοτρανσφεράσες που δρουν σε ημι-μεθυλιωμένο DNA, για τη διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης κατά την αντιγραφή του DNA και τη κυτταρική διαίρεση. Καλύτερα μελετημένες είναι οι μεθυλοτρανσφεράσες Dnmt3a και Dnmt3b που καταλύουν αντιδράσεις *de novo* μεθυλίωσης, και η Dnmt1, η οποία καταλύει τις αντιδράσεις διατήρησης της μεθυλίωσης (37, 41).

### 1.2.1 Επιγενετική τροποποίηση των γαμετών και του εμβρύου

Τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα είναι αρκετά μεθυλιωμένα και εμφανίζουν κανονικά πρότυπα μεθυλίωσης. Όταν εισέρχονται στις γονάδες, παρατηρείται ένα κύμα απομεθυλίωσης, με το οποίο διαγράφεται το πρότυπο της γονιδιακής αποτύπωσης. Μετά την απομεθυλίωση, οι θηλυκοί και οι αρσενικοί γαμέτες εισέρχονται στη φάση της μειωτικής (θηλυκοί) και μιτωτικής παύσης (αρσενικοί). Η παύση των περαιτέρω διαιρέσεων είναι πιθανό να προφυλάσσει το απομεθυλιωμένο γένωμα των γαμετών από την αύξηση της συχνότητας μεταλλάξεων και των δομικών ανωμαλιών στα χρωμοσώματα.

Η επαναμεθυλίωση αρχίζει με την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωαρίων και των σπερματοζωαρίων για την επαναφορά της γονιδιακής αποτύπωσης. Οι μεθυλοτρανσφεράσες Dnmt3a και Dnmt3b είναι εκείνες που πιθανά καταλύουν τη *de novo* προσθήκη μεθυλομάδων σε αυτό το στάδιο. Οι πλήρως ώριμοι γαμέτες είναι σε μεγάλο βαθμό μεθυλιωμένοι.

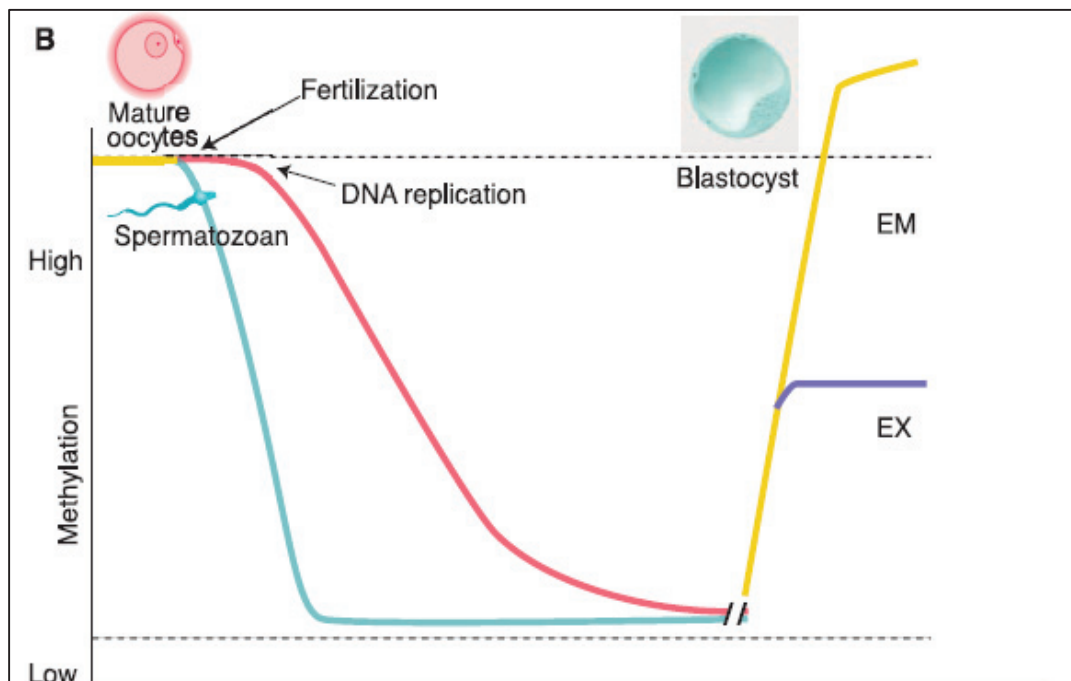


Εικόνα1.9: Προφίλ μεθυλίωσης γαμετικών κυττάρων του μύος.

Κατά τη γονιμοποίηση οι δύο γαμέτες βρίσκονται σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο, με διαφορετικά επιγενετικά σήματα και διαφορετικό βαθμό συμπύκνωσης της χρωματίνης. Ο αρσενικός γαμέτης είναι απλοειδής και έχει σε μεγάλο βαθμό πακεταρισμένο το DNA του με πρωταμίνες, ενώ το ωάριο είναι διπολοειδές και βρίσκεται στο στάδιο της μετάφασης II (42). Μετά τη γονιμοποίηση, ο θηλυκός γαμέτης ολοκληρώνει τη δεύτερη μειωτική διαίρεση. Το γένωμα του πατρικού γαμέτη πριν την ολοκλήρωση της αντιγραφής του, αρχίζει να απομεθυλιώνεται και να υφίσταται αξιοσημείωτες αλλαγές με την αντικατάσταση των πρωταμινών από ακετυλιωμένες ιστόνες (34). Υπάρχουν τμήματα τα οποία δεν απομεθυλιώνονται και περιλαμβάνουν τις περιοχές της ετεροχρωματίνης στα κεντροσώματα ή κοντά σε αυτά, τα IAP ρετρομεταθετά στοιχεία και τα πατρικής προέλευσης γονίδια αποτύπωσης. Αυτό συμβάλλει, αντίστοιχα, στη διατήρηση της ακεραιότητας και της σταθερότητας των χρωμοσωμάτων, στον έλεγχο της έκφρασης των IAP, καθώς και στη διατήρηση του πατρικού γονιδιακού αποτυπώματος (42). Είναι ενδιαφέρον πως οι οργανισμοί στους οποίους η ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γενώματος παρατηρείται νωρίς (2– 8 κύτταρα) κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη (άνθρωπος, μύς, γουρούνι), εμφανίζουν εκτενέστερη απομεθυλίωση του ζυγώτη, σε σχέση με τους οργανισμούς των οποίων το γένωμα ενεργοποιείται σε μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης (πρόβατο και κουνέλι) (42). Αν και η απομεθυλίωση σε αυτό το στάδιο, φαίνεται να οδηγεί σε πολυδύναμα κύτταρα με μεγάλο αναπτυξιακό δυναμικό, είναι ενδιαφέρον να



μελετηθεί και η πιθανή συνεισφορά γονιδίων, η απομεθυλίωση των οποίων, είναι απαραίτητη τόσο για τη μεταγραφική δραστηριότητα του εμβρύου στα πρώιμα στάδια, όσο και για την περαιτέρω ανάπτυξή του. Η απομεθυλίωση του ζυγώτη ακολουθείται από μία νέα μεθυλίωση στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Τα βασικά γεγονότα της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού του ζυγώτη, φαίνεται πως είναι καλά συντηρημένα μεταξύ των θηλαστικών, αν και υπάρχουν κάποιες χρονικές διαφοροποιήσεις, όσον αφορά το στάδιο επαναμεθυλίωσης. Στα ανθρώπινα έμβρυα παρατηρείται από το στάδιο των 8 κυττάρων μέχρι το στάδιο των 10 κυττάρων, ενώ στα έμβρυα του ποντικού παρατηρείται στην εσωτερική κυτταρική μάζα (Inner Cell Mass-ICM), κατά την ανάπτυξη της βλαστοκύστης (34). Αυτό το μεταζυγωτικό κύμα απομεθυλίωσης και μεθυλίωσης, θεωρείται ότι συμμετέχει στην απομάκρυνση τυχόν επιγενετικών τροποποιήσεων, οι οποίες προκλήθηκαν κατά τη γαμετογένεση.



Εικόνα 1.10: Προφίλ μεθυλίωσης κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μυός.

### 1.3 DNA επαναλαμβανόμενες ακολουθίες

Τα τελευταία χρόνια η τεχνική της αλληλούχισης μας έχει προσφέρει σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη δομή, την οργάνωση και το μέγεθος του γονιδιώματος πολλών ευκαρυωτικών οργανισμών. Η ετερογένεια που παρουσιάζει το γονιδίωμα μεταξύ των

διαφόρων οργανισμών, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη παρουσία των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Repetitive Elements). Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες απαντούν σε πολλά αντίγραφα και συνιστούν ένα εξαιρετικά σημαντικό ποσοστό του γονιδιώματος σχεδόν, όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Στον παρακάτω πίνακα απεικονίζεται το ποσοστό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και το ποσοστό των περιοχών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο DNA διαφορετικών οργανισμών.

Species	Genome size <sup>1</sup>	% repetitive DNA	% coding sequences	Reference
<b>Animals</b>				
<i>Caenorhabditis elegans</i>	100 MB	16.5	14	Stein <i>et al.</i> (2003)
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	104 MB	22.4	13	Stein <i>et al.</i> (2003)
<i>Drosophila melanogaster</i>	175 MB	33.7 (female) ~57 (male) <sup>2</sup>	<10	Bennett <i>et al.</i> (2003); Celniker <i>et al.</i> (2002)
<i>Ciona intestinalis</i>	157 MB	35	9.5	Dehal <i>et al.</i> (2002)
<i>Fugu rubripes</i>	365 MB	15	9.5	Aparicio <i>et al.</i> (2002)
<i>Canis domesticus</i>	2.4 GB	31	1.45	Kirkness <i>et al.</i> (2003)
<i>Mus musculus</i>	2.5 GB	40	1.4	Mouse Genome Sequencing Consortium (2002)
<i>Homo sapiens</i>	2.9 GB	≥50	1.2	International Human Genome Consortium (2001)
<b>Plants</b>				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	125–157 MB	13–14	21	<i>Arabidopsis</i> Genome Initiative (2000) Bennett <i>et al.</i> (2003)
<i>Oryza sativa</i> (indica)	466 MB	42	11.8	Yu <i>et al.</i> (2002)
<i>Oryza sativa</i> (Japonica)	420 MB	45	11.9	Goff <i>et al.</i> (2002)
<i>Zea mays</i>	2.5 GB	77	1	Meyers <i>et al.</i> (2001)

<sup>1</sup> MB= megabases (10<sup>6</sup> base pairs), GB= gigabases (10<sup>9</sup> base pairs).  
<sup>2</sup> The *D. melanogaster* Y chromosome is largely heterochromatic repetitive DNA.

Πίνακας 1.1: Ποσοστό επαναλαμβανόμενων ακολουθιών και ακολουθιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο DNA διαφορετικών οργανισμών.

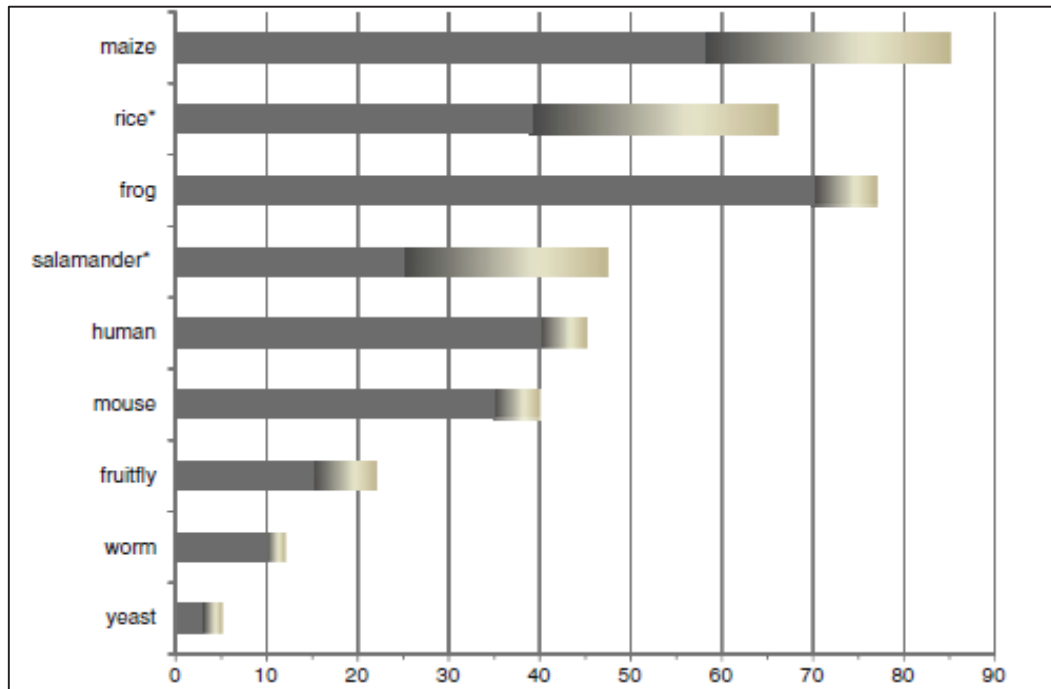
Ο αριθμός και το είδος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών είναι μεγάλο. Ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις παράλληλες επαναλήψεις (Tandem Repeats) και τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια (Transposable Elements).

### 1.3.1 Παράλληλες επαναλήψεις DNA

Οι παράλληλες επαναλήψεις συνιστούν μικρές, μη κωδικές, επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες, με προσανατολισμό στο γένωμα “head-to-tail”. Σύμφωνα με το μέγεθος της κάθε επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας και το συνολικό μήκος που σχηματίζουν, διακρίνονται σε *microsatellites repeats* και σε *minisatellites repeats*. Τα *microsatellites repeats* έχουν μέγεθος 2-5bp και το συνολικό μήκος τους μπορεί να φθάσει μέχρι και κάποιες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων, ενώ τα *minisatellites repeats* έχουν μέγεθος 30-35bp, με ένα συντηρημένο πυρήνα μεγέθους 10-15bp, το συνολικό μήκος των οποίων μπορεί να κυμανθεί από 1-15kb. Στις παράλληλες επαναλήψεις ανήκουν επίσης και οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που παρατηρούνται στα κεντρομερή και στα τελομερή των χρωμοσωμάτων (*satellite repeats*). Αν και ορισμένες φορές οι παράλληλες επαναλήψεις έχουν εντοπιστεί σε κωδικές περιοχές γονιδίων (*Huntingtin gene in vertebrates*), τα ίδια δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη, ούτε εμφανίζουν κάποια ιδιότητα υποκινητή ή ενισχυτή της γονιδιακής έκφρασης. Στη πλειοψηφία των οργανισμών, βρίσκονται στη περικεντρική ετεροχρωματίνη και στα τελομερή, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση της δομής των χρωμοσωμάτων (43).

### 1.3.2 Μεταθετά Στοιχεία

Η άλλη μεγάλη ομάδα επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, τα μεταθετά στοιχεία, αποτελούν DNA αλληλουχίες που έχουν την ικανότητα να μετατίθενται, από ένα σημείο σε άλλο, εντός του γενώματος του κυττάρου τους. Σε αντίθεση με τις παράλληλες επαναλήψεις, τα μεταθετά στοιχεία έχουν καθορισμένη δομή και συγκεκριμένο μέγεθος, εμφανίζουν στα άκρα τους μικρές επαναλήψεις και κωδικοποιούν ειδικές πρωτεΐνες, απαραίτητες για τη μετακίνησή τους. Στον παρακάτω πίνακα, απεικονίζεται το ποσοστό των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα διαφορετικών οργανισμών (44).



Πίνακας 1.2: Ποσοστό μεταθετών στοιχείων (%) στο γένωμα διαφορετικών οργανισμών

Με βάση το μηχανισμό μετάθεσής τους, τα μεταθετά στοιχεία, διακρίνονται σε δύο μεγάλες ομάδες, τα RNA τρανσποζόνια ή ρετροτρανσποζόνια ή ρετρομεταθετά στοιχεία (Class I) και τα DNA τρανσποζόνια (Class II). Τα μεταθετά στοιχεία και των δύο ομάδων υποδιαιρούνται περαιτέρω σε επιμέρους κατηγορίες, σύμφωνα με τη παρουσία ή όχι τελικών επαναλήψεων στα άκρα τους, το είδος των γονιδίων που κωδικοποιούν και τον ακριβή μηχανισμό μετάθεσής τους. Εάν ένα μεταθετό στοιχείο εκφράζει όλες τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μετακίνησή του, τότε αναφέρεται ως αυτόνομο μεταθετό στοιχείο, ενώ σε αντίθετη περίπτωση, όπου είτε εκφράζει μόνο κάποιες από τις απαραίτητες για τη μετακίνησή του πρωτεΐνες ή δεν εκφράζει καμία, τότε καλείται μη αυτόνομο μεταθετό στοιχείο.

### 1.3.3 RNA τρανσποζόνια

Τα RNA τρανσποζόνια μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού, copy and paste, όπου το αρχικό αντίγραφο μεταγράφεται σ' ένα ενδιάμεσο μόριο ρετροτρανσποζονιακού mRNA, μεταγράφεται αντίστροφα σε cDNA και τελικά ενσωματώνεται σε νέα θέση, αυξάνοντας

το συνολικό αριθμό αντιγράφων του τρανσποζονίου στο γένωμα. Τα RNA τρανσποζόνια υποδιαιρούνται σε δύο κύριες ομάδες, τα LTR και τα non LTR ρετροτρανσποζόνια.

### 1.3.3.1 LTR ρετροτρανσποζόνια

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια εμφανίζουν στο 5' και στο 3' άκρο τους χαρακτηριστικές μακρές τελικές επαναλήψεις (Long Terminal Repeats-LTRs) και παρουσιάζουν κοινά δομικά χαρακτηριστικά με τους ρετροϊούς. Περιέχουν το γονίδιο gag, που κωδικοποιεί δομικές πρωτεΐνες υπεύθυνες για την ωρίμανση του RNA γονιδιώματος και το γονίδιο pol, που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη με ενεργότητες πρωτεάσης, ανάστροφης μεταγραφάσης, RnaseH και ιντεγκράσης. Δεν περιέχουν το γονίδιο env, που κωδικοποιεί λειτουργικές δομικές καψιδιακές πρωτεΐνες. Χωρίζονται περαιτέρω σε τρεις κύριες οικογένειες α. Ty1/copia, β. Ty3/gypsy και γ. BEL. Στον άνθρωπο συνιστούν το 8.3% του γενώματός του και στο μυ το 9.87% (45). Οι ενδογενείς ρετροϊοί (Endogenous Retroviruses-ERVs) προέρχονται από μολύνσεις αρχαίων ρετροϊών και απαντώνται στο γένωμα όλων των σπονδυλωτών. Η πλειοψηφία των ενδογενών ρετροϊών απαντά στο γένωμα με τη μορφή LTRs που πιθανά προέρχονται από τον ομόλογο ανασυνδυασμό, πλήρους μήκους, LTRs στοιχείων (46). Εξελικτικά νεότερα, μεταγραφικά ενεργά ρετροτρανσποζόνια στον άνθρωπο είναι τα ERV-I, ERV-II και τα ERV-K (47) και στο μυ τα Intracisternal A Particle-IAP (48).

Η ρετρομετάθεση των LTR στοιχείων αρχίζει με τη μεταγραφή τους από την RNA πολυμεράση II, από το 5'LTR, προς το 3'LTR άκρο. Το παραγόμενο RNA μετάγραφο, μεταφράζεται στη πρωτεΐνη Gag και στις πρωτεΐνες σύντηξης Gag-Pro-Pol. Η πρωτεΐνη Gag δημιουργεί ένα ψευδοϊκό κυστίδιο, στο οποίο εγκαψιδιώνει το mRNA και τις πρωτεΐνες σύντηξης. Η ενεργότητα πρωτεάσης της πρωτεΐνης Pro επεξεργάζεται την πρωτεΐνη Gag και τις πρωτεΐνες σύντηξης, ενώ η πρωτεΐνη Pol δρα ταυτόχρονα ως ανάστροφη μεταγραφάση, RNAase H και ιντεγκράση. Μέσα στο ψευδοϊκό κυστίδιο, το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης, χρησιμοποιεί ένα μεταφορικό μόριο RNA ως υποκινητή και αρχίζει την ανάστροφη μεταγραφή από το τελικό άκρο του μορίου mRNA, ενώ η RNAase H, ξεκινά τη σύνθεση του δεύτερου κλώνου από το νεοσυντιθέμενο cDNA. Η ιντεγκράση αρχικά δημιουργεί ένα σύμπλοκο με το παραχθέν cDNA, στη συνέχεια προσδένεται στη θέση στόχο του γενώματος, προκαλεί δίκλωνη θραύση και

συνδέει τα 3' άκρα του κάθε cDNA κλώνου, στη θέση στόχο. Η προσθήκη και η σύνδεση των νουκλεοτιδίων στα κενά που σχηματίζονται στα 5' άκρα, πραγματοποιούνται από τη δράση των πρωτεϊνικών μηχανισμών του κυττάρου (49).

### 1.3.3.2 YR ρετροτρανσποζόνια

Μία άλλη ομάδα LTRs στοιχείων, με δομή διαφορετική από τα υπόλοιπα LTR ρετροτρανσποζόνια, είναι εκείνη των tyrosine-recombinase encoding retrotransposons or YR retrotransposons (50). Η πιο σημαντική διαφορά τους είναι πως δεν εκφράζουν την ιντεγκράση, αλλά αντιθέτως μία τυροσινική πρωτεΐνη ανασυνδυασμού (tyrosine recombinase). Το πρώτο YR retrotransposon εντοπίστηκε στον οργανισμό *Dictyostelium discoideum* και ονομάστηκε DIRS (51). Στη συνέχεια εντοπίστηκαν και στο γένωμα αρκετών μυκήτων, φυτών και ζώων. Τα YR retrotransposons χωρίζονται σε δύο κύριες ομάδες α. τα DIRS like elements, τα οποία περιβάλλονται από ανάστροφες επαναλήψεις και περιέχουν εσωτερικές συμπληρωματικές περιοχές και β. τα PAT και τα Ngaro elements, τα οποία περιέχουν διαιρούμενες ευθείες επαναλήψεις. Η μη συνηθισμένη δομή των τελικών επαναλήψεων των YR retrotransposons, θεωρείται απαραίτητη για την αντιγραφή τους, μέσω ενός ελεύθερου ενδιάμεσου κυκλικού μορίου (51, 52). Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει αλληλουχίες παρόμοιες του DIRS1-recombinase gene, όμως μέχρι σήμερα, δεν έχει ταυτοποιηθεί το πλήρες γένωμά τους.

### 1.3.3.3 Non LTR ρετροτρανσποζόνια

Τα non LTR ρετροτρανσποζόνια χωρίζονται σε δύο μεγάλες υποομάδες, τα αυτόνομα, μακρά διάσπαρτα ρετρομεταθετά στοιχεία LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements) και τα μη αυτόνομα, βραχέα διάσπαρτα ρετρομεταθετά στοιχεία SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements).

Τα LINEs απαντώνται σε μεγάλο ποσοστό στο γένωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών και αποτελούν σχεδόν το 21% του ανθρώπινου γενώματος και το 19.2% του γενώματος του μύος (45, 53). Χωρίζονται επιμέρους στις οικογένειες των LINEs-1, LINEs-2 και LINEs-3. Τα στοιχεία LINEs-2 και LINEs-3 είναι εξελικτικά παλαιότερα από τα LINEs-1 και αποτελούν το 3% και το 0.38% (LINEs-2 ) και το 0.3% και 0.05% (LINEs-3) του

γενώματος του ανθρώπου και του μύος, αντίστοιχα (54). Παρά το μικρό αριθμό αντιγράφων τους, η παρουσία τους φαίνεται να είναι απαραίτητη για το κύτταρο, καθώς για παράδειγμα τα LINEs-2 στοιχεία θεωρείται ότι αποσιωπούν ειδικά και ισχυρά τα T-κύτταρα (55). Τα LINEs-1 είναι τα μόνα ενεργά στοιχεία στον άνθρωπο (56, 57). Ο αριθμός αντιγράφων πλήρους μήκους στοιχείων L1, στο ανθρώπινο γένωμα είναι 3.000-5.000, από τα οποία μόνο τα 80-100 είναι ενεργά (58, 59). Στο μυ, υπάρχουν αντίστοιχα, 10.000-12.000 πλήρους μήκους στοιχεία L1, εκ των οποίων περίπου τα 3.000 είναι ενεργά (60).

Ένα LINE-1 στοιχείο, πλήρους μήκους, έχει μέγεθος 6kb και αποτελείται από μία 5'αμετάφραστη περιοχή, με ενεργότητα εσωτερικού υποκινητή, μία 3'αμετάφραστη περιοχή, που περιέχει λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης (polyA signal) και δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης ORF-1 και ORF-2. Το ORF-1 κωδικοποιεί τη πρωτεΐνη p40, η οποία σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα και κατέχει ενεργότητα συνοδού νουκλεϊκών οξέων. Το ORF-2 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 150KDa, με τρεις συντηρημένες περιοχές α. μία αμινοτελική περιοχή με ενεργότητα ενδονουκλεάσης, β. μία κεντρική περιοχή με ενεργότητα ανάστροφης μεταγραφάσης και γ. μία καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνη (61, 62). Τα LINEs χρησιμοποιούν αυτή την ενζυμική μηχανή για την in-cis ρετρομετάθεσή τους, που πραγματοποιείται με τον μηχανισμό target primed reverse transcription (TPRT). Κατά τη ρετρομετάθεσή τους, η ενδονουκλεάση κόβει επιλεκτικά το DNA στην αλληλουχία 5'-TTTT/AA-3' και ενσωματώνονται σε ένα μεγάλο αριθμό θέσεων στο γένωμα (63-66). Μετά τη μεταγραφή του L1 RNA, ακολουθεί η μετάφραση των πρωτεϊνών του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης ORF-1 και ORF-2 (ORF-1p, ORF-2p). Η ORF-1p σχηματίζει ένα ριβονουκλεοπρωτεϊνικό σύμπλοκο με το L1 RNA και την ORF-2p. Το σύμπλοκο συνδέεται στο DNA και η πρωτεΐνη ORF-2p, με τη δράση της ενδονουκλεάσης, κόβει τη μία αλυσίδα του DNA επιλεκτικά, όπως στις θέσεις στόχους, πλούσιες σε αδεΐνη (A) και θυμίνη (T). Στη συνέχεια, η ORF-2p, με την ενεργότητα της ανάστροφης μεταγραφάσης, χρησιμοποιεί το 3'-OH ελεύθερο άκρο και συνθέτει νουκλεοτίδια, συμπληρωματικά προς το L1 RNA, αρχίζοντας από την πολυαδενυλιωμένη ουρά (poly(A)-tail). Ακολουθεί η θραύση και της δεύτερης αλυσίδας του DNA στη θέση στόχο, παρέχοντας μία νέα θέση ελεύθερου 3'-OH άκρου, για την έναρξη σύνθεσης του δεύτερου κλώνου του L1 DNA. Τα νουκλεοτιδικά κενά που προκύπτουν στο 5'άκρο κάθε L1 DNA κλώνου, συντίθενται και συνδέονται από

πρωτεϊνικές μηχανές του κυττάρου. Ο μηχανισμός ρετρομετάθεσης target primed reverse transcription (TPRT), οδηγεί σε διπλασιασμό της θέσης στόχου, στη παρουσία 3'-πολυαδενυλιωμένης αλληλουχίας (poly(A)-tail) και σε κολοβωμένο 5' άκρο, όταν η ανάστροφη μεταγραφή είναι ατελής (49).

Τα στοιχεία SINEs συνιστούν περίπου το 13% του ανθρώπινου γενώματος και το 8% του γενώματος του μύος (45, 53). Στο ανθρώπινο γένωμα απαντούν σε δύο κύριες οικογένειες α. Mammalian Wide Interspersed Repeats MIR-tRNA like SINEs, σε ποσοστό 2% και β. Alu-7SL RNA-derived elements, σε ποσοστό 10%, τα οποία αποτελούν και τις πιο συχνές επαναλήψεις στο ανθρώπινο γένωμα (45). Ένας μεγάλος αριθμός γεγονότων ρετρομετάθεσης των Alu, πραγματοποιήθηκε πριν από 50-60 εκατομμύρια χρόνια και από τότε η συχνότητά τους έχει μειωθεί στο ένα γεγονός ρετρομετάθεσης ανά 20-125 νέες γεννήσεις (67, 68).

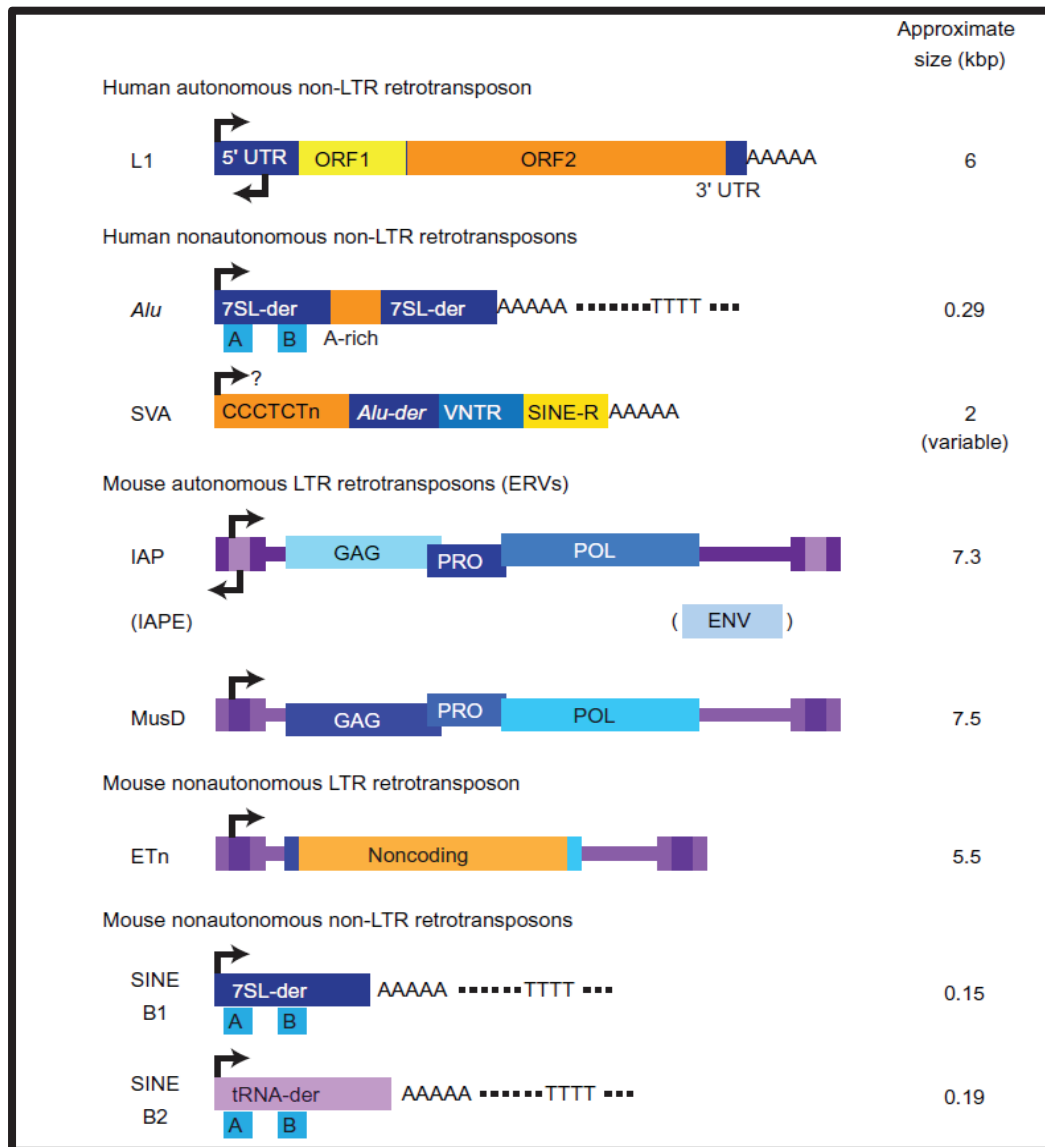
Το μέγεθος των SINEs είναι μικρό (<500bp), δεν κωδικοποιούν καμία πρωτεΐνη και για τη ρετρομετάθεσή τους, χρησιμοποιούν in-trans την ανάστροφη μεταγραφάση των LINEs (69). Συνήθως περιέχουν στο 3' άκρο τους ένα λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης (polyA-signal) ή λιγότερο συχνά μια περιοχή πλούσια σε αδενίνη (A). Τα L1 του ανθρώπου και του μύος, κινητοποιούν αντίστοιχα, τα ανθρώπινα Alus, τα ανθρώπινα SVA και τα SINEs του μύος. Τα SINEs περιέχουν εσωτερικούς υποκινητές της RNA πολυμεράσης III, ενώ τα SVA πιθανά μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (70, 71). Η ρετρομετάθεση των ανθρώπινων Alus και των ανθρώπινων SVA, απαιτεί κυρίως τις ενεργότητες της ORF-2p, ωστόσο η παρουσία και της ORF-1p, οδηγεί σε αύξηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης των Alus και φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη ρετρομετάθεση κάποιων SVA (72-74).

#### 1.3.3.4 Penelope-like elements

Μία επιπλέον ομάδα ρετρομεταθετών στοιχείων, παρούσα στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και διαφορετική από αυτή των LTR και non-LTR ρετροτρανσποζονίων είναι τα Penelope-like elements (PLEs) (75). Αρχικά ανακαλύφθηκαν στην *Drosophila virilis* όπου και θεωρήθηκαν υπεύθυνα για την εμφάνιση του συνδρόμου της υβριδικής δυσγενεσίας (hybrid dysgenesis syndrome). Σταδιακά ταυτοποιήθηκαν και στο γένωμα διαφόρων ευκαρυωτικών οργανισμών. Η δομή τους ποικίλει και είναι πολύπλοκη. Έχει



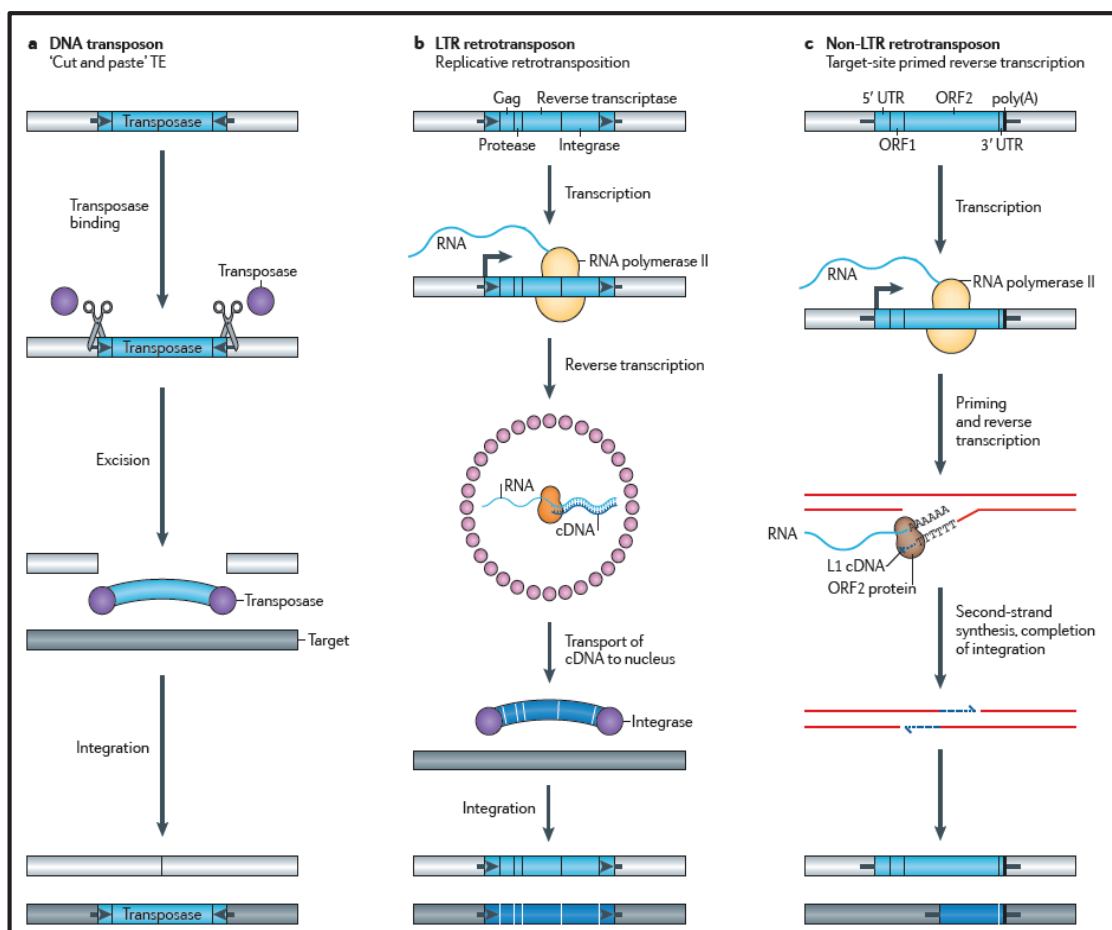
δειχθεί ότι περιέχουν έναν εσωτερικό υποκινητή (76) και ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF), το οποίο κωδικοποιεί ενεργότητες ανάστροφης μεταγραφάσης και ενδονουκλεάσης, διαφορετικές από αυτές των LTR και non-LTR ρετροτρανσποζονίων (75). Η ανάστροφη μεταγραφάση και η ενδονουκλεάση που κωδικοποιούνται από τα PLEs της *Drosophila virilis* είναι ενεργές, αλλά ο μηχανισμός ρετρομετάθεσής τους δεν είναι εξακριβωμένος.



Εικόνα 1.11: Δομική οργάνωση ρετροτρανσποζονίων του ανθρώπου και του μύδς.

### 1.3.4 DNA τρανσποζόνια

Τα DNA τρανσποζόνια μετακινούνται μ' έναν μηχανισμό “cut and paste”, κατά τον οποίο το αρχικό αντίγραφο αποκόπτεται από την αρχική του θέση ως DNA και ενσωματώνεται σε άλλη νέα θέση, διατηρώντας σταθερό, το συνολικό αριθμό αντιγράφων τους στο γένωμα. Τα ενεργά DNA τρανσποζόνια εκφράζουν το ένζυμο τρανσποζάση, το οποίο αναγνωρίζει τις τελικές ανάστροφες αλληλουχίες (Terminal Inverted Repeats TIRs) και καταλύει την αποκοπή του τρανσποζονίου από την αρχική θέση και την ενσωμάτωσή του στη νέα θέση. Σε αντίθεση με τα ρετροτρανσποζόνια, η μετακίνηση των DNA τρανσποζονίων, δεν απαιτεί τη μεταγραφή του στοιχείου, αλλά τη παρουσία άθικτων τελικών επαναλήψεων και τη παρουσία της τρανσποζάσης. Έτσι, η έκφραση ενός DNA τρανσποζονίου είναι δυνατό να οδηγήσει στην ενεργή μετακίνηση όλων των μελών της οικογένειάς τους. Ένα κυρίαρχο παράδειγμα οργανισμού στο οποίο τα DNA τρανσποζόνια είναι ενεργά είναι το νηματοειδές *Caenorhabditis elegans* (43).



Εικόνα 1.12: Σχηματική παράσταση των μηχανισμών μετακίνησης των μεταθετών στοιχείων.

### 1.3.5 Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γένωμα

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του γενώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών και συμβάλλουν στη δυναμική του εξέλιξη.

### 1.3.6 Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στη δομή του γενώματος

1.Δημιουργία νέων ρετροτρανσποζονίων: Νέα ρετροτρανσποζόνια μπορεί να δημιουργηθούν από ενθέσεις ήδη υπάρχοντων ρετροτρανσποζονίων. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το στοιχείο SVA, το οποίο αποτελείται από τέσσερα επιμέρους τμήματα α. εξαμερείς επαναλήψεις (CCCTCT)<sub>n</sub>, β. Alu, γ.15-23 παράλληλες επαναλήψεις και δ.SINE-R (77, 78) . Η οικογένεια των SVA, πιθανά δημιουργήθηκε πριν από 25 εκατομμύρια χρόνια, μετά από ενθέσεις διαφόρων στοιχείων, στο ίδιο σημείο του γενώματος και από τότε έχει αυξησει τον αριθμό αντιγράφων τους, στο ανθρώπινο γένωμα, περίπου στα 3000 αντίγραφα (77). Αποτελούν μη αυτόνομα στοιχεία, μετατίθενται από τα L1 και παραμένουν ενεργά στο ανθρώπινο γένωμα (77, 79, 80). Μέχρι σήμερα, έχει αναφερθεί ότι, τουλάχιστον πέντε ασθένειες οφείλονται σε ενθέσεις των SVA στοιχείων. Γενικά θεωρείται, ότι τόσο τα LTR ρετροτρανσποζόνια, όσο και τα SINEs ρετροτρανσποζόνια αποτελούν χμιαρικά ρετροτρανσποζόνια, τα οποία έχουν προέλθει από σύντηξη των DNA τρανσποζονίων και των non LTR τρανσποζονίων (81).

2.Συμμετοχή των ρετροτρανσποζονίων σε γεγονότα ανασυνδυασμού: Λόγω του ότι τα ρετροτρανσποζόνια απαντούν σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων και εμφανίζουν μεταξύ τους μεγάλη ομολογία, είναι δυνατό να λειτουργούν ως υποστρώματα σε γεγονότα ομόλογου ανασυνδυασμού. Η συχνότητα των γεγονότων ανασυνδυασμού εξαρτάται από τον αριθμό των ομόλογων ακολουθιών, καθώς και από το μέγεθος των ρετροτρανσποζονίων (82, 83). Το αποτέλεσμα του ανασυνδυασμού μπορεί να είναι επιβλαβές, ωφέλιμο ή ουδέτερο για το κύτταρο. Παραδείγματα επιβλαβών γεγονότων ανασυνδυασμού μεταξύ ρετροτρανσποζονίων αποτελεί το σύνδρομο Alport (84) και η πλήρης απλασία των γαμετικών κυττάρων μετά από ανασυνδυασμό μεταξύ των στοιχείων HERV-I (85). Παράδειγμα ωφέλιμου αποτελέσματος αποτελεί η εξέλιξη της οικογένειας του γονιδίου της ανθρώπινης γλυκοφορίνης, μετά από ανασυνδυασμό των στοιχείων Alu, (86) και η σύνδεση DNA τμημάτων στα σημεία θραύσης μετά από ενθέσεις των L1s, που δρουν ως μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA (87).

3.Μεταγωγή των 3'όμορων-DNA αλληλουχιών: Η ικανότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων να δρουν ως μεταγωγείς των 3'όμορων DNA αλληλουχιών αναφέρθηκε πρώτη φορά για τα στοιχεία L1 (88-90). Τα L1s έχουν ένα ασθενές σήμα πολυαδενυλίωσης, με αποτέλεσμα, η RNA πολυμεράση να συνδέεται σε αυτό και να τερματίζει τη μεταγραφή σε οποιαδήποτε σημείο. Έχει υπολογιστεί πως περίπου το 20% των L1 ενθέσεων περιέχουν μεταγόμενο DNA στο 3' άκρο τους. Το μήκος αυτών των αλληλουχιών ποικίλει μεταξύ ενός μικρού αριθμού βάσεων, μέχρι και 1Kb. Μέσω αυτής της διαδικασίας τα L1 συμμετέχουν στο shuffling των εξωνίων και των ρυθμιστικών περιοχών σε νέες γενωμικές θέσεις. Έχει δειχθεί επίσης πως περίπου το 10% των SVA συμμετέχουν σε γεγονότα μεταγωγής του DNA, τα οποία έχουν συσχετιστεί μηχανισμούς διπλασιασμού των γονιδίων και με μηχανισμούς δημιουργίας νέων οικογενειών γονιδίων (77, 80, 91).

4. Δημιουργία επεξεργασμένων ψευδογονίων: Τα ψευδογονίδια βρίσκονται στο γένωμα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, συνήθως δεν περιέχουν ιντρόνια, καταλήγουν σ' ένα πολυαδενυλιωμένο σήμα poly(A)tail, περιέχουν μικρές ευθείες επαναλήψεις στα άκρα τους και θεωρείται ότι έχουν προέλθει από τη δράση των LINEs (92, 93). Στη πλειοψηφία τους είναι μεταγραφικά ανενεργά, ωστόσο έχουν αναφερθεί περιπτώσεις ενεργών ψευδογονιδίων, όπου έχουν ενσωματωθεί σε μία ήδη υπάρχουσα μεταγραφική μονάδα ,οδηγώντας στη δημιουργία νέων γονιδίων ή νέων μεταγράφων. Παραδείγματα αποτελούν α.το στοιχείο *jingway* της *Drosophila yakuba* και της *D.Melanogaster*, το οποίο δημιουργήθηκε μετά από ένθεση του ψευδογονιδίου της δευδρογονάσης στο γονίδιο *yellow-emperor* (94),β. το ρετρογονίδιο του μυός *PMSE2b L1* μετά από ένθεσή του στο L1 (95) και γ. το ψευδογονίδιο *PHGP* του μυός, το οποίο εκφράζεται ιστο-ειδικά από την αλληλουχία που βρίσκεται στο 5' άκρο του (96).

5.Δημιουργία χμαιρικών ρετρογονιδίων μέσω ανάστροφης μεταγραφής: Το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase), είναι δυνατό να αλλάξει το υπόστρωμά του κατά τη σύνθεση του cDNA. Αυτή η ιδιότητα είναι ιδιαίτερα χαρακτηριστική της ανάστροφης μεταγραφάσης των ρετροϊών, όπου κατά τη δράση της μεταπηδά μεταξύ διαφορετικών σημείων του υποστρώματός της, για να συνθέσει τα ρετροϊκά LTRs (97). Αυτό μπορεί να συμβεί και κατά την ανάστροφη μεταγραφή των στοιχείων LINEs. Έχει αναφερθεί η δημιουργία διμερών και τριμερών ρετρογονιδίων στο γένωμα πολλών θηλαστικών και στο γένωμα πολλών μυκήτων. Συνολικά 82, 116, 66 και 36 τέτοια στοιχεία έχουν βρεθεί, αντίστοιχα, στο DNA του ανθρώπου, του μυός, του

αρουραίου και του μύκητα *Magnaporthe grisea* (98-101). Όλα αυτά τα στοιχεία έχουν προκύψει είτε από απευθείας σύνδεση των διαφορετικών κυτταρικών μεταγραφημάτων μεταξύ τους, είτε πιο συχνά, από τη σύντηξή τους με το 3' άκρο των LINEs. Τα κυτταρικά μετάγραφα μπορεί να αποτελούν αγγελιοφόρο RNA, ριβοσωμικό RNA, μικρά πυρηνικά RNAs, 7SL RNA και Alus ρετροτρανσποζόνια. Τα χμαιρικά ρετρογονίδια που σχηματίζουν έχουν τα εξής χαρακτηριστικά α. το 5' άκρο τους περιέχει αντίγραφα του πλήρους RNA κυτταρικού μεταγραφήματος, ενώ το 3' άκρο τους περιέχει κολοβωμένα αντίγραφα του RNA μεταγραφήματος (κυρίως των LINEs), β. και τα δύο τμήματα συνδέονται ως προς την ίδια κατεύθυνση, γ. έχουν ένα σήμα πολυαδενυλίωσης στο 3' άκρο τους και δ. έχουν στα άκρα τους μικρές ευθείες επαναλήψεις (101).

### 1.3.7 Ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή ρύθμιση

1.Ρόλος υποκινητή: Στοιχεία από την ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος, έδειξαν, πως περίπου το 25% των υποκινητών περιέχουν στην αλληλουχία τους ρετρομεταθετά στοιχεία και επιπροσθέτως, πως το 7-10% των θέσεων πρόσδεσης των μεταγραφικών παραγόντων (Transcription Factor Binding Sites–TFBS), έχουν προέλθει από επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, περιλαμβάνοντας κυρίως απλές επαναλήψεις και ρετρομεταθετά στοιχεία (102, 103). Υπάρχει ένας αριθμός αναφορών σχετικά με τη δράση των ρετρομεταθετών στοιχείων ως εναλλακτικοί υποκινητές, που επηρεάζουν τα επίπεδα της μεταγραφής των γονιδίων καθώς και την ιστοειδική έκφρασή τους. Η ενσωμάτωση των LTR στο γονίδιο *CYP19*, που κωδικοποιεί την έκφραση του ενζύμου της αρωματάσης P450, οδήγησε στη δημιουργία ενός εναλλακτικού υποκινητή 1000bp ανοδικά της κωδικής του περιοχής. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το *CYP19* να μεταγράφεται ειδικά στο στρώμα του συγκυτιοτροφοβλάστη στο πλακούντα των πρωτεύοντων και να συμμετέχει με αυτόν τον τρόπο, στον έλεγχο των επιπέδων των οιστρογόνων κατά την εγκυμοσύνη (102).

Τα LTR, αποτελούν τους μοναδικούς υποκινητές που ρυθμίζουν την έκφραση του ηπατικού γονιδίου *BAAT* και ελέγχουν την έκφραση του γονιδίου *NAIP*, υπεύθυνο για τη παραγωγή της πρωτεΐνης που αναστέλλει την απόπτωση των νευρικών κυττάρων (104) και (105). Επίσης, ενδογενείς ρετροϊοί που δρουν ως υποκινητές, έχει αναφερθεί ότι επηρεάζουν την ειδική έκφραση, στο πλακούντα, του γονιδίου *Mid1*, το οποίο σχετίζεται

με το σύνδρομο Orpitz (106), με τον Β-υποδοχέα της ενδοθηλίνης (107) και τον αυξητικό παράγοντα της ινσουλίνης INSL4 (108).

2. Ρόλος ενισχυτή της γονιδιακής μεταγραφής: Μία πρώτη σημαντική αναφορά για τη συμμετοχή των ρετροτρανσποζονίων στην ιστοειδική μεταγραφική ρύθμιση, ήταν για το γονίδιο της ανθρώπινης αμυλάσης (109). Στον άνθρωπο, η αμυλάση παράγεται στο πάγκρεας και στους σιελογόνους αδένες. Η ανθρώπινη αμυλάση κωδικοποιείται από 2 γονίδια στο πάγκρεας (AMY2A και AMY2B) και από 3 γονίδια στους σιελογόνους αδένες (AMY1A, AMY1B και AMY1C). Η δομή των ιντρονίων και των εξωνίων σε αυτά τα γονίδια είναι ταυτόσημη, εκτός από ένα τελικό αμετάφραστο εξώνιο στο 5' άκρο, στα γονίδια της σιελικής αμυλάσης. Όλα τα γονίδια της αμυλάσης που παράγεται στους σιελογόνους αδένες, περιέχουν ανοδικά της μεταγραφικής τους περιοχής, ένθεση ενός πλήρους μήκους στοιχείου HERV-E. Όταν υπάρχει ένθεση μόνο των LTRs και όχι ολόκληρου του στοιχείου HERV-E, η αμυλάση παράγεται μόνο στο πάγκρεας.

Ως μεταγραφικοί παράγοντες, είναι δυνατό να δρουν επίσης τα ρετροτρανσποζόνια LINEs και τα SINEs. Ο ενισχυτής της ανθρώπινης απολιποπρωτεΐνης Α βρίσκεται εντός του στοιχείου LINE (110), ενώ τα Alus αποτελούν τμήμα του ενισχυτή του ανθρώπινου γονιδίου CD8 alpha (111).

3. Ρόλο στη δημιουργία νέων θέσεων μάτισματος: Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι δυνατό να επηρεάσουν το μάτισμα πρόδρομων μορίων RNA. Παράδειγμα αποτελεί η διαδικασία εξωνιοποίησης των Alus, που οδηγεί στην δημιουργία νέων εξωνίων στα γονιδιώματα των πρωτεύοντων και παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη ειδογένεση. Έχει αναφερθεί η προσθήκη ενός Alu εξωνίου στο mRNA του γονιδίου SEPN1, το οποίο εμπλέκεται σε μια μορφή συγγενούς μυϊκής δυστροφίας (112-114). Άλλο παράδειγμα, αποτελεί η παραγωγή ενός ενναλακτικού μεταγραφήματος του υποδοχέα του αγγειακού αυξητικού παράγοντα VEGFR-3, έπειτα από μη κανονικό μάτισμα της ακολουθίας ενός LTR ρετρομεταθετού στοιχείου, που βρίσκεται μέσα στο γένωμα του ρετροϊού, μεταξύ των εξωνίων 1 και 2 (115, 116).

Τα στοιχεία LINE παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στο μάτισμα των RNAs, αν και με σχετικά χαμηλές συχνότητες. Το ποσοστό των στοιχείων LINE-1 στα ιντρόνια των γονιδίων είναι σημαντικά χαμηλότερο από εκείνο των επαναλήψεων Alu, αν και οι δύο ομάδες στοιχείων χρησιμοποιούν τον ίδιο μηχανισμό μετάθεσης (117). Αυτό πιθανά να

οφείλεται σε μηχανισμούς που δρουν ενάντια στη συσσώρευση των LINE-1 στο εσωτερικό των γονιδίων (118) και είναι ενδιαφέρον το ότι έχει αναφερθεί ένα αυξημένο ποσοστό συμβατικού ματίσματος των LINE-1, συγκριτικά με το εναλλακτικό μάτισμα των Alus. Τα LINE-1 περιέχουν αρκετές θέσεις ματίσματος που οδηγούν στη δημιουργία νέων επεξεργασμένων LINE-1 μεταγραφημάτων και συμβάλλουν στη γένεση νέων υβριδικών μεταγράφων, μεταξύ των LINE-1 και των γονιδίων του κυττάρου (119).

4.Ρόλο στη δημιουργία νέων σημάτων πολυαδενυλίωσης: Η πολυαδενυλίωση του mRNA αποτελεί ένα βασικό βήμα για την ωρίμανση σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών mRNAs. Καθοδηγείται από ένα σήμα πολυαδενυλίωσης (AAUAAA) στο 3' άκρο των πρόδρομων μορίων mRNA και επιτελείται κατά τη διάρκεια της μεταγραφής των γονιδίων από τη δράση ενός πρωτεϊνικού συμπλόκου συνδυασμένο με την RNA πολυμεράση II. Μόνο τα προϊόντα της RNA πολυμεράσης II είναι πολυαδενυλιωμένα, με μοναδική εξαίρεση δυο πολυαδενυλιωμένα RNAs μετάγραφα της πολυμεράσης III (120). Τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μεταγραφή τους και χρησιμοποιούν λειτουργικά πολύ(A)σήματα στο 3' άκρο των γονιδίων τους. Ενθέσεις των αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων στα γονίδια, με την ίδια μεταγραφική φορά ως προς αυτά, μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων, μέσω νέων σημάτων πολύ(A) (115, 121).

Έχουν αναφερθεί αρκετές περιπτώσεις τερματισμού της μεταγραφής με σήμα πολυαδενυλίωσης προερχόμενο από τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Για παράδειγμα, στη καρκινική κυτταρική σειρά του μαστού-T47D, έχουν ανιχνευθεί τέσσερα πολυαδενυλιωμένα mRNAs στην αλληλουχία LTR των ρετροϊών HERV-K (122). Τα HERV-H LTRs λειτουργούν ως το κύριο σήμα πολυαδενυλίωσης για τα ανθρώπινα γονίδια *HHLA2* και *HHLA3*, ενώ τα LTRs στο 5' άκρο των *HERV-F* αποτελούν εναλλακτική θέση πολυαδενυλίωσης για το γονίδιο *ZNF195* (123, 124). Έχει δειχθεί επίσης, ότι τα LINE-1s, εκτός από το κύριο σήμα πολυαδενυλίωσης στην 3'UTR, κατέχουν μια επιπλέον θέση τερματισμού μεταγραφής στο 3' άκρο του ORF2, με ανάστροφο προσανατολισμό. Ανεξάρτητα λοιπόν από τον προσανατολισμό τους σε ένα γονίδιο, τα LINE-1s, έχουν τη δυνατότητα να παράγουν κολοβωμένα RNA και μια νέα ισομορφή του mRNA (125, 126).

Από τα 1.1εκατομμύρια ανθρώπινα Alus, περίπου τα 10.000 βρίσκονται ενσωματωμένα στην 3'αμετάφραστη περιοχή γονιδίων, που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και το 1% από αυτά λειτουργούν ως ενεργές θέσεις πολυαδενυλίωσης. Συνήθως αυτές οι θέσεις δεν είναι ισχυρές, όμως είναι πιθανό κάποιες φορές να αντιπροσωπεύουν τη κύρια ή τη μοναδική θέση πολυαδενυλίωσης για ένα γονίδιο. Επίσης, αν και τα Alus ενσωματώνονται στο 3' UTR των γονιδίων, είτε με κανονική, είτε με ανάστροφη διάταξη, το 99% των αλληλουχιών τους, που λειτουργούν ως ενεργές θέσεις πολυαδενυλίωσης, είναι ενσωματωμένες σε κανονική διάταξη (127).

5. Ρόλο μεταγραφικών αποσιωπητών: Κάποια ρετρομεταθετά στοιχεία είναι γνωστό πως λειτουργούν ως αποσιωπητές της μεταγραφής των γονιδίων. Παράδειγμα αποτελεί 1 από τις 44 επαναλήψεις των Alus στο ανθρώπινο γονίδιο υπεύθυνο για τη παραγωγή των αυξητικών ορμονών, (Growth Hormones), η οποία λειτουργεί ως μεταγραφικός αποσιωπητής, που μειώνει το ρυθμό ακετυλίωσης του υποκινητή οδηγώντας σε σταδιακή μείωση της συχνότητας πρόσδεσης της RNA πολυμεράσης II στον υποδοχέα. Είναι πιθανό αυτός ο μεταγραφικός έλεγχος να ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου *hGH* στα κύτταρα της υπόφυσης (128).

Έχει δειχθεί επίσης πως ένα τμήμα του στοιχείου Alu, μήκους 221bp, που βρίσκεται στον υποκινητή του ανθρώπινου γονιδίου *BRC A2*, λειτουργεί ως αποσιωπητής της έκφρασής του. Η έκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης BRCA2 είναι αυστηρώς ρυθμισμένη καθ' όλη την ανάπτυξη. Η αποσιώπησή της εμπλέκεται στην ιστοειδική ρύθμιση της έκφρασής της στα καρκινικά κύτταρα του μαστού (129).

6. Ρόλο αντινοσηματικών ρυθμιστών της μεταγραφής των κυτταρικών γονιδίων: Έχει αποδειχθεί πως, τα ρετροτρανσποζόνια ενσωματώνονται στα ιντρόνια των γονιδίων, κυρίως σε αντινοσηματική φορά ως προς αυτά (115, 130) και καθοδηγούν με τους υποκινητές τους τη μεταγραφή των RNAs που είναι συμπληρωματικά ως προς τα ιντρόνια ή και τα εξώνια των γονιδίων. Επιπλέον, είναι γνωστό πως κάποια ρετροτρανσποζόνια έχουν αμφίδρομους υποκινητές και ακόμη ενθέσεις αυτών των στοιχείων καθοδικά των γονιδίων, μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή των αντινοσηματικών RNAs. Αυτά τα συμπληρωματικά RNAs μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων του κυττάρου (131-134). Θεωρείται πως το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης είναι υπεύθυνο για τη



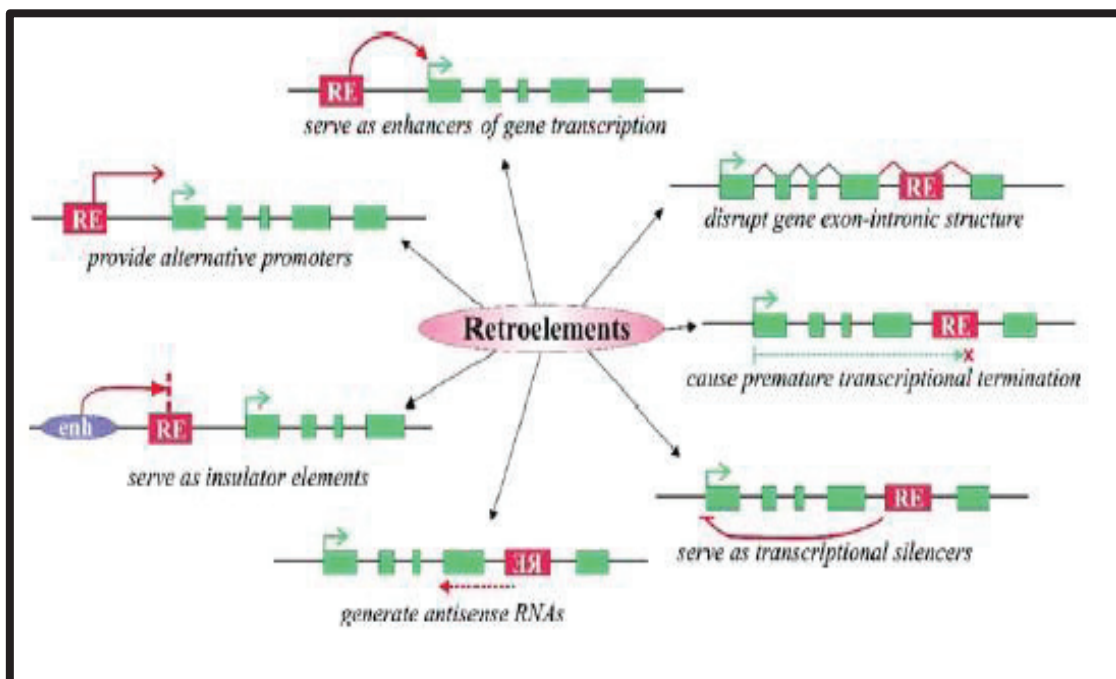
παραγωγή ενός σημαντικού αριθμού ζεύγους νοηματικών αντινοσηματικών ακολουθιών στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών (135).

Επιπλέον, μελέτες γονιδιακής έκφρασης με τη τεχνική CAGE (Cap Analysis of Gene Expression) έδειξαν την ύπαρξη 48.718 αντινοσηματικών περιοχών έναρξης μεταγραφής των γονιδίων, μέσα σε ρετρομεταθετά στοιχεία (136). Μία πρώτη αναφορά, αποτελεί η ένθεση των ανθρώπινων LTRs των HERV-K, στα ιντρόνια των γονιδίων *SLC4A8* και *IFT172*, η οποία οδηγεί στη παραγωγή μεταγράφων συμπληρωματικών ως προς τα εξώνια των αντίστοιχων mRNAs, σε μια ποικιλία ανθρώπινων ιστών. Η υπερέκφραση των αντινοσηματικών μεταγράφων οδήγησε σε 3,9πλάσια μείωση των επιπέδων του mRNA του *SLC4A8* και σε 2,9πλάσια μείωση σε των επιπέδων του *IFT172* (46). Είναι ενδιαφέρον ότι περίπου το 34% των ενθέσεων των μεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γένωμα εδράζεται μέσα σε γνωστά γονίδια. Αυτές οι ενθέσεις συμβάλλουν στη γενετική ποικιλομορφία των ειδών και στη διαδικασία της εξέλιξης.

7. Ρόλο μονωτή: Υπάρχουν αναφορές, οι οποίες φανερώνουν την ικανότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων να δρουν ως *in vivo* μονωτές και να διαχωρίζουν τις ενεργές περιοχές χρωματίνης από τις μη-ενεργές. Για παράδειγμα, το στοιχείο B2 SINE που βρίσκεται στη περιοχή της αυξητικής ορμόνης στο μυ, μπλοκάρει τις κατασταλτικές τροποποιήσεις της χρωματίνης, δημιουργώντας μικρού μήκους μετάγραφα, με τα οποία εξασφαλίζει την ενεργοποίηση του αντίστοιχου γονιδίου (137). Πειράματα στη *Drosophila* έδειξαν πως η ένθεση LTR ρετροτρανσποζονίων σε θέση ανάμεσα στον ενισχυτή και στον υποκινητή ενός γονιδίου μπλοκάρει τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων που έχουν ρόλο ενισχυτή. Για παράδειγμα, η ένθεση του LTR ρετροτρανσποζονίου *gypsy* στη 5' περιοχή του γονιδίου *yellow* είναι υπεύθυνη για τη μελάγχρωση του δέρματος. Ανοδικά του στοιχείου *gypsy*, βρίσκονται δύο περιοχές ενισχυτών που ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου *yellow* σε διαφορετικούς ιστούς. Η ενσωμάτωση του ρετροτρανσποζονίου στη θέση μεταξύ του υποκινητή και των ενισχυτών, είχε ως αποτέλεσμα τη μειορρύθμιση του γονιδίου *yellow* στους συγκεκριμένους ιστούς (138).

8. Ρόλο ρυθμιστή της μετάφρασης: Ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν βρεθεί στα UTRs πολλών λειτουργικών γονιδίων, ωστόσο δεν έχει χαρακτηριστεί ο ρόλος τους στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Αλλά και LINE-1 στοιχεία έχουν εντοπιστεί στη 5'UTR περιοχή μεταγράφων του ανθρώπινου γονιδίου *ZNF177* (Zinc

Finger Gene) και τροποποιούν τη γονιδιακή έκφρασή του σε πρωτεϊνικό επίπεδο, μειώνοντας τη μεταφραστική λειτουργία. Είναι ενδιαφέρον, ότι οι ίδιες επαναλήψεις των Alus και των LINE-1 στην 5'UTR του *ZNF177*, αν και καταστέλλουν τη μετάφραση, ενισχύουν τη μεταγραφή (139). Περίπου το 4% των ανθρώπινων 5'UTRs αλληλουχιών περιέχουν Alus, υποδεικνύοντας ότι η έκφραση πολλών γονιδίων μπορεί να επηρεάζεται από αυτές τις επαναλήψεις (140).



Σχήμα 1.1: Μηχανισμοί επίδρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων στην γονιδιακή έκφραση

### 1.3.8 Έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων

Ο κυτταρικός τύπος και ο χρόνος που πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης καθορίζεται από την έκφραση των ρετροτρανσποζονιακών πρωτεϊνών που καθοδηγούν την όλη διαδικασία.

L1 RNA μετάγραφα έχουν ανιχνευτεί σε θηλυκούς και αρσενικούς γαμέτες, σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα, σε αρχέγονα νευρικά κύτταρα και σε καρκινικά κύτταρα τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά. Επίσης, έχουν ταυτοποιηθεί στα αρχικά στάδια ανάπτυξης εμβρύων μύος και σε διάφορους τύπους σωματικών κυττάρων (141-147). Συνήθως η

έκφρασή τους είναι μεγάλη σε φυσιολογικούς ανθρώπινους ινοβλάστες στα τελευταία στάδια της *ex-vivo* γήρανσής τους, στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ υπερήλικων μυών (148, 149). Το μήκος των περισσότερων μεταγράφων είναι μικρότερο από το αρχικό, είτε λόγω πρόωρου τερματισμού της πολυαδενυλίωσης σε πολυάριθμες εσωτερικές αλληλουχίες, είτε λόγω ματίσματος (150, 151). Πλήρους μήκους L1 RNA μετάγραφα έχουν ανιχνευτεί σε ανθρώπινες ωοθήκες και σε διάφορους τύπους σωματικών κυττάρων, σε ζυγώτες και σε έμβρυα μυός διαφόρων σταδίων προεμφυτευτικής ανάπτυξης. Έχουν ανιχνευτεί επίσης σε όρχεις αρσενικών μυών, τη μέρα μετά τη γέννησή τους (145, 147, 152, 153).

Οι πρωτεΐνες ORF1p και ORF2p των στοιχείων L1, έχουν ανιχνευτεί στους όρχεις και στα κύτταρα του αγγειακού ενδοθηλίου, έφηβων και ώριμων ανδρών. Η ORF2p είναι παρούσα στο μυ, σε σωματικά και σε γαμετικά κύτταρα, από τα τελευταία στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των ωοθηκών και των όρχεων, μέχρι την εφηβεία και την ενηλικίωση. Η ORF1p έχει δειχθεί ότι εκφράζεται σ' έναν μεγάλο αριθμό καρκινικών κυτταρικών σειρών, του ανθρώπου και του μυός (145). Αποτελέσματα έρευνας που πραγματοποιήθηκε σ' ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών μορφών καρκίνου (καρκίνος μαστού, ωοθηκών, προστάτη, οισοφάγου, πνευμόνων κ.α.) οδήγησε σε ταυτοποίηση της ανθρώπινης ORF1p, σχεδόν στο μισό από το συνολικό αριθμό διαφορετικών τύπων καρκίνου (154, 155).

Στο μυ, τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία εκφράζονται κυρίως στους γαμέτες και στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (156, 157). RNA μετάγραφα των IAP είναι παρόντα σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες, σε ώριμα ωάρια και σε πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης (141, 147, 158-160). Η έκφραση των IAP σε σωματικά κύτταρα είναι αρκετά χαμηλή και περιορίζεται σε συγκεκριμένα στοιχεία (156). MusD μετάγραφα έχουν ανιχνευτεί σε εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα και σε αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, ενώ μειώνονται καθώς αναπτύσσεται το έμβρυο. Επίσης, εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στους σκελετικούς μύες και στο ήπαρ υπερήλικων μυών (141, 149).

Στον άνθρωπο και στο μυ, γεγονότα ρετρομετάθεσης έχουν αναφερθεί στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, στα γαμετικά κύτταρα, στα πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης και σε ορισμένους τύπους σωματικών κυττάρων. Ρετρομεταθέσεις του στοιχείου L1 σε ανθρώπινους ιστούς εγκεφάλου και σε γηρασμένους ινοβλάστες, καθώς και ρετρομεταθέσεις των MusD σε κύτταρα του σκελετικού μυ και σε ηπατικά κύτταρα μυός,

οδήγησε σε ανίχνευση αυξημένου αριθμού αντιγράφων τους, με την εφαρμογή της τεχνικής qPCR (143, 148, 149, 161). Ενθέσεις των IAP έχουν ταυτοποιηθεί σε αιμοποιητικές κυτταρικές σειρές και σε καρκινικές σειρές μυός (162-165). Σε διαγονιδιακούς μύες και αρουραίους παρατηρήθηκαν γεγονότα ρετρομετάθεσης ανθρώπινων L1 και L1 του μυός, στις ωοθήκες, στους όρχεις, σε μεγάλο βαθμό στα έμβρυα προεμφυτευτικής ανάπτυξης και στα κύτταρα του εγκεφάλου (146, 166). Γεγονότα ρετρομετάθεσης παρατηρήθηκαν επίσης, μετά από μεταφορά των L1 ως τμήμα γενετικής μηχανής, σε αρχέγονα νευρικά κύτταρα ανθρώπου και αρουραίου, σε ανθρώπινα ωοκύτταρα, σε πρωτογενείς ανθρώπινους ινοβλάστες και σε διάφορες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Το ποσοστό ρετρομετάθεσης, αυξήθηκε, μετά από έκθεση των κυττάρων σε παράγοντες οξειδωτικού στρες και σε ακτινοβολία (62, 142-144, 167-170).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι υπεύθυνα για το 0.1% των αυθόρμητων μεταλλάξεων, που οδηγούν σε κάποια μορφής ασθένειας στον άνθρωπο και για το 10% των αυθόρμητων μεταλλάξεων στο μυ (156). Στο μυ αυτό το ποσοστό μεταλλάξεων οφείλεται κυρίως σε ενθέσεις των IAP, των ETn, των MusD LTR ρετροτανοζονίων και των LINE-1. Οι μύες έχουν μεγαλύτερο αριθμό ενεργών στοιχείων LINE-1 συγκριτικά με τον άνθρωπο, περίπου 3000 LINE-1 στο μυ, εν αντιθέσει με περίπου 100 LINE-1, στον άνθρωπο (58, 60, 156). Σχεδόν 100 ασθένειες στον άνθρωπο, οφείλονται σε ενθέσεις ρετρομεταθετών στοιχείων και σχεδόν οι περισσότερες από αυτές αφορούν ενθέσεις στα γαμετικά κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι ο μεγαλύτερος αριθμός αυθόρμητων μεταλλάξεων προέρχεται από ρετρομεταθέσεις μη αυτόνομων στοιχείων, των Alus στον άνθρωπο και των IAPΔ1 ή των ETn στο μυ, παρά από ρετρομεταθέσεις αυτόνομων στοιχείων (70, 156).

Retrotransposon	Gene	Disorder	Insertion	Expression
LINE 1	APC	Colorectal Cancer	+	-
	Dystrophin	Muscular dystrophy	+	-
	Factor VIII	Hemophilia A	+	-
ALU	BRCA2	Breast Cancer	+	-
	BRCA1/BRCA2	Breast/Ovarian Cancer	+	-
	Factor VIII	Hemophilia A	+	-
	Factor IX	Hemophilia B	+	-
	MLV1-2	B-cell Lymphoma	+	-
	NF1	Neurofibromatosis	+	-
	ADD1	Huntington Disease	+	-
	LDL receptor	Familial Hypercholesterolaemia	+	-
HERVs	-	Diabetes Mellitus Type 1	-	K10 Hyperantigen
	-	Rheumatoid Arthritis	-	K10 gag
	-	Multiple Sclerosis	-	H env

Πίνακας 1.3: Παραδείγματα ανθρώπινων γενετικών νοσημάτων, με ένθεση ή έκφραση ρετρομεταθετών στοιχείων

### 1.3.9 Κυτταρικοί μηχανισμοί ελέγχου της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων

Τα κύτταρα έχουν υιοθετήσει διάφορους μηχανισμούς για να ελέγχουν τα επίπεδα έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων και να διατηρούν τη δομική και τη λειτουργική ακεραιότητα του γενώματός τους. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν τη μεθυλίωση των ρετρομεταθετών στοιχείων, την αποσιώπησή τους μέσω ενδιάμεσων μορίων RNA (RNAi), τη συσσώρευση των ρετροτρανσποζονιακών πρωτεϊνών σε στρεσογόνα κοκία (stress granules) και τις στοχευμένες αλλαγές των νουκλεϊκών οξέων (Nucleic Acid Editing).

Ο έλεγχος της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων περιλαμβάνει την ενζυμική δράση των μεθυλοτρανσφερασών, των διμεθυλασών και των ενζύμων που συμμετέχουν στη τροποποίηση των ιστονών, στην επαναδιαμόρφωση της χρωματίνης και στο μεταβολισμό των μικρών μορίων RNA. Η πρόκληση οποιασδήποτε βλάβης στη λειτουργία των παραπάνω μηχανισμών είναι δυνατό να οδηγήσει σε μειωμένο έλεγχο των γεγονότων ρετρομετάθεσης (171).

Η πλειοψηφία των μεθυλιωμένων κυτοσινών βρίσκεται στα ρετρομεταθετά στοιχεία και έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός μεθυλίωσης του κυττάρου εξελίχθηκε αρχικά για τη προστασία των κυττάρων από την ανεξέλεγκτη έκφρασή τους (35). Οι υποκινητές των L1 στοιχείων στα θηλαστικά και των αυτόνομων LTR ρετρομεταθετών στοιχείων στο μυ, είναι μεθυλιωμένοι στην πλειοψηφία των ιστών, στα περισσότερα αναπτυξιακά στάδια (145, 153). Τα στοιχεία L1 του μυός υπομεθυλιώνονται κατά την ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων, είναι μετρίως μεθυλιωμένα στα ωάρια και στο ζυγωτό, και υπομεθυλιώνονται ξανά κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Τα στοιχεία IAP υπομεθυλιώνονται σε μικρότερο βαθμό συγκριτικά με τα L1 (172-174). Τα επίπεδα των L1 και των IAP είναι αυξημένα στα έμβρυα μυός, στα οποία δεν εκφράζεται η Dnmt1, στα βλαστικά κύτταρα μυός, στα οποία δεν εκφράζεται η Dnmt1, η Dnmt3a και η Dnmt3b και στους αρσενικούς γαμέτες μυός, στους οποίους δεν εκφράζεται η Dnmt3l (174-177). Η υπομεθυλίωση των ρετρομεταθετών στοιχείων έχει συσχετιστεί με γενωμική αστάθεια σε διάφορες μορφές καρκίνου (178). Μύες που εμφάνισαν καρκίνο μετά από υπομεθυλίωση του DNA, λόγω υπομορφικού αλληλομόρφου της Dnmt1, φέρουν συχνές ενθέσεις των στοιχείων IAP στη γενωμική περιοχή *Notch 1*, που οδηγεί στη δημιουργία ογκογονιδίων (165). Η μεθυλίωση του DNA είναι πιθανό να αρχίζει από τα ρετρομεταθετά στοιχεία και να εξαπλώνεται στις γειτονικές περιοχές ρυθμίζοντας τη λειτουργία τους. Η μεθυλίωση που αρχίζει από τα SINEs και εξαπλώνεται στις πλευρικές περιοχές, θεωρείται ότι λειτουργεί ως απομακρυσμένος μηχανισμός επιγενετικών τροποποιήσεων στα φυτά (179). Τα ανθρώπινα Alus θεωρείται ότι συνιστούν de novo κέντρα μεθυλίωσης, που εμπλέκονται στην αποσιώπηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στη νεοπλασία (180). Επιπλέον, φαίνεται πως τα L1 αποτελούν τα κέντρα από τα οποία αρχίζει και εξαπλώνεται η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (181).

Ο έλεγχος της έκφρασης των μεταθετών στοιχείων επιτυγχάνεται επίσης σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο από τη συνδυασμένη δράση των μικρών, μη κωδικών μορίων RNA

και των πρωτεϊνών *Argonaute*, τα οποία στοχεύουν συμπληρωματικά μόρια RNA και αναστέλλουν τη περαιτέρω μετάφρασή τους, μέσω σχάσης. Η οικογένεια των πρωτεϊνών *Argonaute*, κωδικοποιούν ενεργότητες ενδονουκλεάσης, δέσμησης σε μονόκλιωνα μόρια RNA και δέσμησης στο 5' νουκλεοτιδικό άκρο. Διακρίνονται σε δύο τάξεις, στην Ago και στην Piwi.

Η τάξη των πρωτεϊνών Ago εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους ιστούς των πολυκύτταρων οργανισμών και συνδέεται σε μικρά μόρια RNA μεγέθους 21-24 νουκλεοτιδίων, όπως τα siRNAs και τα miRNAs. Τέσσερα miRNAs έχειδειχθεί ότι στοχεύουν τα MIR/LINE-2 στοιχεία και σχεδόν τριάντα ανθρώπινα miRNAs επιδεικνύουν μικρής κλίμακας συμπληρωματικότητα με μια συγκεκριμένη περιοχή εντός των Alus (182, 183). Έχει επιπλέονδειχθεί, ότι δίκλιωνα μόρια L1RNA, τα οποία παράγονται in vitro, μπορούν να μετατραπούν σε λειτουργικά siRNAs μέσω του ενζύμου Dicer (small RNA-processing enzyme) και στη συνέχεια να καταστέλλουν τη ρετρομετάθεση των L1 σε κυτταρικές καλλιέργειες (184, 185).

Οι πρωτεΐνες Piwi παράγονται μόνο στα ζώα και εκφράζονται ειδικά, στα γαμετικά κύτταρα και σε συγκεκριμένα σωματικά κύτταρα, στις γονάδες της *Drosophila*. Συνδέονται στα piRNAs, που έχουν μέγεθος 24-30 νουκλεοτιδίων (186). Μύες που φέρουν μεταλλάξεις σ' ένα από τα τρία γονίδια Piwi, *Mili*, *Miwi* or *Miwi 2*, έχουν φαινότυπο στειρότητας παρόμοιο με του ανθρώπου, λόγω ανωμαλιών που παρατηρούνται σε διάφορα στάδια της σπερματογένεσης, και παρουσιάζουν αυξημένα επίπεδα έκφρασης των στοιχείων L1 και των στοιχείων IAP, μειωμένη μεθυλίωση των στοιχείων L1 και των IAP και χαμηλά επίπεδα των piRNAs (187-190). Η μη σωστή μεθυλίωση που παρατηρείται, υποδεικνύει τη συμμετοχή των πρωτεϊνών Piwi και των piRNAs στην επιγενετική τροποποίηση των ρετροτρανσποζονιακών ακολουθιών (186).

Ένας άλλος μηχανισμός ελέγχου της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων, αποτελεί η απομάκρυνση των L1 ριβονουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων μέσα σε στρεσογόνα κοκκία. Τα κοκκία συνιστούν διακριτά κυτταροπλασματικά συσσωματώματα και σχηματίζονται κάτω από ένα εύρος στρεσογόνων συνθηκών. Έχειδειχθεί ότι το ORF1 των στοιχείων L1, κάτω από αυτές τις συνθήκες, σχηματίζει σύμπλοκο με μία ομάδα mRNA στα στρεσογόνα κοκκία (61). Με αυτό τον τρόπο το κύτταρο μειώνει τον αριθμό των LINEs και των SINEs

ρετρομεταθέσεων, όπως επίσης και τον αριθμό των νεοσχηματιζόμενων επεξεργασμένων ψευδογονιδίων.

Τέλος, η έκφραση αρκετών LTR και non-LTR ρετρομεταθετών στοιχείων είναι δυνατό να ρυθμιστεί μέσω στοχευμένων αλλαγών των νουκλεϊκών οξέων με τη δράση των πρωτεϊνών APOBEC (Mammalian Apolipoprotein B mRNA Editing Catalytic Peptide) και των πρωτεϊνών AID (Activation Induced Deaminase) (191). Αυτές οι πρωτεΐνες ανήκουν στην οικογένεια των απαμιναςών της κυτοσίνης και δρουν μετατρέποντας τα κατάλοιπα της κυτοσίνης του νεοσυντιθέμενου ρετροτρανσποζονιακού DNA σε ουρακίλη, μέσω απαμίνωσης (192-194). Αυτό οδηγεί στη δημιουργία μεταλλάξεων και στην αποικοδόμηση του DNA του ρετροτρανσποζονίου (191). Επτά ανθρώπινα γονίδια που κωδικοποιούν τις APOBEC3 αναστέλλουν την ρετρομετάθεση των στοιχείων L1 και τουλάχιστον τρία από αυτά αναστέλλουν και τη ρετρομετάθεση των LTR ρετροτρανσποζονίων στους μύες (192-194). Στα θηλαστικά, η APOBEC1 περιορίζει την έκφραση των στοιχείων IAP, των στοιχείων MusD και των στοιχείων L1 (195), ενώ οι πρωτεΐνες AID, σε διάφορους οργανισμούς, αναστέλλουν τη μετακίνηση των στοιχείων MusD και των στοιχείων L1 (196).

#### **1.4 Ανάστροφη Μεταγραφάση**

Το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης καταλύει την αντίδραση σύνθεσης cDNA μορίων χρησιμοποιώντας RNA μόρια ως εκμαγείο και έχει συσχετιστεί με τον αναπαραγωγικό κύκλο ζωής των ρετροϊών. Στα κύτταρα, κύρια πηγή έκφρασης της ανάστροφης μεταγραφάσης αποτελούν τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία και το ένζυμο της τελομεράσης (197-201). Έχει δειχθεί πως η έκφραση της ανάστροφης μεταγραφάσης είναι χαμηλή στα σωματικά κύτταρα και υψηλή στα καρκινικά κύτταρα, στους γαμέτες και σε εμβρυϊκούς ιστούς πρώιμων σταδίων ανάπτυξης.

Τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία κωδικοποιούν την ανάστροφη μεταγραφάση και τη χρησιμοποιούν για τη μετακίνησή τους εντός του γενώματος των κυττάρων τους. Όπως αναφέρθηκε, η έκφρασή τους έχει παρατηρηθεί σε αρσενικούς και θηλυκούς γαμέτες (144, 202, 203) και γεγονότα ρετρομετάθεσης έχουν αναφερθεί στη γαμετική σειρά και σε αρχικά στάδια ανάπτυξης εμβρύων μύος (146, 154). Επίσης, ενέργoτητα ανάστροφης



μεταγραφάσης πιθανά προερχόμενη από τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχει αναφερθεί και σε σπερματοζώαρια που έχουν απομονωθεί από την επιδιδυμίδα μυός (204).

Το ένζυμο της τελομεράσης είναι ένα ριβονουκλεϊκό σύμπλοκο, αποτελούμενο από μία υπομονάδα με ενεργότητα ανάστροφης μεταγραφάσης. (Telomerase Reverse Transcriptase-TERT), από RNA (Telomerase RNA Components-TERC) και από πρωτεΐνες (205). Προσδένεται στα άκρα των χρωμοσωμάτων και συνθέτει μικρές νουκλεοτιδικές επαναλήψεις, ρυθμίζοντας το μήκος των τελομερών και προστατεύοντας από θραύσεις, το DNA των χρωμοσωμάτων. Έχει αναφερθεί ότι η δραστικότητα τελομεράσης παραμένει ενεργή στους όρχεις και στις ωοθήκες των εμβρύων, των νεογέννητων και των ώριμων ατόμων (206). Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο στάδιο των σερματογονίων και των πρωτογενών σπερματοκυττάρων, μειώνεται στο στάδιο των δευτερογενών σπερματοκυττάρων, ενώ δεν εκφράζεται καθόλου στις σπερματίδες και στα ώριμα σπερματοζώαρια (207, 208). Στα ώαρια εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα στο στάδιο σχηματισμού του άντρου και κατά το προ-ωορρηκτικό στάδιο, ενώ μειώνεται σημαντικά κατά την ωορρηξία και την ωρίμανση του ωαρίου (207, 209).

### **1.5 Δημιουργία Διαγονιδιακών Οργανισμών**

Διαγονιδιακός οργανισμός, καλείται ο οργανισμός στον οποίο έχει πραγματοποιηθεί τροποποίηση του γενετικού του υλικού, μέσω εισαγωγής νέου εξωγενούς κλωνοποιημένου τμήματος DNA (Transgenesis), ή μέσω αντικατάστασης και τροποποίησης της λειτουργίας των γονιδίων του με ομόλογο ανασυνδυασμό (Gene Targeting, Knock in and Knock out mutations).

Οι τύποι του εξωγενούς DNA είναι δυνατό να αποτελούν α. κλωνοποιημένα τμήματα DNA ή τμήματα cDNA σε ανασυνδυασμένους φορείς (π.χ. πλασμίδια, κοσμίδια, ιϊκοί φορείς), οι οποίοι επιτρέπουν την ενσωμάτωση και την έκφραση του DNA στόχου στον οργανισμό που εισάγονται, β. DNA constructs, στα οποία το DNA στόχος βρίσκεται ενσωματωμένο σε ειδική κατασκευή που περιέχει κάποιο γονίδιο αναφοράς, η έκφραση του οποίου μπορεί να προσδιοριστεί και να αναλυθεί (reporter genes: firefly luciferase gene, lacZ, GFP gene, enhanced GFP), και γ. μεγάλα τμήματα DNA (Yeast Artificial Chromosomes-YACS, Bacterial Artificial Chromosomes-BACS).

Η εισαγωγή του εξωγενούς μορίου DNA είναι δυνατό να συμβεί σε γαμετικά, σε εμβρυϊκά και σε σωματικά κύτταρα. Στην όλη διαδικασία εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι για την επίτευξη της εισαγωγής. Αυτές είναι η χρήση ιικών φορέων, η πρόσληψη DNA με μεσολάβηση φωσφορικού ασβεστίου, η μικροένεση του DNA στο εσωτερικό των ωαρίων, η σύντηξη μεμβρανικών κυστιδίων που περιέχουν DNA με κύτταρα στόχους και η ηλεκτροδιάτρηση (πρόσληψη DNA με μεσολάβηση ηλεκτρικού ρεύματος).

Οι βασικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για τη δημιουργία διαγονιδιακών οργανισμών είναι η τεχνική της μικροένεσης του εξωγενούς DNA στον αρσενικό προπυρήνα γονιμοποιημένων ωαρίων (Pronuclear Microinjection), η χρήση εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Embryonic Stem Cell Methods) και η χρήση ιικών φορέων (Viral Infection). Επιπλέον τεχνικές, οι οποίες αρχίζουν να εφαρμόζονται, είναι η τεχνική μεταφοράς του πυρήνα ενός σωματικού κυττάρου στο εσωτερικό ενός ωαρίου (Nuclear Transfer), η χρήση πλασμιδικών φορέων που φέρουν ενσωματωμένα ρετρομεταθετά στοιχεία (Transposable Elements), η χρήση ενδιάμεσων μορίων RNA (RNAi Interference) και η μεταφορά γενετικού υλικού μέσω της χρήσης σπερματοζωαρίων (Sperm Mediated Gene Transfer-SMGT).

### **1.5.1 Sperm Mediated Gene Transfer**

Η τεχνική Sperm Mediated Gene Transfer στηρίζεται στην ικανότητα των σπερματοζωαρίων να μεταφέρουν στο έμβryo κατά τη γονιμοποίηση, όχι μόνο το δικό τους γενετικό υλικό, αλλά και γενετικό υλικό με το οποίο μπορεί να έρθουν σε επαφή. Η πρώτη σχετική αναφορά έγινε το 1971 από τον Brackett και τους συνεργάτες τους, οι οποίοι έδειξαν την ενσωμάτωση του DNA του Simian Virus, στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων κουνελιού και στη συνέχεια την μεταφορά του στα ωάρια κατά τη γονιμοποίηση (210). Έως το 1989 δεν υπήρχαν άλλες αναφορές, όταν ο C. Spadafora (211) και οι συνεργάτες του μελέτησαν τη μεταφορά εξωγενούς υλικού σε έμβρυα μύδου, μετά από επώαση με τα σπερματοζωάρια. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες σε διάφορα είδη οργανισμών για να διευκρινιστεί ο βασικός μοριακός μηχανισμός που κρύβεται πίσω από αυτή την ιδιότητα των σπερματοζωαρίων και να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη βιοτεχνολογικών εφαρμογών για τη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων οργανισμών.

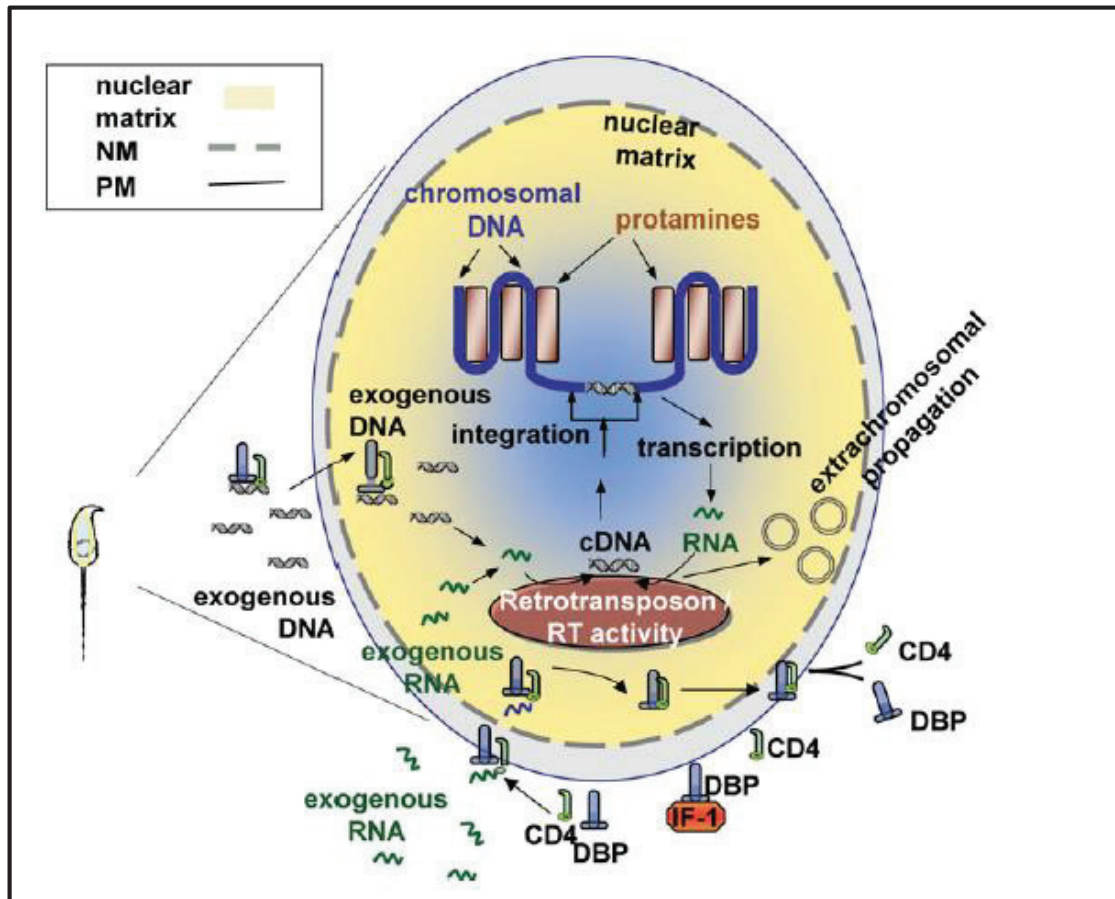
Τα εξωγενή μόρια νουκλεϊκών οξέων (DNA ή RNA) προσδένονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, μεταφέρονται στο εσωτερικό τους και ένα μέρος από αυτά ενσωματώνεται στο DNA του σπερματοζωαρίου. Η όλη διαδικασία δεν γίνεται τυχαία, αλλά ελέγχεται από συγκεκριμένα πρωτεϊνικά μόρια.

Τα βασικά χαρακτηριστικά της διαδικασίας είναι τα εξής:

- Τα εξωγενή μόρια DNA, σε όλα τα είδη των οργανισμών που έχουν μελετηθεί, προσδένονται επιλεκτικά στην μετά-ακροσωμική περιοχή ή στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής των σπερματοζωαρίων. Στον άνθρωπο συνδέονται στην μετά-ακροσωμική περιοχή και στο τμήμα σύνδεσης μεταξύ της ουράς και της κεφαλής. Στο μυ η σύνδεση παρατηρείται στην μετά-ακροσωμική και στην ισημερινή περιοχή της κεφαλής. Ο χρόνος πρόσδεσης είναι αρκετά μικρός και κυμαίνεται μεταξύ 20-40λεπτών. Στον άνθρωπο μέσα σε 20λεπτά προσδένεται το μεγαλύτερο ποσοστό των σπερματοζωαρίων, ενώ στον ταύρο και στο γουρούνι απαιτούνται 40λεπτά (212).
- Η σύνδεση ελέγχεται από ιοντικές αλληλεπιδράσεις και επηρεάζεται από το συνολικό φορτίο του εξωγενούς μορίου. Μεγαλύτερου μήκους μόρια συνδέονται πιο εύκολα συγκριτικά μ' εκείνα μικρότερου μήκους, πιθανά λόγω δημιουργίας περισσότερων ιοντικών αλληλεπιδράσεων. Για παράδειγμα, έχει δειχθεί ότι μόρια DNA μεγέθους 7Kb συνδέονται πιο αποτελεσματικά απ' ότι μόρια DNA μεγέθους 750bp.
- Η πρόσδεση δεν περιορίζεται μόνο στα μόρια του DNA, αλλά αφορά κάθε είδους αρνητικά φορτισμένου μακρομόριο. Η πρόσδεση είναι αντιστρεπτή και μπορεί να ελεγχθεί από τη παρουσία κατάλληλων ιοντικών μακρομορίων. Αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως η ηπαρίνη και ηθειϊκή δεξτράνη, συνιστούν αποτελεσματικούς ανταγωνιστές. Θετικά φορτισμένα μακρομόρια, όπως η πολύ-λυσίνη ευνοούν τη σύνδεση, ενώ μη φορτισμένα μακρομόρια δεν επηρεάζουν τη σύνδεση των μορίων DNA, στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων (213).
- Στη διαδικασία της σύνδεσης μεσολαβεί μία ομάδα πρωτεϊνών μεγέθους 30-35kDA, που βρίσκονται στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων και λειτουργούν ως υποδοχείς των εξωγενών μορίων (214). Τα προϊόντα έκφρασης των γονιδίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας-τάξης II (Major Histocompatibility Complex class II-MHC class II), φαίνεται επίσης, να ελέγχουν αυτή τη σύνδεση (215).
- Η σύνδεση αναστέλλεται από έναν γλυκοπρωτεϊνικό παράγοντα που περιέχεται στο σπερματικό υγρό (Inhibitory Factor-1) και ο οποίος προσδένεται ειδικά στους DNA

- πρωτεϊνικούς υποδοχείς της επιφάνειας των σπερματοζωαρίων (213, 214). Συνεπώς, μόνο σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα ή σπερματοζωάρια από εκσπερμάτιση, από τα οποία απομακρύνεται το σπερματικό υγρό με συνεχείς κατάλληλες πλύσεις, είναι ικανά να δεσμεύσουν και να προσλάβουν εξωγενή μόρια DNA. Η παρουσία του ανασταλτικού παράγοντα στο σπερματικό υγρό πιθανά αποτελεί προστατευτικό μηχανισμό, ενάντια στη πρόσδεση εξωγενών μορίων DNA που συναντούν τα σπερματοζωάρια μέσα στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών. Ένας ακόμα μηχανισμός, που ενδεχομένως να λειτουργεί προστατευτικά για τα σπερματοζωάρια, αποτελεί η ενεργοποίηση ενδονουκλεασών ως απάντηση στην ενσωμάτωση του εξωγενούς DNA. Η ενεργοποίηση των ενδονουκλεασών εξαρτάται από την ποσότητα του προσδεμένου DNA, προκαλεί αποικοδόμηση του εξωγενούς DNA και σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγεί τα σπερματοζωάρια σε θάνατο μέσω απόπτωσης (216).
- Μετά τη σύνδεση, ένα μικρό ποσοστό των εξωγενών μορίων DNA, συνήθως το 15-22%, μεταφέρεται στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων. Η είσοδος των εξωγενών μορίων ελέγχεται από τις πρωτεΐνες CD4, που βρίσκονται στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Ολόκληρη η διαδικασία απαιτεί πολύ μικρό χρονικό διάστημα καθώς έχει δειχθεί ότι στα σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα του μύος ολοκληρώνεται μέσα σε 30λεπτά (215, 217).
  - Την ενσωμάτωση ακολουθεί η δέσμευση των μορίων DNA στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων, η οποία είναι δυνατό να συνοδεύεται και από ενσωμάτωσή τους, μετά από γεγονός ανασυνδυασμού, σε συγκεκριμένες περιοχές στο γένωμα των σπερματοζωαρίων (218).
  - Το γεγονός αυτό υπέδειξε την ύπαρξη περιοχών στο γένωμα των σπερματοζωαρίων με λιγότερο συμπαγή δομή, που ευνοούν την ενσωμάτωση εξωγενών μορίων DNA. Μετέπειτα πειράματα απέδειξαν πως όντως ένα τμήμα του DNA των σπερματοζωαρίων έχει νουκλεοσωμική δομή και δεν είναι πακεταρισμένο με πρωταμίνες. Το τμήμα αυτό είναι ευαίσθητο στη δράση των νουκλεασών, βρίσκεται περιφερικά του πυρήνα και κοντά σε περιοχές πλούσιες σε μη μεθυλιωμένα ρετρομεταθετά στοιχεία, κυρίως της οικογένειας των LINE-1. Έχει προταθεί πως η ένθεση πραγματοποιείται σε αυτό το τμήμα και πως επιτελείται με τη συμμετοχή των ρετρομεταθετών στοιχείων (219). Η συμμετοχή των ρετρομεταθετών στοιχείων στην φαίνεται να σχετίζεται με την έκφραση του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφής.

Τα LINE-1 είναι αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία, που κωδικοποιούν από το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, ORF-2, το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης. Η ύπαρξή τους στη περιοχή του DNA των σπερματοζωαρίων που έχει δομή ευχρωματίνης, οδήγησε στη σκέψη πως εκφράζονται κατά τη σπερματογένεση και πως ενδεχομένως να αποτελούν πηγή ενεργότητας της ανάστροφης μεταγραφάσης. Ο σχεδιασμός ακόλουθων πειραμάτων, οδήγησε στην ανακάλυψη πως τα σπερματοζωάρια διαθέτουν δραστικότητα ανάστροφης μεταγραφάσης και πως είναι ικανά να μεταγράφουν αντίστροφα μόρια RNA σε cDNA (220). Σε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης, αποδείχθηκε πως τα παραγόμενα μόρια cDNA, λειτουργούν ως ενεργά ρετρογονίδια που οδηγούν σε μωσαϊκισμό κατά την εμβρυογένεση και πως μεταφέρονται και κατανέμονται μεταξύ των επόμενων γενεών πάλι με μωσαϊκό τρόπο. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε ότι οι ακολουθίες των cDNA μορίων παραμένουν σε ένα σταθερά χαμηλό αριθμό αντιγράφων ( $1 < \text{copy number per genome}$ ), βρίσκονται ως εξωχρωμοσωμικές δομές και κληρονομούνται με μη-Μενδελικό τρόπο (221). Γενικά, θεωρείται πως τα εξωγενή μόρια RNA ή DNA, αρχικά υπόκεινται σε ένα στάδιο ανάστροφης μεταγραφής, μετά την είσοδό τους στα σπερματοζωάρια και στη συνέχεια είναι πιθανό ένα μέρος από αυτά, να ενσωματωθεί στο DNA των σπερματοζωαρίων ή να παραμένει ως εξωχρωμοσωμικές δομές. Στο σχήμα 1 παρουσιάζεται το προτεινόμενο μοντέλο αντίστροφης μεταγραφής και ενσωμάτωσης ή μη ενσωμάτωσης, των εξωγενών μορίων RNA και DNA, στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων.



Σχήμα 1.2: Υποθετικό μοντέλο αντίστροφης μεταγραφής και ενσωμάτωσης ή μη ενσωμάτωσης, των εξωγενών μορίων RNA και DNA στο DNA των σπερματοζωαρίων

Για να είναι επιτυχής η εφαρμογή της τεχνικής SMGT, θα πρέπει να επιτευχθεί η δέσμευση των εξωγενών μορίων DNA στην επιφάνεια των σπερματοζωαρίων, η μεταφορά τους στο εσωτερικό και η ενσωμάτωσή τους στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων. Η επιτυχία της τεχνικής SMGT, φαίνεται να επηρεάζεται με τη μέθοδο επώασης που χρησιμοποιείται κατά την εφαρμογή της. Απλή επώαση των σπερματοζωαρίων με τα εξωγενή μόρια DNA, συνήθως οδηγεί σε πολύ μικρό ποσοστό ενσωμάτωσης. Η εφαρμογή βελτιωμένων πρωτοκόλλων, όπως τα παρακάτω, είναι δυνατό να έχει καλύτερα αποτελέσματα. α. η αρχική επώαση των σπερματοζωαρίων με τα εξωγενή μόρια DNA να ακολουθείται από μικροένεση του σπερματοζωαρίου στο εσωτερικό του ωαρίου. Ένας συνδυασμός της τεχνικής Sperm Mediated Gene Transfer και της τεχνικής Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) (222, 223), β. η μετατροπή των κυκλικών πλασμιδιακών φορέων σε γραμμικά μόρια με τη χρήση περιοριστικών ενζύμων, η οποία ακολουθείται με την

επιμόλυνση των γραμμικών φορέων και των περιοριστικών ενζύμων με λιποσώματα. Η τεχνική αναφέρεται ως Restriction Enzyme-Mediated Integration (REMI) και η εφαρμογή της ενισχύει την ενσωμάτωση των εξωγενών μορίων DNA στο DNA των σπερματοζωαρίων (224-226), γ. η επώαση των σπερματοζωαρίων με αντισώματα, ειδικά προς τους υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης των σπερματοζωαρίων, που διευκολύνουν την πρόσδεση και τη μεταφορά των εξωγενών μορίων στο εσωτερικό τους, Linker-Based Membrane Transgenesis (LMT) (227).





## **2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**



## 2.ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία συνιστούν ένα είδος γενετικών στοιχείων, η μελέτη των οποίων είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα, λόγω της ικανότητάς τους να μετατίθενται εντός του γενώματος του κυττάρου τους και να επηρεάζουν με αυτόν τον τρόπο, τη δομική και τη λειτουργική ακεραιότητά του. Έχει πραγματοποιηθεί πλήθος ερευνητικών εργασιών για τη μελέτη του ρόλου των ρετρομεταθετών στοιχείων στο εσωτερικό των κυττάρων, οι οποίες έχουν οδηγήσει σε σημαντικές παρατηρήσεις σχετικά με τον μηχανισμό με τον οποίο μετατίθενται, με το αποτέλεσμα που έχει η μετάθεσή τους για το κύτταρο, καθώς και με το είδος των κυττάρων που συνήθως εκφράζονται και μετατίθενται. Όσον αφορά το είδος των κυττάρων, είναι ενδιαφέρον ότι παρατηρούνται κυρίως σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα, σε αρχέγονα νευρικά κύτταρα, σε νευρικά κύτταρα εγκεφάλου και σε εμβρυϊκούς ιστούς. Ωστόσο, η έκφρασή τους ελέγχεται από τα κύτταρα, για να εξασφαλίζεται η εύρυθμη λειτουργία τους.

Σκοπός της παρούσας εργασίας αποτέλεσε η μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης σε πλήρως διαφοροποιημένα σπερματοζώαρια και η μελέτη της επαγωγής της έκφρασής τους στη φυσιολογική προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μύος. Αν και έχουν αναφερθεί γεγονότα ρετρομετάθεσης σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των σπερματοζωαρίων, δεν έχουν αναφερθεί σε ώριμα σπερματοζώαρια. Επίσης, αν και έχουν ανιχνευθεί γεγονότα ρετρομετάθεσης σε πρώιμα εμβρυϊκά στάδια ανάπτυξης, δεν έχει αναφερθεί το πώς επηρεάζει η ανεξέλεγκτη έκφρασή τους, τη πορεία της εμβρυϊκής προεμφυτευτικής ανάπτυξης.

Παράλληλα, σκοπός της εργασίας αποτέλεσε η μελέτη του ρόλου του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση και στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης εμβρύων μύος. Τόσο τα σπερματοζώαρια, όσο και τα ωάρια, διαθέτουν ενεργότητα ανάστροφης μεταγραφάσης και για το λόγο αυτό, μελετήσαμε τον τρόπο, με τον οποίο συμμετέχει και ρυθμίζει τη φυσιολογική ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων καθώς και τον τρόπο, με τον οποίο επηρεάζει τη φυσιολογική γονιμοποίηση και τη φυσιολογική ανάπτυξη των εμβρύων μύος.



### **3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

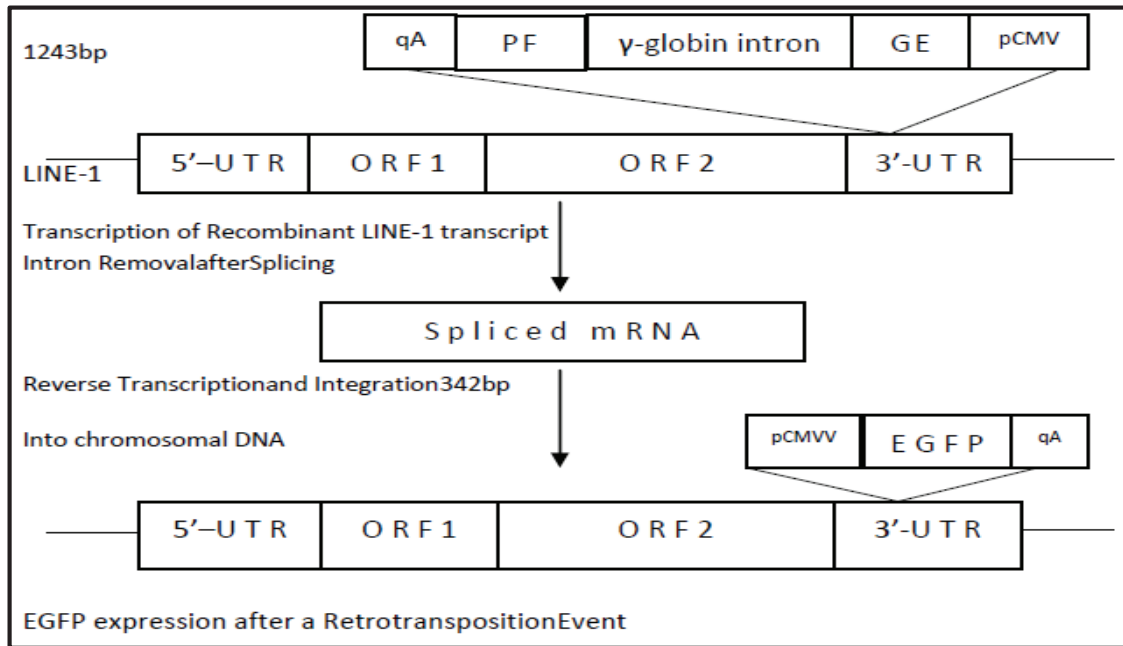


### **3. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Μελέτη Γεγονότων Ρετρομετάθεσης**

##### **3.1.1 Πειραματικό εργαλείο για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης**

Για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς, που φέρουν κλωνοποιημένα τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1(pL1PR-EGFP), τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10 (HERV/EGFP-INT) και τα ρετρομεταθετά στοιχεία του μύδου VL30(pNVL-3\*/EGFP-INT) (228, 229). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία βρίσκονται σημασμένα στο 3' άκρο τους, με ειδική κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης. Η κασέτα περιέχει το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP, η έκφραση του οποίου, διακόπτεται από τη παρουσία του εσωνίου της γ-σφαιρίνης σε αντίθεση με μεταγραφική ως προς αυτό. Η έκφραση της EGFP πιστοποιεί την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης και προϋποθέτει: α. τη μεταγραφή του ρετρομεταθετού στοιχείου και του γονιδίου της EGFP, β. το μάτισμα και την απομάκρυνση του εσωνίου της γ-σφαιρίνης από το γονίδιο της EGFP, γ. την αντίστροφη μεταγραφή του ενδιάμεσου μορίου mRNA σε μόριο cDNA, δ. την ενσωμάτωση του cDNA σε νέα θέση στο γένωμα και ε. την έκφρασή του. Ως θετικό control, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς, οι οποίοι δεν φέρουν κανένα ρετρομεταθετό στοιχείο, αλλά περιέχουν μόνο το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP, η έκφραση του οποίου είναι δυνατή καθώς απουσιάζει το εσωνίο της γ-σφαιρίνης (pEGFP-N1). Ως αρνητικό control, χρησιμοποιήθηκαν ανασυνδυασμένοι πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 (pL1RP-JM111), τα οποία έχουν υποστεί μετάλλαξη και είναι ανενεργά. Τα ανενεργά στοιχεία LINE-1 βρίσκονται σημασμένα στο 3' άκρο τους με την κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης (228). Η κατασκευή των πλασμιδιακών φορέων πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας του Τμήματος της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, από την ερευνητική ομάδα του καθηγητή Τζαβάρα Θεόδωρου.



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση της κασέτας αντίληψης των γεγονότων ρετομετάθεσης, που φέρει τα ανθρώπινα ρετρομεταθέτα στοιχεία LINE -1.

### 3.1.2 Πειραματόζωα

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί μύες, στελέχους FVB/N. Η προμήθεια των πειραματόζωων έγινε από το Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ και οι συνεχείς αναπαραγωγές του στελέχους πραγματοποιήθηκαν στο εκτροφείο της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο σχεδιασμός των πειραμάτων ήταν σύμφωνος με όλες τις προβλεπόμενες προϋποθέσεις για τη ευζωία των πειραματόζωων και χορηγήθηκε έγκριση από τη Γενική Διεύθυνση Αγροτικής Οικονομίας και Κτηνιατρικής Π.Ε. Ιωαννίνων, για τη πραγματοποίησή τους. Οι μύες είχαν ελεύθερη πρόσβαση στο νερό και συγκεκριμένο πρότυπο διατροφής. Η φωτοπερίοδος, στο χώρο φύλαξής τους, είχε διάρκεια 12 ωρών. Οι αρσενικοί μύες χρησιμοποιήθηκαν σε ηλικία 10-12 εβδομάδων και οι θηλυκοί μύες σε ηλικία 6-8 εβδομάδων. Στο τέλος κάθε πειράματος, η θανάτωση των πειραματόζωων γίνονταν με αυχενική εξάρθρωση.



### 3.1.3 Απομόνωση σπερματοζωαρίων από αρσενικούς μύες

Η απομόνωση των σπερματοζωαρίων πραγματοποιήθηκε από γόνιμους αρσενικούς μύες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε χρονικό διάστημα 3-7 ημερών, μετά την απομάκρυνσή τους από τον χώρο ζευγαρώματος με τις θηλυκές μύες. Από κάθε μυ αφαιρέθηκαν οι δύο επιδιδυμίδες των όρχεων και τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Sperm Medium, COOK, Limerick, Ireland), το οποίο ήταν καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland). Μετά από την διάτρηση, του σημείου ουράς, της κάθε επιδιδυμίδας (cauda epididymis) με σύριγγα ινσουλίνης, οι επιδιδυμίδες τοποθετήθηκαν για 30 λεπτά σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας, για να απελευθερωθούν τα σπερματοζωάρια στο καλλιεργητικό μέσο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η επιλογή των καλύτερα κινητών σπερματοζωαρίων με τη μέθοδο Swim Up και ο υπολογισμός της συγκέντρωσής τους σε πλάκα Neubauer. Ένα μέρος της ποσότητας των σπερματοζωαρίων χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης για τη μελέτη της επίδρασης των γεγονότων ρετρομετάθεσης στη πρώιμη ανάπτυξη εμβρύων μυός και ένα άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε σε πειράματα μελέτης γεγονότων ρετρομετάθεσης.

### 3.1.4 Υπολογισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων με την πλάκα Neubauer, αρχικά χρησιμοποιήθηκε μια μικρή ποσότητα του σπέρματος (~6μL) για τον προσδιορισμό του αριθμού των σπερματοζωαρίων ανά οπτικό πεδίο και για την αξιολόγηση της κατάλληλης αραιώσης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία:

Σπερματοζωάρια/οπτικό πεδίο με φακό 10X	Αραίωση	Δείγμα (ml)	Διαλύτης(ml)
Swim up	1:2	100	100
<15	1:5	100	400
15-40	1:10	50	450
40-200	1:20	50	950
>200	1:50	50	2450

Πίνακας3.1: Υπολογισμός της αραιώσης

1)Υπολογισμός της κατάλληλης αραιώσης και Vortex του δείγματος περίπου για 10 δευτερόλεπτα.

2)Τοποθέτηση της καλυπτρίδας και προσθήκη σε κάθε θάλαμο της πλάκας Neubauer περίπου 10μl από το δείγμα σπέρματος.

3)Τοποθέτηση της πλάκας Neubauer σε υγρό περιβάλλον για 10-15 λεπτά, ώστε να κατακαθίσουν τα σπερματοζωάρια στο πλέγμα του θαλάμου μέτρησης.

4)Προσδιορισμός του αριθμού των τετραγώνων που πρέπει να μετρηθούν

Αριθμός σπερματοζωαρίων στον πρώτο θάλαμο	Αριθμός τετραγώνων που πρέπει να μετρηθούν
<10	25
10-40	10
>40	5

Πίνακας3.2: Αριθμός τετραγώνων που πρέπει να μετρηθούν

5)Πρόσθεση των μετρήσεων από τους δύο θαλάμους, διαίρεση με τον κατάλληλο συντελεστή και υπολογισμός της συγκέντρωση των σπερματοζωαρίων/ml.

Αραίωση	Αριθμός τετραγώνων που μετρήθηκαν		
	25	10	5
1:2	100	40	20
1:5	40	16	8
1:10	20	8	4
1:20	10	4	2
1:50	4	1,6	0,8

Πίνακας3.3: Υπολογισμός της συγκέντρωσης με σύμφωνα με τον αριθμό των τετραγώνων που μετρήθηκαν.

6)Πολλαπλασιασμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων επί τον συνολικό όγκο του σπέρματος και υπολογισμός του συνολικού αριθμού σπερματοζωαρίων στο δείγμα.

### 3.1.5 Επεξεργασία του σπέρματος για τα πειράματα μελέτης γεγονότων ρετρομετάθεσης στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων

Μετά τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του σπέρματος, τα σπερματοζωάρια επωάστηκαν σε κατάλληλο καλλιεργητικό υλικό (Sydney IVF Sperm Medium, COOK, Limerick, Ireland) με τους πλασμιδιακούς φορείς, που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 ή HERVK-10 και τα στοιχεία VL30 του μυός. Οι πλασμιδιακοί φορείς επωάστηκαν με τα σπερματοζωάρια συγκεντρώσεις των 50,100,200 και 400ngr/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια, για 5, 12 και 24 ώρες, σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Ως ομάδες ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν α. η ομάδα των σπερματοζωαρίων, τα οποία δεν επωάστηκαν με κανέναν πλασμιδιακό φορέα β. η ομάδα των σπερματοζωαρίων που επωάστηκαν με το πλασμιδιακό φορέα pEGFP και γ. η ομάδα σπερματοζωαρίων που επωάστηκαν με το πλασμιδιακό φορέα που φέρει τα ανενεργά ανθρώπινα στοιχεία LINE-1. Η ταυτοποίηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια, πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή τεχνική της PCR, με την ανάλυση με κυτταρομετρία ροής (FACS analysis) και με τη παρατήρηση σε συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscopy).

Παράλληλα, μελετήθηκε η αναστολή των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια, με τη χρήση του αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine (Sigma Aldrich, Life Science Chemilab A.E., Athens, Greece). Η Lamivudine διαλύθηκε σε DMSO (Sigma Aldrich, Life Science Chemilab A.E., Athens, Greece), παρασκευάστηκε στις συγκεντρώσεις των 15, 25, 50, 200, 400 και 800μM και προστέθηκε στο καλλιεργητικό υλικό των σπερματοζωαρίων σε τελικό όγκο 0.5%v/v. Τα σπερματοζωάρια επωάστηκαν με την Lamivudine για 2 ώρες και στη συνέχεια προστέθηκαν οι πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση 50ngr/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια. Στην ομάδα ελέγχου προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο των σπερματοζωαρίων DMSO, χωρίς τη Lamivudine, σε τελικό όγκο 0.5%v/v. Τα υπό μελέτη δείγματα επωάστηκαν για 5 ώρες σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) και στη συνέχεια αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής, για τον προσδιορισμό του ποσοστού μείωσης των γεγονότων ρετρομετάθεσης.

### **3.1.6 Επεξεργασία του σπέρματος για τα πειράματα in vitro γονιμοποίησης**

Το δείγμα των σπερματοζωαρίων που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα in vitro γονιμοποίησης χωρίστηκε σε 4 επιμέρους τμήματα για να σχηματιστούν οι εξής ομάδες μελέτης: α. ομάδα ελέγχου β. ομάδα σπερματοζωαρίων επωασμένων με πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 ή τα ανθρώπινα στοιχεία HERVK-10 ή τα στοιχεία VL30, του μυός, γ. ομάδα σπερματοζωαρίων επωασμένων με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1 και δ. ομάδα σπερματοζωαρίων επωασμένων με τον πλασμιδιακό φορέα , που φέρει τα ανενεργά ανθρώπινα στοιχεία LINE-1. Κάθε επιμέρους τμήμα των σπερματοζωαρίων μεταφέρθηκε σε καλλιεργητικό μέσο γονιμοποίησης (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland), καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland) και τοποθετήθηκε για 1<sup>1/2</sup> ώρα σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5%CO<sub>2</sub>), ώστε να αποκτήσουν τα σπερματοζωάρια ικανότητα γονιμοποίησης. Μετά το πέρας της 1<sup>ης</sup> ώρας, προστέθηκαν στο καλλιεργητικό μέσο, σε συγκέντρωση 50ngr/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια τα ρετρομεταθετά στοιχεία και επώαστηκαν με τα σπερματοζωάρια για 30λεπτά. Μετά το τέλος της επώασης, τα σπερματοζωάρια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία γονιμοποίησης (καλλιεργητικό μέσο Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland, καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland), σε συγκέντρωση 200 σπερματοζωάρια/μl. Κάθε τρυβλίο προετοιμάστηκε και τοποθετήθηκε στον κλίβανο υγρής καλλιέργειας 14-16 ώρες πριν τη χρήση του.

### **3.1.7 Απομόνωση ωαρίων από θηλυκούς μύες, μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας**

Για την πολλαπλή ανάπτυξη των ωαρίων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά, στις θηλυκές μύες, η θυλακιοτρόπος ορμόνη FSH (rec-FSH, Gonal-F, Merk Serono, London, UK), σε ποσότητα 8IU. Για την ωρίμανση και την απελευθέρωση των ωαρίων χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά 48 ώρες μετά την FSH, η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη hCG ((hCG, Pregnyl, N.V. Organon, Oss, The Netherlands), σε ποσότητα 5IU. Τα ωάρια απομονώθηκαν από τον ωαγωγό των θηλυκών μυών, 13 ώρες μετά τη χορήγηση της hCG, σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Follicle Flush Buffer & Fertilization

Medium, COOK, Limerick, Ireland), το οποίο ήταν καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland).

### **3.1.8 In vitro γονιμοποίηση**

Τα ωάρια μετά την απομόνωσή τους τοποθετήθηκαν στα τρυβλία γονιμοποίησης και επώαστηκαν με τα σπερματοζωάρια για 5 ώρες σε κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland), καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland), σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Μετά τις 5 ώρες τα ωάρια καθαρίστηκαν σε κατάλληλο μέσο (Sydney IVF Fertilization Medium, COOK, Limerick, Ireland) για την απομάκρυνση της περίσσειας του σπέρματος και τοποθετήθηκαν σε νέο καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης, καλυμμένο με ορυκτέλαιο (Sydney IVF Cleavage Medium & Sydney IVF Blastocyst Medium, COOK, Limerick, Ireland, Sydney IVF Culture Oil, COOK, Limerick, Ireland), έως το στάδιο της βλαστοκύστης, σε κλίβανο υγρής καλλιέργειας (37°C, 5%CO<sub>2</sub>). Η επιτυχία της γονιμοποίησης ελέγχθηκε με τη παρουσία του δεύτερου πολικού σωματίου και το σχηματισμό των δύο προπυρήνων. Η in vitro προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων του μυός καταγράφηκε σε καθημερινή βάση. Κάθε τρυβλίο προετοιμάστηκε και τοποθετήθηκε στον κλίβανο υγρής καλλιέργειας 14-16 ώρες πριν τη χρήση του.

### **3.1.9 Συνεστιακή Μικροσκοπία**

Τα σπερματοζωάρια, μετά το τέλος της επώασης με τους πλασμιδιακούς φορείς, καθαρίστηκαν με κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο και τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα μικροσκοπίου, για τη παρατήρηση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP στο συνεστιακό μικροσκόπιο. Στα έμβρυα η παρατήρηση για την έκφραση της EGFP, έγινε μετά από την παύση της προεμφυτευτικής τους πορείας, στο καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξής τους.

Η παρατήρηση πραγματοποιήθηκε με Leica TCS SP5 ομοεστιακό μικροσκόπιο (Confocal), το οποίο είναι εξοπλισμένο με λέιζερ αργού (για διέγερση στα 488nm), ακτίνα λέιζερ στερεάς κατάστασης 561 και λέιζερ ηλίου-νέον (για διέγερση στα 633nm). Για την εύρεση του στόχου χρησιμοποιήθηκε Leica X10 και οι εικόνες αποκτήθηκαν με χρήση

LASAF Software. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα, καθώς οι παρατηρήσεις στις ομάδες ελέγχου και στις ομάδες επώασης με τους πλασμιδιακούς φορείς, έχουν παρθεί με τις ίδιες ρυθμίσεις έντασης φθορισμού (Excitation=488, Detection=500–630, Argon 30%, Lazer Power=15%, Smart gain=852v).

### **3.1.10 Ανάλυση με Κυτταρομετρία Ροής**

Τα σπερματοζώαρια, μετά το τέλος της επώασής τους με τα ρετρομεταθετά στοιχεία, καθαρίστηκαν με PBS και αναλύθηκαν με ποσοτική κυτταρομετρία ροής, για τον προσδιορισμό της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 σπερματοζώαρια/ανά δείγμα σπέρματος και η ανάλυση των δεδομένων έγινε με τη χρήση του λογισμικού CellQuest v.3.1. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των κυττάρων θετικά στη ρετρομετάθεση έγινε με τη χρήση κατανομών φθορισμού, οι οποίες χαρακτηρίζονται από συγκεκριμένα όρια έντασης φθορισμού, για τη διάκριση του θετικού από το αρνητικό σήμα. Σε κάθε ανάλυση, με βάση τη κατανομή της έντασης φθορισμού του δείγματος ελέγχου, τα όρια φθορισμού τοποθετούνται έτσι, ώστε το 99.6% των κυττάρων να συνιστά αρνητικές τιμές και το 0.4% ψευδώς θετικές τιμές. Μετατόπιση της κατανομής φθορισμού, στα υπό μελέτη δείγματα, πέρα από το όριο του 0.4% συνιστά θετικές τιμές. Το ποσοστό των κυττάρων θετικά στα γεγονότα ρετρομετάθεσης υπολογίζεται με την αφαίρεση του ποσοστού των ψευδώς θετικών τιμών από το ποσοστό των θετικών τιμών, μετά από επικάλυψη των καμπυλών κατανομής του υπό μελέτη δείγματος και του δείγματος ελέγχου (229). Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων αξιολογήθηκε με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Μετρήσεις με  $p \leq 0.001, D/s(n) \geq 12$  και  $D \geq 0.12$  θεωρήθηκαν ως στατιστικά σημαντικές. Η στατιστική ανάλυση για το προσδιορισμό της μέσης συχνότητας ρετρομετάθεσης στα δείγματα του σπέρματος, πραγματοποιήθηκε με το ANOVA και το t-test, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS (version 20).

### **3.1.11 Εξαγωγή DNA από σπερματοζώαρια**

Η εξαγωγή του DNA από τα σπερματοζώαρια έγινε με το QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen), με ορισμένες αρχικές τροποποιήσεις της πειραματικής πορείας. Συγκεκριμένα, προστέθηκαν 20μl από την Proteinase K (QIAGEN) και 100μl από το buffer X (20 mM

Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 80 mM DTT, 4% SDS) σε tube που περιέχει το δείγμα σπερματοζωαρίων σε συγκέντρωση  $5 \times 10^6$  και επώαστηκαν για 1 ώρα στους  $56^\circ\text{C}$ . Μετά τη 1 ώρα προστέθηκαν 200  $\mu\text{l}$  από το AL buffer και 200  $\mu\text{l}$  απόλυτης αιθανόλης και στη συνέχεια το πρωτόκολλο ακολούθησε τα υπόλοιπα βήματα της πορείας του 'blood and body fluid protocol'. **1.** Φυγοκέντρηση του tube στις 6000xg (8000 rpm) για 1 λεπτό **2.** Μεταφορά του μίγματος σε QIAamp spin column και φυγοκέντρηση στις 6000xg (8000 rpm) για 1 λεπτό **3.** Τοποθέτηση του υπερκειμένου σε collection tube (2ml) **4.** Προσθήκη 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1 και φυγοκέντρηση στις 6000xg (8000 rpm) για 1 λεπτό **5.** Τοποθέτηση υπερκειμένου σε νέο collection tube (2ml) **6.** Προσθήκη 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2 και φυγοκέντρηση στις 20.000xg (14.000 rpm) για 3 λεπτά **7.** Τοποθέτηση του υπερκειμένου σε νέο tube των 1,5ml **8.** Προσθήκη 80  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O **9.** Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό **10.** Φυγοκέντρηση στις 6000xg (8000 rpm) για 1 λεπτό.

### 3.1.12 Λύση εμβρύων

Κάθε έμβryo μεταφέρθηκε σε Eppendorf tube που περιείχε 10  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O και τοποθετήθηκε στους  $-20^\circ\text{C}$ , τουλάχιστον, για 12 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκε PCR-grade Proteinase K (Qiagen) σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  και ακολούθησε κυκλοποίηση και λύση των εμβρύων μετά από επώαση στις εξής συνθήκες α.  $37^\circ\text{C}$  για 1 ώρα, β.  $55^\circ\text{C}$  για 30 λεπτά και γ.  $95^\circ\text{C}$  για 10 λεπτά.

### 3.1.13 Ανάλυση PCR

GFP968F forward (5'-3')	GCACCATCTTCTTCAAGGACGAC	Unspliced:1243 Spliced:342
GFP1013R reverse (5'-3')	TCTTTGCTCAGGGCGGACTG	Unspliced:1243 Spliced:342

Πίνακας 3.4: Ζεύγη εκκινήτων για την αλληλουχία του γονιδίου της EGFP

Η αντίδραση για κάθε δείγμα σπερματοζωαρίων είναι η εξής:

Buffer10x	5 $\mu$ L
dNTPs 0.02mM	5 $\mu$ L
Forward primer, 0.4 $\mu$ mol/	2 $\mu$ l
Reverse primer, 0.4 $\mu$ mol/m	2 $\mu$ L
MgCl 1.75mM	1,75 $\mu$ L
Taq Pol 0.05 Units/ml	0,5 $\mu$ L
DNA	10 $\mu$ L
dH <sub>2</sub> O	μέχρι 50 $\mu$ L

Οι συνθήκες της PCR για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζώαρια είναι οι εξής:

	EGFP	
Αρχική αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C 15 min	
Αποδιάταξη	94 <sup>0</sup> C 30 sec	36 Κύκλοι
Υβριδισμός	59 °C 30 sec	36 Κύκλοι
Σύνθεση	72 °C 1.5 min	36 Κύκλοι
Τελική επιμήκυνση	72 °C 10 min	

Πίνακας3.5: Συνθήκες της PCR για το γονίδιο της EGFP

Οι συνθήκες της PCR για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα έμβρυα είναι οι ίδιες με αυτές των σπερματοζωαρίων. Μετά τη PCR, πραγματοποιήθηκε και Nested PCR 25 κύκλων. Για τη Nested PCR χρησιμοποιήθηκαν 2 $\mu$ L από την αρχική αντίδραση PCR και 8  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O. Το μείγμα και οι συνθήκες της αντίδρασης είναι ίδια με τα παραπάνω. Ο



διαχωρισμός και η ταυτοποίηση των PCR προϊόντων έγινε σε πηκτή αгарόζης 2%. Τα προϊόντα παρατηρήθηκαν μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο.

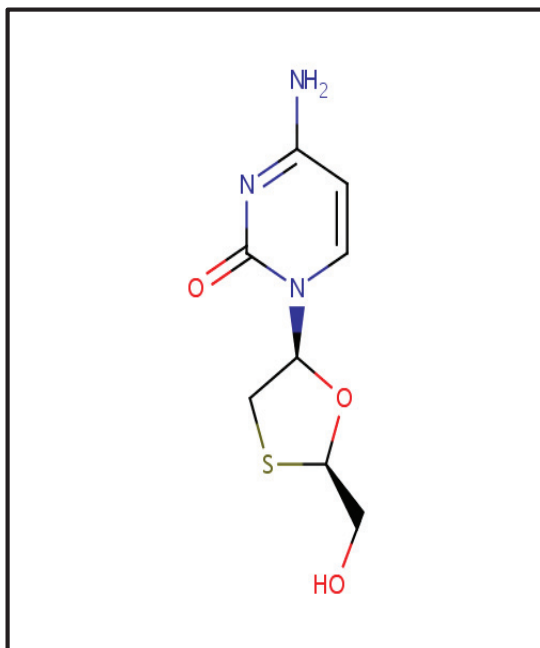
### **3.2 Πειράματα αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης**

#### **3.2.1 Πειραματόζωα**

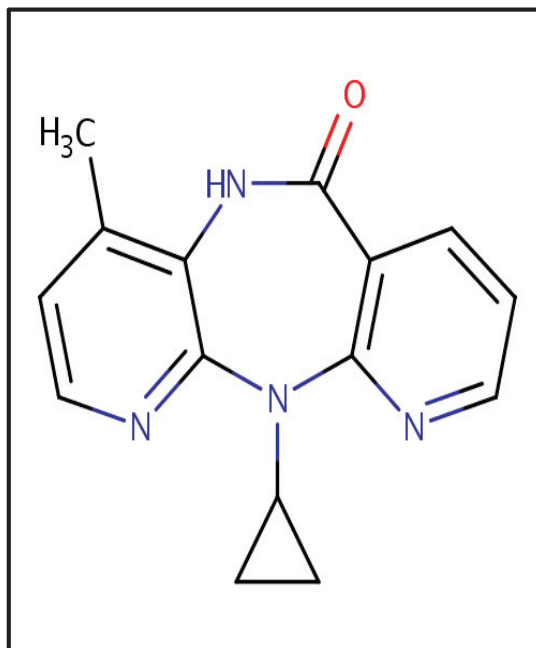
Για τη μελέτη της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση, χρησιμοποιήθηκαν ως πειραματόζωα αρσενικοί και θηλυκοί μύες, στελέχους FVB/N και ηλικίας 21 ημερών.

#### **3.2.2 Πρωτόκολλο χορήγησης των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης**

Ως αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης χρησιμοποιήθηκαν η Lamivudine και η Nevirapine. Η Lamivudine (2',3'-διδεοξυ-3'-θειοκυτιδίνη), είναι ένα νουκλεοσιδικό ανάλογο, ισχυρός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης (Nucleoside Analog Reverse Transcriptase Inhibitor-NRTI). Έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί από τον ιό του HIV (AIDS) και από Ηπατίτιδα Β. Η Nevirapine (11-Cyclopropyl-5,11-dihydro-4-methyl-6H-dipyrido(3,2-b:2',3'e)(1,4)diazepin-6-one), είναι ένα μη νουκλεοσιδικό ανάλογο, ισχυρός αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης (Non Nucleoside Analog Reverse Transcriptase Inhibitor-NNRTI) και έχει χρησιμοποιηθεί και αυτή για τη θεραπεία ασθενών που έχουν μολυνθεί από τον ιό του HIV (AIDS).



Εικόνα3.1: Χημική δομή της Lamivudine



Εικόνα3.2: Χημική δομή της Nevirapine

Η Lamivudine διαλυτοποιήθηκε σε DMSO και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά, σε φυσιολογικό ορό (300μl), στα πειραματόζωα σε συγκέντρωση 50mgr/Kg. Στα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου χορηγήθηκε η ίδια ποσότητα φυσιολογικού ορού και DMSO (χωρίς τη Lamivudine). Οι ενέσεις γινόντουσαν καθημερινά για 5 ημέρες/εβδομάδα. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 10 εβδομάδες.

Η Nevirapine διαλυτοποιήθηκε σε DMSO και χορηγήθηκε ενδοπεριτοναϊκά, σε φυσιολογικό ορό (300μl), στα πειραματόζωα σε συγκέντρωση 30mgr/Kg. Στα πειραματόζωα της ομάδας ελέγχου χορηγήθηκε η ίδια ποσότητα φυσιολογικού ορού και DMSO (χωρίς τη Nevirapine). Οι ενέσεις γινόντουσαν καθημερινά για 5 ημέρες/εβδομάδα. Η συνολική διάρκεια του πειράματος ήταν 10 εβδομάδες.

Στα πειράματα με τη χρήση του αναστολέα Lamivudine μελετήθηκαν συνολικά 32 θηλυκά και 32 αρσενικά, τα οποία για κάθε φύλο χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες, α. ομάδα ελέγχου και β. ομάδα αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης. Στα πειράματα με τη χρήση του αναστολέα Nevirapine μελετήθηκαν συνολικά 6 αρσενικά και 6 θηλυκά, τα οποία χωρίστηκαν επίσης τυχαία, για κάθε φύλο, σε 2 ομάδες των 3 πειραματόζωων. Μετά το πέρας του πειράματος, τα αρσενικά και τα θηλυκά πειραματόζωα θυσιάστηκαν με αυχενική εξάρθρωση. Από τους αρσενικούς μύες απομονώθηκαν οι όρχεις και τα

σπερματοζωάρια από τις επιδιδυμίδες, και από τους θηλυκούς μύες οι ωοθήκες. Παρατηρήθηκε η μορφολογία των όρχεων και των ωοθηκών, μετά από ιστολογική εξέταση με χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης. Καταγράφηκε ο αριθμός και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και μελετήθηκε η μορφολογία τους, με τη χρώση Παπανικολάου. Τέλος, μελετήθηκε η ακεραιότητα της δομής του DNA των σπερματοζωαρίων με κυτταρομετρία ροής μετά από χρώση με το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (acridine orange).

### **3.2.3 Ιστολογική εξέταση**

Για την ιστολογική μελέτη οι όρχεις και οι ωοθήκες μονιμοποιήθηκαν σε φορμαλίνη, καλύφθηκαν σε παραφίνη και χρωματίστηκαν με αιματοξυλίνη-ωσίνη. Η παρατήρηση της μορφολογίας των ιστών έγινε με οπτική μικροσκοπία.

### **3.2.4 Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των σπερματοζωαρίων έγινε με τη χρήση της πλάκας Neubauer ακολουθώντας τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

### **3.2.5 Παρατήρηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων**

Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων μελετήθηκε με τη τεχνική της χρώση Παπανικολάου, κατά την οποία χρησιμοποιούνται οι χρωστικές Αιματοξυλίνη, Orange και Εωσίνη, και βάφουν διαφορετικά τα επιμέρους τμήματα της δομής του σπερματοζωαρίου (κεφαλή, αυχένος, ουρά). Στην αρχή της τεχνικής έγινε επίστρωση κάθε δείγματος σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετήθηκε για 15 λεπτά σε αιθανόλη 95% και στη συνέχεια ακολουθήσαν τα εξής στάδια:

1. Οινόπνευμα 50%-10εμβαπτίσεις
2. Απεσταγμένο Νερό-10εμβαπτίσεις
3. Χρωστική Αιματοξυλίνης Harris-3λεπτά
4. Νερό βρύσης-5λεπτά
5. Όξινη Αιθανόλη-2βυθίσματα

6. Νερό βρύσης-5λεπτά
7. Απεσταγμένο Νερό-1εμβάπτιση
8. Οινόπνευμα 50%-10εμβαπτίσεις
9. Οινόπνευμα 70%-10εμβαπτίσεις
10. Οινόπνευμα 80%-10εμβαπτίσεις
11. Οινόπνευμα 95%-10 εμβαπτίσεις
12. Χρωστική Orange-2λεπτά
13. Οινόπνευμα 95%-8εμβαπτίσεις
14. Οινόπνευμα 95%-8εμβαπτίσεις
15. Χρωστική Εωσίνη-5λεπτά
16. Οινόπνευμα 95%-8εμβαπτίσεις 17. Οινόπνευμα 95%-8εμβαπτίσεις

Η παρατήρηση της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων πραγματοποιήθηκε σε οπτικό μικροσκόπιο.

### 3.2.6 Τεστ ανάλυσης της δομής της χρωματίνης σπέρματος

Η ακεραιότητα της δομής του DNA των σπερματοζωαρίων, μελετήθηκε με την τεχνική Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA), με ανάλυση κυτταρομετρίας ροής, μετά από χρώση του σπέρματος με τη χρωστική πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (Acridine Orange AO). Το πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης συνδέεται σε μόρια νουκλεϊκών οξέων με ηλεκτροστατικούς δεσμούς και εκπέμπει πράσινο φθορισμό (στα 520nm), όταν συνδέεται σε δίκλωνο DNA και κόκκινο φθορισμό (στα 640nm), όταν συνδέεται σε μονόκλωνο DNA ή RNA. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για κάθε δείγμα σπέρματος περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα. Αρχικά το σπέρμα συλλέγεται από την επιδιδυμίδα ώριμων αρσενικών μυών σε καλλιεργητικό υλικό, προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του και αναμειγνύεται με αποδιατακτικό διάλυμα TNE (0.15M NaCl, 0.1M Tris, 1mM EDTA, pH7.4), σε τελική συγκέντρωση  $2 \times 10^6$  cells/ml. Σε 100μL από αυτό το δείγμα, προστίθενται 200μL όξινου απορρυπαντικού διαλύματος λύσης (0.1% TritonX-100, 0.15M NaCl, 0.08M HCl pH1.2) και τοποθετούνται για 30 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθενται 600μL από το διάλυμα της Acridine Orange (37mM citric acid, 126mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM EDTA, 0.15M NaCl, pH7.4 και Acridine Orange (Sigma), σε τελική συγκέντρωση 10mg/ml) και μετά από 5 λεπτά παραμονής σε

θερμοκρασία δωματίου, το δείγμα αναλύεται με κυτταρομετρία ροής. Σε κάθε μέτρηση αναλύθηκαν 30.000 σπερματοζωάρια/δείγμα και προσδιορίστηκε ο φθορισμός του δείγματος με τη χρήση κατάλληλων φίλτρων εκπομπής στο πράσινο (BP 530/30 filter) και στο κόκκινο (BP 650LP filter), μετά από διέγερση της χρωστικής Acridine Orange στα 488 nm.

### **3.2.7 Παρατήρηση της *in vitro* προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός, παρουσία των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης**

Για να μελετηθεί η επίδραση των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης στην *in vitro* προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μυός, ακολουθήθηκε η παρακάτω πειραματική πορεία:

1. Απομόνωση σπερματοζωαρίων από την επιδιδυμίδα αρσενικών μυών, προσδιορισμός της συγκέντρωσής τους και διαίρεση κάθε δείγματος σε δύο ομάδες, στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα επίδρασης με τους αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης Nevirapine ή Lamivudine. Καθ' όλη τη διάρκεια του capacitation των σπερματοζωαρίων στο καλλιεργητικό μέσο της ομάδας ελέγχου προστίθενται DMSO σε τελικό όγκο 0,25% v/v και στην ομάδα επίδρασης με τους αναστολείς, 50μM του κάθε αναστολέα σε τελικό όγκο 0,25% v/v.

2. Απομόνωση ωαρίων από τον ωαγωγό θηλυκών μυών, μετά από πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας.

3. Προσθήκη DMSO στο καλλιεργητικό μέσο γονιμοποίησης της ομάδας ελέγχου σε τελικό όγκο 0,25%v/v. Προσθήκη στην ομάδα επίδρασης με τους αναστολείς, 200μM του κάθε αναστολέα σε τελικό όγκο 0,25% v/v. Επάωση των σπερματοζωαρίων και των ωαρίων, για πέντε ώρες στο μέσο γονιμοποίησης.

4. Προσθήκη DMSO στο καλλιεργητικό μέσο εμβρυϊκής ανάπτυξης της ομάδας ελέγχου, σε τελικό όγκο 0,25%v/v. Προσθήκη στην ομάδα επίδρασης με τους αναστολείς, 200μM του κάθε αναστολέα, σε τελικό όγκο 0,25% v/v. Μεταφορά των γονιμοποιημένων ωαρίων στο καλλιεργητικό μέσο εμβρυϊκής ανάπτυξης, μετά τον καθαρισμό τους από την περίσσεια σπέρματος. Παρατήρηση και καταγραφή της *in vitro* ανάπτυξης των εμβρύων ως το στάδιο της βλαστοκύστης.



## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**





## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Αποτελέσματα μέτρησης γεγονότων ρετρομετάθεσης

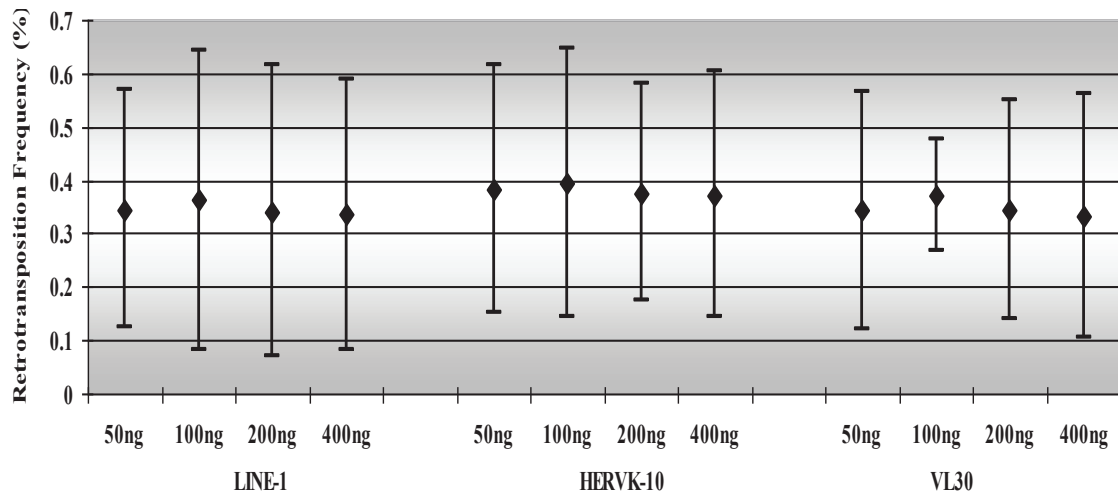
#### 4.1.1 Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζώαρια μύδς

Για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζώαρια μύδς, επώασαμε τα σπερματοζώαρια με εξωγενείς πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν κλωνοποιημένα τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10 και τα ρετρομεταθετά στοιχεία του μύδς VL30. Τα υπό μελέτη στοιχεία φέρουν ενσωματωμένο το γονίδιο της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP, η οποία βρίσκεται σε αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς αυτή του ρετρομεταθετού στοιχείου και η έκφρασή της διακόπτεται από το εσώνιο της β-σφαιρίνης. Η έκφραση της EGFP είναι ενδεικτική των γεγονότων ρετρομετάθεσης, καθώς ένα γεγονός ρετρομετάθεσης προϋποθέτει την μεταγραφή της πλασμιδιακής κασέτας και την παραγωγή ενός ενδιάμεσου μορίου mRNA αποτελούμενο από το ρετροτρανσποζόνιο και την EGFP κασέτα, το μάτισμα και την απομάκρυνση του εσωνίου της γ-σφαιρίνης, την αντίστροφη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του παραθθέντος cDNA μορίου σε νέα θέση στο γένωμα.

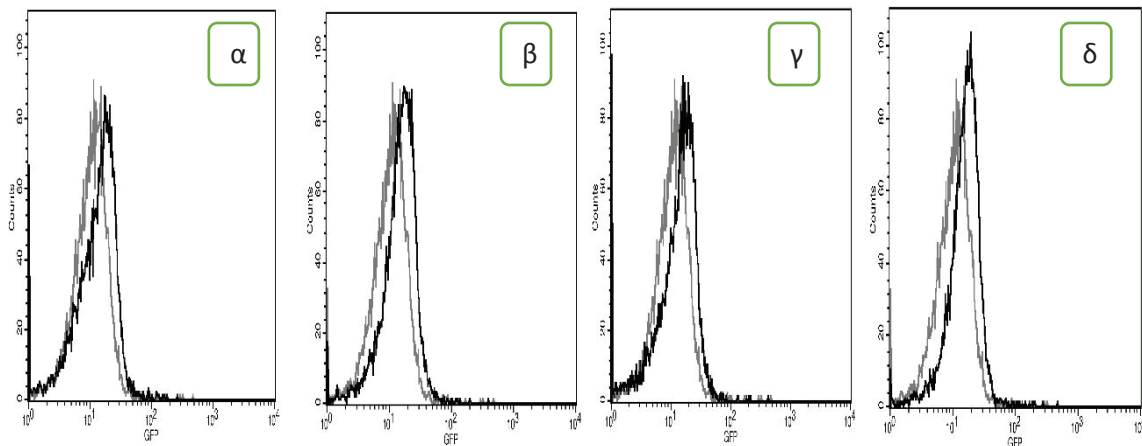
Κάθε δείγμα σπερματοζωαρίων επώαστηκε με το καθένα από τα ρετρομεταθετά στοιχεία, LINE-1, HERVK-10 και VL30 στις συγκεντρώσεις των 50, 100, 200 και 400ng/10<sup>6</sup> σπερματοζώαρια, για 5, 12 και 24ώρες. Συνολικά μελετήθηκαν 53 δείγματα σπέρματος εκ των οποίων τα 28 (52.8%) βρέθηκαν θετικά στη ρετρομετάθεση. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική στατιστική διαφορά της συχνότητας ρετρομετάθεσης για τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, HERVK-10 και VL30 στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων (Εικόνα4.1). Η συχνότητα ρετρομετάθεσης δεν επηρεάζεται σημαντικά από τη συγκέντρωση των εξωγενών ρετρομεταθετών στοιχείων (Εικόνα 4.2) και από το χρόνο επώασής τους με τα σπερματοζώαρια. Για το λόγο αυτό, μετά τα αρχικά πειράματα, ο χρόνος επώασης στον οποίο πραγματοποιήθηκε η πλειοψηφία των πειραμάτων, ήταν 5 ώρες.

Η συχνότητα ρετρομετάθεσης του στοιχείου HERVK-10 στα σπερματοζώαρια υπολογίστηκε σε ποσοστό 0.38±0.23% στα 50ng, 0.39±0.25% στα 100ng, 0.37±0.22% στα 200ng και 0.37±0.22% at 400ng, η οποία αντιστοιχεί σε 38, 39, 37 και 37 σπερματοζώαρια από το σύνολο των 10.000 που αναλύθηκαν. Για το στοιχείο LINE-1 η συχνότητα ρετρομετάθεσης είναι 34±0.22% στα 50ng, 0.36±0.28% στα 100ng,

0.34±0.27% στα 200ng και 0.33±0.25% στα 400ng, η αντιστοιχεί σε 34, 36, 34, 33 σπερματοζώαρια από τα 10.000 συνολικά. Τέλος, η συχνότητα ρετρομετάθεσης του στοιχείου VL30 είναι 0.34±0.22% στα 50ng, 0.37±0.1% στα 100ng, 0.34±0.2% στα 200ng και 0.33±0.22% στα 400ng, η οποία αναφέρεται αντίστοιχα σε 34, 37, 34 και 33 σπερματοζώαρια από τα 10.000 συνολικά που αναλύθηκαν.



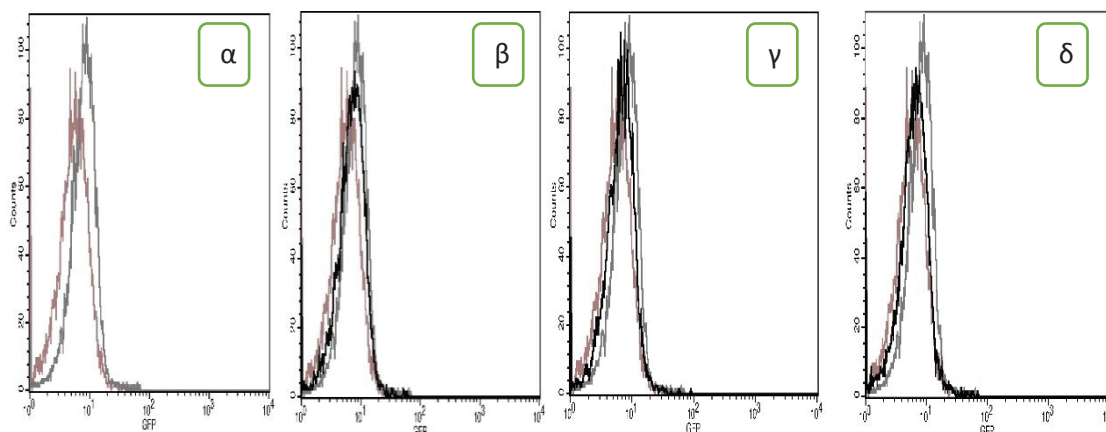
Εικόνα4.4: Συχνότητα ρετρομετάθεσης των ανθρώπινων ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, HERVK-10 και των στοιχείων VL30 του μύζ, σε σπερματοζώαρια από την επιδιδυμίδα μύζ, μετά από 5 ώρες επώασής τους με τον κάθε πλασμιδιακό φορέα στις συγκεντρώσεις των 50, 100, 200 and 400 ng /10<sup>6</sup> σπερματοζώαρια.



Εικόνα4.2: Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής, του ποσοστού ρετρομετάθεσης του ανθρώπινου στοιχείου HERVK-10, σε σπερματοζώαρια από την επιδιδυμίδα μύζ. Τα σπερματοζώαρια επώαστηκαν για 5 ώρες με τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει τα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10, στις συγκεντρώσεις των α)50, β) 100, γ) 200 και δ) 400 ng/10<sup>6</sup> σπερματοζώαρια. Η αλληλοεπικάλυψη της καμπύλης της ομάδας ελέγχου (μαύρο) με εκείνη της ομάδας μέτρησης (γκρι) δείχνει μια μικρή αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης από τη συγκέντρωση των 50ng(0.65%),στα100ng (0.8%), η οποία μειώθηκε στα 200ng(0.58%) και στα 400ng(0.59%).

#### 4.1.1.2 Μείωση του ποσοστού των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια με τη χρήση του αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine

Για τη μελέτη της αναστολής των γεγονότων ρετρομετάθεσης, τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν με τον αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine. Η Lamivudine μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις των 15, 25, 50, 200, 400 και 800 $\mu$ M και προστέθηκε στο καλλιεργητικό μέσο των σπερματοζωαρίων 2 ώρες πριν την προσθήκη και των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια. Η μελέτη της μείωσης της συχνότητας των γεγονότων ρετρομετάθεσης πραγματοποιήθηκε με κυτταρομετρία ροής. Παρατηρήθηκε αναστολή των γεγονότων ρετρομετάθεσης, μετά από επώαση των σπερματοζωαρίων με μικρές συγκεντρώσεις της Lamivudine (15-50 $\mu$ M), κυρίως στα 50 $\mu$ M, ενώ αντίθετα η επώαση με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της Lamivudine δεν προκάλεσε σημαντική μείωση του ποσοστού των γεγονότων ρετρομετάθεσης (Εικόνα 4.3). Η συχνότητα των γεγονότων ρετρομετάθεσης του στοιχείου LINE-1 μειώθηκε από 0.34 $\pm$ 0.22% σε 0.19 $\pm$ 0.12% στα 15 $\mu$ M, σε 0.12 $\pm$ 0.07% στα 25 $\mu$ M, σε 0.02 $\pm$ 0.01% στα 50 $\mu$ M, σε 0.28 $\pm$ 0.18% στα 200 $\mu$ M, σε 0.29 $\pm$ 0.19% στα 400 $\mu$ M και σε 0.31 $\pm$ 0.2% στα 800 $\mu$ M.

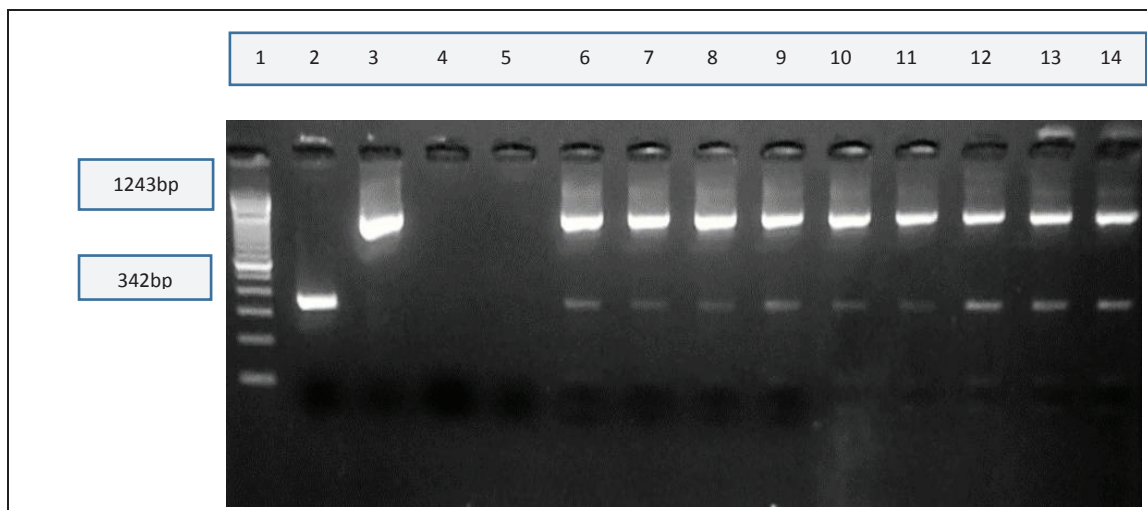


Εικόνα4.3: Αντιπροσωπευτικό παράδειγμα ανάλυσης με κυτταρομετρία ροής του ποσοστού μείωσης της συχνότητας ρετρομετάθεσης του στοιχείου LINE-1, σε σπερματοζωάρια από την επιιδυμίδα μυός. Τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 2 ώρες με τον αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine, στις συγκεντρώσεις 15 $\mu$ M, 25 $\mu$ M και 50 $\mu$ M και στη συνέχεια για 5 ώρες και με τον πλασμιδιακό φορέα που φέρει τα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια.

Από την επικάλυψη των καμπυλών μέτρησης της ομάδας ελέγχου (κόκκινο), της ομάδας των σπερματοζωαρίων που επώστηκαν μόνο τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα LINE-1 (γκρι) και της ομάδας των σπερματοζωαρίων που επώστηκαν με τον αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης συν τους πλασμιδιακούς φορείς (μαύρο), παρατηρείται μείωση του ποσοστού της συχνότητας ρετρομετάθεσης του στοιχείου LINE-1 από α) 0.25% σε β) 0.14% στα 15μM γ) 0.08% στα 25μM και δ) αναστέλλεται πλήρως στα 50μM της Lamivudine.

#### **4.1.1.3 Ταυτοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζωάρια μύδς με ανάλυση PCR**

Η ανίχνευση των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια επιβεβαιώθηκε και με την μοριακή τεχνική της PCR. Μετά το τέλος της επώασης των σπερματοζωαρίων με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 ή HERVK-10 και τα στοιχεία VL30 του μύδς, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA και PCR ανάλυση. Η παρουσία της ζώνης μεγέθους 1243bp στο gel αγαρόζης υποδηλώνει την απουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης, ενώ η ύπαρξη της ζώνης 342bp, είναι ενδεικτική των γεγονότων ρετρομετάθεσης, καθώς έχει αφαιρεθεί το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, μετά από μεταγραφή και μάτισμα της κασέτας EGFP (Εικόνα4.4).



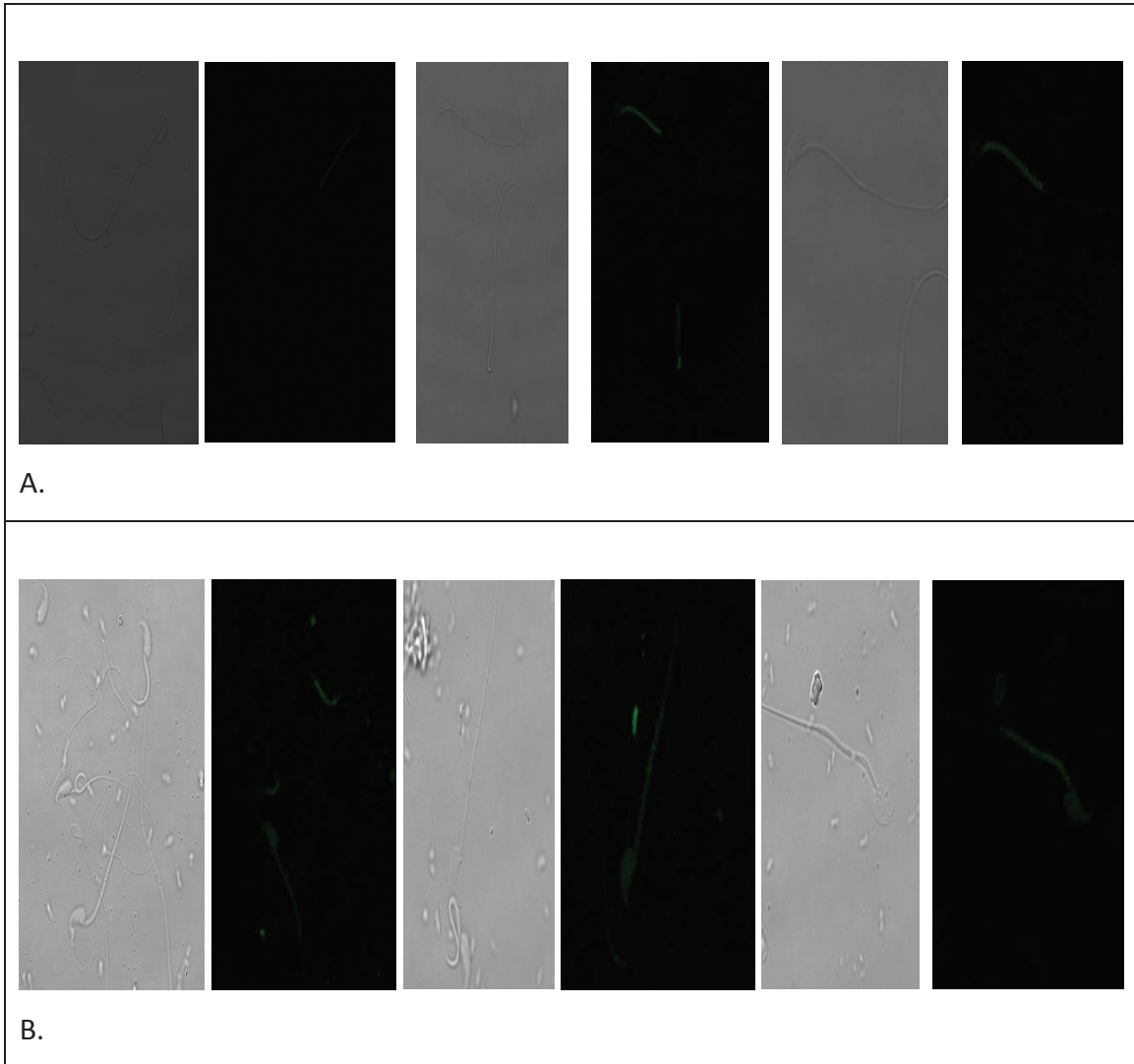
Εικόνα4.4: Ανάλυση με PCR σε δείγματα σπερματοζωαρίων από την επιιδυμίδα μύος, μετά από 5 ώρες επώασης με πλασμιδιακούς φορείς, που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 ή HERVK-10 και τα στοιχεία VL30 του μύος, στις συγκεντρώσεις 50ng, 100ng και 200ng/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια. Η ύπαρξη της ζώνης μεγέθους 1243bp αναφέρεται στην κασέτα της EGFP μαζί με το ιντρόνιο της γ-σφαιρίνης, ενώ η ύπαρξη της ζώνης μεγέθους 342bp, είναι χαρακτηριστική των γεγονότων ρετρομετάθεσης.

1.100bp ladder, 2. σπερματοζωάρια που έχουν επωαστεί με το πλασμιδιακό φορέα pEGFP 3.σπερματοζωάρια που έχουν επωαστεί με το πλασμιδιακό φορέα pL1RP (JM111)-EGFP 4.τυφλό δείγμα (blank), 5. δείγμα ελέγχου (control) 6-8.δείγματα θετικά στη ρετρομετάθεση για τα στοιχεία LINE-1 (50ng,100ng,200ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια), 9-11.δείγματα θετικά στη ρετρομετάθεση για τα στοιχεία VL30 (50ng,100ng,200ng/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια),12-14.δείγματα θετικά στη ρετρομετάθεση για τα στοιχεία HERVK-10 (50ng,100ng,200ng/10<sup>6</sup> σπερματοζωάρια).

#### 4.1.1.4 Παρατήρηση της έκφρασης EGFP σε σπερματοζωάρια μύος με συνεστιακό μικροσκόπιο

Η έκφραση της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP στα σπερματοζωάρια, παρατηρήθηκε σε συνεστιακό μικροσκόπιο, με σκοπό την επιβεβαίωση των γεγονότων ρετρομετάθεσης. Τα σπερματοζωάρια μετά από 5 ώρες επώασης με τους πλασμιδιακούς φορείς, που φέρουν τα εξωγενή ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 (50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια), τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και μελετήθηκαν στο μικροσκόπιο. Παρατηρήθηκε ανίχνευση πράσινου φθορίζον σήματος στη κεφαλή των σπερματοζωαρίων στην ομάδα μελέτης, συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, παρατηρήθηκε πράσινο φθορίζον σήμα στην

ουρά των σπερματοζωαρίων και των δύο ομάδων. Τα σπερματοζωάρια στην ουρά, και ιδίως στο μεσαίο τμήμα που βρίσκονται τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν έντονο αυτοφθορισμό και είναι δύσκολη η διάκριση μεταξύ αυτοφθορισμού και σήματος λόγω της έκφρασης της EGFP (Εικόνα 4.5).



Εικόνα4.5: Παρατήρηση, με συνεστιακό μικροσκόπιο, σπερματοζωαρίων από την επιιδυμίδα μυός, μετά από 5 ώρες επώασης με πλασμιδιακό φορέα που φέρει τα εξωγενή ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1(50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια). Στην ομάδα ελέγχου (A), παρατηρείται σήμα μόνο στην περιοχή των μιτοχονδρίων της ουράς, λόγω έντονου αυτοφθορισμού των σπερματοζωαρίων στο σημείο αυτό. Στην ομάδα μελέτης (B), παρατηρείται ένα επιπλέον σήμα στη περιοχή της κεφαλής, πιθανά προερχόμενο από την έκφραση της EGFP. Είναι πιθανή η έκφραση της EGFP στο σημείο της ουράς, λόγω όμως του αυτοφθορισμού είναι δύσκολο να διακριθεί.

Το σύνολο των παραπάνω αποτελεσμάτων επιβεβαιώνει την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων.

#### 4.1.2 Υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων σε έμβρυα μύος

Με σκοπό να μελετήσουμε το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων στην προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μύος, πραγματοποιήσαμε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης, στα οποία τα ρετρομεταθετά στοιχεία, αποτελώντας τμήμα ενός πλασμιδιακού φορέα, μεταφέρονται από τα σπερματοζωάρια στα έμβρυα, μέσω της *in vitro* γονιμοποίησης. Συνολικά μελετήθηκαν πέντε ομάδες εμβρύων :

1.Ομάδα ελέγχου (control):τα σπερματοζωάρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη γονιμοποίηση δεν επώαστηκαν με κανέναν πλασμιδιακό φορέα.

2.Ομάδα LINE-1:τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 30λεπτά πριν τη γονιμοποίηση, με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια.

3.Ομάδα HERVK-10:τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 30λεπτά πριν τη γονιμοποίηση, με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια.

4.Ομάδα VL30:τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 30λεπτά πριν τη γονιμοποίηση, με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα ρετρομεταθετά στοιχεία του μύος VL30, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια.

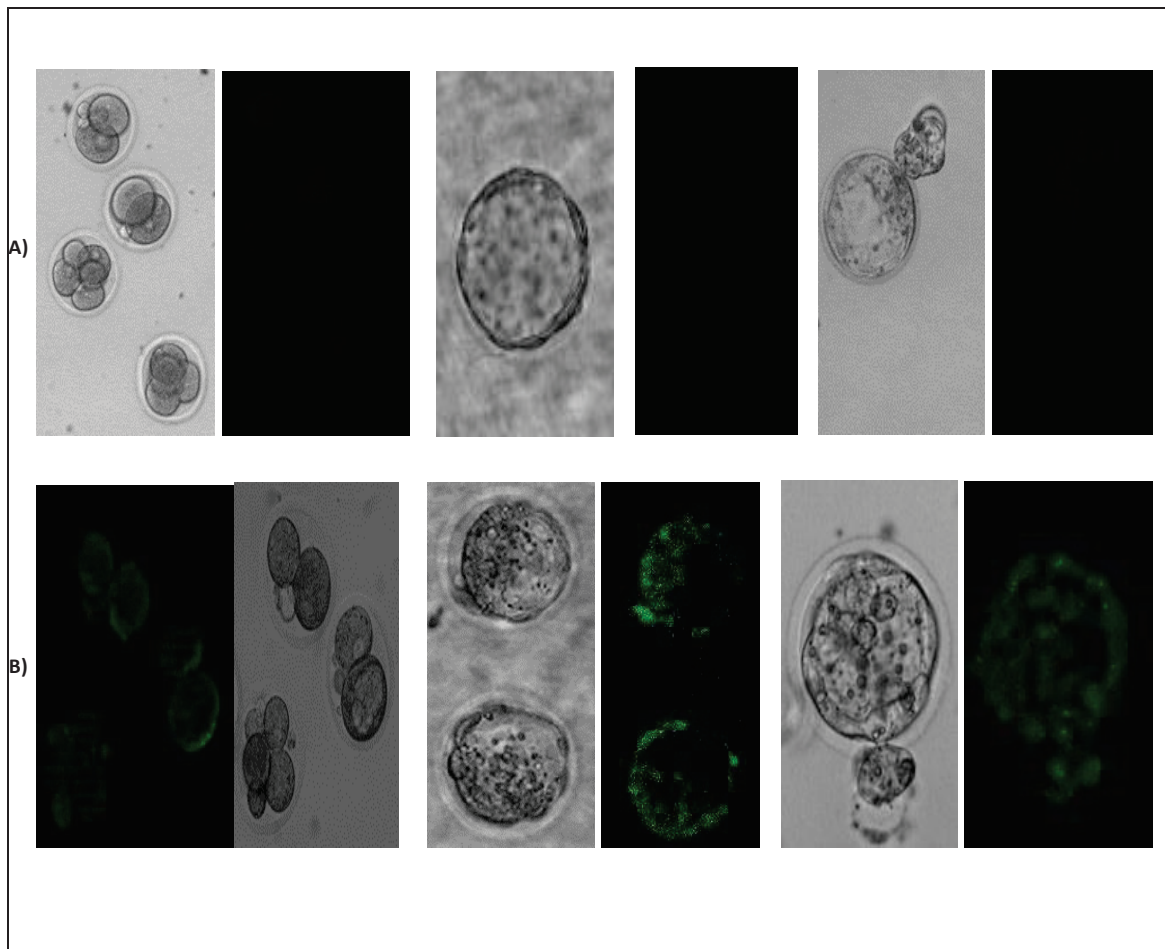
5.Ομάδα pEGFP-N1:τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 30λεπτά πριν τη γονιμοποίηση, με τους πλασμιδιακούς φορείς pEGFP-N1, που φέρουν μόνο το γονίδιο της EGFP, χωρίς το εσώνιο της γ-σφαιρίνης, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια. Ο πλασμιδιακός φορέας pEGFP-N1 χρησιμοποιείται ως θετικό control.

6.Ομάδα mutant LINE-1:τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν για 30λεπτά πριν τη γονιμοποίηση, με τους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν τα μη ενεργά ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση 50ng/10<sup>6</sup>σπερματοζωάρια. Ο πλασμιδιακός φορέας mutant LINE-1 χρησιμοποιείται ως αρνητικό control.

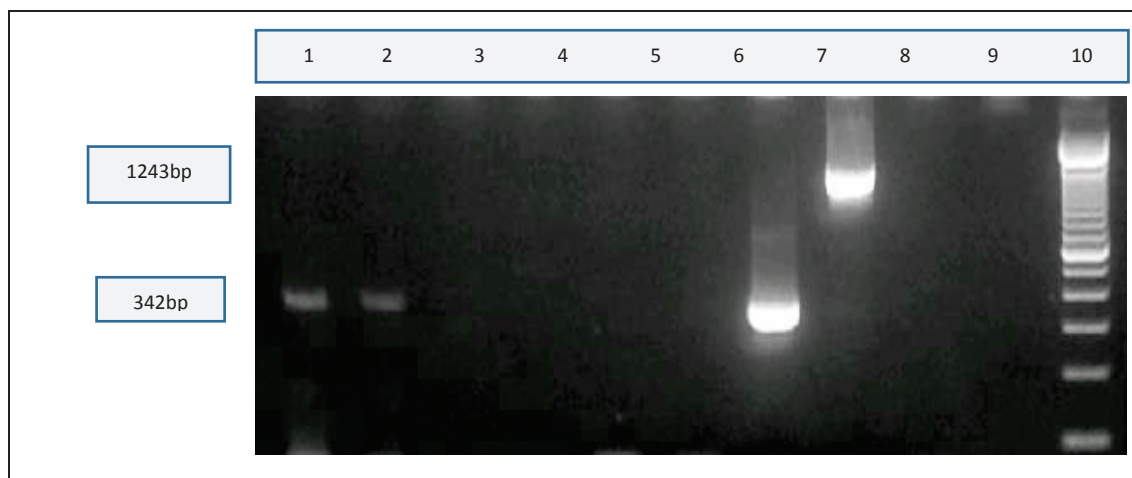
Στην ομάδα ελέγχου (control) μελετήθηκαν συνολικά 140 έμβρυα, στην ομάδα LINE-1 114 έμβρυα, στην ομάδα HERVK-10 73 έμβρυα, στην ομάδα VL30 65 έμβρυα, στην ομάδα the pEGFP-N1 40 έμβρυα και στην ομάδα mutant LINE-1 45 έμβρυα. Η πορεία της *in vitro* προεμφυτευτικής ανάπτυξης των εμβρύων ελέγχονταν καθημερινά σε οπτικό

μικροσκόπιο. Κάθε έμβρυο, το οποίο διέκοπτε τις μιτωτικές διαιρέσεις του, ελέγχονταν για την ύπαρξη και την επιβεβαίωση των γεγονότων ρετρομετάθεσης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε με συνεστιακό μικροσκόπιο για την ανίχνευση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP (Εικόνα 4.6) και στη συνέχεια με την εφαρμογή της τεχνικής της PCR, για την ταυτοποίησης της ζώνης 342bp (Εικόνα 4.7). Η παρουσία της ζώνης 342bp στο προϊόν της PCR υποδηλώνει την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης, μετά από την έκφραση της πρωτεΐνης της EGFP, μετά από την αφαίρεση του εσωνίου της γ-σφαιρίνης, την αντίστροφη μεταγραφή αυτού και την ενσωμάτωσή του σε νέα θέση στο γενετικό υλικό των εμβρύων.





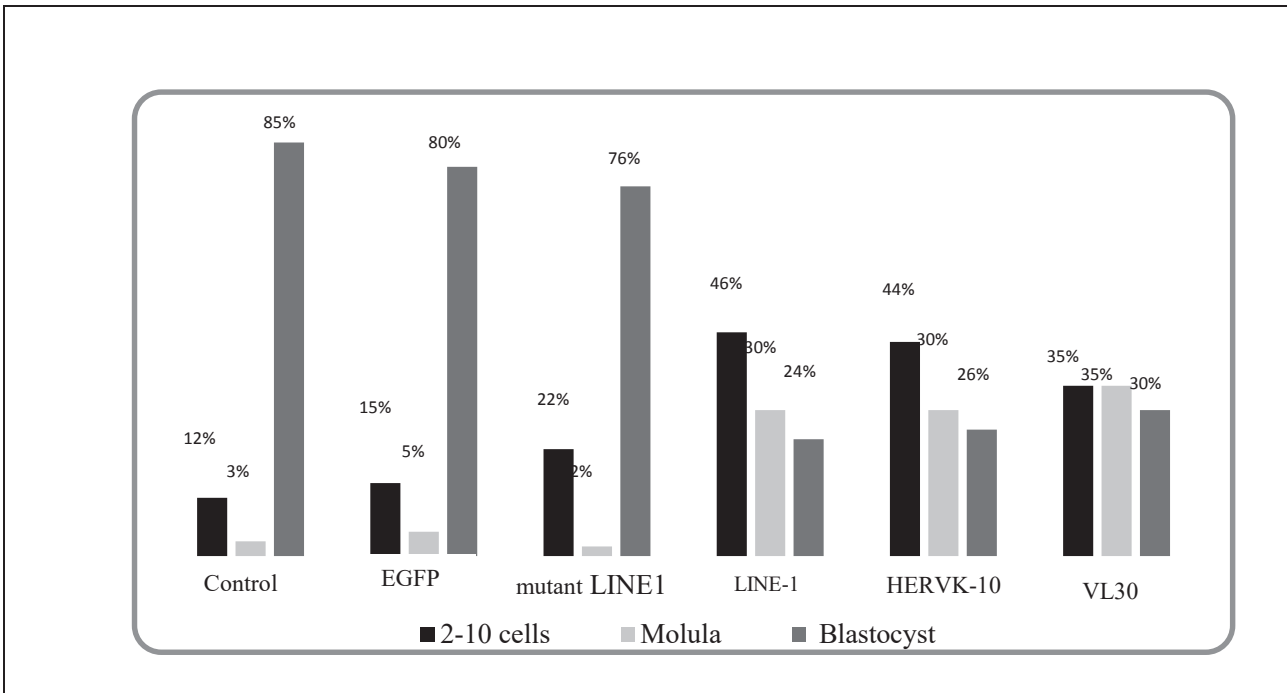
Εικόνα4.6: Ανάλυση με συνεστιακό μικροσκόπιο Α. Έμβρυα της ομάδας ελέγχου Β. Έμβρυα της ομάδας LINE-1, θετικά στην ρετρομετάθεση, μετά από την ανίχνευση της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας πρωτεΐνης EGFP σε αυτά.



Εικόνα4.7: Ανάλυση με PCR σε κάθε ένα έμβρυο, για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης, μετά από την *in vitro* γονιμοποίηση με σπερματοζώαρια, που έχουν επωαστεί με πλασμιδιακούς φορείς, που

φέρουν τα ανθρωπινά ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, σε συγκέντρωση  $50\text{ng}/10^6$  σπερματοζωάρια. **1.**έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης, θετικό στη ρετρομετάθεση των LINE-1 στοιχείων **2.**έμβρυο στο στάδιο του μοριδίου, θετικό στη ρετρομετάθεση των LINE-1 στοιχείων **3-4.**έμβρυα της ομάδας LINE-1, αρνητικά στη ρετρομετάθεση **5-6.**έμβρυα της ομάδας ελέγχου **7.**έμβρυα της ομάδας pEGFP-N, που περιέχουν την κασέτα EGFP, χωρίς το εσώνιο της  $\gamma$ -σφαιρίνης (342bp), **8.**έμβρυα της ομάδας mutant LINE-1, που περιέχουν την κασέτα EGFP με το εσώνιο της  $\gamma$ -σφαιρίνης (1243bp), **9.**τυφλό δείγμα (blank), **10.**100bp ladder.

Από το σύνολο των εμβρύων που μελετήθηκαν, το 29% των LINE-1, το 37% των HERVK-10 και το 30% των VL30 εμβρύων, βρέθηκαν θετικά σε γεγονότα ρετρομετάθεσης. Σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, τα έμβρυα αυτά εμφανίζουν περισσότερα ανισομεγέθη βλαστομερίδια, περισσότερα κυτταροπλασματικά θραύσματα, παύση της ανάπτυξης σε πρώιμο στάδιο και εκφυλισμό (Εικόνα 4.9). Από τα LINE-1 θετικά έμβρυα μόνο το 24% έφτασε στο στάδιο της βλαστοκύστης, από τα HERVK-10 θετικά έμβρυα το 26% και από τα VL30 θετικά έμβρυα το 30%. Οι βλαστοκύστες είχαν κακή μορφολογία, εμφάνιζαν πολλά θραύσματα και απέπιπταν πριν το σπάσιμο της διάφανης ζώνης (hatching). Αντίθετα, στην ομάδα ελέγχου, το 85% των εμβρύων διαιρέθηκαν φυσιολογικά, σχηματίζοντας καλής ποιότητας βλαστοκύστες. Η ανάπτυξη των εμβρύων στην ομάδα pEGFP-N1 και στην ομάδα mutant LINE-1 ήταν εξίσου καλή, το 80% και το 76% των εμβρύων, αντίστοιχα, σχημάτισαν βλαστοκύστες, γεγονός που δείχνει πως ο πλασμιδιακός φορέας από μόνος του δεν επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη των εμβρύων και πως η φυσιολογική πορεία της πρώιμης ανάπτυξης των εμβρύων επηρεάστηκε από την έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων (Εικόνα 4.8). Συμπεραίνουμε ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης, τα οποία πραγματοποιούνται στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των εμβρύων και δεν βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο των μηχανισμών του κυττάρου, είναι δυνατό να επηρεάσουν τη φυσιολογική προεμφυτευτική πορεία τους και να οδηγήσουν σε παύση της ανάπτυξής τους.



Γράφημα4.1: Στάδιο της *in vitro* προεμφυτευτικής πορείας στο οποίο έμβρυα θετικά στη ρετρομετάθεση σταμάτησαν την ανάπτυξή τους

## 4.2 Αποτελέσματα πειραμάτων αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης

### 4.2.1 Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση

Για τη μελέτη της επίδρασης των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine και Nevirapine, στη διαδικασία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των αρσενικών και των θηλυκών αναπαραγωγικών κυττάρων, χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί και θηλυκοί μύες στελέχους FVB/N, στους οποίους χορηγήθηκε για 8 εβδομάδες Lamivudine σε δοσολογία 50mgf/Kg και Nevirapine σε δοσολογία 30mgf/Kg. Μετά το πέρας του πειράματος, απομονώθηκαν οι όρχεις από τα αρσενικά πειραματόζωα και οι ωοθήκες από τα θηλυκά και μελετήθηκε η μορφολογία τους, με ιστολογική εξέταση. Παράλληλα, απομονώθηκαν τα σπερματοζώαρια από την επιδιδυμίδα των μύων και προσδιορίστηκε η συγκέντρωσή τους, η κινητικότητά τους, η παρουσία μορφολογικών ανωμαλιών με τη χρώση Παπανικολάου και η ακεραιότητα της δομής του DNA με τη τεχνική SCSA. Συνολικά

μελετήθηκαν 32 πειραματόζωα, για κάθε φύλο, για τον αναστολέα της Lamivudine και 6 πειραματόζωα, για κάθε φύλο, για τον αναστολέα της Nevirapine.

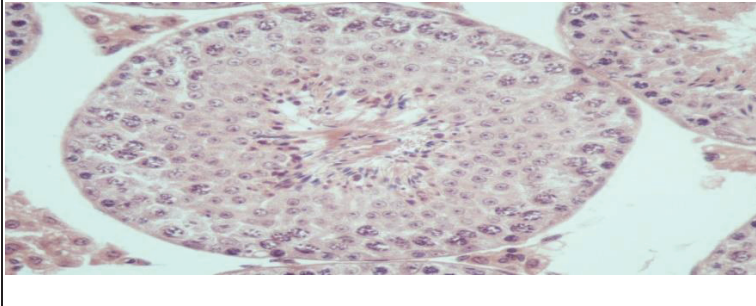
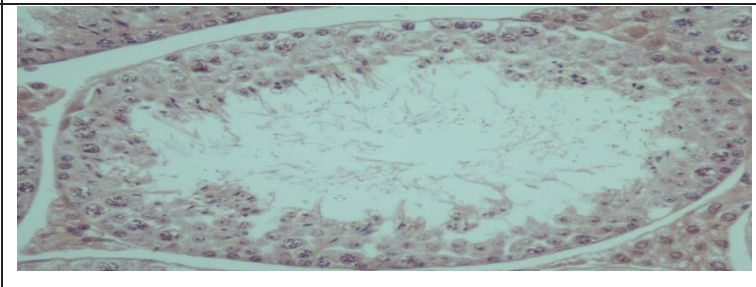
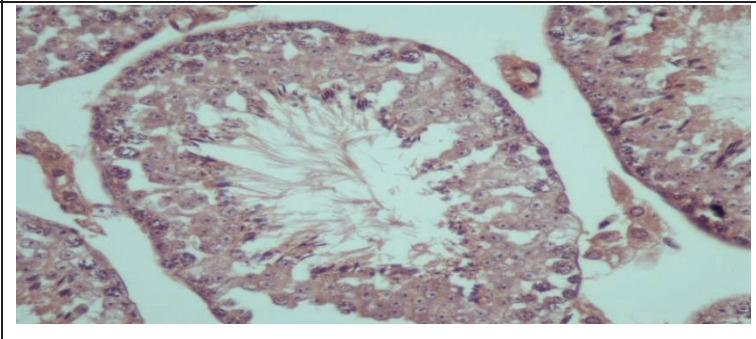
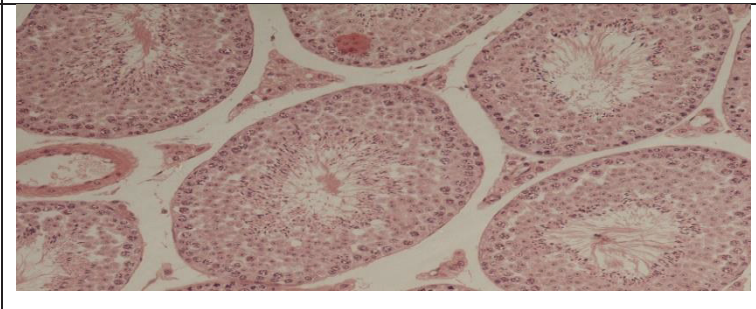
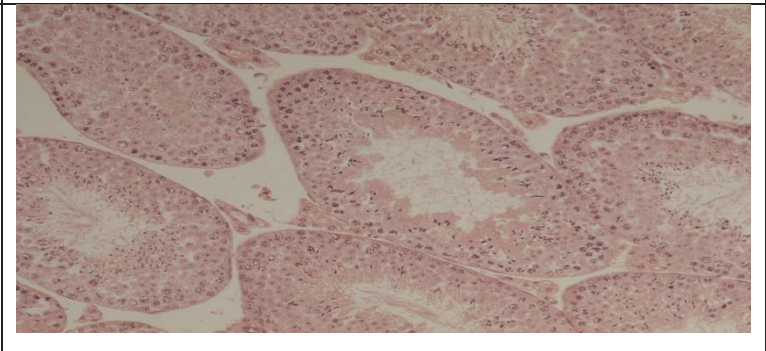
	Control	Lamivudine	Control	Nevirapine
Αρσενικά	16	16	3	3
Θηλυκά	16	16	3	3

Πίνακας 4.1: Αριθμός πειραματόζωων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ομάδα, για τη μελέτη της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης, στη διαδικασία της γαμετογένεσης.

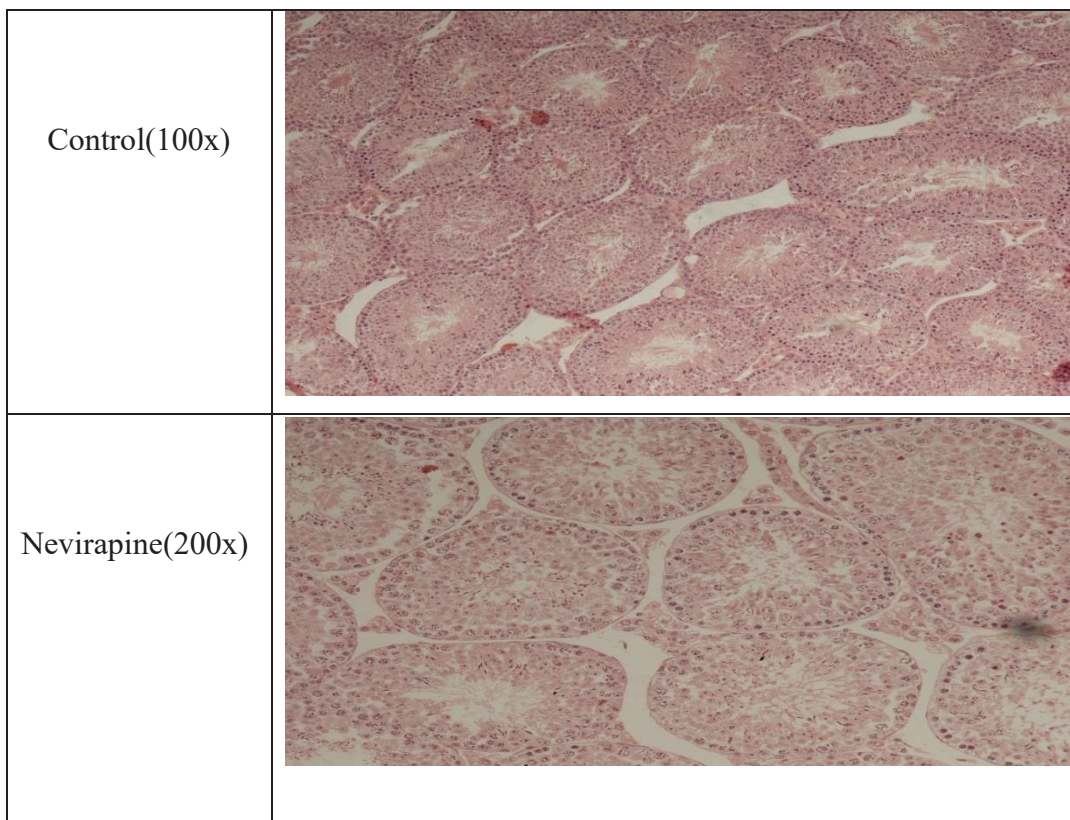
## 4.2.2 Αποτελέσματα ιστολογικής εξέτασης

### 4.2.2.1 Τομές όρχεων

Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι τομές των όρχεων, μετά από χρώση με αιματοξυλίνη–ηωσίνη, και παρατήρηση της μορφολογίας τους με οπτικό μικροσκόπιο.

1.Control (400x)	
1.Lamivudine(400x)	
2.Lamivudine(400x)	
2.Control(200x)	
3.Lamivudine(200x)	

Πίνακας4.2: Ιστολογική μελέτη τομών όρχεων, από αρσενικούς μύες, των ομάδων Control και Lamivudine.



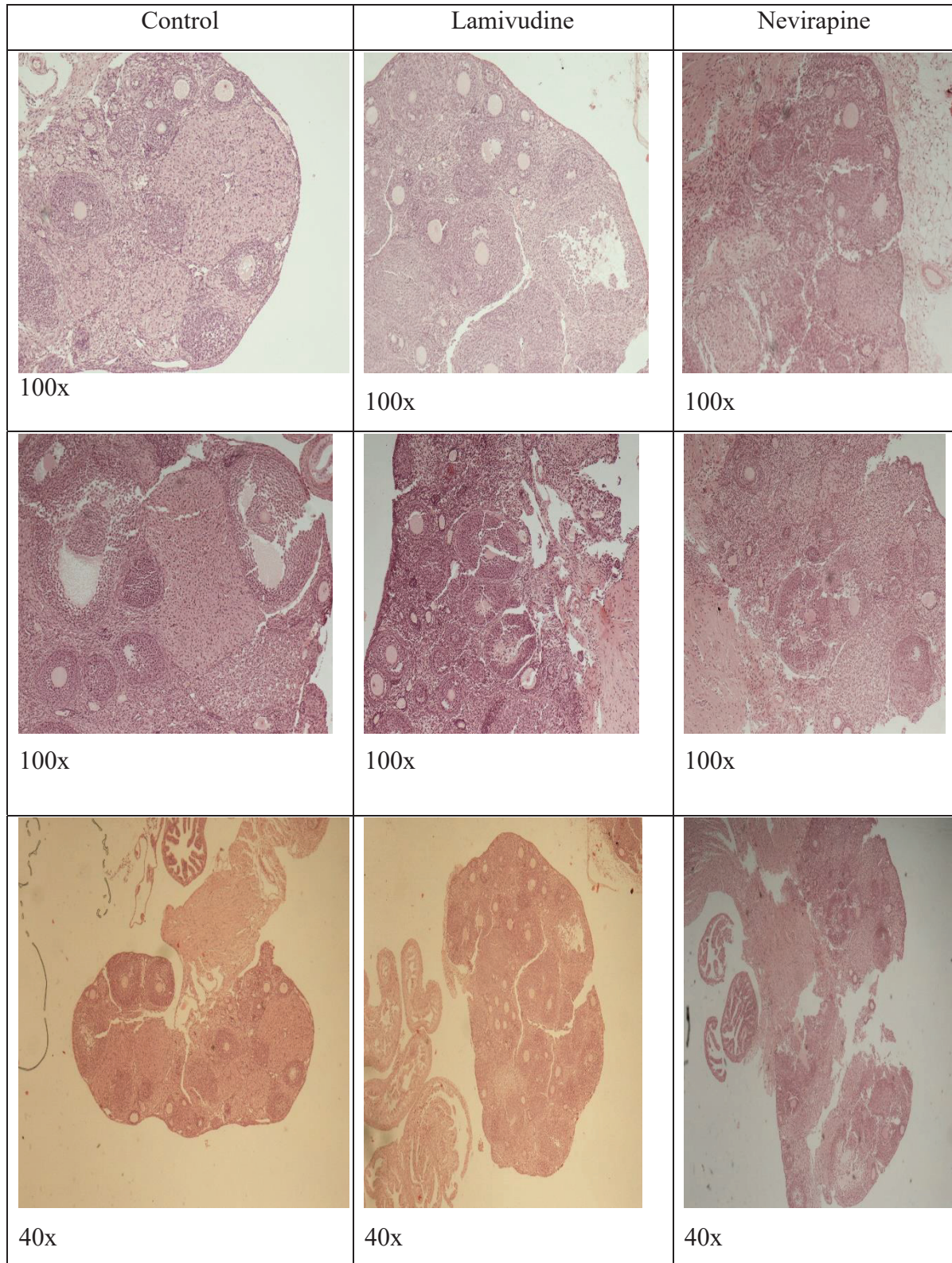
Πίνακας4.3: Ιστολογική μελέτη τομών όρχεων, από αρσενικούς μύες, των ομάδων Control και Nevirapine.

Από τις εικόνες, στον πίνακα 4.2, παρατηρούμε διαφορές στη μορφολογία των σπερματοφόρων σωληναρίων, μεταξύ της ομάδας Control και της ομάδας Lamivudine. Στην ομάδα Control, η εικόνα της μορφολογίας των σπερματοφόρων σωληναρίων είναι φυσιολογική σε σχέση με την εικόνα της μορφολογίας των σπερματοφόρων της ομάδας Lamivudine, όπου φαίνεται πώς έχει διαταραχθεί σημαντικά η αρχιτεκτονική δομή των σπερματοφόρων σωληναρίων και έχει επηρεαστεί όλη η πορεία της σπερματογένεσης. Παρατηρείται μείωση του αριθμού των πρωτογενών και δευτερογενών σπερματοκυττάρων, καθώς και μία σημαντική μείωση της παρουσίας των κυττάρων Sertoli, που έχει ως συνέπεια να δημιουργούνται πολλά κενά σημεία τόσο στο θεμελιώδες, όσο και στο κεντρικό διαμέρισμα των σπερματοφόρων σωληναρίων. Στον αυλό των σωληναρίων παρατηρούνται λιγότερα σπερματοζώαρια, συγκριτικά με την ομάδα Control, πολλά εκ των οποίων παρουσιάζουν μορφολογικές ανωμαλίες, με σημαντικότερη το σπάσιμο στο σημείο του αυχένα και το διαχωρισμό της ουράς με τη κεφαλή. Αυτό το φαινόμενο παρατηρείται έντονα στον πίνακα 4.2, στην εικόνα 1.Lamivudine(400x), όπου

βλέπουμε μέσα στον αυλό πολλές ουρές και ακέφαλα σπερματοζωάρια. Ταυτόχρονα, λόγω των πολλών κενών που έχουν δημιουργηθεί σε όλο το μήκος των σωληναρίων, πολλά μορφολογικά ώριμα σπερματοζωάρια, κινούνται αντίθετα και μεταναστεύουν από το σημείο του αυλού προς το θεμελιώδες διαμέρισμα, ένα φαινόμενο που παρατηρείται καλά στον πίνακα 4.2, στην εικόνα 2.Lamivudine(400x). Η δομή των σπερματοφόρων σωληναρίων φαίνεται να έχει επηρεαστεί και στην περίπτωση της Nevirapine, όπου παρατηρούνται παρόμοιες μορφολογικές αλλοιώσεις, πίνακας 4.3. Στην ομάδα Control τα σπερματοφόρα σωληνάκια έχουν πολλή καλή εικόνα, με σωστή διάταξη όλων των κυτταρικών τύπων από τη βασική μεμβράνη μέχρι τον αυλό. Από την άλλη πλευρά, στην ομάδα Nevirapine, παρατηρούνται πολλά κενά κατά μήκος των σωληναρίων, που φαίνεται να αφορούν τόσα τα σπερματοζωάρια στα διαφορετικά στάδια ανάπτυξής τους, όσο και τα κύτταρα Sertoli, Nevirapine(200x). Ο αυλός των σωληναρίων της ομάδας Nevirapine, συγκριτικά με τον αυλό της ομάδας Control, φαίνεται να περιέχει μικρότερο αριθμό σπερματοζωαρίων, καθώς παρατηρείται και εδώ το φαινόμενο της μετακίνησης μορφολογικά ώριμων σπερματοζωαρίων, από τη βάση του αυλού προς το κεντρικό και το θεμελιώδες διαμέρισμα των σωληναρίων. Από το σύνολο των ορχικών τομών, μεταξύ των διαφορετικών ομάδων Control, Lamivudine και Nevirapine, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η χορήγηση αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης προκαλεί αλλοιώσεις σ' όλα τα διαμερίσματα των σπερματοφόρων σωληναρίων, από τη βασική μεμβράνη ως και τον αυλό, και επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογική πορεία της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των σπερματοζωαρίων.

#### **4.2.2.2 Τομές ωοθηκών**

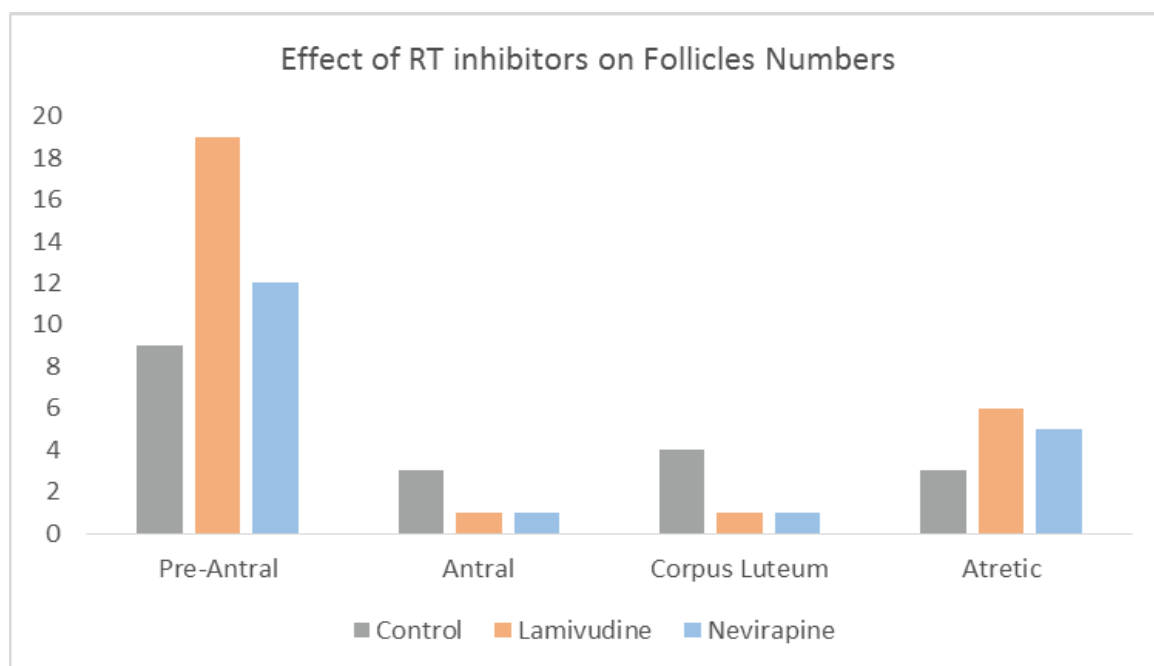
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται οι τομές των ωοθηκών, μετά από χρώση με αιματοξυλίνη-ηωσίνη και παρατήρηση της μορφολογίας τους με οπτικό μικροσκόπιο.



Πίνακας4.4: Ιστολογική μελέτη τομών ωοθηκών, από θηλυκές μύες, των ομάδων Control, Lamivudine και Nevirapine.



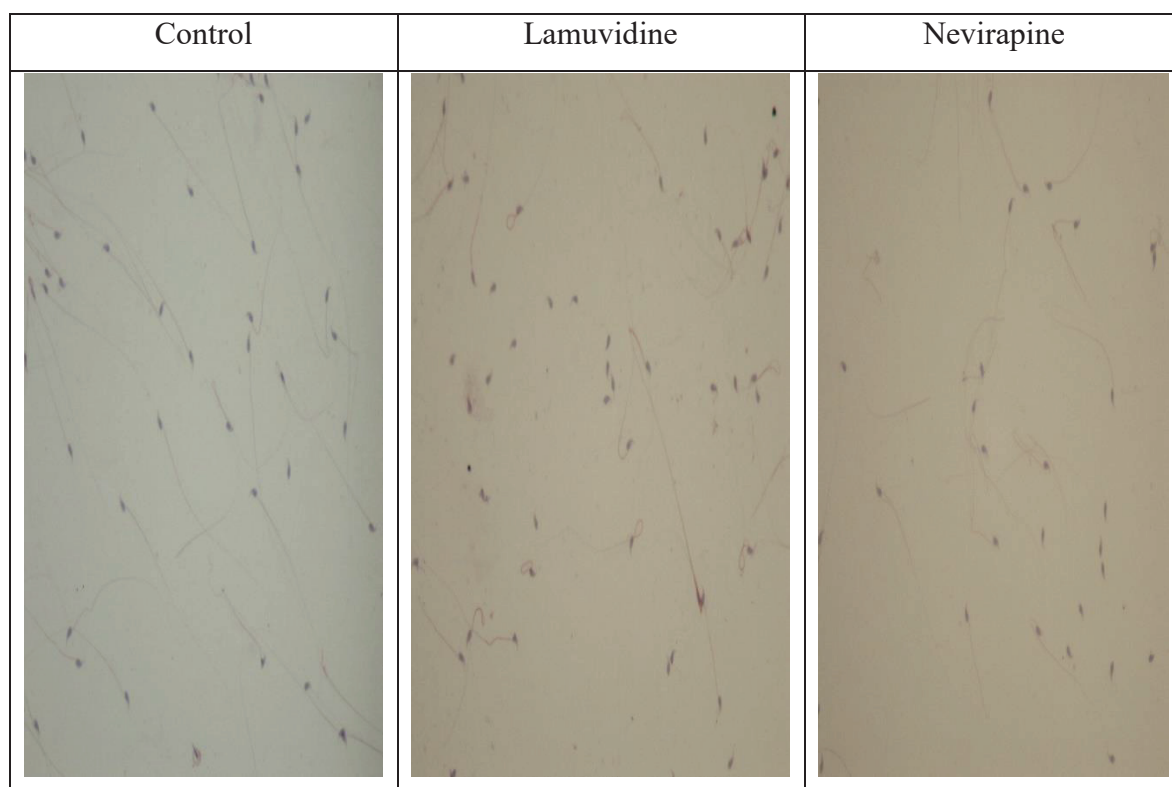
Αυτό που παρατηρείται από τη σύγκριση των ωθηκικών τομών μεταξύ της ομάδας Control και των ομάδων Lamivudine και Nevirapine, είναι πως επηρεάζεται η φυσιολογική ανάπτυξη και η ωρίμανση των ωοθυλακίων. Στις ωθήκες των πειραματόζων που ανήκουν στις ομάδες Lamivudine και Nevirapine, η πλειοψηφία των ωοθυλακίων βρίσκονται στο στάδιο πριν το σχηματισμό του άντρου (pre-antral follicles). Ένας μικρός αριθμός ωοθυλακίων παρατηρείται να έχει ωριμάσει και να έχει μετατραπεί σε ωχρό σωματίο, μετά την απελευθέρωση του ωαρίου. Ταυτόχρονα, παρατηρούνται περισσότερα ατρητικά ωοθυλάκια, τα οποία φαίνεται να αρχίζουν να αποπίπτουν σε διάφορα στάδια της αναπτυξιακής τους πορείας. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζεται ο αριθμός και το στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων μεταξύ της ομάδας Control και των ομάδων Lamivudine και Nevirapine. Από το γράφημα διαπιστώνουμε πως στις ωθηκικές τομές των πειραματόζων των ομάδων Lamivudine και Nevirapine παρατηρείται διπλάσιος αριθμός pre-antral ωοθυλακίων, διπλάσιος αριθμός ατρητικών ωοθυλακίων, μικρός αριθμός ωχρών σωματίων και μεγαλύτερος αριθμός ατρητικών ωοθυλακίων, συγκριτικά με τις ωθηκικές τομές των πειραματόζων της ομάδας Control. Από το σύνολο των αποτελεσμάτων, συμπεραίνουμε πως το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των ωοθυλακίων, καθώς η αναστολή του, φαίνεται να επηρεάζει τη φυσιολογική διαδικασία της ωογένεσης σε θηλυκούς μύες.



Γράφημα4.2: Στάδιο ανάπτυξης των ωοθυλακίων που παρατηρείται στις τομές ωθηκών σε θηλυκούς μύες, στις ομάδες Control, Lamivudine και Nevirapine

### 4.2.3 Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη μορφολογία σπερματοζωαρίων μυός

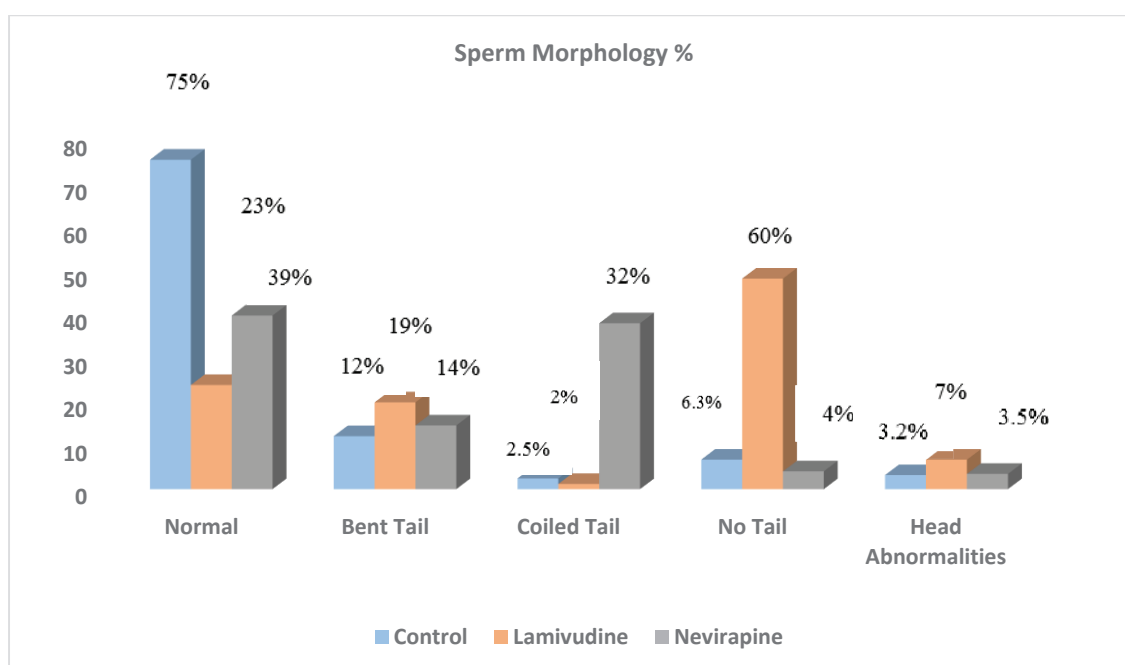
Η μορφολογία των σπερματοζωαρίων παρατηρήθηκε, μετά από χρώση Παπανικολάου, σε οπτικό μικροσκόπιο. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η μορφολογία των σπερματοζωαρίων από αρσενικούς μύες της ομάδας Control και των ομάδων Lamuvidine και Nevirapine.



Πίνακας4.5: Μορφολογική παρατήρηση των σπερματοζωαρίων από αρσενικούς μύες της ομάδας Control και των ομάδων Lamuvidine και Nevirapine.

Για κάθε δείγμα σπέρματος, μετρήθηκαν συνολικά 100 σπερματοζωάρια, τα οποία με βάση τη μορφολογία τους, ταξινομήθηκαν στις εξής κατηγορίες 1.σπερματοζωάρια με φυσιολογική μορφολογία (normal morphology), 2.σπερματοζωάρια με σπασμένη ουρά (bent tail),3.σπερματοζωάρια με κουλουριασμένη ουρά (coiled tail), 4.σπερματοζωάρια με απουσία ουράς (absent tail) και 5.σπερματοζωάρια με ανωμαλίες στη κεφαλή (head abnormalities).

Το ποσοστό των φυσιολογικών σπερματοζωαρίων της ομάδας Lamivudine και της ομάδας Nevirapine ήταν αντίστοιχα 23% και 39% χαμηλότερο από το ποσοστό των σπερματοζωαρίων της ομάδας Control group, το οποίο ήταν 75%. Η πλειοψηφία των σπερματοζωαρίων και στις δύο ομάδες των πειραματόζωων, που χορηγήθηκαν οι αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης, παρουσίαζε ανωμαλίες στην ουρά. Στην ομάδα Lamivudine παρατηρήθηκε ότι το 48% των σπερματοζωαρίων είχε μόνο κεφαλή και καθόλου ουρά, ενώ στην ομάδα Nevirapine η μορφολογική αυτή ανωμαλία παρατηρήθηκε στο 38% των σπερματοζωαρίων. Σπασμένη ουρά παρατηρήθηκε στο 19% των σπερματοζωαρίων της ομάδας Lamivudine και στο 14% των σπερματοζωαρίων της ομάδας Nevirapine. Στο παρακάτω γράφημα παρουσιάζονται τα % ποσοστά των σπερματοζωαρίων των ομάδων Control, Lamivudine και Nevirapine που εμφανίζουν φυσιολογική ή ανώμαλη μορφολογία.



Γράφημα 4.3: Παρατήρηση του % ποσοστού των σπερματοζωαρίων των ομάδων Control, Lamivudine και Nevirapine, που εμφανίζουν φυσιολογική μορφολογία, ανωμαλίες ουράς-λυγισμένη ουρά, κουλουριασμένη ουρά, καθόλου ουρά-και ανωμαλίες κεφαλής, μετά από χρώση Παπανικολάου.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων, παρατηρούμε πως η χορήγηση των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης, Lamivudine και Nevirapine σε αρσενικούς μύες, επηρέασε τη φυσιολογική μορφολογική ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και οδήγησε στην εμφάνιση μεγάλου ποσοστού ανωμαλιών, κυρίως στην ουρά τους.

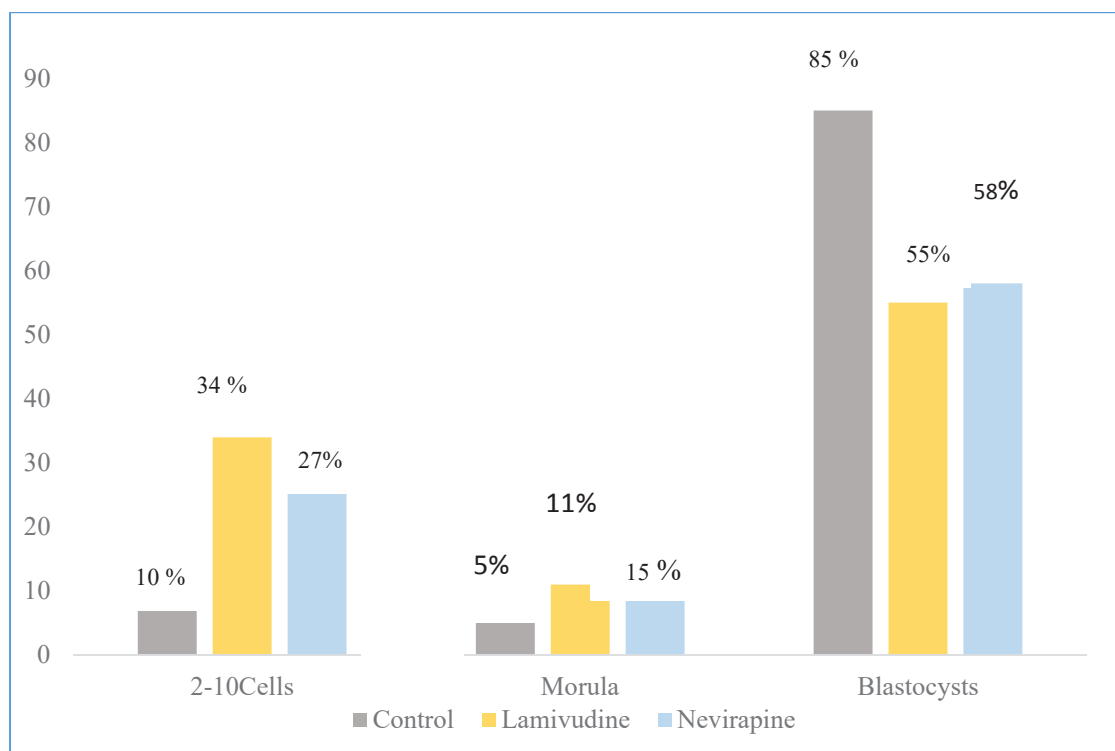
#### **4.2.4 Επίδραση της αναστολής της ανάστροφης μεταγραφάσης στη δομή της χρωματίνης σπερματοζωαρίων μυός**

Για τη μελέτη του βαθμού συμπύκνωσης και της ακεραιότητας του DNA των σπερματοζωαρίων στις ομάδες Control, Lamivudine και Nevirapine, εφαρμόστηκε η τεχνική Sperm Chromatin Structure Assay, κατά την οποία κάθε δείγμα σπέρματος επωάστηκε με την χρωστική πορτοκαλόχρουν της ακριδίνης (Acridine Orange) και στη συνέχεια αναλύθηκε με κυτταρομετρία ροής. Σε κάθε μέτρηση αναλύθηκαν 30,000 σπερματοζωάρια και προσδιορίστηκε το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που έχουν καλά συμπυκνωμένο DNA, σε σχέση με το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που παρουσιάζουν ανωμαλίες, με βάση το φθορισμό των δειγμάτων στο πράσινο ή στο κόκκινο. Στην ομάδα Control το ποσοστό των πλήρως συμπυκνωμένων σπερματοζωαρίων είναι  $90.96 \pm 2.49$ , στην ομάδα της Lamivudine είναι  $84.84 \pm 4.87$  και στην ομάδα της Nevirapine είναι  $85.57 \pm 0.45$ . Παρατηρείται μία μικρή μείωση του ποσοστού των πλήρως συμπυκνωμένων σπερματοζωαρίων στις ομάδες της Lamivudine και της Nevirapine, συγκριτικά με την ομάδα Control, γεγονός που οφείλεται στη πιθανή παρουσία ανώριμων σπερματοζωαρίων ή σπερματοζωαρίων με ανωμαλίες κεφαλής.

#### **4.2.5 Αποτελέσματα της in vitro προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός παρουσία αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης**

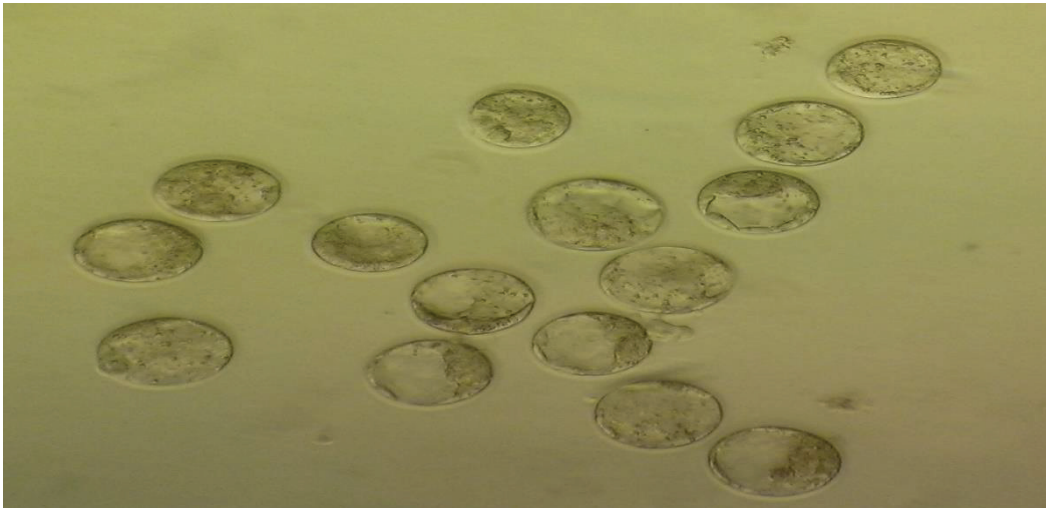
Για να μελετηθεί ο ρόλος του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στην πορεία της γονιμοποίησης και της in vitro προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός, πραγματοποιήθηκαν πειράματα in vitro γονιμοποίησης με τη χρήση των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine και Nevirapine. Μελετήθηκαν 3 ομάδες εμβρύων 1. Control, 2. Lamivudine και 3. Nevirapine. Πριν τη γονιμοποίηση, τα σπερματοζωάρια επωάστηκαν με τους αναστολείς Lamivudine (50μM) ή Nevirapine (50μM) κατά τη διάρκεια του capacitation. Κατά τη γονιμοποίηση και κατά τη διάρκεια της in vitro ανάπτυξης ως το στάδιο σχηματισμού βλαστοκύστης, τα έμβρυα επωάστηκαν με τους αναστολείς Lamivudine ή Nevirapine, σε συγκέντρωση 200μM. Η πορεία της ανάπτυξης των εμβρύων ελέγχονταν καθημερινά σε οπτικό μικροσκόπιο και καταγράφονταν ο ρυθμός διαρρέσεων και η μορφολογία τους. Συνολικά μελετήθηκαν 120 έμβρυα στην ομάδα Control, 110 έμβρυα στην ομάδα Lamivudine και 95 έμβρυα στην ομάδα

Nevirapine. Στο στάδιο της βλαστοκύστης έφτασε το 85% των εμβρύων της ομάδας Control, το 55% της ομάδας Lamivudine και το 58% της ομάδας Nevirapine. Στο παρακάτω γράφημα απεικονίζονται τα αποτελέσματα της προεμφυτευτικής ανάπτυξης των εμβρύων για τις 3 ομάδες.

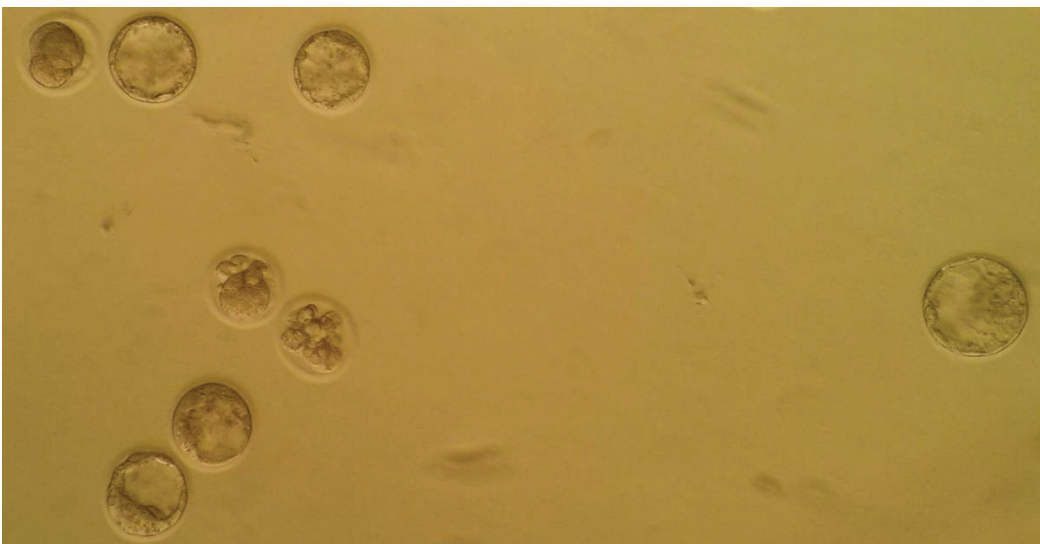


Γράφημα4.4: Στάδιο της in vitro προεμφυτευτικής πορείας, στο οποίο σταμάτησαν την ανάπτυξή τους έμβρυα της ομάδας Control, Lamivudine και Nevirapine.

Από το παραπάνω γράφημα φαίνεται πως η παρουσία των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης επηρεάζει τη φυσιολογική πορεία της in vitro προεμφυτευτικής πορείας εμβρύων μυών, καθώς μόνο το 55% και το 58% των εμβρύων των ομάδων Lamivudine και Nevirapine, αντίστοιχα φτάνει στο στάδιο της βλαστοκύστης. Επίσης, ένα μεγάλο ποσοστό 34% και 27% των εμβρύων των ομάδων Lamivudine και Nevirapine αντίστοιχα, σταματά την ανάπτυξή του στις πρώτες μιτωτικές διαιρέσεις. Ορισμένα από αυτά τα έμβρυα, είχαν πολλά κυτταροπλασματικά θραύσματα και απέπιπταν, ενώ άλλα είχαν καλή μορφολογία, την οποία και διατηρούσαν μετά την παύση των διαιρέσεων.



Εικόνα4.8: Έμβρυα στο στάδιο της βλαστοκύστης της ομάδας Control



Εικόνα4.9: Έμβρυα της ομάδας Nevirapine. Διακρίνονται έμβρυα, τα οποία σταμάτησαν την ανάπτυξή τους πριν το σχηματισμό της βλαστοκύστης και έμβρυα το στάδιο της βλαστοκύστης.

### Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο ANOVA και το t-test, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS (version 20).

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**





## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία συνιστούν μία ομάδα μετρίως επαναλαμβανόμενων ακολουθιών DNA, που απαντούν σε πολλά αντίγραφα στο γένωμα σχεδόν όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, καταλαμβάνοντας περίπου το 43.2% του γενώματος του ανθρώπου και το 37.3% του γενώματος του μυός. Η ικανότητά τους να αντιγράφονται, να ενσωματώνονται σε νέες θέσεις στο γένωμα και να κληρονομούνται, τα καθιστά έναν από τους βασικότερους παράγοντες αναδιάταξης και δυναμικής εξέλιξης του γενώματος των οργανισμών. Η μελέτη της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι απαραίτητη για τη πλήρη κατανόηση του ρόλου τους στο γένωμα των οργανισμών. Έχει αναφερθεί η παρουσία ρετροτρανσποζονιακών μετάγραφων και πρωτεϊνών σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα, σε αρχέγονα νευρικά κύτταρα και σε νευρικά κύτταρα εγκεφάλου, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα τρωκτικά. Επιπλέον, έχουν αναφερθεί γεγονότα ρετρομετάθεσης σε αρχέγονα αναπαραγωγικά κύτταρα, σε αναπαραγωγικά κύτταρα, σε όρχεις και ωοθήκες, σε καρκινικά κύτταρα, σε ιστούς εγκεφάλου και σε πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης (143, 144, 147-149). Είναι σημαντικό οι εσωτερικοί μηχανισμοί του κυττάρου να εξασφαλίζουν τον έλεγχο της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων και κατά συνέπεια τον έλεγχο της συχνότητας εμφάνισης των γεγονότων ρετρομετάθεσης, ώστε να προστατεύουν το κύτταρο από τυχόν αρνητικές συνέπειες των ανεξέλεγκτων γεγονότων ρετρομετάθεσης και να διατηρούν συνθήκες ισορροπίας και εύρυθμης λειτουργίας στο εσωτερικό του κυττάρου. Τα κύτταρα έχουν αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς ελέγχου της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων, ο κυριότερος εκ των οποίων, αποτελεί η μεθυλίωση του DNA, η οποία επιδρά αρνητικά στη μεταγραφή του DNA καθώς ευνοεί τη πρόσδεση μεταγραφικών αναστολέων. Το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA καθορίζεται από αντιδράσεις απομεθυλίωσης και μεθυλίωσης, που πραγματοποιούνται κατά την ωρίμανση των γαμετών και κατά το προεμφυτευτικό στάδιο, που έπεται της γονιμοποίησης. Μετά από τις αντιδράσεις απομεθυλίωσης, η υπομεθυλίωση που χαρακτηρίζει το DNA ευνοεί τη μεταγραφή και τότε παρατηρείται έκφραση των ρετροτρανσποζονίων. Το αποτέλεσμα των γεγονότων ρετρομετάθεσης είναι δυνατό να έχει θετικό, αρνητικό ή ουδέτερο αντίκτυπο για το κύτταρο. Υπάρχει πλήθος αναφορών σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν τη δομή και τη λειτουργία του γενώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών (77-81, 100-103). Γεγονότα ρετρομετάθεσης έχουν συσχετιστεί με την εμφάνιση διαφόρων μορφών καρκίνου και 65

γενετικών ασθενειών (70, 156). Από την άλλη πλευρά η παρουσία τους φαίνεται να είναι απαραίτητη, καθώς έχει συσχετιστεί με τη φυσιολογική προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μύος (230). Ωστόσο, ο ρόλος των ρετρομεταθετών στοιχείων δεν είναι πλήρως διευκρινισμένος και είναι απαραίτητες επιπλέον μελλοντικές πειραματικές εργασίες, που θα δώσουν νέα στοιχεία σχετικά με τον λόγο για τον οποίο τα ρετρομεταθετά στοιχεία απαρτίζουν ένα τόσο μεγάλο ποσοστό του γενώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών και σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο επηρεάζουν τη δομή, τη λειτουργία και την εξέλιξή του.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ανιχνεύσουμε γεγονότα ρετρομετάθεσης στα ώριμα σπερματοζωάρια μύος και να μελετήσουμε το ρόλο τους στη πρώιμη ανάπτυξη εμβρύων μύος. Παράλληλα, σκοπός της εργασίας αποτελεί και η μελέτη του ρόλου του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση και στα αρχικά στάδια ανάπτυξης εμβρύων μύος.

Για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα σπερματοζωάρια και στα έμβρυα μύος, χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς που φέρουν ενσωματωμένα τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10 και τα ρετρομεταθετά στοιχεία VL30, του μύος. Η ταυτοποίηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης πραγματοποιείται μέσω της παρατήρησης της έκφρασης του γονιδίου της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP, το οποίο βρίσκεται κλωνοποιημένο στο εσωτερικό της αλληλουχίας των ρετρομεταθετών στοιχείων. Η μεταφορά των πλασμιδιακών φορέων στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων επιτυγχάνεται μέσω απλής επώασης, καθώς τα σπερματοζωάρια έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν αυθόρμητα, σε μικρό χρονικό διάστημα, και να μεταφέρουν στο εσωτερικό τους εξωγενή μόρια νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA). Τα σπερματοζωάρια, τα οποία έχουν επωαστεί με τους ανασυνδυασμένους πλασμιδιακούς φορείς, επιτελούν επίσης τη παθητική μεταφορά των φορέων στα έμβρυα, μέσω της *in vitro* γονιμοποίησης των ωαρίων.

### **5.1 Μελέτη γεγονότων ρετρομετάθεσης σε σπερματοζωάρια μύος**

Το σύνολο των αποτελεσμάτων που προέκυψαν με την εφαρμογή των τεχνικών της PCR, της κυτταρομετρίας ροής και του συνεστιακού μικροσκοπίου κατέδειξαν την έκφραση της πρωτεΐνης EGFP στα ώριμα σπερματοζωάρια από την επιδιδυμίδα μύος και επιβεβαίωσαν

την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης, ενώ ταυτόχρονα με τη χρήση του αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης, μειώθηκε το ποσοστό αυτών των γεγονότων. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι ενισχύει τα δεδομένα που υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός μεταβολικά ενεργού περιβάλλοντος στο εσωτερικό των ώριμων σπερματοζωαρίων, εν αντιθέσει με την επικρατούσα άποψη, ότι τα σπερματοζωάρια, λόγω του ότι χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός πολύ καλά πακεταρισμένου γενετικού υλικού και έχουν πολύ μικρό κυτταρόπλασμα, είναι κύτταρα μεταβολικά ανενεργά, από τα οποία απουσιάζει η μεταγραφική και μεταφραστική δραστηριότητα.

Έχει αναφερθεί ότι ένα πολύ μικρό ποσοστό του DNA των σπερματοζωαρίων δεν είναι πακεταρισμένο με πρωταμίνες και δεν παρουσιάζει δομή ετεροχρωματινής, αλλά αντίθετα είναι συνδεδεμένο με ιστόνες και παρουσιάζει δομή ευχρωματινής, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη ενός εν δυνάμει ενεργού μεταγραφικού τμήματος, του γενετικού υλικού των σπερματοζωαρίων. Σε αυτή τη περιοχή είναι πολύ πιθανό να ενσωματώνεται το εξωγενές DNA, μετά την μεταφορά του στο εσωτερικό των σπερματοζωαρίων (219). Είναι ενδιαφέρον ότι η περιοχή ευχρωματινής είναι πλούσια σε ρετρομεταθετά στοιχεία, κυρίως της οικογενείας των LINE-1, τα οποία είναι πολύ πιθανό να συμμετέχουν στην όλη διαδικασία ενσωμάτωσης των εξωγενών μορίων νουκλεϊκών οξέων στο DNA των σπερματοζωαρίων (231).

Μεταγραφική δραστηριότητα στα σπερματοζωάρια έχει παρατηρηθεί κυρίως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της διαφοροποίησης των σπερματοζωαρίων, όπου συντίθενται και παράγονται αρκετά μόρια RNA, τα οποία συσσωρεύονται στα ώριμα σπερματοζωάρια. Επιπλέον, έχει αναφερθεί μεταγραφική και μεταφραστική δραστηριότητα στα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων στα βοοειδή (232), καθώς και ενεργή μεταφραστική λειτουργία κατά τη διάρκεια της απόκτησης ικανότητας για γονιμοποίηση (capacitation) στα σπερματοζωάρια ανθρώπου, βοοειδών και τρωκτικών (233). Όμως, δεν έχει αναφερθεί σύνθεση νέων μορίων RNA από το DNA του πυρήνα των ώριμων σπερματοζωαρίων (234, 235).

Ωστόσο, μελέτες που αφορούν το μοριακό μηχανισμό που εμπλέκεται στη διαδικασία μεταφοράς και ενσωμάτωσης εξωγενών μορίων νουκλεϊκών οξέων στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων (Sperm Mediated Gene Transfer), απέδειξαν την ύπαρξη μιας μεταγραφικής μηχανής, ικανής να υποστηρίξει τη μεταγραφή και τη διαδικασία

ματίσματος πρόδρομων μορίων mRNA, καθώς επίσης και την ύπαρξη ενεργούς ενζυμικής δραστηριότητας της ανάστροφης μεταγραφάσης, ικανής να μεταγράφει αντίστροφα μόρια RNA σε cDNA (204). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε, στα ώριμα σπερματοζωάρια, μια δοσο-εξαρτώμενη ενεργοποίηση της ενδονουκλεάσης, ως απόκριση στην είσοδο εξωγενών μορίων DNA, η οποία οδήγησε στην αποικοδόμηση τόσο των «ξένων» μορίων DNA, όσο και του DNA των σπερματοζωαρίων, μέσω μιας διαδικασίας με παρόμοια χαρακτηριστικά, με εκείνα της απόπτωσης (216). Τα παραπάνω ευρήματα υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός ενεργού πυρήνα και ενός ενεργού κυτταροπλάσματος στα ώριμα σπερματοζωάρια.

Στα πειράματα που πραγματοποιήσαμε για να μελετήσουμε την ικανότητα των ώριμων σπερματοζωαρίων να επιτρέπουν γεγονότα ρετρομετάθεσης, καταλήξαμε, μέσω των αποτελεσμάτων μας, στο συμπέρασμα, ότι διαθέτουν όλους τους απαραίτητους μηχανισμούς που υποστηρίζουν την ύπαρξη τέτοιων γεγονότων. Υποθέτουμε πως τα σπερματοζωάρια συνθέτουν και εφοδιάζονται με το σύνολο αυτών των μεταγραφικών και μεταφραστικών μηχανισμών, πιθανά κατά το στάδιο της ανάπτυξης και της ωρίμανσής τους, και πως η ενεργοποίηση των μηχανισμών αυτών στο στάδιο των ώριμων σπερματοζωαρίων, είναι δυνατό να οφείλεται στην είσοδο των εξωγενών μορίων DNA και να αποτελεί τμήμα του μοριακού μηχανισμού που κρύβεται πίσω από την τεχνική sperm mediated gene transfer. Τέλος, είναι πολύ πιθανό ακόμη και η ίδια η φυσική ιδιότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων να μετατίθενται εντός των κυττάρων τους, και μάλιστα πολύ περισσότερο η ικανότητα των αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων (LINE-1, HERVK-10), τα οποία κωδικοποιούν και εκφράζουν τις απαραίτητες για τη μετάθεσή τους πρωτεΐνες, να ενισχύει και να ευνοεί την ενσωμάτωσή τους σε νέες θέσεις, πιθανά στη περιοχή της ευχρωματίνης του γενώματος των σπερματοζωαρίων.

## **5.2 Η υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων επηρεάζει τη προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων μύος**

Η ταυτοποίηση των γεγονότων ρετρομετάθεσης σε έμβρυα μύος, διαφόρων σταδίων προεμφυτευτικής ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης της έκφρασης της πράσινης φθορίζουσας ουσίας EGFP, με τη παρατήρηση των εμβρύων σε συνεστιακό μικροσκόπιο και την εφαρμογή της μοριακής τεχνικής PCR. Τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά

στοιχεία LINE-1 και HERVK-10, καθώς και τα ρετρομεταθετά στοιχεία VL30 του μυός, μεταφέρθηκαν στα έμβρυα από τα σπερματοζωάρια, κατά τη γονιμοποίηση. Τα σπερματοζωάρια είναι δυνατό να μετέφεραν στο εσωτερικό τους, ακόμα και να ενσωμάτωσαν στο DNA τους, τα εξωγενή ρετρομεταθετά στοιχεία πριν τη γονιμοποίηση του ωαρίου, ή απλώς να τα δέσμευσαν στην επιφάνειά τους και να τα μετέφεραν στο εσωτερικό του ωαρίου κατά τη γονιμοποίηση.

Ένα γεγονός ρετρομετάθεσης απαιτεί την μεταγραφή, το μάτισμα, την αντίστροφη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του ρετροτρανσποζονίου μαζί με την EGFP, σε νέα θέση στο γενετικό υλικό των εμβρύων. Έμβρυα στα οποία δεν ανιχνεύθηκαν γεγονότα ρετρομετάθεσης, είναι πιθανό να ενσωμάτωσαν τους εξωγενείς πλασμιδιακούς φορείς και να τους διατήρησαν ως εξωχρωμοσωμικές δομές, χωρίς να επιτρέψουν την παρουσία ρετρομεταθέσεων. Η ανάπτυξη αυτών των εμβρύων ήταν ωστόσο φυσιολογική και δεν επηρεάστηκε από τη πιθανή παρουσία των πλασμιδιακών φορέων με τη μορφή επισωμάτων, στο εσωτερικό των εμβρύων. Το ίδιο φυσιολογική ήταν και η ανάπτυξη των εμβρύων που γονιμοποιήθηκαν με σπερματοζωάρια προ-επωασμένα με τον πλασμιδιακό φορέα pEGFP-N1 και τον πλασμιδιακό φορέα mutant LINE-1, γεγονός που υποδεικνύει πως ο πλασμιδιακός φορέας από μόνος του, δεν επηρεάζει τη πορεία ανάπτυξης των εμβρύων. Η *in vitro* προεμφυτευτική αναπτυξιακή πορεία επηρεάστηκε από τη παρουσία μη ελεγχόμενων ρετρομεταθέσεων στα έμβρυα, που βρέθηκαν θετικά στη ρετρομετάθεση, τόσο για τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1 και HERVK-10, όσο και για τα ρετρομεταθετά στοιχεία VL30 του μυός. Συγκεκριμένα, σε αυτά τα έμβρυα παρατηρήθηκαν πολλά κυτταροπλασματικά θραύσματα και παύση της ανάπτυξης, πριν από το στάδιο σχηματισμού της βλαστοκύστης (Εικόνα4.8). Ταυτόχρονα όσα έμβρυα από αυτά σχημάτισαν βλαστοκύστες, η πλειοψηφία αυτών ήταν κακής ποιότητας και απέπιπταν πριν το hatching (Εικόνα4.6). Είναι πιθανό η αυξημένη παρουσία των γεγονότων ρετρομετάθεσης να επηρεάζει τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του DNA των εμβρύων (π.χ. πρόκληση DSBs) και να οδηγεί στη δημιουργία βλαστομεριδίων με μεγάλο ποσοστό κυτταροπλασματικών θραυσμάτων και χαμηλό αναπτυξιακό δυναμικό. Επίσης, είναι δυνατό να οδηγεί σε απόπτωση των βλαστομεριδίων, μέσω του μηχανισμού του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.

Μετά τη γονιμοποίηση, στα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής προεμφυτευτικής ανάπτυξης, παρατηρείται ένα σύνολο επιγενετικών τροποποιήσεων που επηρεάζει σημαντικά το

πρότυπο μεθυσίας του αναπτυσσόμενου εμβρύου και ευνοεί την έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων. Ενδεχομένως, η έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στα στάδια αυτά να είναι απαραίτητη για την διαδικασία της εμβρυογένεσης και να βρίσκεται υπό τον έλεγχο του κυττάρου (236). Έχει δειχθεί επίσης, πως η μεταφορά εξωγενών ρετρομεταθετών στοιχείων στο εσωτερικό σωματικών κυττάρων επηρεάζει τη μορφολογία τους, τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό τους (237). Έχουν αναφερθεί πολλές περιπτώσεις μεταλλαξιγενέσεων και διαταραχών, που οφείλονται σε γεγονότα ρετρομετάθεσης, τα οποία διέφυγαν από τον έλεγχο των κυττάρων (200). Συνεπώς, στη παρούσα μελέτη, η μεταφορά των εξωγενών ανθρώπινων ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1, και HERVK-10 και των στοιχείων VL30 του μύος, από τα σπερματοζώαρια στα έμβρυα του μύος κατά τη γονιμοποίηση, πιθανά οδήγησε στη παρουσία νέων, ανεξέλεγκτων γεγονότων ρετρομετάθεσης, τα οποία διέφυγαν από τον έλεγχο των προστατευτικών μηχανισμών του κυττάρου και επηρέασαν τη μορφολογία και την αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων.

### **5.3 Ο ρόλος του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση και στα αρχικά στάδια ανάπτυξης εμβρύων μύος**

Το ένζυμο της ανάστροφης μεταγραφάσης καταλύει τη μετατροπή μορίων RNA σε cDNA, και σχετίζεται με τον αναπαραγωγικό κύκλο ζωής των ρετροϊών. Στα κύτταρα πηγή έκφρασης της ανάστροφης μεταγραφάσης αποτελούν τα ρετρομεταθετά στοιχεία και το ένζυμο της τελομεράσης, το οποίο έχει και δραστηριότητα ανάστροφης μεταγραφάσης. Έχει δειχθεί πως η έκφρασή της είναι υψηλή σε γαμετικά κύτταρα, σε έμβρυα και εμβρυϊκούς ιστούς, σε μη-διαφοροποιημένους ιστούς και σε καρκινικά κύτταρα. Αντίθετα, παρατηρείται μειωμένη έκφρασή της, σε πλήρως διαφοροποιημένα κύτταρα και σε μη παθολογικούς ιστούς. Στη παρούσα μελέτη, χορηγήθηκε σε αρσενικούς και θηλυκούς μύες, για διάστημα 10 εβδομάδων ενέσιμο διάλυμα των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine (50mg/Kg) και Nevirapine (30mg/Kg) και μελετήθηκε το αποτέλεσμα της αναστολής του ενζύμου στη φυσιολογική πορεία ανάπτυξης και διαφοροποίησης των γαμετών, παρατηρώντας τις τομές των όρχεων και των ωοθηκών. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε και η επίδραση των αναστολέων στη μορφολογία των σπερματοζωαρίων, στον αριθμό, στη κινητικότητα και στην δομική ακεραιότητα του DNA τους. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης, στα οποία

παρατηρήθηκε η επίδραση της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη φυσιολογική προεμφυτευτική αναπτυξιακή πορεία των εμβρύων μυός.

Η χορήγηση των αναστολέων Lamivudine και Nevirapine επηρέασε τη φυσιολογική ανάπτυξη των σπερματοζωαρίων μέσα στα σπερματοφόρα σωληνάκια, όπως προέκυψε από τη σύγκριση των τομών των όρχεων στα πειραματόζωα, στα οποία χορηγήθηκαν οι αναστολείς, με τις τομές των όρχεων των πειραματόζωων της ομάδας control. Επηρεάστηκε σε σημαντικό βαθμό η αρχιτεκτονική δομή των σπερματοφόρων σωληναρίων και παρατηρήθηκαν αλλοιώσεις στον αριθμό και τη μορφολογία τόσο των αναπτυσσόμενων γαμετικών κυττάρων, όσο και των κυττάρων Sertoli. Παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και αυξημένες μορφολογικές ανωμαλίες, εντοπισμένες, κυρίως, στην ουρά. Από την μελέτη των ωοθηκικών τομών, φάνηκε πως οι αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης επηρέασαν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των ωοθυλακίων, καθώς, συγκριτικά με την ομάδα Control, παρατηρήθηκαν πολλά ωοθυλάκια σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης, περισσότερα ατρητικά ωοθυλάκια και λιγότερα ωχρά σωμάτια. Τέλος, οι αναστολείς της ανάστροφης μεταγραφάσης επηρέασαν τη φυσιολογική πορεία της προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μυός, οδηγώντας σε παύση των μιτωτικών διαιρέσεων των βλαστομερίδιων, καθώς μόνο το 55% και το 58% των εμβρύων των ομάδων Lamivudine και Nevirapine, αντίστοιχα, έφτασε στο στάδιο της βλαστοκύστης, συγκριτικά με το 85% των εμβρύων της ομάδας Control (Γράφημα 4.3).

Ανάλογες πειραματικές μελέτες, έχουν δείξει πως η χορήγηση της Nevirapine σε αρουραίους προκάλεσε αυξημένη υπεροξειδωση των λιπιδίων στους όρχεις, μειωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και αυξημένες μορφολογικές ανωμαλίες (238, 239). Παράλληλα, η χρήση των αναστολέων της ανάστροφης μεταγραφάσης από ασθενείς που έχουν μολυνθεί από τον ιό του HIV, επηρέασε τα χαρακτηριστικά του σπέρματος και οδήγησε σε μείωση του όγκου του σπερματικού υγρού, σε μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων και σε αύξηση των μορφολογικών ανωμαλιών (240-243). Η χορήγηση του αναστολέα της ανάστροφης μεταγραφάσης Zidovudine (AZT) σε θηλυκές μύες κατά την κύηση, προκάλεσε πρόωρο τερματισμό της ανάπτυξης και θάνατο των εμβρύων. Σε πειράματα *in vitro* γονιμοποίησης η Zidovudine επηρέασε το ρυθμό μιτωτικών διαιρέσεων και την *in vitro* προεμφυτευτική ανάπτυξη των εμβρύων μυός (244), ενώ η Nevirapine, οδήγησε σε παύση της διαίρεσης των εμβρύων στα πρώτα στάδια της ανάπτυξής τους (245).

Φαίνεται λοιπόν, πως η αναστολή του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης επηρεάζει τη διαδικασία της γαματογένεσης σε διάφορα στάδια ανάπτυξης και διαφοροποίησης των γαμετών, όπως επίσης, την *in vitro* ανάπτυξη των εμβρύων μύος. Η αναστολή αυτή μπορεί να προέρχεται είτε από την αναστολή της ανάστροφης μεταγραφάσης των ρετρομεταθετών στοιχείων, είτε από την αναστολή της ανάστροφης μεταγραφάσης της τελομεράσης.

Έχει δειχθεί πως τα ρετρομεταθετά στοιχεία εκφράζονται κατά την γαματογένεση και πως τόσο τα σπερματοζώαρια, όσο και τα ωάρια, διαθέτουν ενεργότητα ανάστροφης μεταγραφάσης, ρετροτρανσποζονιακής προέλευσης (144, 220). Επίσης έχει παρατηρηθεί ενεργότητα τελομεράσης στους όρχεις και στις ωοθήκες εμβρύων, έφηβων και ώριμων ατόμων (206). Πιο συγκεκριμένα έχουν παρατηρηθεί, υψηλά επίπεδα έκφρασης της τελομεράσης στο στάδιο των σπερματογονίων και στα πρωτογενή σπερματοκύτταρα όρχεων, ώριμων ατόμων, μειωμένη έκφραση σε δευτερογενή σπερματοκύτταρα και καθόλου έκφραση στις σπερματίδες και στα ώριμα σπερματοζώαρια (207, 208). Στις ωοθήκες, η τελομεράση εκφράζεται κυρίως στα πρώιμα στάδια σχηματισμού του άντρου και στο προωοθυλακιορρηκτικό στάδιο, ενώ μειώνεται σημαντικά κατά την ωοθυλακιορρηξία και την ωρίμανση του ωαρίου (207, 209). Σε *in vitro* κυτταρικές μελέτες έχει δειχθεί πως ο αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης Lamivudine, επηρεάζει την δραστηριότητα της τελομεράσης και το μήκος των τελομερών των κυττάρων (246). Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και μία άλλη *in vitro* μελέτη, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας της ανάστροφης μεταγραφάσης Zidovudine (AZT), ο οποίος οδήγησε σε μείωση του μεγέθους των τελομερών των κυττάρων (247-250). Μειωμένη δραστηριότητα της τελομεράσης και μειωμένο μήκος των τελομερών, έχει συνδεθεί, με μειωμένη παραγωγή σπερματοζωαρίων και μειωμένη γονιμότητα (251), με αυξημένο αριθμό ανώμαλων ωαρίων, με πολλαπλές χρωμοσωμικές ανωμαλίες και με αναπαραγωγική γήρανση (207). Ωστόσο, στη μελέτη μας ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο οι αναστολείς Lamivudine και Nevirapine προκαλούν διαταραχές στην πορεία της γαματογένεσης απαιτεί περαιτέρω μελέτη για να διευκρινιστεί, εάν είναι αποτέλεσμα της αναστολής της δράσης της ανάστροφης μεταγραφάσης των ρετρομεταθετών στοιχείων ή της τελομεράσης, ή ταυτόχρονα και των δύο.



## **6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρατήρηση και την ανάλυση των αποτελεσμάτων, καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα:

- Τα ώριμα σπερματοζώαρια, από την επιδιδυμίδα μυός, διαθέτουν όλους τους απαραίτητους μηχανισμούς για να υποστηρίξουν την ύπαρξη γεγονότων ρετρομετάθεσης στο εσωτερικό τους.
- Η υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων επηρεάζει την *in vitro* προεμφυτευτική πορεία ανάπτυξης εμβρύων μυός.
- Η αναστολή του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης, με τη χρήση των αναστολέων Lamivudine και Nevirapine, επηρεάζει σημαντικά τη φυσιολογική πορεία της σπερματογένεσης και της ωογένεσης.
- Η αναστολή του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης, με τη χρήση των αναστολέων Lamivudine και Nevirapine, επηρεάζει την *in vitro* προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μυός.



## **7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ**



## 7. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν επαναλαμβανόμενες ακολουθίες DNA και απαντώνται σε πολλά αντίγραφα στο γένωμα όλων των οργανισμών. Λόγω της ικανότητάς του να μετακινούνται και να αυξάνουν τον αριθμό αντιγράφων τους, έχουν διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη δομή, τη λειτουργία και την εξέλιξη του γενώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών. Ωστόσο, από το σύνολο των ρετρομεταθετών στοιχείων, λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων, μόνο ένας μικρός αριθμός από αυτά έχει παραμείνει ενεργός. Γεγονότα ρετρομετάθεσης έχουν παρατηρηθεί σε γαμετικά κύτταρα, σε καρκινικά κύτταρα, σε νευρικά κύτταρα εγκεφάλου και σε πρώιμα στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης. Τα κύτταρα ελέγχουν την έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων μέσω μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση του DNA και ο μεταμεταγραφικός έλεγχος που ασκούν τα μικρά, μη-κωδικά μόρια RNAi, για να εξασφαλίζουν τη δομική και τη λειτουργική ακεραιότητα του γενώματός τους.

Σκοπός της ερευνητικής εργασίας αποτέλεσε η μελέτη της παρουσίας των γεγονότων ρετρομετάθεσης στο εσωτερικό ώριμων σπερματοζωαρίων και η μελέτη του ρόλου των ρετρομεταθετών στοιχείων στη φυσιολογική πορεία της προεμφυτευτικής ανάπτυξης εμβρύων μύος. Ταυτόχρονα, μελετήθηκε η επίδραση της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης στη γαμετογένεση και στην *in vitro* πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Για τη μελέτη των γεγονότων ρετρομετάθεσης χρησιμοποιήθηκαν πλασμιδιακοί φορείς που φέρουν κλωνοποιημένα τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, τα ανθρώπινα ρετρομεταθετά στοιχεία HERVK-10 και τα ρετρομεταθετά στοιχεία του μύος, VL30. Τα υπό μελέτη στοιχεία φέρουν ενσωματωμένη ειδική κασέτα αντίχενωσης των γεγονότων ρετρομετάθεσης, η οποία στηρίζεται στην έκφραση της EGFP. Οι εξωγενείς πλασμιδιακοί φορείς δεσμεύονται αυθόρμητα από τα σπερματοζωάρια και ενσωματώνονται στο εσωτερικό τους, και μέσω *in vitro* γονιμοποίησης, μεταφέρονται παθητικά από τα σπερματοζωάρια στα ωάρια. Για τη μελέτη της αναστολής του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης, χρησιμοποιήθηκαν οι αναστολείς Lamivudine και Nevirapine, οι οποίοι χορηγήθηκαν σε αρσενικούς και θηλυκούς μύες, για διάστημα 10 εβδομάδων. Προστέθηκαν επίσης στο καλλιεργητικό μέσο ανάπτυξης των εμβρύων και μελετήθηκε ο ρόλος τους στην φυσιολογική προεμφυτευτική πορεία των εμβρύων μύος.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν πως α. τα σπερματοζώαρια ενσωματώνουν τα εξωγενή ρετρομεταθετά στοιχεία και ευνοούν την παρουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης β. τα σπερματοζώαρια μεταφέρουν τα εξωγενή ρετρομεταθετά στοιχεία στα ωάρια μέσω της γονιμοποίησης γ. η υπερέκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων επηρεάζει τη φυσιολογική πορεία της πρώιμης ανάπτυξης εμβρύων μυός δ. η αναστολή του ενζύμου της ανάστροφης μεταγραφάσης επηρεάζει τη φυσιολογική πορεία της σπερματογένεσης και της ωογένεσης, καθώς και τη φυσιολογική προεμφυτευτική ανάπτυξη εμβρύων μυός.



## **8. SUMMARY**



## 8. SUMMARY

Retroelements are a major type of genetic mobile elements which have played a crucial role in the genome structure, function and evolution, by relocating themselves from site to site in the genome. Despite their high distribution in the mammalian genomes, only a minority of them are still active as they have lost their capacity to retrotranspose, due to defective mutations and truncations. Active retroelement transcripts are present in male and female gametes, where they are typically regulated by methylation, non-coding RNAs and transcription factors. Retroelement control failure may exert negative effects on cellular function and proliferation.

In the present study, we investigated the occurrence of *de novo* retrotransposition events in mouse spermatozoa, the potential transfer of these retroelements into the mouse oocyte during fertilization as well as their impact on the mouse preimplantation embryo development. Additionally, we studied the effect of reverse transcriptase inhibition in gametogenesis and early mouse embryonic development. In order to study the retrotransposition events, we used plasmid vectors containing the human LINE-1, HERVK-10 and the mouse VL30 retroelements, tagged with an enhanced green fluorescence (EGFP) gene-based retrotransposition cassette. Plasmid vectors were spontaneously taken up by mouse epididymal spermatozoa and were transferred in oocytes via in vitro fertilization. To explore the effect of reverse transcriptase inhibition on gametogenesis in male and female mice, were treated with the inhibitors Lamivudine and Nevirapine, for 10 weeks. After treatment, sperm parameters, testicular and ovarian morphology were examined.

Our findings show that a) Sperm cell incorporates cloned retroelements and favors retrotransposition events, b) Spermatozoa can transfer cloned human or mouse retroelements to the oocyte during fertilization, c) Retroelement overexpression affects embryo morphology and impairs preimplantation, d) Reverse transcriptase inhibition by the use of antiretroviral drugs impairs the normal process of gametogenesis and the preimplantation development of mouse embryos.



## **9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**



## 9.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Vander A. SJ, Luciano D., Τσακόπουλος Μ. Human Physiology The Mechanisms of Body Function 2001.
2. Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*. 1992;131(3):1458-66.
3. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2007;80(2):84-97.
4. Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982;27(2):327-39.
5. Ramos SD, Lee JM, Peuler JD. An inexpensive meter to measure differences in electrical resistance in the rat vagina during the ovarian cycle. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(2):667-70.
6. Achiraman S, Archunan G, Sankarganesh D, Rajagopal T, Rengarajan RL, Kokilavani P, et al. Biochemical analysis of female mice urine with reference to endocrine function: a key tool for estrus detection. *Zoolog Sci*. 2011;28(8):600-5.
7. Champlin AK, Dorr DL, Gates AH. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod*. 1973;8(4):491-4.
8. Caligioni CS. Assessing reproductive status/stages in mice. *Curr Protoc Neurosci*. 2009;Appendix 4:Appendix 4I.
9. Jonge CJD. The Sperm Cell Production, Maturation, Fertilization, Regeneration 2006.
10. Ho HC, Suarez SS. Characterization of the intracellular calcium store at the base of the sperm flagellum that regulates hyperactivated motility. *Biology of reproduction*. 2003;68(5):1590-6.

11. Dacheux JL, Dacheux F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2014;147(2):R27-42.
12. Vigil P, Orellana RF, Cortes ME. Modulation of spermatozoon acrosome reaction. *Biological research*. 2011;44(2):151-9.
13. Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2001;122(4):519-26.
14. Yao Y, Ho P, Yeung WS. Effects of human follicular fluid on the capacitation and motility of human spermatozoa. *Fertility and sterility*. 2000;73(4):680-6.
15. Suarez SS, Osman RA. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. *Biology of reproduction*. 1987;36(5):1191-8.
16. White DR, Aitken RJ. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. *Gamete research*. 1989;22(2):163-77.
17. Aoki F, Sakai S, Kohmoto K. Regulation of flagellar bending by cAMP and Ca<sup>2+</sup> in hamster sperm. *Molecular reproduction and development*. 1999;53(1):77-83.
18. Neill JM, Olds-Clarke P. A computer-assisted assay for mouse sperm hyperactivation demonstrates that bicarbonate but not bovine serum albumin is required. *Gamete research*. 1987;18(2):121-40.
19. Okamura N, Tajima Y, Soejima A, Masuda H, Sugita Y. Sodium bicarbonate in seminal plasma stimulates the motility of mammalian spermatozoa through direct activation of adenylate cyclase. *The Journal of biological chemistry*. 1985;260(17):9699-705.
20. Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, et al. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science (New York, NY)*. 2000;289(5479):625-8.
21. Ziomek CA, Johnson MH. Cell surface interaction induces polarization of mouse 8-cell blastomeres at compaction. *Cell*. 1980;21(3):935-42.
22. Tarkowski AK, Wroblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1967;18(1):155-80.



23. Johnson MH, Ziomek CA. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell*. 1981;24(1):71-80.
24. Bowman P, McLaren A. Cleavage rate of mouse embryos in vivo and in vitro. *Journal of embryology and experimental morphology*. 1970;24(1):203-7.
25. Merz EA, Brinster RL, Brunner S, Chen HY. Protein degradation during preimplantation development of the mouse. *Journal of reproduction and fertility*. 1981;61(2):415-8.
26. Clegg KB, Piko L. Poly(A) length, cytoplasmic adenylation and synthesis of poly(A)+ RNA in early mouse embryos. *Developmental biology*. 1983;95(2):331-41.
27. De Leon V, Johnson A, Bachvarova R. Half-lives and relative amounts of stored and polysomal ribosomes and poly(A) + RNA in mouse oocytes. *Developmental biology*. 1983;98(2):400-8.
28. Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, et al. In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome research*. 2003;13(5):1011-21.
29. Wang QT, Piotrowska K, Ciemerych MA, Milenkovic L, Scott MP, Davis RW, et al. A genome-wide study of gene activity reveals developmental signaling pathways in the preimplantation mouse embryo. *Developmental cell*. 2004;6(1):133-44.
30. Hamatani T, Carter MG, Sharov AA, Ko MS. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental cell*. 2004;6(1):117-31.
31. Nothias JY, Miranda M, DePamphilis ML. Uncoupling of transcription and translation during zygotic gene activation in the mouse. *The EMBO journal*. 1996;15(20):5715-25.
32. Futscher BW, Oshiro MM, Wozniak RJ, Holtan N, Hanigan CL, Duan H, et al. Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet*. 2002;31(2):175-9.
33. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 1993;3(2):226-31.

34. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293(5532):1089-93.
35. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG*. 1997;13(8):335-40.
36. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(1):21-35.
37. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. 2000;9(16):2395-402.
38. Gromova ES, Khoroshaev AV. [Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2003;37(2):300-14.
39. Baniushin BF. [Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes]. *Molekuliarnaia biologiiia*. 2005;39(4):557-66.
40. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology*. 2001;195(1):97-110.
41. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cellular & molecular biology letters*. 2005;10(4):631-47.
42. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*. 2005;14 Spec No 1:R47-58.
43. Padeken J, Zeller P, Gasser SM. Repeat DNA in genome organization and stability. *Current opinion in genetics & development*. 2015;31:12-9.
44. Chenais B, Caruso A, Hiard S, Casse N. The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: from genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. *Gene*. 2012;509(1):7-15.
45. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409(6822):860-921.

46. Gogvadze E, Stukacheva E, Buzdin A, Sverdlov E. Human-specific modulation of transcriptional activity provided by endogenous retroviral insertions. *Journal of virology*. 2009;83(12):6098-105.
47. Bannert N, Kurth R. The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annual review of genomics and human genetics*. 2006;7:149-73.
48. Heidmann O, Heidmann T. Retrotransposition of a mouse IAP sequence tagged with an indicator gene. *Cell*. 1991;64(1):159-70.
49. Maxwell PH. Consequences of ongoing retrotransposition in mammalian genomes. *Advances in Genomics and Genetics*. 2014;4:129–42.
50. Poulter RT, Goodwin TJ. DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons. *Cytogenetic and genome research*. 2005;110(1-4):575-88.
51. Cappello J, Handelsman K, Lodish HF. Sequence of Dictyostelium DIRS-1: an apparent retrotransposon with inverted terminal repeats and an internal circle junction sequence. *Cell*. 1985;43(1):105-15.
52. Goodwin TJ, Poulter RT. A new group of tyrosine recombinase-encoding retrotransposons. *Molecular biology and evolution*. 2004;21(4):746-59.
53. Waterston RH, Lindblad-Toh K, Birney E, Rogers J, Abril JF, Agarwal P, et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*. 2002;420(6915):520-62.
54. Gentles AJ, Wakefield MJ, Kohany O, Gu W, Batzer MA, Pollock DD, et al. Evolutionary dynamics of transposable elements in the short-tailed opossum *Monodelphis domestica*. *Genome research*. 2007;17(7):992-1004.
55. Donnelly SR, Hawkins TE, Moss SE. A conserved nuclear element with a role in mammalian gene regulation. *Human molecular genetics*. 1999;8(9):1723-8.
56. Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature genetics*. 1998;19(1):19-24.
57. Kazazian HH, Jr., Wong C, Youssoufian H, Scott AF, Phillips DG, Antonarakis SE. Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature*. 1988;332(6160):164-6.

58. Brouha B, Schustak J, Badge RM, Lutz-Prigge S, Farley AH, Moran JV, et al. Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(9):5280-5.
59. Babushok DV, Kazazian HH, Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Human mutation*. 2007;28(6):527-39.
60. Goodier JL, Ostertag EM, Du K, Kazazian HH, Jr. A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome research*. 2001;11(10):1677-85.
61. Goodier JL, Zhang L, Vetter MR, Kazazian HH, Jr. LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(18):6469-83.
62. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, DeBerardinis RJ, Boeke JD, Kazazian HH, Jr. High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*. 1996;87(5):917-27.
63. Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, Eickbush TH. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell*. 1993;72(4):595-605.
64. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Jr., Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996;87(5):905-16.
65. Jurka J. Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(5):1872-7.
66. Wei W, Gilbert N, Ooi SL, Lawler JF, Ostertag EM, Kazazian HH, et al. Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(4):1429-39.
67. Cordaux R, Hedges DJ, Herke SW, Batzer MA. Estimating the retrotransposition rate of human Alu elements. *Gene*. 2006;373:134-7.
68. Shen MR, Batzer MA, Deininger PL. Evolution of the master Alu gene(s). *Journal of molecular evolution*. 1991;33(4):311-20.

69. Eickbush TH. Transposing without ends: the non-LTR retrotransposable elements. *The New biologist*. 1992;4(5):430-40.
70. Hancks DC, Kazazian HH, Jr. Active human retrotransposons: variation and disease. *Current opinion in genetics & development*. 2012;22(3):191-203.
71. Ichiyanagi K. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes & genetic systems*. 2013;88(1):19-29.
72. Dewannieux M, Esnault C, Heidmann T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nature genetics*. 2003;35(1):41-8.
73. Hancks DC, Goodier JL, Mandal PK, Cheung LE, Kazazian HH, Jr. Retrotransposition of marked SVA elements by human L1s in cultured cells. *Human molecular genetics*. 2011;20(17):3386-400.
74. Wallace N, Wagstaff BJ, Deininger PL, Roy-Engel AM. LINE-1 ORF1 protein enhances Alu SINE retrotransposition. *Gene*. 2008;419(1-2):1-6.
75. Evgen'ev MB, Arkhipova IR. Penelope-like elements--a new class of retroelements: distribution, function and possible evolutionary significance. *Cytogenetic and genome research*. 2005;110(1-4):510-21.
76. Schostak N, Pyatkov K, Zelentsova E, Arkhipova I, Shagin D, Shagina I, et al. Molecular dissection of Penelope transposable element regulatory machinery. *Nucleic acids research*. 2008;36(8):2522-9.
77. Wang H, Xing J, Grover D, Hedges DJ, Han K, Walker JA, et al. SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *Journal of molecular biology*. 2005;354(4):994-1007.
78. Shen L, Wu LC, Sanlioglu S, Chen R, Mendoza AR, Dangel AW, et al. Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region. Molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(11):8466-76.
79. Goodier JL, Kazazian HH, Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008;135(1):23-35.

80. Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, Kazazian HH, Jr. SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *American journal of human genetics*. 2003;73(6):1444-51.
81. Ohshima K, Hamada M, Terai Y, Okada N. The 3' ends of tRNA-derived short interspersed repetitive elements are derived from the 3' ends of long interspersed repetitive elements. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(7):3756-64.
82. Boissinot S, Davis J, Entezam A, Petrov D, Furano AV. Fitness cost of LINE-1 (L1) activity in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(25):9590-4.
83. Song M, Boissinot S. Selection against LINE-1 retrotransposons results principally from their ability to mediate ectopic recombination. *Gene*. 2007;390(1-2):206-13.
84. Segal Y, Peissel B, Renieri A, de Marchi M, Ballabio A, Pei Y, et al. LINE-1 elements at the sites of molecular rearrangements in Alport syndrome-diffuse leiomyomatosis. *American journal of human genetics*. 1999;64(1):62-9.
85. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Human molecular genetics*. 2000;9(17):2563-72.
86. Makalowski W. Genomic scrap yard: how genomes utilize all that junk. *Gene*. 2000;259(1-2):61-7.
87. Morrish TA, Gilbert N, Myers JS, Vincent BJ, Stamato TD, Taccioli GE, et al. DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nature genetics*. 2002;31(2):159-65.
88. Goodier JL, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Transduction of 3'-flanking sequences is common in L1 retrotransposition. *Human molecular genetics*. 2000;9(4):653-7.
89. Pickeral OK, Makalowski W, Boguski MS, Boeke JD. Frequent human genomic DNA transduction driven by LINE-1 retrotransposition. *Genome research*. 2000;10(4):411-5.
90. Moran JV, DeBerardinis RJ, Kazazian HH, Jr. Exon shuffling by L1 retrotransposition. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5407):1530-4.

91. Xing J, Wang H, Belancio VP, Cordaux R, Deininger PL, Batzer MA. Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(47):17608-13.
92. Weiner AM, Deininger PL, Efstratiadis A. Nonviral retroposons: genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. *Annual review of biochemistry*. 1986;55:631-61.
93. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature genetics*. 2000;24(4):363-7.
94. Long M, Wang W, Zhang J. Origin of new genes and source for N-terminal domain of the chimerical gene, jingwei, in *Drosophila*. *Gene*. 1999;238(1):135-41.
95. Zaiss DM, Kloetzel PM. A second gene encoding the mouse proteasome activator PA28beta subunit is part of a LINE1 element and is driven by a LINE1 promoter. *Journal of molecular biology*. 1999;287(5):829-35.
96. Boschan C, Borchert A, Ufer C, Thiele BJ, Kuhn H. Discovery of a functional retrotransposon of the murine phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: chromosomal localization and tissue-specific expression pattern. *Genomics*. 2002;79(3):387-94.
97. Temin HM. Retrovirus variation and reverse transcription: abnormal strand transfers result in retrovirus genetic variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(15):6900-3.
98. Buzdin A, Gogvadze E, Lebrun MH. Chimeric retrogenes suggest a role for the nucleolus in LINE amplification. *FEBS letters*. 2007;581(16):2877-82.
99. Gogvadze E, Barbisan C, Lebrun MH, Buzdin A. Tripartite chimeric pseudogene from the genome of rice blast fungus *Magnaporthe grisea* suggests double template jumps during long interspersed nuclear element (LINE) reverse transcription. *BMC genomics*. 2007;8:360.
100. Fudal I, Bohnert HU, Tharreau D, Lebrun MH. Transposition of MINE, a composite retrotransposon, in the avirulence gene ACE1 of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Fungal genetics and biology : FG & B*. 2005;42(9):761-72.

101. Buzdin A, Gogvadze E, Kovalskaya E, Volchkov P, Ustyugova S, Illarionova A, et al. The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through in vivo RNA recombination. *Nucleic acids research*. 2003;31(15):4385-90.
102. van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends in genetics : TIG*. 2003;19(10):530-6.
103. Polavarapu N, Marino-Ramirez L, Landsman D, McDonald JF, Jordan IK. Evolutionary rates and patterns for human transcription factor binding sites derived from repetitive DNA. *BMC genomics*. 2008;9:226.
104. Romanish MT, Lock WM, van de Lagemaat LN, Dunn CA, Mager DL. Repeated recruitment of LTR retrotransposons as promoters by the anti-apoptotic locus NAIP during mammalian evolution. *PLoS genetics*. 2007;3(1):e10.
105. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, et al. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nature genetics*. 2003;34(1):91-6.
106. Landry JR, Rouhi A, Medstrand P, Mager DL. The Opitz syndrome gene Mid1 is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Molecular biology and evolution*. 2002;19(11):1934-42.
107. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(3):1896-903.
108. Bieche I, Laurent A, Laurendeau I, Duret L, Giovannardi Y, Frendo JL, et al. Placenta-specific INSL4 expression is mediated by a human endogenous retrovirus element. *Biology of reproduction*. 2003;68(4):1422-9.
109. Meisler MH, Ting CN. The remarkable evolutionary history of the human amylase genes. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1993;4(3-4):503-9.
110. Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R. Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(2):891-7.



111. Hambor JE, Mennone J, Coon ME, Hanke JH, Kavathas P. Identification and characterization of an Alu-containing, T-cell-specific enhancer located in the last intron of the human CD8 alpha gene. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(11):7056-70.
112. Corvelo A, Eyraes E. Exon creation and establishment in human genes. *Genome biology*. 2008;9(9):R141.
113. Lin L, Shen S, Tye A, Cai JJ, Jiang P, Davidson BL, et al. Diverse splicing patterns of exonized Alu elements in human tissues. *PLoS genetics*. 2008;4(10):e1000225.
114. Lev-Maor G, Ram O, Kim E, Sela N, Goren A, Levanon EY, et al. Intronic Alus influence alternative splicing. *PLoS genetics*. 2008;4(9):e1000204.
115. van de Lagemaat LN, Medstrand P, Mager DL. Multiple effects govern endogenous retrovirus survival patterns in human gene introns. *Genome biology*. 2006;7(9):R86.
116. Hughes DC. Alternative splicing of the human VEGFGR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *Journal of molecular evolution*. 2001;53(2):77-9.
117. Buzdin AA. Retroelements and formation of chimeric retrogenes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2004;61(16):2046-59.
118. Pavlicek A, Jabbari K, Paces J, Paces V, Hejnar JV, Bernardi G. Similar integration but different stability of Alus and LINEs in the human genome. *Gene*. 2001;276(1-2):39-45.
119. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*. 2008;411(1-2):38-45.
120. Borodulina OR, Kramerov DA. Transcripts synthesized by RNA polymerase III can be polyadenylated in an AAUAAA-dependent manner. *RNA (New York, NY)*. 2008;14(9):1865-73.
121. Cutter AD, Good JM, Pappas CT, Saunders MA, Starrett DM, Wheeler TJ. Transposable element orientation bias in the *Drosophila melanogaster* genome. *Journal of molecular evolution*. 2005;61(6):733-41.
122. Baust C, Seifarth W, Germaier H, Hehlmann R, Leib-Mosch C. HERV-K-T47D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts. *Genomics*. 2000;66(1):98-103.

123. Mager DL, Hunter DG, Schertzer M, Freeman JD. Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics*. 1999;59(3):255-63.
124. Kjellman C, Sjogren HO, Salford LG, Widegren B. HERV-F (XA34) is a full-length human endogenous retrovirus expressed in placental and fetal tissues. *Gene*. 1999;239(1):99-107.
125. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature*. 2004;429(6989):268-74.
126. Wheelan SJ, Aizawa Y, Han JS, Boeke JD. Gene-breaking: a new paradigm for human retrotransposon-mediated gene evolution. *Genome research*. 2005;15(8):1073-8.
127. Chen C, Ara T, Gautheret D. Using Alu elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Molecular biology and evolution*. 2009;26(2):327-34.
128. Trujillo MA, Sakagashira M, Eberhardt NL. The human growth hormone gene contains a silencer embedded within an Alu repeat in the 3'-flanking region. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006;20(10):2559-75.
129. Sharan C, Hamilton NM, Parl AK, Singh PK, Chaudhuri G. Identification and characterization of a transcriptional silencer upstream of the human BRCA2 gene. *Biochemical and biophysical research communications*. 1999;265(2):285-90.
130. Medstrand P, van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome research*. 2002;12(10):1483-95.
131. Domansky AN, Kopantzev EP, Snezhkov EV, Lebedev YB, Leib-Mosch C, Sverdlov ED. Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS letters*. 2000;472(2-3):191-5.
132. Dunn CA, Romanish MT, Gutierrez LE, van de Lagemaat LN, Mager DL. Transcription of two human genes from a bidirectional endogenous retrovirus promoter. *Gene*. 2006;366(2):335-42.
133. Huh JW, Kim DS, Kang DW, Ha HS, Ahn K, Noh YN, et al. Transcriptional regulation of GSDML gene by antisense-oriented HERV-H LTR element. *Archives of virology*. 2008;153(6):1201-5.

134. Matlik K, Redik K, Speek M. L1 antisense promoter drives tissue-specific transcription of human genes. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(1):71753.
135. Galante PA, Vidal DO, de Souza JE, Camargo AA, de Souza SJ. Sense-antisense pairs in mammals: functional and evolutionary considerations. *Genome biology*. 2007;8(3):R40.
136. Conley AB, Miller WJ, Jordan IK. Human cis natural antisense transcripts initiated by transposable elements. *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(2):53-6.
137. Lunyak VV, Prefontaine GG, Nunez E, Cramer T, Ju BG, Ohgi KA, et al. Developmentally regulated activation of a SINE B2 repeat as a domain boundary in organogenesis. *Science (New York, NY)*. 2007;317(5835):248-51.
138. Dorsett D. Distance-independent inactivation of an enhancer by the suppressor of Hairy-wing DNA-binding protein of *Drosophila*. *Genetics*. 1993;134(4):1135-44.
139. Landry JR, Medstrand P, Mager DL. Repetitive elements in the 5' untranslated region of a human zinc-finger gene modulate transcription and translation efficiency. *Genomics*. 2001;76(1-3):110-6.
140. Khanam T, Raabe CA, Kiefmann M, Handel S, Skryabin BV, Brosius J. Can ID repetitive elements serve as cis-acting dendritic targeting elements? An in vivo study. *PloS one*. 2007;2(9):e961.
141. Baust C, Gagnier L, Baillie GJ, Harris MJ, Juriloff DM, Mager DL. Structure and expression of mobile ETnII retroelements and their coding-competent MusD relatives in the mouse. *Journal of virology*. 2003;77(21):11448-58.
142. Garcia-Perez JL, Marchetto MC, Muotri AR, Coufal NG, Gage FH, O'Shea KS, et al. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Human molecular genetics*. 2007;16(13):1569-77.
143. Coufal NG, Garcia-Perez JL, Peng GE, Yeo GW, Mu Y, Lovci MT, et al. L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*. 2009;460(7259):1127-31.
144. Georgiou I, Noutsopoulos D, Dimitriadou E, Markopoulos G, Apergi A, Lazaros L, et al. Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Human molecular genetics*. 2009;18(7):1221-8.

145. Branciforte D, Martin SL. Developmental and cell type specificity of LINE-1 expression in mouse testis: implications for transposition. *Molecular and cellular biology*. 1994;14(4):2584-92.
146. Kano H, Godoy I, Courtney C, Vetter MR, Gerton GL, Ostertag EM, et al. L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes & development*. 2009;23(11):1303-12.
147. Fadloun A, Le Gras S, Jost B, Ziegler-Birling C, Takahashi H, Gorab E, et al. Chromatin signatures and retrotransposon profiling in mouse embryos reveal regulation of LINE-1 by RNA. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(3):332-8.
148. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, Hillenmeyer S, Hamm EA, Manivannan J, et al. Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging cell*. 2013;12(2):247-56.
149. De Cecco M, Criscione SW, Peterson AL, Neretti N, Sedivy JM, Kreiling JA. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging*. 2013;5(12):867-83.
150. Perepelitsa-Belancio V, Deininger P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nature genetics*. 2003;35(4):363-6.
151. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic acids research*. 2006;34(5):1512-21.
152. Belancio VP, Roy-Engel AM, Pochampally RR, Deininger P. Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic acids research*. 2010;38(12):3909-22.
153. Packer AI, Manova K, Bachvarova RF. A discrete LINE-1 transcript in mouse blastocysts. *Developmental biology*. 1993;157(1):281-3.
154. Rosser JM, An W. L1 expression and regulation in humans and rodents. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2012;4:2203-25.
155. Rodic N, Sharma R, Sharma R, Zampella J, Dai L, Taylor MS, et al. Long interspersed element-1 protein expression is a hallmark of many human cancers. *The American journal of pathology*. 2014;184(5):1280-6.

156. Maksakova IA, Romanish MT, Gagnier L, Dunn CA, van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS genetics*. 2006;2(1):e2.
157. Maksakova IA, Mager DL, Reiss D. Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008;65(21):3329-47.
158. Piko L, Hammons MD, Taylor KD. Amounts, synthesis, and some properties of intracisternal A particle-related RNA in early mouse embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(2):488-92.
159. Dupressoir A, Heidmann T. Germ line-specific expression of intracisternal A-particle retrotransposons in transgenic mice. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(8):4495-503.
160. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, et al. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Developmental cell*. 2004;7(4):597-606.
161. Muotri AR, Marchetto MC, Coufal NG, Oefner R, Yeo G, Nakashima K, et al. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*. 2010;468(7322):443-6.
162. Ishihara H, Tanaka I. Detection and cloning of unique integration sites of retrotransposon, intracisternal A-particle element in the genome of acute myeloid leukemia cells in mice. *FEBS letters*. 1997;418(1-2):205-9.
163. Pogue-Geile KL, Gott JA, Greenberger JS. The role of intracisternal A-type particles in the evolution of factor-independent murine hematopoietic cell lines. *Leukemia*. 1998;12(1):4-12.
164. Lee JS, Haruna T, Ishimoto A, Honjo T, Yanagawa S. Intracisternal type A particle-mediated activation of the Notch4/int3 gene in a mouse mammary tumor: generation of truncated Notch4/int3 mRNAs by retroviral splicing events. *Journal of virology*. 1999;73(6):5166-71.
165. Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene*. 2008;27(3):404-8.

166. Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*. 2005;435(7044):903-10.
167. Shi X, Seluanov A, Gorbunova V. Cell divisions are required for L1 retrotransposition. *Molecular and cellular biology*. 2007;27(4):1264-70.
168. Haoudi A, Semmes OJ, Mason JM, Cannon RE. Retrotransposition-Competent Human LINE-1 Induces Apoptosis in Cancer Cells With Intact p53. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2004;2004(4):185-94.
169. Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET. Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic acids research*. 2006;34(4):1196-204.
170. Giorgi G, Marcantonio P, Del Re B. LINE-1 retrotransposition in human neuroblastoma cells is affected by oxidative stress. *Cell and tissue research*. 2011;346(3):383-91.
171. Weil C, Martienssen R. Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants. *Current opinion in genetics & development*. 2008;18(2):188-92.
172. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, et al. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis (New York, NY : 2000)*. 2003;35(2):88-93.
173. Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, et al. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature*. 2012;484(7394):339-44.
174. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature genetics*. 1998;20(2):116-7.
175. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247-57.
176. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Molecular and cellular biology*. 2002;22(2):480-91.

177. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96-9.
178. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R, et al. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;124(1):81-7.
179. Arnaud P, Goubely C, Pelissier T, Deragon JM. SINE retroposons can be used in vivo as nucleation centers for de novo methylation. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(10):3434-41.
180. Graff JR, Herman JG, Myohanen S, Baylin SB, Vertino PM. Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(35):22322-9.
181. Lyon MF. Do LINEs have a role in X-chromosome inactivation? *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2006;2006(1):59746.
182. Smalheiser NR, Torvik VI. Mammalian microRNAs derived from genomic repeats. *Trends in genetics : TIG*. 2005;21(6):322-6.
183. Smalheiser NR, Torvik VI. Alu elements within human mRNAs are probable microRNA targets. *Trends in genetics : TIG*. 2006;22(10):532-6.
184. Soifer HS, Zaragoza A, Peyvan M, Behlke MA, Rossi JJ. A potential role for RNA interference in controlling the activity of the human LINE-1 retrotransposon. *Nucleic acids research*. 2005;33(3):846-56.
185. Yang N, Kazazian HH, Jr. L1 retrotransposition is suppressed by endogenously encoded small interfering RNAs in human cultured cells. *Nature structural & molecular biology*. 2006;13(9):763-71.
186. Chuma S, Nakano T. piRNA and spermatogenesis in mice. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2013;368(1609):20110338.

187. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Landgraf P, Iovino N, et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 2006;442(7099):203-7.
188. Carmell MA, Girard A, van de Kant HJ, Bourc'his D, Bestor TH, de Rooij DG, et al. MIWI2 is essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Developmental cell*. 2007;12(4):503-14.
189. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes & development*. 2008;22(7):908-17.
190. Reuter M, Berninger P, Chuma S, Shah H, Hosokawa M, Funaya C, et al. Miwi catalysis is required for piRNA amplification-independent LINE1 transposon silencing. *Nature*. 2011;480(7376):264-7.
191. Koito A, Ikeda T. Intrinsic immunity against retrotransposons by APOBEC cytidine deaminases. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:28.
192. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, Dewannieux M, Ribet D, Hance AJ, et al. APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature*. 2005;433(7024):430-3.
193. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic acids research*. 2006;34(1):89-95.
194. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic acids research*. 2007;35(9):2955-64.
195. Ikeda T, Abd El Galil KH, Tokunaga K, Maeda K, Sata T, Sakaguchi N, et al. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic acids research*. 2011;39(13):5538-54.
196. MacDuff DA, Demorest ZL, Harris RS. AID can restrict L1 retrotransposition suggesting a dual role in innate and adaptive immunity. *Nucleic acids research*. 2009;37(6):1854-67.



197. Verma IM. The reverse transcriptase. *Biochimica et biophysica acta*. 1977;473(1):1-38.
198. Telesnitsky A, Goff SP. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, editors. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.
199. Nisole S, Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*. 2004;1:9.
200. Kazazian HH, Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5664):1626-32.
201. Autexier C, Lue NF. The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual review of biochemistry*. 2006;75:493-517.
202. Miller D. Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2 Suppl):259-64.
203. Ergun S, Buschmann C, Heukeshoven J, Dammann K, Schnieders F, Lauke H, et al. Cell type-specific expression of LINE-1 open reading frames 1 and 2 in fetal and adult human tissues. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(26):27753-63.
204. Pittoggi C, Beraldi R, Sciamanna I, Barberi L, Giordano R, Magnano AR, et al. Generation of biologically active retro-genes upon interaction of mouse spermatozoa with exogenous DNA. *Molecular reproduction and development*. 2006;73(10):1239-46.
205. Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Developmental biology*. 2002;249(1):74-84.
206. Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics*. 1996;18(2):173-9.
207. Bekaert S, Derradji H, Baatout S. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. *Developmental biology*. 2004;274(1):15-30.
208. Yamamoto Y, Sofikitis N, Ono K, Kaki T, Isoyama T, Suzuki N, et al. Postmeiotic modifications of spermatogenic cells are accompanied by inhibition of telomerase activity. *Urological research*. 1999;27(5):336-45.

209. Liu JP, Li H. Telomerase in the ovary. *Reproduction* (Cambridge, England). 2010;140(2):215-22.
210. Brackett BG, Baranska W, Sawicki W, Koprowski H. Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(2):353-7.
211. Lavitrano M, Camaioni A, Fazio VM, Dolci S, Farace MG, Spadafora C. Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*. 1989;57(5):717-23.
212. Camaioni A, Russo MA, Odorisio T, Gandolfi F, Fazio VM, Siracusa G. Uptake of exogenous DNA by mammalian spermatozoa: specific localization of DNA on sperm heads. *Journal of reproduction and fertility*. 1992;96(1):203-12.
213. Lavitrano M, French D, Zani M, Frati L, Spadafora C. The interaction between exogenous DNA and sperm cells. *Molecular reproduction and development*. 1992;31(3):161-9.
214. Zani M, Lavitrano M, French D, Lulli V, Maione B, Sperandio S, et al. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Experimental cell research*. 1995;217(1):57-64.
215. Lavitrano M, Maione B, Forte E, Francolini M, Sperandio S, Testi R, et al. The interaction of sperm cells with exogenous DNA: a role of CD4 and major histocompatibility complex class II molecules. *Experimental cell research*. 1997;233(1):56-62.
216. Maione B, Pittoggi C, Achene L, Lorenzini R, Spadafora C. Activation of endogenous nucleases in mature sperm cells upon interaction with exogenous DNA. *DNA and cell biology*. 1997;16(9):1087-97.
217. Francolini M, Lavitrano M, Lamia CL, French D, Frati L, Cotelli F, et al. Evidence for nuclear internalization of exogenous DNA into mammalian sperm cells. *Molecular reproduction and development*. 1993;34(2):133-9.
218. Zoraqi G, Spadafora C. Integration of foreign DNA sequences into mouse sperm genome. *DNA and cell biology*. 1997;16(3):291-300.

219. Pittoggi C, Zaccagnini G, Giordano R, Magnano AR, Baccetti B, Lorenzini R, et al. Nucleosomal domains of mouse spermatozoa chromatin as potential sites for retroposition and foreign DNA integration. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2 Suppl):248-51.
220. Giordano R, Magnano AR, Zaccagnini G, Pittoggi C, Moscufo N, Lorenzini R, et al. Reverse transcriptase activity in mature spermatozoa of mouse. *The Journal of cell biology*. 2000;148(6):1107-13.
221. Sciamanna I, Barberi L, Martire A, Pittoggi C, Beraldi R, Giordano R, et al. Sperm endogenous reverse transcriptase as mediator of new genetic information. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;312(4):1039-46.
222. Perry AC, Wakayama T, Kishikawa H, Kasai T, Okabe M, Toyoda Y, et al. Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5417):1180-3.
223. Moreira PN, Giraldo P, Cozar P, Pozueta J, Jimenez A, Montoliu L, et al. Efficient generation of transgenic mice with intact yeast artificial chromosomes by intracytoplasmic sperm injection. *Biology of reproduction*. 2004;71(6):1943-7.
224. Kroll KL, Amaya E. Transgenic *Xenopus* embryos from sperm nuclear transplantations reveal FGF signaling requirements during gastrulation. *Development (Cambridge, England)*. 1996;122(10):3173-83.
225. L'Hostis-Guidet A, Recher G, Guillet B, Al-Mohammad A, Coumailleau P, Tiaho F, et al. Generation of stable *Xenopus laevis* transgenic lines expressing a transgene controlled by weak promoters. *Transgenic research*. 2009;18(5):815-27.
226. Shemesh M, Gurevich M, Harel-Markowitz E, Benvenisti L, Shore LS, Stram Y. Gene integration into bovine sperm genome and its expression in transgenic offspring. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2 Suppl):306-8.
227. Chang K, Qian J, Jiang M, Liu YH, Wu MC, Chen CD, et al. Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC biotechnology*. 2002;2:5.

228. Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, Moran JV, Kazazian HH, Jr. Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic acids research*. 2000;28(6):1418-23.
229. Noutsopoulos D, Vartholomatos G, Kolaitis N, Tzavaras T. SV40 large T antigen up-regulates the retrotransposition frequency of viral-like 30 elements. *Journal of molecular biology*. 2006;361(3):450-61.
230. Beraldi R, Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Spadafora C. Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Molecular reproduction and development*. 2006;73(3):279-87.
231. Spadafora C. Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2008;23(4):735-40.
232. Premkumar E, Bhargava PM. Transcription and translation in bovine spermatozoa. *Nature: New biology*. 1972;240(100):139-43.
233. Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes & development*. 2006;20(4):411-6.
234. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia*. 2005;37(2-3):69-71.
235. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Tagett R, Anton E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(12):3401-12.
236. van den Hurk JA, Meij IC, Seleme MC, Kano H, Nikopoulos K, Hoefsloot LH, et al. L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Human molecular genetics*. 2007;16(13):1587-92.
237. Tzavaras T, Kalogera C, Eftaxia S, Saragosti S, Pagoulatos GN. Clone-specific high-frequency retrotransposition of a recombinant virus containing a VL30 promoter in SV40-transformed NIH3T3 cells. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1442(2-3):186-98.
238. Adaramoye OA, Adesanoye OA, Adewumi OM, Akanni O. Studies on the toxicological effect of nevirapine, an antiretroviral drug, on the liver, kidney and testis of male Wistar rats. *Human & experimental toxicology*. 2012;31(7):676-85.

239. Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and cellular endocrinology*. 2004;216(1-2):31-9.
240. Nicopoullos JD, Almeida PA, Ramsay JW, Gilling-Smith C. The effect of human immunodeficiency virus on sperm parameters and the outcome of intrauterine insemination following sperm washing. *Human reproduction (Oxford, England)*. 2004;19(10):2289-97.
241. Bujan L, Sergerie M, Moinard N, Martinet S, Porte L, Massip P, et al. Decreased semen volume and spermatozoa motility in HIV-1-infected patients under antiretroviral treatment. *Journal of andrology*. 2007;28(3):444-52.
242. van Leeuwen E, Wit FW, Repping S, Eeftinck Schattenkerk JK, Reiss P, van der Veen F, et al. Effects of antiretroviral therapy on semen quality. *AIDS (London, England)*. 2008;22(5):637-42.
243. Lambert-Niclot S, Poirot C, Tubiana R, Houssaini A, Soulie C, Dominguez S, et al. Effect of antiretroviral drugs on the quality of semen. *Journal of medical virology*. 2011;83(8):1391-4.
244. Toltzis P, Mourton T, Magnuson T. Effect of zidovudine on preimplantation murine embryos. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(8):1610-3.
245. Pittoggi C, Sciamanna I, Mattei E, Beraldi R, Lobascio AM, Mai A, et al. Role of endogenous reverse transcriptase in murine early embryo development. *Molecular reproduction and development*. 2003;66(3):225-36.
246. Leeansyah E, Cameron PU, Solomon A, Tennakoon S, Velayudham P, Gouillou M, et al. Inhibition of telomerase activity by human immunodeficiency virus (HIV) nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors: a potential factor contributing to HIV-associated accelerated aging. *The Journal of infectious diseases*. 2013;207(7):1157-65.
247. Gomez DE, Tejera AM, Olivero OA. Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;246(1):107-10.
248. Strahl C, Blackburn EH. Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(1):53-65.

249. Murakami J, Nagai N, Shigemasa K, Ohama K. Inhibition of telomerase activity and cell proliferation by a reverse transcriptase inhibitor in gynaecological cancer cell lines. *European journal of cancer* (Oxford, England : 1990). 1999;35(6):1027-34.
250. Yegorov YE, Chernov DN, Akimov SS, Bolsheva NL, Krayevsky AA, Zelenin AV. Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts. *FEBS letters*. 1996;389(2):115-8.
251. Thilagavathi J, Mishra SS, Kumar M, Vemprala K, Dekka D, Dhadwal V, et al. Analysis of telomere length in couples experiencing idiopathic recurrent pregnancy loss. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2013;30(6):793-8.