



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΤΙΚΗ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΑΡΡΕΝΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΧΑΡΙΛΑΟΣ Α. ΚΩΣΤΟΥΛΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΣΤΗΝ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΤΙΚΗ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΣΤΑ ΑΡΡΕΝΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

ΧΑΡΙΛΑΟΣ Α. ΚΩΣΤΟΥΛΑΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2018

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Κωστούλα Χαρίλαου: 9-10-2008

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 653^α/3-2-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

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

Μέλη

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μακρυδήμας Γεώργιος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 8-4-2009

«Απομόνωση γενετικού υλικού και μεθυλιωτική τροποποίηση στα άρρενα γαμετικά κύτταρα»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 873^α/13-11-2018

Γεωργίου Ιωάννης	Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής -Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μακρυδήμας Γεώργιος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Ναυρόζογλου Ιορδάνης	Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ογκολογία και Παθολογία του Μαστού, του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Παρασκευαΐδης Ευάγγελος	Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σοφικίτης Νικόλαος	Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Μπαλτογιάννης Δημήτριος	Αναπληρωτής Καθηγητής Ουρολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 12-12-2018

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Άννα Μπατισιάτου

Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Η Γραμματέας του Τμήματος

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ


....στους γονείς μου

...στην Άλεξ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μια από τις σημαντικότερες περιόδους της προσωπικής μου ζωής αλλά και της ερευνητικής μου αναζήτησης έφτασε στο τέλος της. Αυτή δεν είναι άλλη από την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Αναλογιζόμενος τα χρόνια που πέρασαν μέχρι το τέλος αυτής της διαδρομής, μόνο συναισθήματα χαράς και ευτυχίας με κατακλύζουν. Για αυτό το υπέροχο ταξίδι δεν μπορώ παρά να ευχαριστήσω και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους ανθρώπους που χωρίς την παρουσία τους, τη στήριξή τους και την καθοδήγησή τους δε θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση του.

Θα ήθελα να εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου, πρώτα από όλους, στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Γεωργίου Ιωάννη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε όλα αυτά τα χρόνια να αποτελώ μέλος της ερευνητικής του ομάδας αλλά και για την πολύτιμη επιστημονική και τεχνική καθοδήγησή του σε όλα τα στάδια μέχρι την ολοκλήρωση της διατριβής. Η ελευθερία κινήσεων, που μου έδωσε αμέτρητες φορές, αλλά και οι καθοριστικές συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της συνεργασίας μας με οδήγησαν στην συλλογή εμπειριών και στην απόκτηση δυνατοτήτων που ποτέ δεν είχα φανταστεί ότι θα αποκτήσω. Σας ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου!

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Παρασκευαΐδη Ευάγγελο, και τον Καθηγητή, κ. Μακρυδήμα Γεώργιο, για τις εποικοδομητικές συζητήσεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους από την αρχή μέχρι το τέλος της διατριβής.

Ευχαριστώ πολύ τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο, τον Καθηγητή κ. Σοφικίτη Νικόλαο και Δ/ντή της Ουρολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων, τον Καθηγητή κ. Μπαλτογιάννη Δημήτριο και τον Καθηγητή κ. Ναυρόζογλου Ιορδάνη.

Για τις εποικοδομητικές συζητήσεις στο άκρως ενδιαφέρον πεδίο των ρετρομεταθετών, επιθυμώ να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Τζαβάρια Θεόδωρο και την

ερευνητική του ομάδα. Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω θερμά και τον κ. Σαΐνη Ιωάννη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π., για τη σημαντική βοήθειά του.

Ευχαριστώ τον Δρ Λάζαρο Λέανδρο για τη συλλογή των δειγμάτων του και για τις πολύωρες ενδιαφέρουσες και διαφωτιστικές συζητήσεις στο πεδίο της Γενετικής. Πάνω από όλα, όμως, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω θερμά για τη φιλία του. Η κ. Μπούμπα Ιωάννα, μέλος Ε.Τ.Ε.Π., με βοήθησε σημαντικά σε τεχνικά και θεωρητικά ζητήματα σε όλη την διάρκεια της διατριβής γι' αυτό την ευχαριστώ θερμά. Φυσικά, ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω προς τους φίλους και συναδέλφους μου, Δρ Σακάλογλου Πρόδρομο, κ. Πάρη Λαδιά, Δρ Μιτσιώνη Άρτεμις, Δρ Χρύσα Κίτσου και κ. Γκιάκα Αικατερίνη, για την εκπληκτική συνεργασία μας, την υπομονή τους απέναντί μου αλλά και για τις όμορφες και ξεχωριστές στιγμές που ζήσαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Προσωπικά, θα ήθελα να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστήσω στους γονείς μου, Θανάση και Όλγα, για την αδιάκοπη στήριξη τους και την ενθάρρυνσή τους σε όλα μου τα όνειρα και σε όλες μου τις προσπάθειες. Ένα μεγάλο συγνώμη στη μητέρα μου που δεν πρόλαβε να δει την ολοκλήρωση της διατριβής μου. Σας ευχαριστώ για όλα! Τέλος, θα ήθελα να πω ένα ευχαριστώ στον άνθρωπο που με στηρίζει όλα αυτά τα χρόνια, που είναι δίπλα μου και στα εύκολα και στα δύσκολα, τον άνθρωπο που χωρίς την βοήθειά του δε θα είχε ολοκληρωθεί η διατριβή, στον άνθρωπο που αποτελεί το άλλο μου μισό, στη γυναίκα μου, την Άλεξ.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	7
ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	7
1.1 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΛΑΣΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ.....	7
1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ	11
1.2.1 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΩΝ.....	13
1.2.2 ΜΕΙΩΣΗ	15
1.2.3 ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗ	16
1.2.4 ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ	18
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	21
ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	21
2.1 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ DNA	21
2.2 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	22
2.2.1 DNA ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ.....	23
2.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ	25
2.2.2.1 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΧΩΡΙΣ ΜΑΚΡΕΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ (non-Long Terminal Repeats, non-LTR).....	26
2.2.2.1.1 ΜΑΚΡΑ ΔΙΑΣΠΑΡΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ (LINEs)	26
2.2.2.1.2 ΒΡΑΧΕΑ ΔΙΑΣΠΑΡΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ(SINEs).....	29
2.2.2.1.3 ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ(SVA)	30
2.2.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΜΕ ΜΑΚΡΕΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΛΗΨΕΙΣ (LTR retrotransposons)	31
2.2.2.2.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΡΕΤΡΟΪΟΙ (HERV)	32
Εικόνα 2.6: Τυπική δομή προΐων.....	34
2.3 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	41
ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ.....	41

3.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	41
3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ.....	42
3.3 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ	43
3.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	46
3.5 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ	49
3.5.1 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΑ ΑΡΡΕΝΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	50
3.5.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΖΥΓΩΤΟΥ	51
3.6 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	52
3.7 ΡΙWI RNAs ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	53
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	57
ΣΚΟΠΟΣ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	63
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	63
4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	63
4.2 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ	63
4.3 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ DNA ΜΕ ΟΞΙΝΟ ΘΕΙΩΔΕΣ ΝΑΤΡΙΟ (NaHSO ₃)	65
4.4 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	67
4.5 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΣΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ (Combined Bisulfite Restriction Analysis, COBRA)	68
4.5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 (COBRALINE-1)	69
4.6 ΠΕΨΕΙΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	71
4.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (NON- DENATURATING POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS, PAGE).....	72
4.8 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ HERV-K10	73
4.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ.....	75
4.10 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ RNA ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ	76
4.10.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ.....	76
4.10.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ RNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ	77

4.10.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΟΦΗΣ ΜΤΑΓΡΑΦΗΣ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR).....	80
4.11 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ LINE-1 ΚΑΙ HERVK-10.....	81
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	85
ΑΠΟΤΕΛΣΜΑΤΑ	85
5.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ	85
5.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ	85
5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ LINE-1.....	86
5.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ.....	89
5.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1	97
5.6 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ HERV-K10	102
5.7 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ	104
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	107
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	107
6.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	107
6.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	108
6.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1	111
6.4 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ.....	114
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	121
ABSTRACT	125
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	133

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

1.1 ΚΑΘΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΙΑΠΛΑΣΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

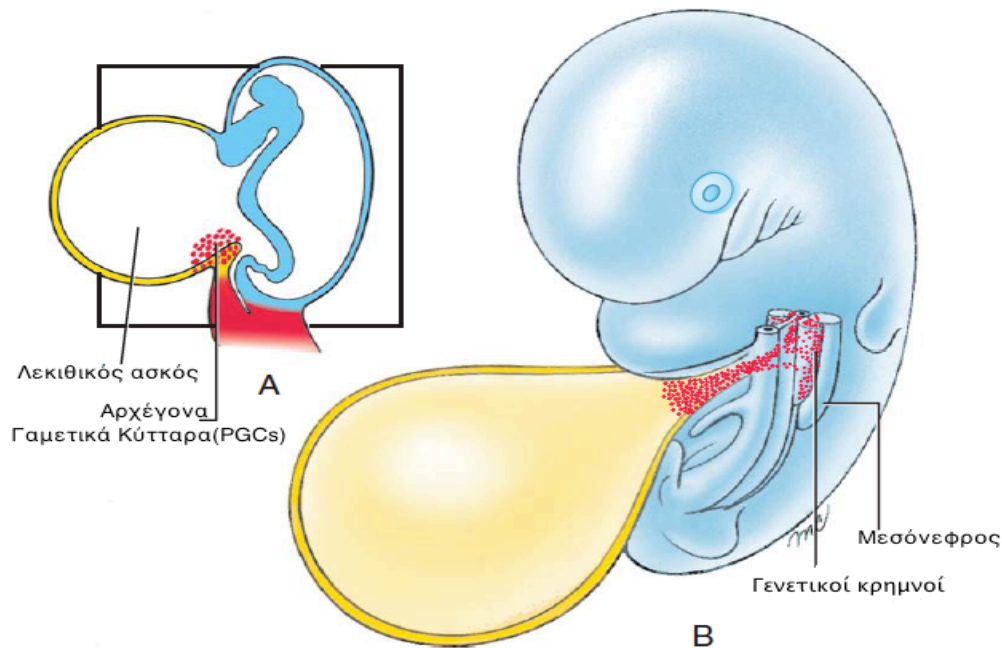
Το αναπαραγωγικό σύστημα των θηλαστικών και του ανθρώπου εμφανίζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς την ανάπτυξή και την εξέλιξη του. Εμφανίζεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης και είναι το πρώτο σύστημα το οποίο αναπτύσσεται ενώ αποτελεί το τελευταίο που τίθεται σε λειτουργία κατά την ήβη. Τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα το αναπαραγωγικό σύστημα είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με το ουροποιητικό σύστημα, από εμβρυολογική άποψη, καθώς και τα δυο συστήματα προέρχονται από το ενδιάμεσο μεσόδερμα. Ενώ από λειτουργικής άποψης το γεννητικό σύστημα είναι ανεξάρτητο από το ουροποιητικό.

Στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης το αναπαραγωγικό σύστημα του αρσενικού και του θηλυκού εμβρύου αναπτύσσονται με τον ίδιο ακριβώς τρόπο μέχρι την 6^η εβδομάδα. Αν και το φύλο του εμβρύου καθορίζεται γενετικά αμέσως μετά τη γονιμοποίηση από την παρουσία (άρρεν) ή την απουσία (θήλυ) του χρωμοσώματος Y, οι γονάδες αρχίζουν να διαφοροποιούνται μορφολογικά σε όρχεις ή ωθήκες μετά την 7^η εβδομάδα (1). Μέχρι την 6^η εβδομάδα οι καταβολές των γονάδων και των δυο φύλων αναπτύσσονται με τον ίδιο τρόπο, στάδιο γνωστό ως στάδιο αδιαφοροποίητων αναπαραγωγικών γονάδων ή αμφίπλευρο στάδιο (2). Στο τέλος της αμφίπλευρης φάσης το γεννητικό σύστημα και των δυο φύλων αποτελείται από τις γονάδες και τα δυο συστήματα γεννητικών πόρων (μεσонеφρικοί πόροι ή πόροι Wolff και παραμεσонеφρικοί πόροι ή πόροι Müller) (3).

Οι γονάδες των θηλαστικών προέρχονται από τον άξονα Αορτή-Μεσόνεφρος-Γονάδες (Aorta-Mesonephros-Gonads, AMG). Ο άξονας AMG έχει μεσοδερματική προέλευση, συγκεκριμένα κατά την 4^η εβδομάδα το σπλαχνικό μεσόδερμα χωρίζεται σε τρεις διακριτές δομές: τη ραχιαία αορτή, τη γεννητική ταινία και το μεσόνεφρο. Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη η ραχιαία αορτή παράγει τα αιμοποιητικά στελεχιαία κύτταρα που είναι απαραίτητα για την

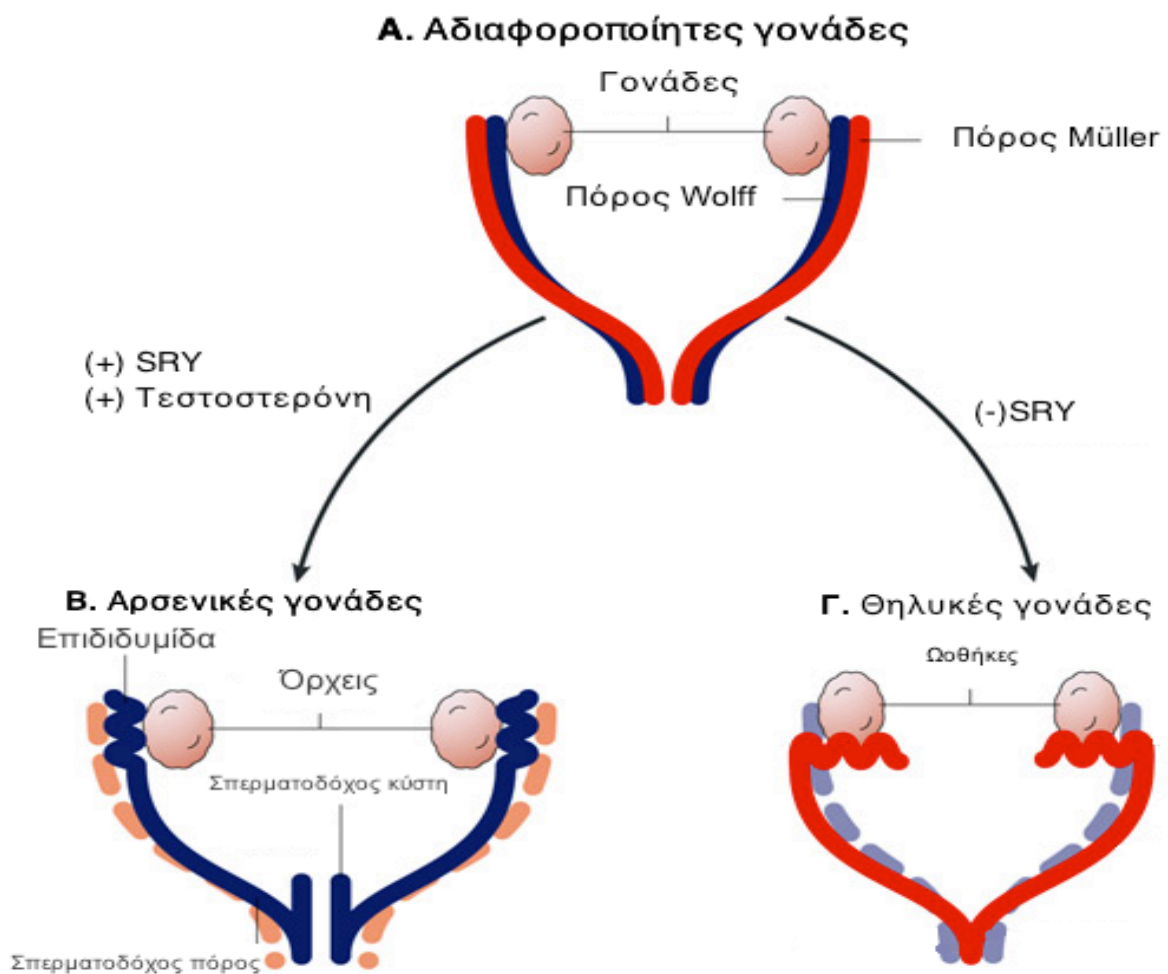
αιμοποίηση του εμβρύου, ο μεσόνεφρος σχηματίζει τη βασική μονάδα των νεφρών ενώ η γεννητική ταινία θα δώσει τις γονάδες (4).

Η πρώτη καταβολή των γονάδων (γεννητικοί κρημνοί) εμφανίζεται από τον πολλαπλασιασμό του επιθηλίου και την πύκνωση του μεσεγγύματος κατά μήκος του μεσόνεφρου και του μεσεντερίου. Την 4^η εβδομάδα ανάπτυξης παράγονται τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (Primordial Germ Cells, PGCs) εξωγοναδικώς από το ενδόδερμα και εμφανίζονται σε διάσπαρτος πληθυσμός στο ενδόδερμα του λεκιθικού ασκού κοντά στην αλλαντοΐδα. Τα PGCs μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις, την 5^η εβδομάδα ανάπτυξης, από το λεκιθικό ασκό μέσω του μεσεντερίου και εγκαθίστανται στους γεννητικούς κρημούς την 6^η εβδομάδα (Εικόνα 1.1) (5). Σε περίπτωση που τα PGCs δεν φτάσουν στις αρχέγονες γονάδες τότε οι γονάδες δεν θα αναπτυχθούν. Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και πριν την άφιξη των PGCs στους γεννητικούς κρημούς τα επιθηλιακά κύτταρα των γονάδων πολλαπλασιάζονται δημιουργώντας τις αρχέγονες δοκίδες και εισέρχονται στο μεσέγγυμα. Έτσι η αδιαφοροποίητη γονάδα αποτελείται εξωτερικά από το επιθύλιο και εσωτερικά από το μεσέγγυμα. Το μεσέγγυμα δομικά αποτελείται από τις φλοιώδεις και τις μυελώδεις περιοχές (6, 7).



Εικόνα 1.1: Μετανάστευση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων. Α) Τα PGCs βρίσκονται στο λεκιθικό ασκό και μεταναστεύουν προς τους γενετικούς κρημνούς. Β) Στα ανθρώπινα έμβρυα η ολοκλήρωση της μετανάστευσης ολοκληρώνεται στο τέλος της 5ης εβδομάδας της ανάπτυξης (6)

Στα αρρενα άτομα η διαδικασία της φυλετικής διαφοροποίησης της αρχέγονης γονάδας σε όρχι διακρίνεται στην πρωτογενή και δευτερογενή φυλετική διαφοροποίηση. Η πρωτογενής φυλετική διαφοροποίηση εξαρτάται από την ύπαρξη και την έκφραση του γονιδίου SRY (sex-determining region). Το SRY γονίδιο βρίσκεται στη φυλοκαθοριστική περιοχή του βραχέος σκέλους του χρωμοσώματος Y και η έκφρασή του αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα διαφοροποίησης των όρχεων (Testis Determining Factor, TDF) (8). Η έκφραση του SRY σηματοδοτεί την ενεργοποίηση ενός συνόλου γονιδίων του χρωμοσώματος Y και των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων τα οποία συμμετέχουν και αυτά στην εξέλιξη των αδιαφοροποίητων γονάδων σε όρχεις. Στα θηλαστικά η έλλειψη του χρωμοσώματος Y και η ύπαρξη του X αλλά και μεταλλάξεις του SRY ή των εμπλεκόμενων γονιδίων οδηγούν στη διαφοροποίηση των αρχέγονων γονάδων σε ωθήκες (Εικόνα 1.2) (1, 9). Η έκφραση του SRY γονιδίου και των εμπλεκόμενων γονιδίων από τα κύτταρα των δοκίδων επάγει τη διαφοροποίηση των κυττάρων της μυελώδους περιοχής του μεσεγχύματος σε προ-Sertoli κύτταρα (10).



Εικόνα 1.2: Α) Οι αδιαφοροποίητες γονάδες και οι αναπαραγωγικοί πόροι (Πόρος Wolff με μπλε και πόρος Müller με κόκκινο) Β) Η παρουσία του χρωμοσώματος Y οδηγεί στη διαφοροποίηση των γονάδων σε όρχεις με την παραγωγή AMH για τον εκφυλισμό του πόρου Müller ενώ η παραγωγή τεστοστερόνης οδηγεί τη διαφοροποίηση του πόρου Wolff στα έσω αρσενικά αναπαραγωγικά όργανα Γ) Η απουσία έκφρασης του SRY γονιδίου προκαλεί τη διαφοροποίηση των αρχέγονων γονάδων σε ωοθήκες, με εκφυλισμό του πόρου Wolff και διαφοροποίηση του πόρου Müller (11).

Στη δευτερογενή φυλετική διαφοροποίηση έχουμε την ανάπτυξη και διαφοροποίηση των πόρων Wolff και τον εκφυλισμό των πόρων Müller. Στα αρσενικά έμβρυα στη δευτερογενή φυλετική διαφοροποίηση σημαντικό ρόλο έχουν οι ορμόνες τεστοστερόνη, η οποία παράγεται από τα Leydig κύτταρα, και η αντιμυλλέρια ορμόνη (Anti- Müllerian Hormone, AMH) η οποία εκκρίνεται από τα προ-Sertoli κύτταρα. Η AMH είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μεγέθους 560 αμινοξέων και ανήκει στην οικογένεια των αυξητικών

παραγόντων μετασχηματισμού (Transforming Growth Factor, TGF). Η έκφραση της AMH στα αρσενικά έμβρυα ξεκινάει κατά την 8^η εβδομάδα ανάπτυξης και προκαλεί υποστροφή και εκφυλισμό του παραμεσονεφρικού πόρου μέχρι την 10^η εβδομάδα. Η AMH δρα έμμεσα στους υποδοχείς AMH-τύπου II (Anti- Müllerian hormone receptor II, Amhr-II) των μεσεγχυματικών κυττάρων τα οποία περιβάλλουν το παραμεσονεφρικό πόρο και όχι άμεσα στα επιθηλιακά κύτταρα του πόρου (7).

Παράλληλα με την έκφραση της AMH παρατηρείται και ο σχηματισμός των κυττάρων Leydig. Το μεσέγχυμα του γενετικού κρημού κατά την 8^η εβδομάδα αρχίζει να διαφοροποιείται σε κύτταρα Leydig. Τα κύτταρα Leydig παράγουν το κύριο ανδρογόνο των όρχεων, τη τεστοστερόνη. Η τεστοστερόνη εισέρχεται στα κύτταρα στόχους και παραμένει ως έχει ή μετατρέπεται σε διυδροστερόνη με την επίδραση της 5-α-αναγωγάσης. Η τεστοστερόνη επάγει τη διαφοροποίηση του γεννητικού πόρου (επιδιδυμίδας, σπερματικό πόρο, σπερματοδόχες κύστες) ενώ η διυδροστερόνη επάγει το σχηματισμό των έξω γεννητικών οργάνων (5-7). Επίσης κατά τον 5^ο μήνα της ανάπτυξης τα Leydig κύτταρα αρχίζουν να μειώνονται σε αριθμό με αποτέλεσμα τα επίπεδα της τεστοστερόνης να παραμένουν χαμηλά μέχρι την ήβη, όπου και εμφανίζονται πάλι τα Leydig για τη σπερματογένεση τα κύτταρα Sertoli και Leydig μετά την εφηβεία συμμετέχουν τόσο στον ορμονικό έλεγχο της σπερματογένεσης όσο και στη φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι από το μεσονεφρικό πόρο και μετά την εκβλάστηση των σπερματοδόχων κύστεων, σχηματίζεται ένα τμήμα του σπερματικού πόρου, το οποίο βρίσκεται περιφερικά των δύο σπερματοδόχων κύστεων και ονομάζεται εκσπερματιστικός πόρος (12).

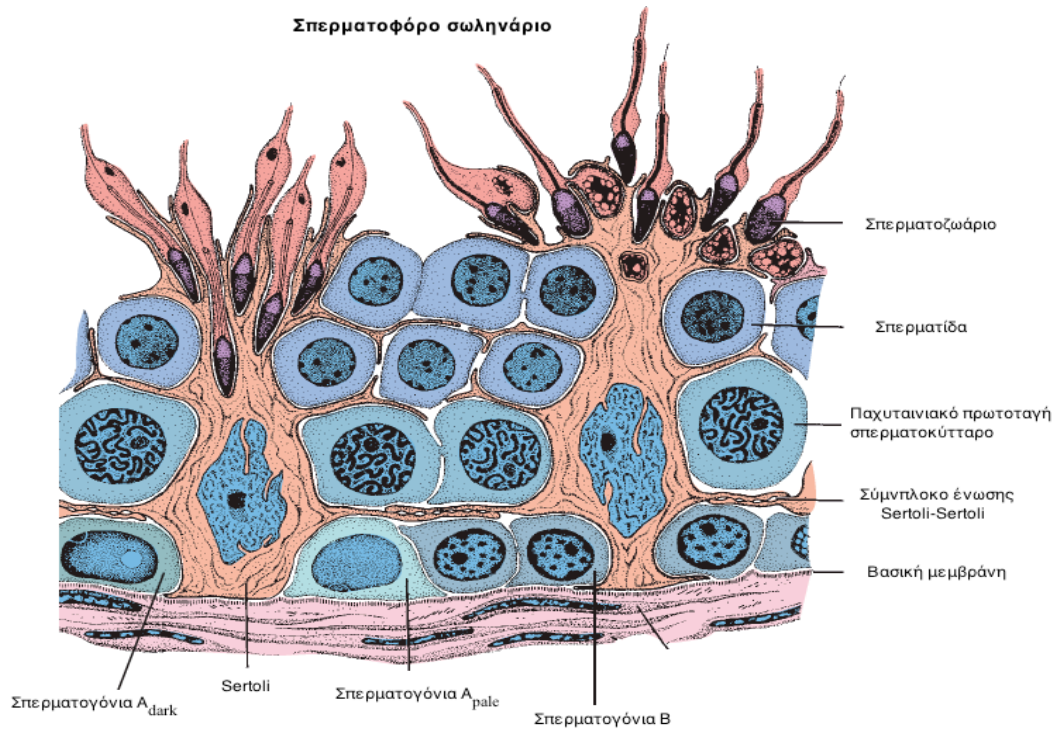
1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Μετά τη μετανάστευση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων, από το λεκιθικό ασκό και την αποίκισή τους στους όρχεις, τα PGCs αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε πρόδρομες ανώριμες μορφές σπερματικών κυττάρων, τα σπερματογόνια, τα οποία παραμένουν αδρανή μέχρι την εφηβεία. Η διαδικασία παραγωγής ώριμων σπερματοζωαρίων (απλοειδή) από τα

σπερματογόνια (διπλοειδή) ονομάζεται σπερματογένεση (6). Η σπερματογένεση πραγματοποιείται στα σπερματοφόρα σωληνάκια τα οποία και συνθέτουν τον όρχι. Τα σπερματοφόρα σωληνάκια αποτελούνται από γαμετικά κύτταρα και κύτταρα Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli αποτελούν το μοναδικό τύπο σωματικών κυττάρων στα σπερματοφόρα σωληνάκια και είναι ακτινωτά κατανομημένα σε αυτά, έχουν κωνοειδές σχήμα με φαρδιά βάση και εκτείνονται στον αυλό του σπερματοφόρου σωληναρίου (Εικόνα 1.3). Σε όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης τα σπερματογόνια βρίσκονται ανάμεσα στη βασική μεμβράνη των σπερματοφόρων σωληναρίων και στη βάση των κυττάρων Sertoli. Ανάμεσα στα σπερματοφόρα σωληνάκια βρίσκονται και τα κύτταρα Leydig τα οποία συμμετέχουν στον ορμονικό έλεγχο της σπερματογένεσης μαζί με τα κύτταρα Sertoli (13).

Η σπερματογένεση στον άνθρωπο διαρκεί 74 ημέρες (10) και διακρίνεται σε τρεις φάσεις, εμφανίζοντας διαφορετικό τύπο γαμετικών κυττάρων σε κάθε φάση (Εικόνα 1.4). Οι τρεις φάσεις είναι οι εξής:

1. Ο πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων,
2. η μείωση και
3. η σπερμιογένεση.

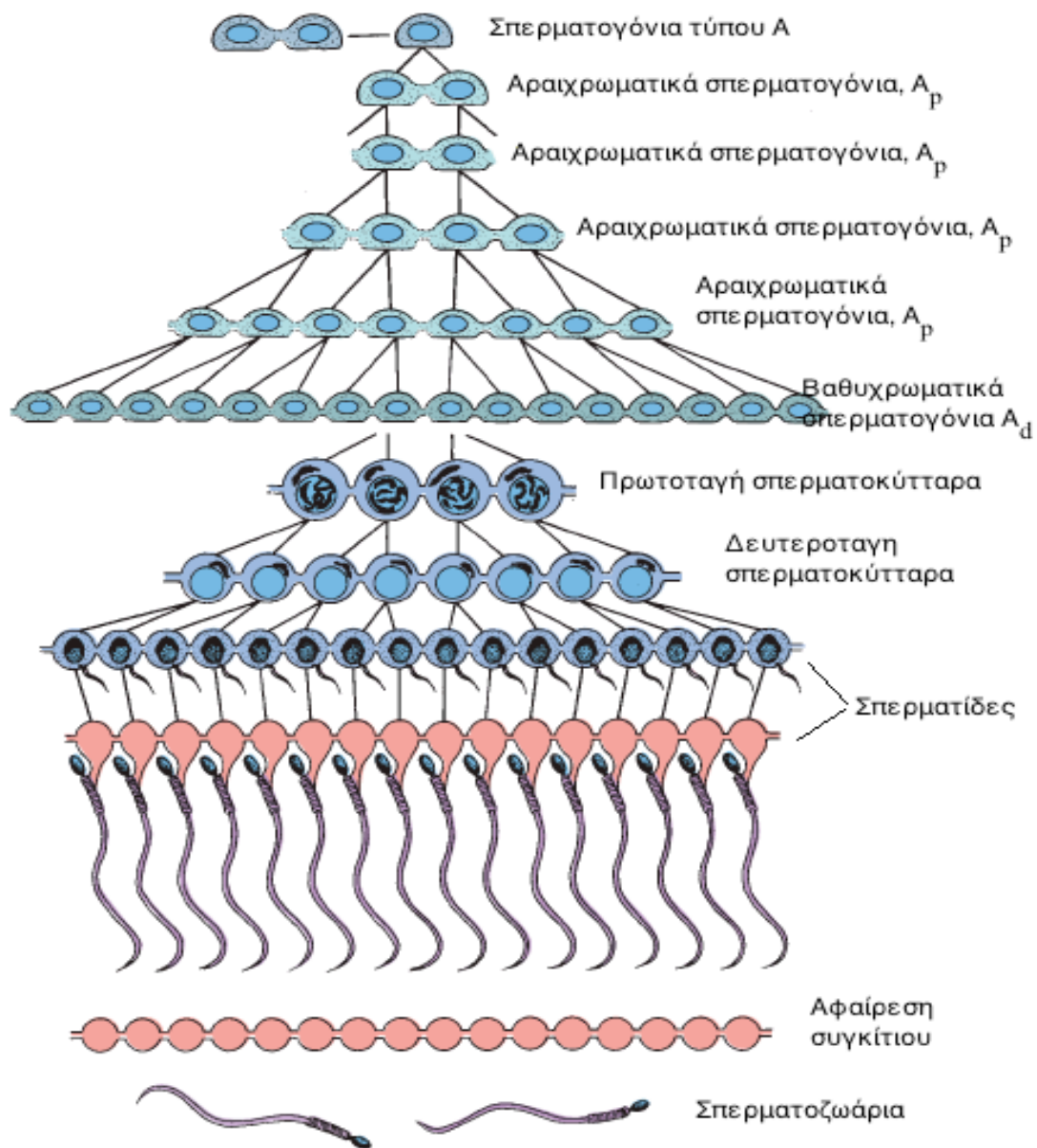


Εικόνα 1.3: Φυσιολογία της σπερματογένεσης

1.2.1 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΟΝΙΩΝ

Στην πρώτη φάση της σπερματογένεσης έχουμε τον πολλαπλασιασμό του πληθυσμού των σπερματογονίων με μιτωτικές διαιρέσεις, καθώς και την παραγωγή των σπερματογονίων τα οποία και θα εισέλθουν στη μείωση. Τα σπερματογόνια συναντώνται στα σπερματοφόρα σωληνάκια ανάμεσα στη βάση των κυττάρων Sertoli και στην υποκείμενη βασική μεμβράνη. Οι τύποι των σπερματογονίων που συναντάμε είναι: τα σπερματογόνια τύπου A, τα οποία διαχωρίζονται στα βαθυχρωματικά σπερματογόνια A_d (A_{dark}), στα αραιχρωματικά σπερματογόνια A_p (A_{pale}), και τα σπερματογόνια τύπου B (Εικόνα 1.4). Τα βαθυχρωματικά σπερματογόνια A_d (A_{dark}) έχουν ωοειδές πυρήνα με βαθυχρωματική κοκκιώδη χρωματίνη και ένα κεντρικό κυστίδιο (14, 15). Έχουν προέλθει από τη διαφοροποίηση των PGCs και αποτελούν ουσιαστικά την πιο ανώριμη μορφή γεννητικών κυττάρων. Θεωρούνται τα στελεχιαία κύτταρα (stem cells) της σπερματογένεσης έχοντας μια βασική ιδιότητα των στελεχιαίων κυττάρων, την αυτοανανέωση (6). Τα A_d μπορούν να διαιρεθούν μιτωτικά και να δώσουν δυο πανομοιότυπα A_d ή να δώσουν δυο σπερματογόνια A_p . Τα αραιχρωματικά

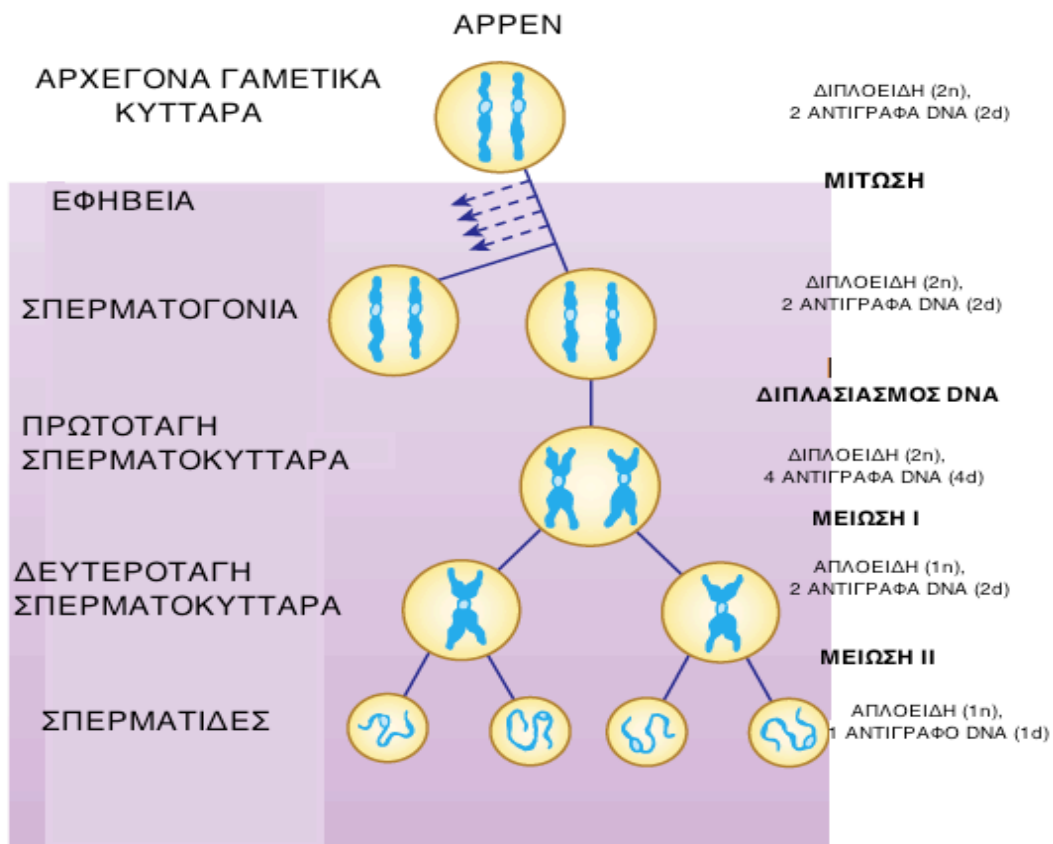
σπερματογόνια A_p έχουν υποστρογγύλο πυρήνα με αραιοχρωματική χρωματίνη και ένα ή περισσότερα κυστίδια. Πολλαπλασιάζονται σε τακτικά χρονικά διαστήματα ενώ κάποια από αυτά διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους και ωριμάζουν σε σπερματογόνια τύπου B. Τα σπερματογόνια τύπου B έχουν σφαιρικό πυρήνα και αποτελούν το τελευταίο στάδιο της πρώτης φάσης της σπερματογένεσης (15).



Εικόνα 1.4: Διάγραμμα απεικόνισης των διαφόρων τύπων κυττάρων στη διάρκεια της σπερματογένεσης (16).

1.2.2 ΜΕΙΩΣΗ

Εν συνεχεία τα σπερματογόνια τύπου Β διαιρούνται μιτωτικά και δίνουν τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα τα οποία εισέρχονται στη μείωση. Τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα υποβάλλονται σε δυο διαδοχικές μειωτικές διαιρέσεις από τις οποίες προκύπτουν 4 σπερματίδες (15, 17). Οι σπερματίδες είναι απλοειδή ($1n$) κύτταρα και φέρουν 23 χρωμοσώματα, ενώ τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα είναι διπλοειδή ($2n$) καθώς φέρουν 46 χρωμοσώματα. Τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα πριν εισέλθουν στην πρώτη μειωτική διαίρεση πολλαπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό και δημιουργούν δυο αδερφές χρωματίδες, έχοντας έτσι συνολικά 4 αντίγραφα DNA (Εικόνα 1.5) (14). Πιο αναλυτικά και συγκεκριμένα στη διάρκεια της πρόφασης στο στάδιο της λεπτοταινίας, στην πρώτη μειωτική διαίρεση, τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται. Στο στάδιο αυτό παρατηρούνται συχνά φαινόμενα θραύσεις της διπλής έλικας του DNA (double strand breaks, DSBs), τα οποία αποτελούν και σημεία γενετικού ανασυνδυασμού. Στο στάδιο της ζυγοταινίας τα ομόλογα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν και εν συνεχεία εισέρχονται στο στάδιο της παχυταινίας. Τα ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων, τα οποία είναι συμπυκνωμένα, παραμένουν στο στάδιο της παχυταινίας για μεγάλο χρονικό διάστημα, κατά το οποίο παρατηρείται αύξηση του μεγέθους του πυρήνα καθώς και των σπερματοκυττάρων (15). Τα ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων, γνωστά ως *τετράδες*, υπόκεινται σε ανταλλαγή γενετικού υλικού μέσω του μηχανισμού ομόλογων ανασυνδυασμών, γνωστού ως *επιχιάσμα*. Κατά τη διαδικασία των επιχιασμάτων τα χρωμοσώματα οργανώνονται, με τη συμμετοχή πρωτεϊνών, σε μια τριμερή δομή γνωστή ως συναπτονημικό σύμπλοκο (synaptonemal complex) (18). Τα επιχιάσματα συμβάλλουν στη γενετική ποικιλότητα καθώς οι 4 σπερματίδες, που σχηματίζονται από ένα σπερματοκύτταρο, διαφέρουν μεταξύ τους αλλά και με οποιαδήποτε άλλη σπερματίδα (14). Έπειτα στο στάδιο της διπλοταινίας τα ομόλογα χρωμοσώματα αρχίζουν να διαχωρίζονται. Μετά το τέλος της πρώτης μειωτικής διαίρεσης από κάθε πρωτοταγή σπερματοκύτταρο προκύπτουν 2 δευτεροταγή σπερματοκύτταρα (απλοειδή) τα οποία φέρουν ένα αντίγραφο από κάθε χρωμόσωμα αλλά δύο αντίγραφα DNA για το κάθε χρωμόσωμα (αδερφές χρωματίδες). Στη δεύτερη μειωτική διαίρεση τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα διαιρούνται μειωτικά και σχηματίζουν της σπερματίδες οι οποίες είναι απλοειδή κύτταρα με 1 αντίγραφο DNA και σφαιρικό σχήμα (14).

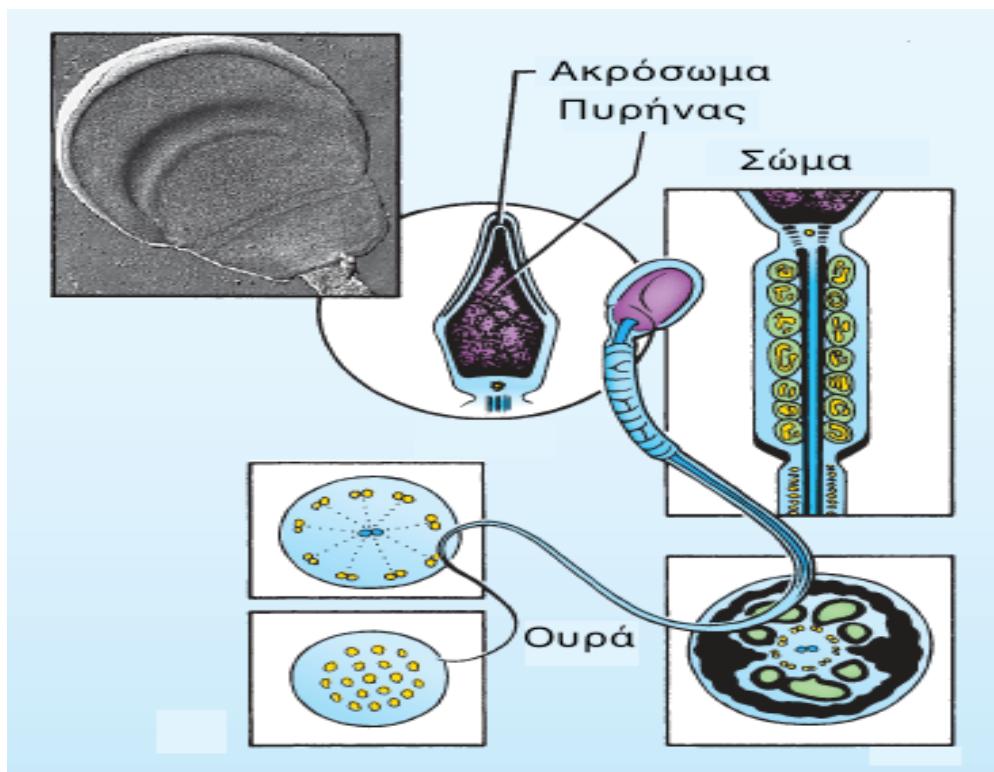


Εικόνα 1.5: Αριθμός αντιγράφων DNA στη μίτωση, Μείωση I και Μείωση II (6).

1.2.3 ΣΠΕΡΜΙΟΓΕΝΕΣΗ

Στη τελευταία φάση της σπερματογένεσης οι σπερματίδες ωριμάζουν σε σπερματοζώαρια. Η διαδικασία της σπερμιογένεσης αποτελείται από εκτεταμένη αναδιαμόρφωση των κυττάρων χωρίς περαιτέρω κυτταρικές διαιρέσεις. Στη φάση της διαφοροποίησης των σπερματίδων σε σπερματοζώαρια παρατηρούνται οι εξής διεργασίες: η συμπύκνωση της χρωματίνης, ο σχηματισμός του ακροσώματος από το σύμπλοκο Golgi και η ανάπτυξη των δομών του μαστιγίου (19). Το σπερματοζώαριο αποτελείται από την κεφαλή το σώμα και την ουρά (Εικόνα 1.6). Η ουρά του σπερματοζωαρίου είναι υπεύθυνη για την κίνηση του μέσω μαστιγοειδών κινήσεων. Η ενέργεια για αυτές τις μαστιγοειδείς κινήσεις

προέρχεται από τα μιτοχόνδρια που βρίσκονται στο ενδιάμεσο τμήμα (σώμα) του σπερματοζωαρίου (14).



Εικόνα 1.6: Δομή ώριμου σπερματοζωαρίου (6).

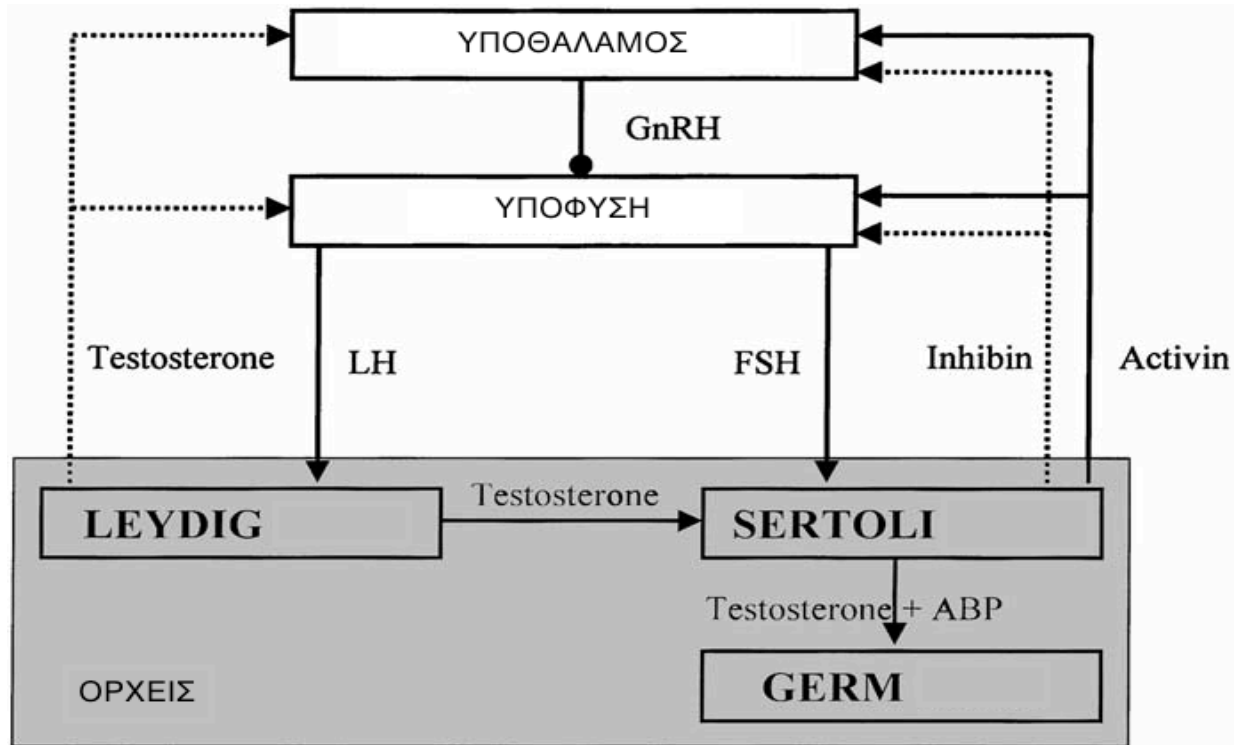
Ένα ιδιαίτερο φαινόμενο της σπερματογένεσης είναι ότι κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης των σπερματογονίων οι κυτταροπλασματικές διαιρέσεις δεν ολοκληρώνονται με αποτέλεσμα όλα τα θυγατρικά κύτταρα που προέρχονται από τα σπερματογόνια τύπου Α να παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους μέσω κυτταροπλασματικών γεφυρών δημιουργώντας έτσι ένα συγκύτιο. Το συγκύτιο αποκόπτεται στη φάση της σπερμιογένεσης από τα κύτταρα Sertoli (20) και τα σπερματοζωάρια ελευθερώνονται στον αυλό των σπερματικών πόρων για να καταλήξουν στην επιδιδυμίδα, όπου το σπερματοζωάριο θα αποκτήσει κινητικότητα και ικανότητα για γονιμοποίηση (10). Κατά τη φάση παρουσίασης των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα ορισμένα γονίδια υπόκεινται σε αλλαγές στο μοτίβο μεθυλίωσής τους σαν μέρος της ωρίμανσης (21).

Μια σημαντική διαδικασία της σπερμιογένεσης είναι η συμπύκνωση της χρωματίνης μέσω της αντικατάστασης των ιστονών από πρωταμίνες. Το 85% των ιστονών στον άνθρωπο αντικαθίστανται από πρωταμίνες (22). Οι κύριες πρωταμίνες στον άνθρωπο είναι η πρωταμίνη 1 και η πρωταμίνη 2 σε αναλογία περίπου 1 προς 1. Αλλαγή της αναλογίας αυτής έχει συσχετιστεί με υπογονιμότητα (23, 24). Βρέθηκε πως ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία της σπερματογένεσης έχουν κάποιες ισομορφές ιστονών όπως η ιστόνη H2AX και η H3.3 οι οποίες δεν αντικαθίστανται από πρωταμίνες. Οι ισομορφές αυτές εμπλέκονται στο μηχανισμό της μειωτικής αδρανοποίησης των φυλετικών χρωμοσωμάτων (meiotic inactivation SEX chromosome, MISC), τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y παραμένουν μεταγραφικά αδρανή μέσα σε ένα φυλετικό κυστίδιο (XY body), στο στάδιο της παχυταινίας στη μειωτική πρόφαση (25). Η ιστόνη H2AX αποτελεί ένα σημαντικό στοιχείο των νουκλεοσωμάτων καθώς φωσφορυλιώνεται δημιουργώντας τη φωσφορυλιωμένη ιστόνη H2AX (γH2AX) λόγω των θραύσεων διπλής έλικας (DSBs) που συμβαίνουν στα φυλετικά χρωμοσώματα (26). Η δημιουργία της γH2AX έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA (27).

1.2.4 ΟΡΜΟΝΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο. Οι κύριες ορμόνες στη γαμετογένεση είναι δυο γοναδοτροπίνες: 1) η ωχρινιοποιητική ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και 2) η θυλακιοτρόπος ορμόνη (Follicle-stimulating Hormone, FSH), οι οποίες διεγείρονται από τη γοναδοεκλυτίνη (Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH). Η GnRH εκλύεται από τον υποθάλαμο κατά κύματα. Η GnRH προκαλεί τη διέγερση των γοναδοτρόπων κυττάρων της υπόφυσης, τα οποία εκκρίνουν τις γοναδοτροπίνες, FSH και LH. Η LH εν συνεχεία προκαλεί τη διέγερση των κυττάρων Leydig για την παραγωγή τεστοστερόνης. Η παραγωγή της τεστοστερόνης έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία αρνητικής ανάδρασης, μεταξύ του υποθαλάμου και της υπόφυσης, με σκοπό τον ορμονικό έλεγχο. Η τεστοστερόνη που απελευθερώνεται προσδένεται στα κύτταρα Sertoli για την επαγωγή της σπερματογένεσης. Η FSH διεγείρει τα κύτταρα Leydig για την παραγωγή της ανδρογονοδεσμευτικής πρωτεΐνης (Androgen binding receptor, ABP), η οποία προσδένεται στην τεστοστερόνη επιτρέποντάς της

να περάσει από τις συνδέσεις που δημιουργούνται μεταξύ των συμπλόκων Sertoli-Sertoli. Επίσης η FSH διεγείρει τα κύτταρα Sertoli τα οποία παράγουν την ανασταλίνη (inhibin), η οποία καταστέλλει την παραγωγή της GnRH, και την ακτιβίνη (activin) η οποία διεγείρει την παραγωγή της GnRH (Εικόνα 1.7) (28).



Εικόνα 1.7: Ορμονικός έλεγχος σπερματογένεσης

Τα κύτταρα Sertoli κατά τη σπερματογένεση θρέφουν τα γαμετικά κύτταρα και τα εκθέτουν σε ορμονικό έλεγχο. Επίσης είναι υπεύθυνα για τη φακοκυττάρωση των ανώριμων σπερματοζωαρίων αλλά και για την έκκριση σπερματικού υγρού το οποίο επιτρέπει τη μεταφορά των σπερματοζωαρίων από τα σπερματοφόρα σωληνάρια στην επιδυμίδα για τα τελικά στάδια ωρίμανσης (13).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

2.1 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ DNA

Το γένωμα κάθε οργανισμού αποτελείται από συγκεκριμένη ποσότητα DNA που είναι και το βασικό μόριο μεταφοράς και διατήρησης της γενετικής πληροφορίας. Το γένωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, εκτός από τα γονίδια, αποτελείται και από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA ή αλλιώς επαναλαμβανόμενο DNA (repetitive DNA). Οι επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες καταλαμβάνουν το 50% του ανθρώπινου γενώματος και διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

1. Το υπερεπαναλαμβανόμενο DNA της ιδιοστατικής ετεροχρωματίνης, γνωστό και ως δορυφορικό DNA (satellite DNA) αποτελείται από μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών καταλαμβάνοντας το 3% περίπου του ανθρώπινου γενώματος. Διακρίνεται i) στις μεγάλες μονάδες (Major satellites), συνολικού μεγέθους περίπου 6 Mb, οι οποίες αποτελούνται από αλληλουχίες μεγέθους 234 bp σε 10.000 αντίγραφα σε ευθείες επαναλήψεις και ii) στις μικρές μονάδες (Minor satellites) αποτελούμενες από 2.000 τμήματα περίπου των 123 bp το κάθε τμήμα.
2. Τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια βρίσκονται σε 3.2×10^6 αντίγραφα και αποτελούν το 43,36% του ανθρώπινου γενώματος. Είναι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA μικρού μεγέθους της τάξεως των 1000 bp. Μοναδικό χαρακτηριστικό τους είναι η ικανότητά τους να μετατίθενται στο γένωμα, είτε μεταπηδώντας σε νέες θέσεις είτε δημιουργώντας αντίγραφα των ιδίων, τα οποία και ενσωματώνονται σε νέες θέσεις στο γένωμα.
3. Τα κατεργασμένα ψευδογονίδια είναι ανενεργά γονίδια, προερχόμενα από την ανάστροφη μεταγραφή του mRNA τους σε DNA και την ενσωμάτωση του cDNA στο

γένωμα. Αποτελούν το 2% του ανθρώπινου γενώματος και κωδικοποιούν πρωτεΐνες απαραίτητες για τη λειτουργία των ριβοσωμάτων (29).

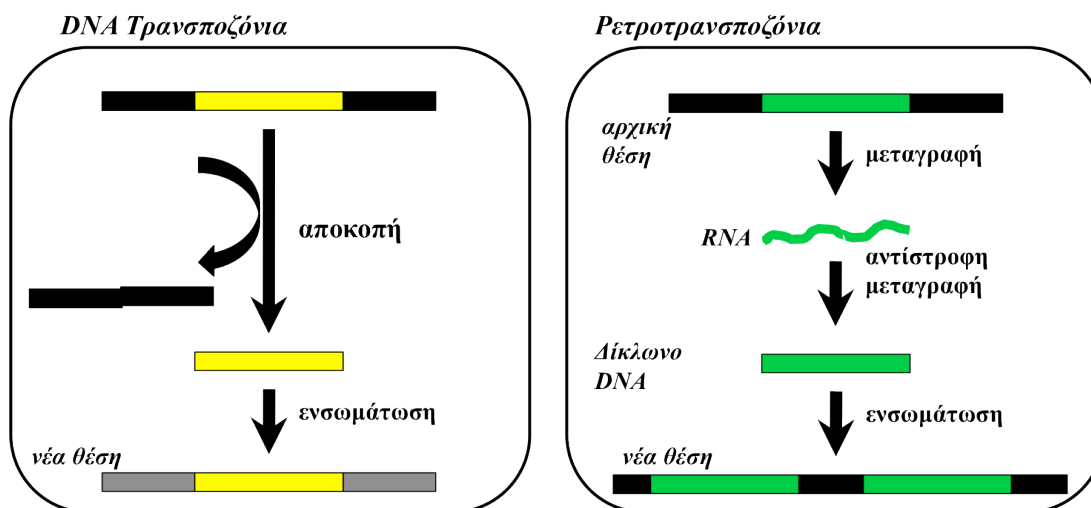
2.2 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια είναι μη κωδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να μεταπηδούν σε νέες θέσεις στο γένωμα, μια ιδιότητά τους γνωστή ως μετάθεση (30). Το 43,46% του γενώματος του ανθρώπου αποτελείται από μεταθετά στοιχεία και ο συνολικός αριθμός αντιγράφων τους ξεπερνάει τα αντίγραφα των «κλασικών» γονιδίων (29).

Η πρώτη αναφορά στα μεταθετά στοιχεία έγινε στα τέλη της δεκαετίας του 1940 από τη νομπελίστα Barbara McClintock, η οποία μελέτησε τον έντονο χρωματικό μωσαϊκισμό που εμφανίζονταν στο αραβόσιτο (*Zea mays*) (31). Σύμφωνα με την McClintock, τα μεταθετά στοιχεία χαρακτηρίστηκαν ως «στοιχεία ελέγχου», θεωρώντας ότι το διαφορετικό χρωματικό μοτίβο οφείλονταν στη μετακίνησή τους από και προς τα γονίδια (32). Η ύπαρξη των μεταθετών στοιχείων βρέθηκε αρχικά στα βακτήρια, ενώ στον άνθρωπο βρέθηκαν πολύ αργότερα. Τα μεταθετά στοιχεία χαρακτηρίστηκαν σαν «εγωιστικό» DNA (selfish DNA) και σαν DNA «σκουπίδι» (junk DNA), αφού χρησιμοποιούν τους μηχανισμούς αντιγραφής και μεταγραφής του κυττάρου προκειμένου να διατηρηθούν στο γονιδίωμα, χωρίς όμως να συμβάλουν στο φαινότυπο (33-35). Πλέον και μετά από πολυετείς ερευνητικές μελέτες έχει αποδειχτεί ότι τα τρανσποζόνια δεν αποτελούν παρασιτικό και εγωιστικό DNA για το κύτταρο αλλά συμβάλλουν στην εξέλιξη και στη ρύθμιση του κυττάρου (36) (37).

Τα μεταθετά στοιχεία κατηγοριοποιούνται σε δυο (2) κύριες τάξεις, με βάση το μηχανισμό μετάθεσής τους, στα DNA μεταθετά στοιχεία ή DNA τρανσποζόνια και στα RNA μεταθετά στοιχεία ή ρετροτρανσποζόνια. Τα ρετροτρανσποζόνια μετατίθενται μέσω του μηχανισμού «αντιγραφής και επικόλλησης» (copy & paste) χρησιμοποιώντας ένα ενδιάμεσο μεταγραφικό RNA (mRNA). Το ρετροτρανσποζόνιο μέσω της δράσης της RNA πολυμεράσης μεταγράφεται σε mRNA, το οποίο εν συνεχεία μετατρέπεται σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) με τη δράση της μεταγραφάσης και ενσωματώνεται σε μια νέα θέση στο γένωμα ενώ το αρχικό αντίγραφο παραμένει στην αρχική του θέση (38, 39). Σε

αντίθεση, τα DNA τρασποζόνια μετατίθενται στο γένωμα μέσω του μηχανισμού «αποκοπής και επικόλλησης» (cut & paste) (Εικόνα 2.1) (40, 41).

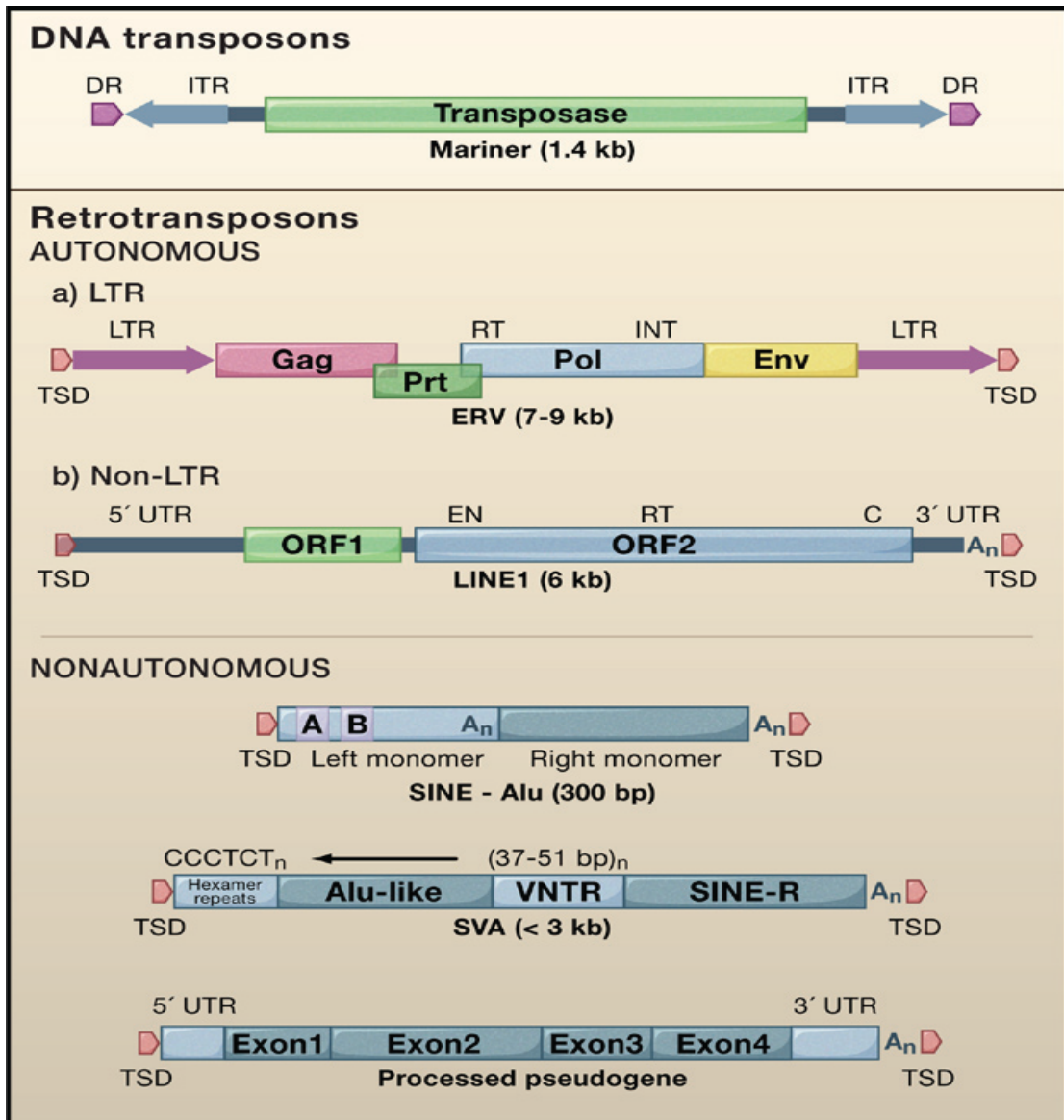


Εικόνα 2.1: Ταξινόμηση των μεταθετών στοιχείων με βάση τους μηχανισμούς ενσωμάτωσης «αποκοπής και επικόλλησης» (DNA Τρανσποζόνια) και «αντιγραφής και επικόλλησης» (Ρετροτρανσποζόνια).

2.2.1 DNA ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Τα πρώτα DNA τρασποζόνια, που ανακαλύφθηκαν, ήταν τα στοιχεία Dissociation (Ds) και Activator (Ac) από τη McClintock (32), ενώ ο μοριακός τους χαρακτηρισμός έγινε δεκαετίες αργότερα (42). Τα DNA τρασποζόνια αποτελούν το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος και απαντώνται σε 300.000 αντίγραφα. Τα αντίγραφα αυτά, παρόλο που μπορεί να παραμείνουν ανενεργά για περισσότερα από 40 εκατομμύρια χρόνια, είναι δυνατόν να κινητοποιηθούν από ήδη ενεργά τρασποζόνια του γενώματος παρέχοντάς τους όλα τα απαραίτητα στοιχεία για τη μετάθεσή τους (43-45). Η ιδιαιτερότητα του μηχανισμού ενσωμάτωσης των DNA τρασποζονίων, «αποκοπής και επικόλλησης», είναι ότι ο αριθμός των αντιγράφων παραμένει σταθερός. Τα DNA τρασποζόνια των ευκαρυωτικών οργανισμών κατηγοριοποιούνται με βάση το μηχανισμό και την τρασποζονάση που κωδικοποιούν για τη μετάθεσή τους στις εξής οικογένειες: hAT, piggyback, Mudr και Tc1/mariner (45).

Τα DNA τρoσποζόνια δομικά αποτελούνται από ένα ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (open reading frame, ORF) που κωδικοποιεί τη τρoσποζονάση, από δυο ανάστροφες επαναλήψεις (Terminal Inverted Repeats, TIRs) μεγέθους 5-500 bp που οριοθετούν το ORF και από δύο ευθείες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 2-8 βάσεων στα άκρα των DNA τρoσποζονίων (Εικόνα 2.2). Η μετάθεσής τους πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού «αποκοπής και επικόλλησης» κατά τον οποίο τα DNA τρoσποζόνια αποκόπτονται από την αρχική τους θέση στο γονιδίωμα και μετατίθενται σε μια νέα με τη δράση της τρoσποζονάσης (41). Η τρoσποζονάση, η οποία αναγνωρίζει τις ανάστροφες επαναλήψεις και προσδένεται πάνω σε αυτές, αποκόβει το DNA τρoσποζόνιο από την αρχική του θέση και το μεταθέτει σε μια νέα (46). Οι ευθείες επαναλήψεις παραμένουν στην αρχική τους θέση μετά τη μετάθεση και είναι χαρακτηριστικές για κάθε κατηγορία DNA τρoσποζονίων, αποτελώντας ένα είδος «αποτυπώματος». Σε ορισμένες περιπτώσεις το κενό που δημιουργείται από τη μετάθεση του τρoσποζονίου στην αρχική θέση επιδιορθώνεται χρησιμοποιώντας την αδερφή χρωματίδα σαν εκμαγείο (47). Σε περίπτωση ατελούς μετάθεσης, οι ευθείες επαναλήψεις μπορεί να προκαλέσουν αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων ή στη λειτουργία των ρυθμιστικών περιοχών (48).



Εικόνα 2.2: Μεταθετά στοιχεία θηλαστικών και τα δομικά χαρακτηριστικά τους. DR: Διπλασιασμοί (Duplications repeats), TSD: Βραχείες ευθείες επαναλήψεις, UTR: μη μεταφραζόμενη περιοχή, ORF: Ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, VNTR: Ποικίλου αριθμού επαναλήψεις, ITR: Ανεστραμμένες τελικές επαναλήψεις (36).

2.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Τα ρετροτρανσποζόνια είναι ενδογενή στοιχεία των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελούν το 90% του συνόλου των μεταθετών στοιχείων στον άνθρωπο. Το 42,3% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από 2.8×10^6 αντίγραφα ρετρομεταθετών στοιχείων (29, 49, 50). Τα ρετροτρανσποζόνια εμφανίζουν πολλές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με τους πρώτους ρετροϊούς βάση των οποίων διακρίνονται α) στα ρετροτρανσποζόνια με

μακρές τελικές επαναλήψεις (Long Terminal Repeats, LTRs) ή ιικού τύπου και β) στα ρετροτρανσποζόνια χωρίς μακρές τελικές επαναλήψεις (non-Long Terminal Repeats, non-LTR) ή μη ιικού τύπου. Η μετάθεση των ρετρομεταθετών στοιχείων γίνεται μέσω του μηχανισμού «αντιγραφής και επικόλλησης». Η μετάθεση επιτελείται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA από το οποίο προκύπτει συμπληρωματικό DNA με τη δράση της ανάστροφης μεταγραφάσης. Το cDNA εισέρχεται σε μια νέα θέση μέσα στο γένωμα. Με το μηχανισμό αυτόν, το αρχικό ρετρομεταθετό παραμένει στην ίδια θέση, ενώ το αντίγραφο εισέρχεται σε μια νέα θέση μέσα στο γένωμα έχοντας σα αποτέλεσμα την αύξηση του συνολικού αριθμού των αντιγράφων (38, 39).

2.2.2.1 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΧΩΡΙΣ ΜΑΚΡΕΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΕΙΣ (non-Long Terminal Repeats, non-LTR)

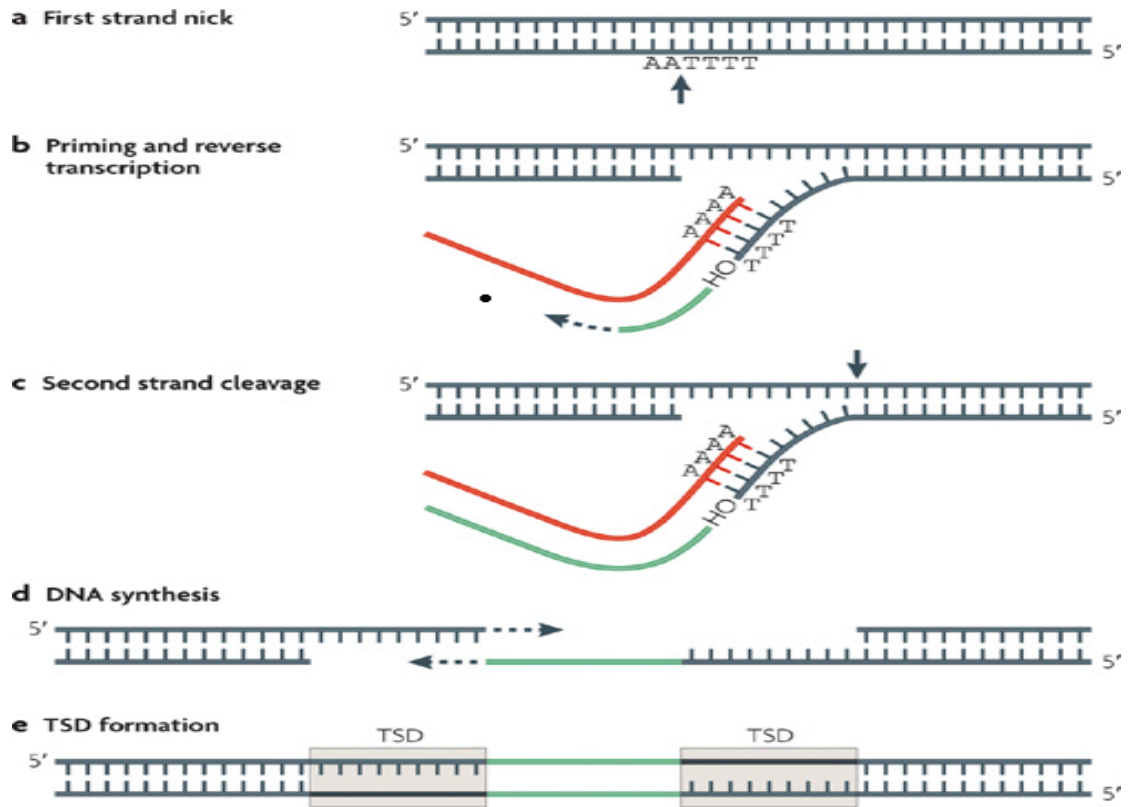
Τα ρετροτρανσποζόνια χωρίς μακρές τελικές επαναλήψεις καταλαμβάνουν το 1/3 του ανθρώπινου γενώματος, σε ποσοστό 33,9%, αποτελώντας και την πιο διαδεδομένη κατηγορία ρετροτρανσποζονίων (29). Τα non-LTR ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται στα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Long Interspersed Nuclear Elements, LINEs), στα βραχέα διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Short Interspersed Nuclear Elements, SINEs) και στα σύνθετα στοιχεία SVA (SINE-R, Alu) (51-53).

2.2.2.1.1 ΜΑΚΡΑ ΔΙΑΣΠΑΡΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ (LINEs)

Τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία, LINEs, είναι τα πιο καλοχαρακτηρισμένα αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR (54). Καταλαμβάνουν το 20% του γενώματος στον άνθρωπο με περίπου 700.000 αντίγραφα. Διακρίνονται σε τρεις οικογένειες: LINE-1 (L1), LINE-2 (L2) και LINE-3 (L3), με τα στοιχεία L1 να αποτελούν την πολυπληθέστερη από τις τρεις, με 520.000 αντίγραφα (17% του ανθρώπινου γενώματος). Παρά το μεγάλο αριθμό αντιγράφων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα πλήρους μήκους είναι περίπου 3.000 με 5.000. Από αυτά, τα ενεργά ανέρχονται περίπου στα 100 (55, 56).

Τα ενεργά στοιχεία L1 στον άνθρωπο έχουν μέγεθος περίπου 6 Kb και κωδικοποιούν δύο πρωτεΐνες απαραίτητες για τη ρετρομετάθεσή τους. Δομικά αποτελούνται από δυο αμετάφραστες περιοχές στο 5' άκρο (5' Untranslated Region, 5' UTR) και στο 3' άκρο (3' Untranslated Region, 3' UTR), από δυο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORF1, ORF2) τα οποία διαχωρίζονται μεταξύ τους με μια αλληλουχία DNA μεγέθους 63 βάσεων και από μια μεταβλητού μεγέθους πολυ-A (poly-A) η οποία οδηγεί σε λειτουργικό σήμα πολυαδελυνίωσης (36). Η περιοχή 5' UTR παίζει το ρόλο εσωτερικού υποκινητή και χρησιμοποιείται από την RNA πολυμεράση II για τη μεταγραφή των L1 (57-59). Η περιοχή ORF1 κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη μεγέθους 40 kDa, μία περιοχή της οποίας συμμετέχει στο σχηματισμό ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματίων (Ribonucleic Particles, RNPs) μέσω του μοτίβου φερμουάρ λευκίνης (leucine-zipper), ενώ η καρβοξυτελική περιοχής της έχει ρόλο συνοδού μορίου νουκλειικών οξέων (60-62). Η ORF2 περιοχή κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη με μέγεθος 150 kDa αποτελούμενη από τρεις περιοχές: μια αμινοτελική, μια κεντρική και μια καρβοξυτελική. Η αμινοτελική περιοχή έχει δράση ενδονουκλεάσης (Endonuclease, EN) (63), ενώ η κεντρική έχει δράση ανάστροφης μεταγραφάσης (reverse Transcriptase, RT) (64). Οι δυο πρωτεΐνες των ORF1 και ORF2 παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρετρομετάθεση των στοιχείων L1 (55).

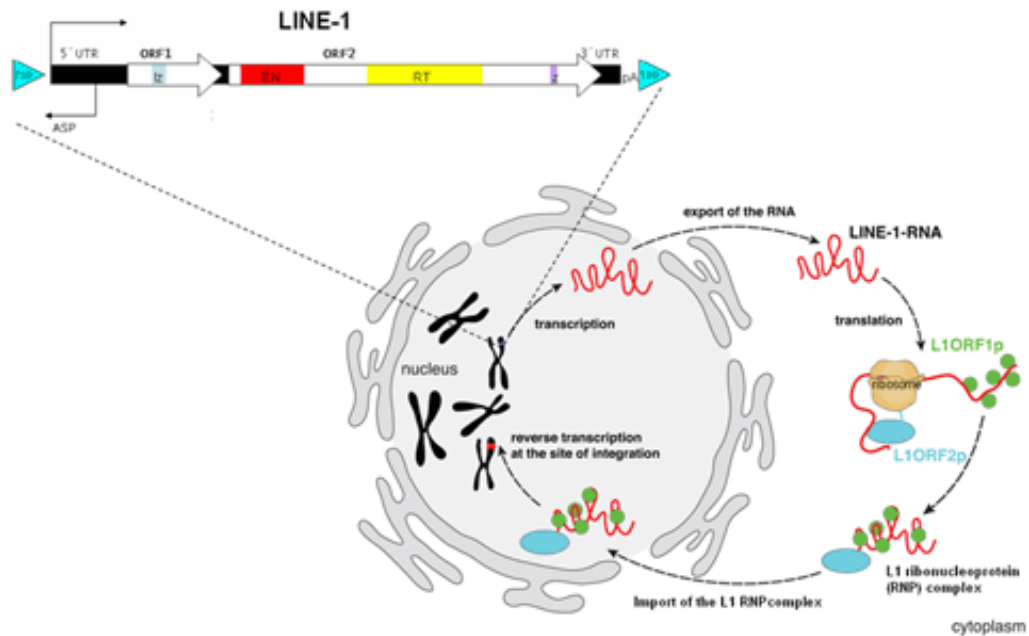
Τα στοιχεία LINE-1 μετατίθενται μέσα στο γένωμα μέσω του μηχανισμού αντίστροφης μεταγραφής με εκκινητή-πριματοδότη αλληλουχίας DNA (Target Primed Reverse Transcription, TPRT) (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3: Ανάστροφη μεταγραφή του L1 μέσω του μηχανισμού TPRT. Η EN προκαλεί θραύση στο DNA ανάμεσα στις βάσεις A-T. Η μονόκλωνη προεξοχή αποτελεί τον πριματοδότη για τη δημιουργία του συμπληρωματικού DNA. Μέσω του μηχανισμού, μετά την ολοκλήρωση της ρετρομετάθεσης, στη θέση στόχο δημιουργούνται βραχείες επαναλήψεις (65).

Η ρετρομετάθεση των L1 αρχίζει με την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης στον υποκινητή της 5' UTR περιοχής και τη δημιουργία ενός mRNA στον πυρήνα του κυττάρου. Εν συνεχεία, το mRNA εξέρχεται από τον πυρήνα και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα όπου και εκφράζονται οι πρωτεΐνες των ORF1 και ORF2 περιοχών. Έπειτα το mRNA μαζί με τις πρωτεΐνες εισέρχονται στον πυρήνα σαν RNP (Εικόνα 2.4). Η EN προκαλεί θραύση στη αλυσίδα του DNA δημιουργώντας μια μονόκλωνη προεξοχή πλούσια σε βάσεις θυμίνης, η οποία υβριδοποιείται με το πολυ-A τμήμα του μετάγραφου των L1. Η μονόκλωνη προεξοχή αποτελεί τον πριματοδότη για το ξεκίνημα της δράσης της ανάστροφης μεταγραφάσης και τη δημιουργία του συμπληρωματικού DNA (63, 66). Στα άκρα των αντιγράφων των L1

υπάρχουν βραχείες ευθείες επαναλήψεις (Target Site Duplications, TSD), μεγέθους 2-20 bp, προερχόμενες από το διπλασιασμό της θέσης-στόχου κατά τη μετάθεση των L1 (53).



Εικόνα 2.4: Κύκλος ρετρομετάθεσης στοιχείων L1.

2.2.2.1.2 ΒΡΑΧΕΑ ΔΙΑΣΠΑΡΤΑ ΠΥΡΗΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ (SINEs)

Τα μεταθετά στοιχεία SINEs αποτελούν μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια και έχουν μέγεθος 100-300 bp. Αποτελούν τη μεγαλύτερη οικογένεια μη-LTR ρετροτρανσποζονίων με 1.6×10^6 αντίγραφα, καταλαμβάνοντας το 13,63% του ανθρώπινου γενώματος (46). Η κυριότερη οικογένεια των SINEs είναι τα μεταθετά Alu με κύρια χαρακτηριστικά τους το μικρό μέγεθος, έως 300 βάσεις, αλλά και το μεγάλο αριθμό αντιγράφων, αποτελώντας το 10% του γενώματος. Μελέτες έδειξαν πως τα Alu δεν βρίσκονται τυχαία διάσπαρτα στο γονιδίωμα αλλά φέρεται να συσσωρεύονται σε περιοχές με μεγάλο αριθμό γονιδίων (67).

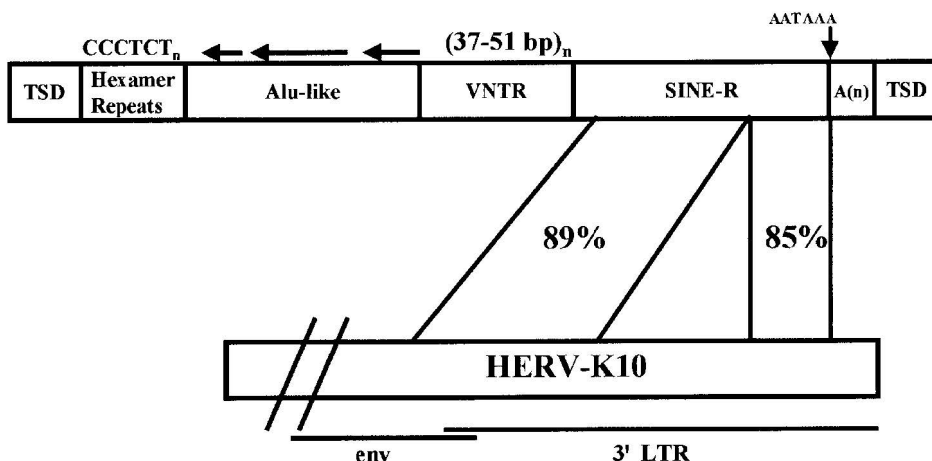
Τα στοιχεία SINEs δεν κωδικοποιούν καμία από τις πρωτεΐνες που είναι απαραίτητες για τη ρετρομετάθεση και για αυτό χαρακτηρίζονται ως μη αυτόνομα. Τα SINEs μετατίθενται

μέσα στο γένωμα μέσω του μηχανισμού «αντιγραφής και επικόλλησης», όπου αρχικά μεταγράφονται σε RNA από την RNA πολυμεράση III (RNA polymerase III) (68).

Τα SINEs εμφανίζουν ομολογία με διάφορα μόρια RNAs όπως tRNA, 5s RNA και 7SL RNA. Δομικά αποτελούνται από μια περιοχή με αλληλουχία tRNA ή 5s ή 7SL η οποία έχει ρόλο υποκινητή για τη δράση της RNA πολυμεράσης III, από μια μη κωδική περιοχή tRNA και από μια πολυ-A περιοχή (69). Στα άκρα των SINEs υπάρχουν TSD (70, 71).

2.2.2.1.3 ΣΥΝΘΕΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ(SVA)

Τα στοιχεία SVA αποτελούν τη μικρότερη κατηγορία ρετροτρανσποζονίων (~ 0,2 % ανθρώπινου γενώματος) και τα λιγότερο μελετημένα ρετρομεταθετά. Τα SVA είναι σύνθετα ρετρομεταθετά και η ονομασία τους έχει προέλθει από την ύπαρξη ενός μεταθετού SINE-R, από μια περιοχή συνεχών επαναλήψεων διαφόρου μήκους (Variable Number Tandem Repeats, VNTR) και από μια περιοχή η οποία φέρει αλληλουχία όμοια με αυτή των Alu (SVA=SINE-R, VNTR, Alu). Τα στοιχεία SVA απαντώνται στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε 3.000 αντίγραφα (72). Ένα πλήρους μήκους στοιχείο SVA έχει μέγεθος ~ 2 kb και αποτελείται από ένα επαναλαμβανόμενο εξαμερές, από μια περιοχή VNTR, από μια αλληλουχία όμοια με αυτή των Alu στοιχείων, από μια περιοχή με υψηλή ομολογία με SINE-R (το 3' άκρο του γονιδίου *env* και το 3' άκρο LTR του HERV-K10) και από ένα σήμα πολυαδενυλίωσης. Επίσης στα άκρα τους φέρουν TSD (Εικόνα 2.5) (52). Τα στοιχεία SVA μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II. Όπως τα στοιχεία Alu έτσι και τα στοιχεία SVA είναι μη αυτόνομα και για την ένθεσή τους χρησιμοποιούν το μηχανισμό ρετρομετάθεσης των L1 (52, 72).



Εικόνα 2.5: Δομικά στοιχεία πλήρους μήκους SVA (52).

2.2.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΜΕ ΜΑΚΡΕΣ ΤΕΛΙΚΕΣ ΕΠΑΝΑΛΛΗΨΕΙΣ (LTR retrotransposons)

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια είναι ευθείες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία ρετρομεταθετών στοιχείων στους φυτικούς οργανισμούς καθώς αποτελούν το 80% του γονιδιώματος τους (73), ενώ στον άνθρωπο καταλαμβάνουν το 8,3% του γονιδιώματος (29). Η ονομασία τους έχει προέλθει από την ύπαρξη μακρών τελικών επαναλήψεων, LTR, στα άκρα τους. Έχουν μέγεθος 6-10 Kb και εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τους ρετροϊούς, καθώς εμφανίζουν μια εσωτερική περιοχή η οποία περικλείεται από τα LTR. Η εσωτερική περιοχή αποτελείται από δυο ORFs που κωδικοποιούν δομικές και ενζυμικές πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στη ρετρομετάθεση. Το πρώτο ORF ονομάζεται gag και κωδικοποιεί μια δομική πρωτεΐνη η οποία επάγει το σχηματισμό ιικού τύπου καψιδίου (virus-like particle, VLP) (74). Το δεύτερο ORF κωδικοποιεί την ενζυματική πολύ-πρωτεΐνη pol με δράση:

- πρωτεάσης, για την ωρίμανση της gag πρωτεΐνης,
- ανάστροφης μεταγραφάσης και RNάσης H, για την ανάστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA, και
- ιντεγκράσης, για τη θραύση της διπλής έλικας και της ενσωμάτωσης του αντιγράφου στο γένωμα (75-77).

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια φέρουν μακρές τελικές επαναλήψεις οι οποίες έχουν μέγεθος 300-1500 Kb και περιέχουν αλληλουχίες για την έναρξη (υποκινητής) και για τη λήξη (σήμα πολυαδελυνίωσης) της μεταγραφής (78). Κάποια LTR ρετρομεταθετά στοιχεία, όπως οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί HERV-K, φέρουν το γονίδιο *env* το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη φακέλου ιικού τύπου (79).

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα, ανάλογα με την ικανότητά τους να φέρουν ή όχι γονίδια που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες απαραίτητες για τη ρετρομετάθεσή τους. Στα μη αυτόνομα LTR (solo-LTR), τα γονίδια αυτά είτε απουσιάζουν είτε είναι ανενεργά λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων, διατηρώντας όμως ακέραιη την LTR περιοχή τους. Τα μη αυτόνομα LTR ρετρομεταθετά μετατίθενται χρησιμοποιώντας τις λειτουργικές πρωτεΐνες των αυτόνομων LTR-ρετροτρανσποζονίων *in trans* (80).

Τα LTR-ρετροτρανσποζόνια, με βάση τα κοινά χαρακτηριστικά τους με τους ρετροϊούς, διακρίνονται στις τάξεις I, II, III και MaLR. Τα LTR-ρετροτρανσποζόνια τάξης I εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά με τους γάμμα ρετροϊούς (ρετροϊούς C) και με κυριότερα μέλη τους ανθρώπινους ενδογενείς ρετροϊούς HERV-E, HERV-R και HERV-H. Τα LTR-ρετροτρανσποζόνια τάξης II εμφανίζουν κοινά χαρακτηριστικά με τους τύπου β ρετροϊούς και με κυριότερα μέλη τους ενδογενείς ρετροϊούς HERV-K και HERV-L. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης III είναι ενδογενή ρετροϊικά στοιχεία τα οποία σχετίζονται με τους αφρώδεις ρετροϊούς (*spuma retroviruses*). Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης MaLR είναι μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια, που σχετίζονται με τα μέλη της τάξης I αλλά όχι με τους μολυσματικούς ρετροϊούς (81).

2.2.2.2.1 ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΡΕΤΡΟΪΟΙ (HERV)

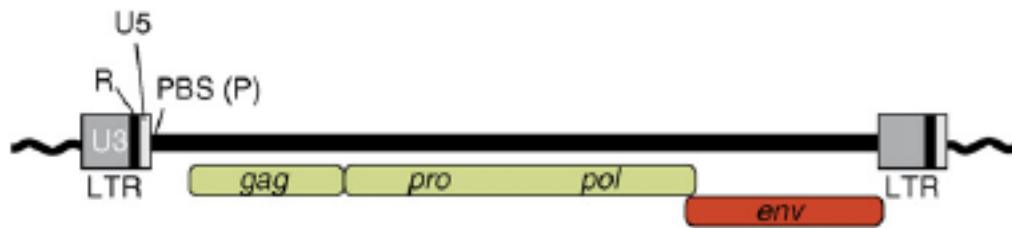
Οι ρετροϊοί αποτελούν μια οικογένεια σημαντικών ιών οι οποίοι μπορούν να μολύνουν τα σωματικά και τα γαμετικά κύτταρα των σπονδυλωτών (82). Οι ρετροϊοί που μολύνουν γαμετικά κύτταρα ονομάζονται ενδογενείς ρετροϊοί (83-85). Οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (Human endogenous retrovirus, HERV) αποτελούν τα κατάλοιπα της μόλυνσης των ανθρώπινων γαμετικών κυττάρων από εξωγενείς ρετροϊούς. Σε αντίθεση με

τους κοινούς ιούς, οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί δεν είναι μολυσματικοί για τον άνθρωπο (86) και μπορούν να μεταβιβαστούν στις επόμενες γενεές κάθετα, με βάση τη μεντελική κληρονομικότητα, σαν πρωϊοί (87). Στον άνθρωπο μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί πάνω από 30.000 αντίγραφα ενδογενών ρετροϊών καταλαμβάνοντας το 8,3% του ανθρώπινου γονιδιώματος (83).

Οι ρετροϊοί μπορεί να συνθέτουν ακέραιους HERV αλλά και αλληλουχίες που φέρουν ένα μέρος των HERV, όπως τα στοιχεία SINE-R (που φέρουν βραχέες επαναλήψεις και ένα μεγάλο τμήμα της αλληλουχίας των HERV) και τα στοιχεία SVA. Το 5% των HERV αποτελείται από solo-LTR, τα οποία προέκυψαν από τον ομόλογο ανασυνδυασμό των 5' και 3' LTR καθώς και από συσσώρευση μεταλλάξεων και ελλειμμάτων σε περιοχές με κωδικές αλληλουχίες, ενώ τα πλήρους αλληλουχίας HERV αποτελούν το 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος (29). Παρόλο που μέχρι σήμερα δεν έχει καταγραφεί ρετρομετάθεση των HERV, δεν αποκλείεται να μπορούν να ρετρομετατίθενται χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες είτε άλλων αυτόνομων ρετροτρανσοζονίων είτε και μη πλήρως λειτουργικές πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα ίδια (88).

Οι ακέραιοι ενδογενείς ρετροϊοί δομικά είναι όμοιοι με τους εξωγενείς ρετροϊούς (Εικόνα 2.6) (89). Τα πλήρους μήκους στοιχεία HERV έχουν μέγεθος 9-10 kb και αποτελούνται από μια κωδικοποιούσα περιοχή η οποία περιλαμβάνει τα γονίδια gag (δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου), pro (πρωτεάση), pol (δράση αντίστροφης μεταγραφάσης, ριβονουκλεάσης και ιντεγκράσης) και env (γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου). Στα άκρα της κωδικοποιούσας περιοχής συναντώνται δυο περιοχές LTR (5' και 3') (90). Οι περιοχές αυτές έχουν μέγεθος 0,3-1,5 Kb, φέρουν σήματα για την έναρξη και τη λήξη της μεταγραφής. Η 5'LTR φέρει τον υποκινητή της RNA πολυμεράσης II ενώ η 3'LTR φέρει σήμα πολυαδελυνίωσης (78). Επίσης τα στοιχεία HERV φέρουν και αλληλουχίες καθοδικά της 5'LTR και ανοδικά της 3'LTR οι οποίες συμμετέχουν και στην αντίστροφη μεταγραφή. Καθοδικά της 5'LTR υπάρχει μια αλληλουχία, η οποία συνδέει την 5'LTR περιοχή με το γονίδιο gag και λειτουργεί σε θέση πρόσδεσης του εκκινητή (primer binding site, PBS) για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής, ενώ ανοδικά της 3'LTR περιοχής υπάρχει μια πολυουριδική περιοχή (PPT), η οποία συνδέει την 3'LTR με το γονίδιο env και λειτουργεί σαν πριμοδότης για την αντίστροφη μεταγραφή (91). Καθοδικά της PBS βρίσκεται το σήμα πακεταρίσματος Ψ, που

κωδικοποιείται από το γονίδιο *gag*. Επίσης τα πλήρους μήκους στοιχεία HERV φέρουν θέσεις δότη (Splice Donor, SD) και αποδέκτη ματίσματος (Splice Acceptor) (81).



Εικόνα 2.6: Τυπική δομή προϊών.

Η ονοματολογία των HERV στοιχείων μέχρι σήμερα δεν ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μοτίβο, καθώς πολλές οικογένειες HERV ονομάστηκαν αυθαίρετα από της ερευνητικές ομάδες που τις ανακάλυψαν. Η προτιμώμενη συστηματική ονοματολογία χρησιμοποιεί την ειδικότητα του αμινοξέος του μεταφορικού tRNA που υβριδοποιείται στη θέση PBS για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής. Το όνομα προσδιορίζεται με την προσθήκη του γράμματος του αμινοξέος ως κατάληξη στο HERV. Για παράδειγμα, το αμινοξύ του tRNA που συνδέεται με τη θέση PBS της οικογένειας των HERV-K είναι η λυσίνη, η οποία συμβολίζεται με το κεφαλαίο γράμμα K (92, 93).

Στη βάση δεδομένων των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Repbase) έχουν καταχωρηθεί περισσότερα από 200 στοιχεία HERV. Οι καλύτερα μελετημένες οικογένειες HERV είναι HERV-H, HERV-W, HERV-L, ERV-9 και HERV-K.

Οι οικογένεια HERV-K ταξινομείται σε δέκα οικογένειες και που λόγω της ομολογίας τους με τον ιό του μαστικού αδενοκαρκινώματος του ποντικού (Mouse Mammary Tumor Virus, MMTV), ονομάζονται και HML-1 έως HML-10 (Human MMTV like). Το πιο πρόσφατο HERV-K που βρέθηκε είναι το HERV-K113 (94, 95) και φέρει διατηρημένες ORFs οι οποίες κωδικοποιούν ρετροϊκές πρωτεΐνες. Κάποια μέλη της οικογένειας HERV-K φέρουν το γονίδιο REC που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη Rec η οποία συμμετέχει στην εξαγωγή του mRNA από τον πυρήνα. Επίσης συμμετέχει και στην ογκογένεση, (96).

2.3 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΡΟΛΟΣ ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ

Τα μεταθετά στοιχεία καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο τμήμα του γονιδιώματος των θηλαστικών. Το ανθρώπινο γονιδίωμα καταλαμβάνεται σε ποσοστό 45 % από μεταθετά στοιχεία. Το γονιδίωμα όλων των οργανισμών λειτουργεί σαν ένα εξειδικευμένο μέσο αποθήκευσης πληροφοριών (97). Συχνά το γονιδίωμα θεωρείται σαν το πρότυπο κληρονομικότητας, καθώς παραμένει «σταθερό» χωρίς αλλαγές ή πολλές φορές ακόμη και αδρανές, με εξαίρεση τις σημειακές μεταλλάξεις. Αυτή η άποψη έχει αρχίσει να εκφυλίζεται, καθώς το γονιδίωμα θεωρείται δυναμικό αφού «αλλάζει» μέσω ανακατατάξεων, ελλείψεων και ενθέσεων. Ένα μεγάλο μέρος της πλαστικότητας του γονιδιώματος οφείλεται στα ρετρομεταθετά στοιχεία (98). Η ανάλυση του ανθρώπινου γονιδιώματος (Human Genome Project) επιβεβαίωσε ότι τα μεταθετά στοιχεία συμβάλλουν στη διαμόρφωση του γενώματος καταρρίπτοντας το μύθο ότι είναι «εγωιστικά» και «παρασιτικά». Τα ρετροτρανσποζόνια στα θηλαστικά αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία μεταθετών με δυνατότητα μετάθεσης, ενώ τα DNA τρανσποζόνια αποτελούν ένα μικρό μέρος των μεταθετών με μη ικανότητα ενεργής ρετρομετάθεσης λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων, με την πάροδο των χρόνων, στην αλληλουχία τους (79).

Τα ρετρομεταθετά, λόγω της ικανότητας μετάθεσής τους καθώς και λόγω του μεγάλου αριθμού αντιγράφων τους, συμμετέχουν ενεργά τόσο στην εξέλιξη όσο και στη διαμόρφωση του συνόλου του γενώματος αλλά και των γονιδίων, με τρόπο είτε θετικό είτε αρνητικό τόσο για το ίδιο το κύτταρο όσο και για τον ίδιο τον οργανισμό. Τα ρετρομεταθετά επηρεάζουν τη λειτουργία και τη δομή του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους, όπως με ανακατατάξεις από ομόλογο ανασυνδυασμό των χρωμοσωμάτων, με σύντηξη γονιδίων, με ενθέσεις και διαγραφές, με διπλασιασμό τμημάτων αλλά και ολόκληρων γονιδίων και με μεταγωγή εξωνίων (exon shuffling) (46).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνονται σε κωδικές (εξώνια) ή ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων προκαλώντας αλλαγές στη δομή των γονιδίων και στην έκφραση των πρωτεϊνών. Αυτό δημιουργεί αστάθεια στο γονιδίωμα του κυττάρου αλλά και γενετική αστάθεια στον οργανισμό (79). Το 0,27% των κληρονομούμενων γενετικών διαταραχών στον άνθρωπο οφείλεται σε de novo ενθέσεις των ρετρομεταθετών Alu, LINE-1

και SVA. Μέχρι στιγμής, οι ενθέσεις των στοιχείων Alu, LINE-1 και SVA είναι υπεύθυνες για 85 ασθένειες, όπως η αιμορροφιλία A B, η κυστική ίνωση, η β-μεσογειακή αναιμία, η μυϊκή δυστροφία Duchenne (99), η συγγενής μυϊκή δυστροφία τύπου Fukuyama, ο καρκίνος του μαστού και του παχέος εντέρου, η επερχοληστερολαιμία και πολλές άλλες (100). Από τις 85 γενετικές διαταραχές, οι 56 οφείλονται σε ενθέσεις σε εξώνια (38 Alu, 15 L1 και 3 SVA) και οι υπόλοιπες σε ενθέσεις σε μη κωδικοποιούσες περιοχές (18 Alu, 6 L1 και 4 SVA) (101). Αξιοσημείωτο είναι να αναφερθεί πως αρκετές διαταραχές, οι οποίες προέρχονται από ενθέσεις των L1, σχετίζονται με το χρωμόσωμα X. Ο αριθμός των L1 στο X χρωμόσωμα είναι σχεδόν διπλάσιος από αυτόν των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων. Ένα ενδιαφέρον μοντέλο που προτάθηκε για την ερμηνεία του διπλάσιου αριθμού L1 στο X χρωμόσωμα σε σύγκριση με τα αυτοσωμικά, είναι ότι αποτελούν σταθμούς για τη διάδοση του σήματος της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος (31, 102).

Τα ρετρομεταθετά προκαλούν γενετική αστάθεια και μέσω θραύσεων της διπλής έλικας (Double Strand Breaks, DSBs) του DNA. Οι θραύσεις αυτές προέρχονται από την πρωτεΐνη ενδονουκλεάση της ORF 2 του L1, η οποία προκαλεί περισσότερες θραύσεις από αυτές που είναι απαραίτητες για την ένθεση του L1 σε νέα θέση μέσα στο γένωμα κατά τη ρετρομετάθεση (103). Εκτός από την αρνητική δράση της ρετρομετάθεσης για το γονιδίωμα, μελέτες έδειξαν πως τα L1 και Alu στοιχεία συσχετίζονται με τις επιδιορθώσεις των θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA. Οι ρετρομεταθέσεις των L1, ανεξαρτήτως από τη δράση της ενδονουκλεάσης (endonuclease-independent, EN_i), πραγματοποιούνται σε κύτταρα που δε φέρουν το μηχανισμό μη ομόλογης σύνδεσης άκρων (non homologous end joining- NHEJ), ένας κύριος μηχανισμός επιδιόρθωσης DSBs. Τα στοιχεία L1- EN_i δρουν σαν εκμαγείο για την επιδιόρθωση των θέσεων που έχουν υποστεί θραύσεις μέσω του μηχανισμού της ανάστροφης μεταγραφής (104). Έρευνες σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς έδειξαν πως τα στοιχεία L1-EN_i και τα Penelope στοιχεία (L1 με έλλειψη ORF2), χρησιμοποιούν δυσλειτουργικά τελομερή σαν υπόστρωμα για τη ρετρομετάθεσή τους (105, 106).

Αποδείχθηκε σε διαφορες μελετες την η ικανότητα των μη LTR ρετροτρανσποζονίων να δημιουργούν ασταθείς μικροδορυφορικές επαναλήψεις (microsatellites repeats) (107-109). Έρευνες που εξετασαν τα στοιχεία Alu έδειξαν, έδειξαν πως κάθε αντίγραφο Alu που ρετρομετατίθενται αποτελείται από τις πολυμερικές περιοχές (Homopolymeric tracts), την

περιοχή πρόσδεσης στο κέντρο του Alu και την περιοχή πολυπολυαδενλίωσης στο 3' άκρο (110). Οι περιοχές αυτές μπορούν να υποστούν μεταλλάξεις που έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία επαναλήψεων, γνωστών ως μικροδορυφόρων, το μέγεθος των οποίων ποικίλλει. Αύξηση του μεγέθους των μικροδορυφορικών περιοχών μπορεί να προκαλέσει κληρονομούμενες ασθένειες, όπως η αταξία Friedrich (111, 112).

Τα ρετροτρανσποζόνια μπορούν να προκαλέσουν όχι μόνο γενετική αστάθεια στα γονίδια αλλά και αλλαγή στη δομή του γονιδιώματος. Τα στοιχεία L1 και Alu, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού αντιγράφων τους στο γονιδίωμα, μπορούν να προκαλέσουν δομικές αλλαγές στο γένωμα όπως διπλασιασμούς ελλείμματα και αναστροφές μέσω του μη αλληλόμορφου ομόλογου ανασυνδυασμού (non-allelic homologous recombination). Το γονιδίωμα στον άνθρωπο αποτελείται από μεγάλες και όμοιες διπλασιασμένες περιοχές, γνωστές ως τμηματικοί διπλασιασμοί (segmental duplications) μεγέθους 200 kb έως 400 kb (113). Σημαντική είναι η παρουσία των Alu στις τμηματικές επαναλήψεις, που αποτελούν το 24% των άκρων των επαναλήψεων. Ο ανασυνδυασμός μεταξύ των Alu στοιχείων μπορεί να ερμηνεύσει την προέλευση και την αύξηση των τμηματικών αλληλουχιών, καθώς το 5% του γονιδιώματος έχει διπλασιαστεί τα τελευταία 40 εκατομμύρια χρόνια (114). Θα πρέπει να αναφερθεί πως το σύνολο των ρετρομεταθετών στοιχείων συμβάλλει και στην αύξηση του μεγέθους του γενώματος λόγω του μηχανισμού αντιγραφής επικόλλησης. Τα τελευταία 6 εκατομμύρια χρόνια υπήρξε αύξηση του γονιδιώματος κατά 8Mb λόγω της συσσώρευσης 2000 L1, 7000 Alu και 1000 SVA (115, 116).

Κατά την ένθεση των L1 και των Alu στο γονιδίωμα έχει παρατηρηθεί απομάκρυνση γειτονικών αλληλουχιών από τις θέσεις ενσωμάτωσής τους. Οι ενθέσεις αυτές συσχετίστηκαν τόσο με τη δομική ανακατάταξη των περιοχών καθώς και με τα ελλείμματα μεγέθους από 1 bp έως 800 bp. Σε κυτταρικές καλλιέργειες βρέθηκε πως το 10% του συνόλου των ενθέσεων του L1 δημιούργησε μεγάλα ελλείμματα στο γονιδίωμα (117-119). Επιπλέον ένα μικρό ποσοστό των ενθέσεων των L1 και των Alu (0,7%) οδηγούν σε μη κανονική δομή, υποθέτοντας πως τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια λειτουργούν σα μια δικλείδα ασφαλείας (fail-safe) στη διατήρηση της σταθερότητας του γενώματος (120, 121).

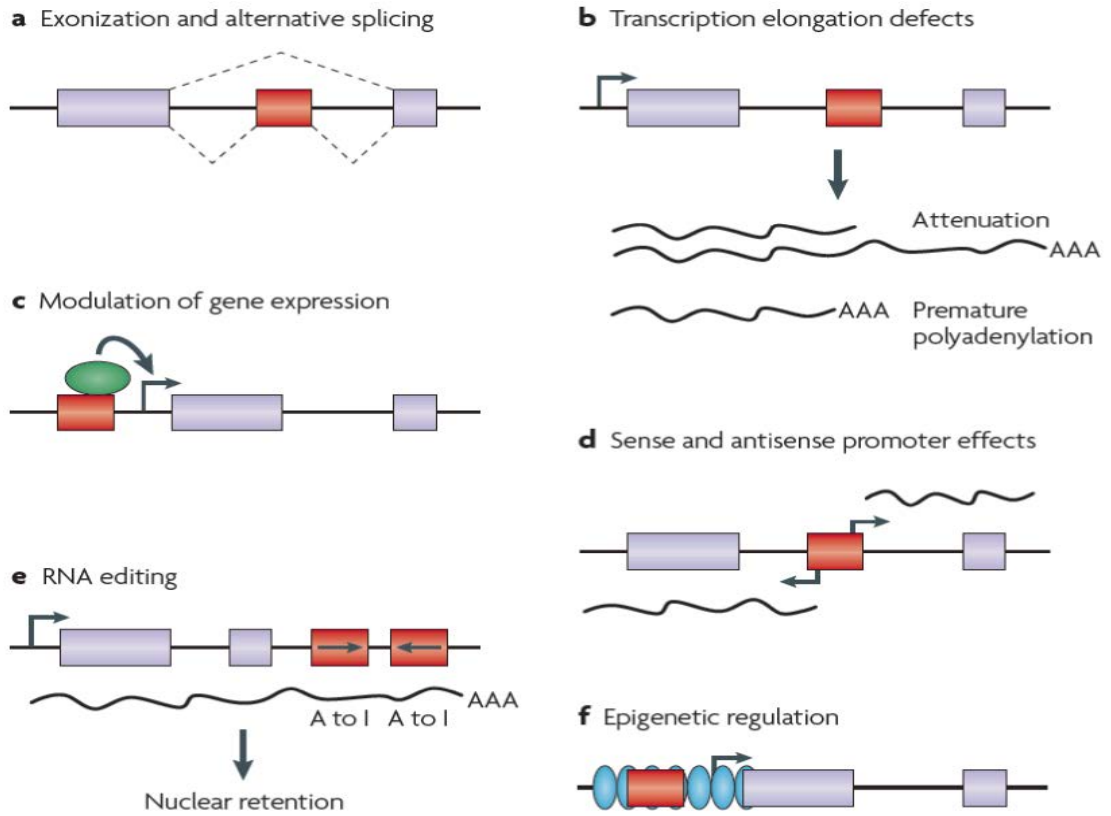
Οι ελλείψεις που παρατηρούνται στο γένωμα, λόγω γεγονότων μεσολαβούμενου ανασυνδυασμού (recombination-mediated deletions, RMD) από Alu και L1, ανέρχονται σε 492 και 73 περιπτώσεις αντίστοιχα. Μέχρι στιγμής έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία περισσότερες από 70 περιπτώσεις ελλειμμάτων λόγω μεσολαβούμενου ανασυνδυασμού από Alu. Αυτές έχουν συσχετιστεί με πληθώρα γενετικών διαταραχών αλλά και με διάφορους τύπους καρκίνου. Αντιθέτως γίνεται αναφορά μόνο σε 3 περιπτώσεις ελλειμμάτων λόγω ανασυνδυασμού μεσολαβούμενου (101, 122-124). Τα μεταθετά στοιχεία συμμετέχουν και στις αναστροφές του γονιδιώματος μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός Alu-Alu και L1-L1 αποτελεί το 20% των αναστροφών στο ανθρώπινο γένωμα. Παρόλο που σε αυτόν τον τύπο ανακατατάξεων δεν παρατηρείται αύξηση ή έλλειμμα αλληλουχιών, φαίνεται ότι συμβάλλουν στη γενετική ποικιλότητα λόγω αναστροφής εξωνίων. Η μεγαλύτερη συχνότητα ανασυνδυασμών των Alu από των L1 μπορεί να είναι αποτέλεσμα ή του μεγαλύτερου αριθμού αντιγράφων Alu ή της τάσης των Alu να εισέρχονται σε περιοχές πλούσιες σε βάσεις G+C ή επειδή φέρουν περιοχές ανασυνδυασμού (125, 126).

Η διακύμανση του αριθμού των γονιδίων μεταξύ των ειδών υποδεικνύει πως νέα γονίδια δημιουργούνται συνεχώς από την ανακατάταξη των ήδη υπάρχοντων γονιδίων (65). Τα L1 και τα SVA μέσω του μηχανισμού μεταγωγής σηματοδοτικών αλληλουχιών (transduction of flanking sequences) μπορούν στις νέες θέσεις ένθεσης να φέρουν σηματοδοτικές αλληλουχίες καθοδικά του 3' άκρου τους. Λόγω του ότι τα L1 έχουν ασθενές σήμα πολυαδενυλίωσης, η μεταγραφή τους δε σταματάει στο 3' άκρο τους αλλά σε άλλο ισχυρό σήμα καθοδικά του 3' άκρου τους, με αποτέλεσμα την αντιγραφή εξωνίων αλλά και ολόκληρων γονιδίων. Ο μηχανισμός αυτός οδηγεί στη μεταγωγή εξωνίων (exons shuffling) και ρυθμιστικών περιοχών σε νέες θέσεις κατά τη διάρκεια της μετάθεσης των ρετρομεταθετών, προκαλώντας έτσι γενετικές αλλαγές στο γονιδίωμα, όπως τη δημιουργία νέων γονιδίων. Σε αντίθεση με τη μεταγωγή σηματοδοτικών αλληλουχιών, κατά τη ρετρομετάθεση γονιδίων (gene retrotransposition) γίνεται διπλασιασμός και ένθεση μόνο κωδικών αλληλουχιών και όχι αλληλουχιών του ρετρομεταθετού. Κατά τη ρετρομετάθεση γονιδίων, τα mRNAs των γονιδίων χρησιμοποιούν το μηχανισμό της ανάστροφης μεταγραφής του L1 για τη δημιουργία του cDNA, το οποίο εν συνεχεία ενσωματώνεται μέσα στο γένωμα σε νέες θέσεις που έχουν δημιουργηθεί από τη δράση της ενδονουκλεάσης του L1. Ο

μηχανισμός αυτός έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία αντιγράφων μη λειτουργικών γονιδίων μέσα στο γονιδίωμα, γνωστά ως ρετροψευδογονίδια. Τα ρετροψευδογονίδια δε μεταγράφονται λόγω της έλλειψης υποκινητή (30). Η μεγάλη πρωτεωμική ποικιλομορφία που εμφανίζει το ανθρώπινο γονιδίωμα οφείλεται στους διαφορετικούς τύπους RNA που δημιουργούνται από το εναλλακτικό μάτισμα (alternative splicing). Είναι αξιοσημείωτο πως οι αλληλουχίες των ρετρομεταθετών στοιχείων μπορούν να ενσωματωθούν ως εξώνια γονιδίων, μια διαδικασία γνωστή ως εξωνοποίηση (exonization). Η διαδικασία αυτή μπορεί να προκαλέσει εναλλακτικό μάτισμα και τη μετάφραση πλήρως λειτουργικών ή ακόμα και κολοβών (truncated) πρωτεϊνών (127, 128). Η εξωνοποίηση οφείλεται στο γεγονός πως αρκετά ρετρομεταθετά φέρουν κρυφές περιοχές δότη και αποδέκτη ματίσματος (donor-acceptor splice sites). Τα L1 μεταθετά στοιχεία μπορούν να δημιουργήσουν χιμαιρικά ρετρογονίδια που υπερεκφράζονται. Τα χιμαιρικά ρετρογονίδια είναι μικρά πυρηνικά RNAs που πιθανόν να προήλθαν από την ανάστροφη μεταγραφή των μεταγράφων των L1 ή των Alu (129).

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη του ανθρώπου σε επίπεδο DNA. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω, τα ρετρομεταθετά συμβάλλουν στην εξέλιξη του ανθρώπου και σε επίπεδο RNA επιδρώντας σε αυτό με διάφορους μηχανισμούς (Εικόνα 2.7). Ένας τέτοιος μηχανισμός είναι η επεξεργασία του RNA (RNA editing) με τον οποίο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες RNA τροποποιούνται στη διάρκεια και στο τέλος της μεταγραφής. Ένα είδος επεξεργασίας του RNA είναι η αντικατάσταση της αδενοσίνης σε ιοσίνη (A-I) σε δίκλινα μόρια RNA (dsRNA). Η A-I αντικατάσταση μπορεί να δημιουργήσει ή να εξαλείψει περιοχές δότη και αποδέκτη ματίσματος και ως εκ τούτου μπορεί να προκαλέσει εναλλακτικό μάτισμα αλλά και εξωνοποίηση των αλληλουχιών. Η A-I αντικατάσταση λαμβάνει χώρα σε dsRNA που σχηματίζονται από ανεστραμμένα Alu και βρίσκονται είτε σε εσώνια είτε σε UTRs των mRNAs και αποτελούν το 90% της επεξεργασίας του RNA στον άνθρωπο (130-134). Τα ρετρομεταθετά μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση γειτονικών γονιδίων με πολλούς τρόπους. Τα Alu και τα L1 στοιχεία μπορούν να προσφέρουν νέες περιοχές ματίσματος οι οποίες οδηγούν σε εναλλακτικό μάτισμα και σε εξωνοποίηση. Η ένθεση των L1 σε εσώνια προκαλεί αναστολή της μεταγραφικής επιμήκυνσης είτε λόγω

πρώρου σήματος πολυαδελυνίωσης που φέρουν τα L1 στοιχεία, είτε λόγω αδυναμίας της RNA πολυμεράσης II να αναγνωρίσει τα L1.



Εικόνα 2.7: Επιπτώσεις των ρετροτρανσποζονίων στην έκφραση του ανθρώπινου γονιδίου A) Το ρετροτρανσποζόνιο (κόκκινο) μπορεί να «προσληφθεί» και να ενσωματωθεί ως εξώνιο (μπλε) σε ένα γονίδιο. Αυτή η διαδικασία συχνά σχετίζεται με εναλλακτικό μάτισμα (Διακεκομμένες γραμμές). Β) Η ύπαρξη ενός ρετρομεταθετού (κόκκινο) στο εσώνιο (μπλε) ενός γονιδίου μπορεί να οδηγήσει σε ελαττωματική επιμήκυνση της μεταγραφής, όπως ο πρόωρος τερματισμός. Γ) Το ρετροτρανσποζόνιο (κόκκινο) μπορεί να φέρει θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων (πράσινο) επηρεάζοντας την έκφραση γειτονικών γονιδίων (μπλε). Δ) Το ρετροτρανσποζόνιο (κόκκινο) μπορεί να φέρει στην κωδική και στη μη-κωδική αλυσίδα υποκινητές (οριζόντια βέλη) από όπου μπορεί να ξεκινήσει η μεταγραφή ανοδικά και καθοδικά. Ε) Η παρουσία δύο στοιχείων Alu (κόκκινο), με αντίθετη κατεύθυνση σε μετάγραφα γονιδίων οδηγεί σε αντικατάσταση της Αδενοσίνης σε Ιοσίνη οδηγώντας στην καταστολή της έκφρασης μέσω της διατήρησης του μετάγραφου στον πυρήνα του κυττάρου. ΣΤ) Τα ρετροτρανσποζόνια (κόκκινο) μπορεί να είναι μεθυλιωμένα, με αποτέλεσμα η μεθυλίωση να ξεκινήσει και να εξαπλωθεί (οριζόντιο βέλος και μπλε). Αυτό επηρεάζει την έκφραση των γειτονικών γονιδίων (65).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Μέχρι πρότινος στη βιολογία ίσχυε το δόγμα πως τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των οργανισμών οφείλονται μόνο στη σύσταση του γενωμικού DNA. Αυτή η άποψη, όμως, δεν μπορούσε να δώσει ερμηνεία ούτε στη μορφολογική και λειτουργική ποικιλότητα ενός πληθυσμού αλλά ούτε και σε φαινόμενα όπου οργανισμοί με πανομοιότυπο γονιδίωμα έχουν διαφορετικό φαινότυπο, όπως στα μονοζυγωτικά δίδυμα ή στους κλωνοποιημένους οργανισμούς. Όλα αυτά τα φαινόμενα, εν μέρει, μπορούν να ερμηνευθούν με τον όρο «**επιγενετική**». Ο όρος επιγενετική πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε το 1942 από τον C. H. Waddington ως μια σύνθετη λέξη προερχόμενη από τις λέξεις επιγένεση (εξέλιξη των οργανισμών) και γενετική (μελέτη της κληρονομικότητας). Με τον όρο αυτό θέλησε να περιγράψει τον τρόπο με τον οποίο τα γονίδια και οι πρωτεΐνες αλληλοεπιδρούν με διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες ώστε να προκύψει ο φαινότυπος (135). Ο όρος επιγενετική, το 1996 ορίστηκε από τον Riggs ως «οι μειωτικές και/ή μιτωτικές κληρονομούμενες αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων οι οποίες δεν επιφέρουν αλλαγές στην αλληλουχία του DNA» (136). Σήμερα η επιγενετική αποτελεί το συνδετικό κρίκο του γονιδιώματος, του γονοτύπου και των περιβαλλοντικών επιπτώσεων, το σύνολο των οποίων ορίζει το μεταγραφικό μοτίβο, δηλαδή το φαινότυπο (137). Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι πληροφορίες οι οποίες εγκαθιδρύονται στο γονιδίωμα και αποτελούν σταθερά και κληρονομούμενα χαρακτηριστικά υπεύθυνα για την οργάνωση και τη δομή της χρωματίνης, ελέγχοντας έτσι τη μεταγραφική δραστηριότητα του οργανισμού. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις συμβάλλουν σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών στον οργανισμό όπως στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων και των microRNAs, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στην αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος, στη γονιδιωματική αποτύπωση (genomic imprinting), κ.ά (138). Το σύνολο των τροποποιήσεων αυτών ονομάζεται επιγονιδίωμα. Οι κύριοι μηχανισμοί των επιγενετικών τροποποιήσεων είναι οι μετα-μεταφραστικές

τροποποιήσεις ιστονών (histone posttranslational modifications, HPTMs) και η μεθυλίωση του DNA. Η σπουδαιότητα των επιγενετικών τροποποιήσεων αντικατοπτρίζεται στο γεγονός πως, όταν εγκαθιδρύονται στο γονιδίωμα σε λάθος σημείο ή σε λάθος χρόνο, προκαλούν δυσλειτουργία στην επιγενετική ρύθμιση με αποτέλεσμα την εμφάνιση ασθενειών (139).

3.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΙΣΤΟΝΩΝ

Το DNA όλων των ευκαρυωτικών κυττάρων είναι οργανωμένο σε ένα σύμπλοκο αποτελούμενο από ιστόνες, μη ιστονικές πρωτεΐνες και από την χρωματίνη, η οποία αποτελεί την κύρια δομή των χρωμοσωμάτων (140). Η χρωματίνη διακρίνεται στην ετεροχρωματίνη και την ευχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη, βρίσκεται στο κεντρομερίδιο και στα τελομερή, είναι πλούσια σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ((141), φέρει κάποια γονίδια, είναι μεταγραφικά ανενεργή και αποτελεί τη συμπυκνωμένη μορφή χρωματίνης. Αντίθετα, η ευχρωματίνη είναι λιγότερο συμπυκνωμένη, αποτελεί το μεγαλύτερο τμήμα του γενώματος στον άνθρωπο (92%), είναι μεταγραφικά ενεργή και φέρει το σύνολο των γονιδίων (142, 143).

Το πρώτο και βασικό επίπεδο οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα (144). Το νουκλεόσωμα αποτελείται από πέντε είδη ιστονών τις H1, H2A, H2B, H3 και H4. Ο πυρήνας του νουκλεοσώματος αποτελείται από ένα σύμπλοκο οκτώ ιστονών: δυο μόρια από τις ιστόνες H2A, H2B, H3 και H4. Γύρω από αυτό περιελίσσεται ένα δίκλωνο μόριο DNA μεγέθους 147 ζευγών βάσεων. Ανάμεσα στα γειτονικά νουκλεοσώματα βρίσκεται ένα συνδετικό DNA (linker DNA), μεγέθους 10-80bp, που μαζί με τη συνδετική ιστόνη H1 (linker histone) φέρουν το ένα νουκλεόσωμα κοντά στο άλλο σε μια επαναληπτική ακολουθία (145, 146). Οι τροποποιήσεις των ιστονών, οι οποίες αποτελούν τους κυριότερους μηχανισμούς επιγενετικής τροποποίησης, μπορεί να συμβούν είτε στα αμινοτελικά άκρα είτε στα καρβοξυλικά άκρα των ιστονών. Οι αλλαγές στα καρβοξυλικά άκρα συσχετίζονται με μη ιστονικά πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία μπορούν να μετακινήσουν ή ακόμα και να εξαλείψουν ένα νουκλεόσωμα. Ένα τέτοιο σύμπλοκο είναι το ATP-εξαρτώμενο σύμπλοκο τροποποίησης της χρωματίνης (ATP - depended chromatin remodeling complexes). Οι αλλαγές στα αμινοτελικά άκρα επιφέρουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. Ο ρόλος της χρωματίνης δεν περιορίζεται μόνο στη συμπύκνωση και στην προστασία του DNA αλλά

επεκτείνεται στη διατήρηση της γενετικής πληροφορίας και στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης (3 epigenetics book). Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί οι εξής οκτώ διαφορετικοί μηχανισμοί τροποποίησης των ιστονών:

- ακετυλίωση της λυσίνης,
- μεθυλίωση της λυσίνης και αργινίνης,
- φωσφορυλίωση της σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης,
- ουβικιτινυλίωση της λυσίνης (ubiquitylation),
- Σουμουλίωση της λυσίνης (SUMOylation, Small Ubiquitin-like Modifier or SUMO proteins),
- ADP ριβοσυλίωση του γλουταμινικού οξέος (ADP ribosylation, προσθήκη μιας ή περισσότερων ADP-ριβοζών σε μια πρωτεΐνη),
- κιτρουλινίωση (deimination, αντικατάσταση αργινίνης με κιτρουλίνη) και
- δημιουργία ισομερούς της προλίνης (proline isomerization).

Αυτές οι τροποποιήσεις των ιστονών συμβαίνει στα αμινοτελικά άκρα των ουρών των ιστονών που δημιουργούν το οκταμερές. Οι ουρές αυτές προεξέχουν από το νουκλεόσωμα. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στις τροποποιήσεις των ιστονών ονομάζονται «ιστονικός κώδικας» και είναι υπεύθυνες ευθύνονται για αλλαγές στη δομή της χρωματίνης.

3.3 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

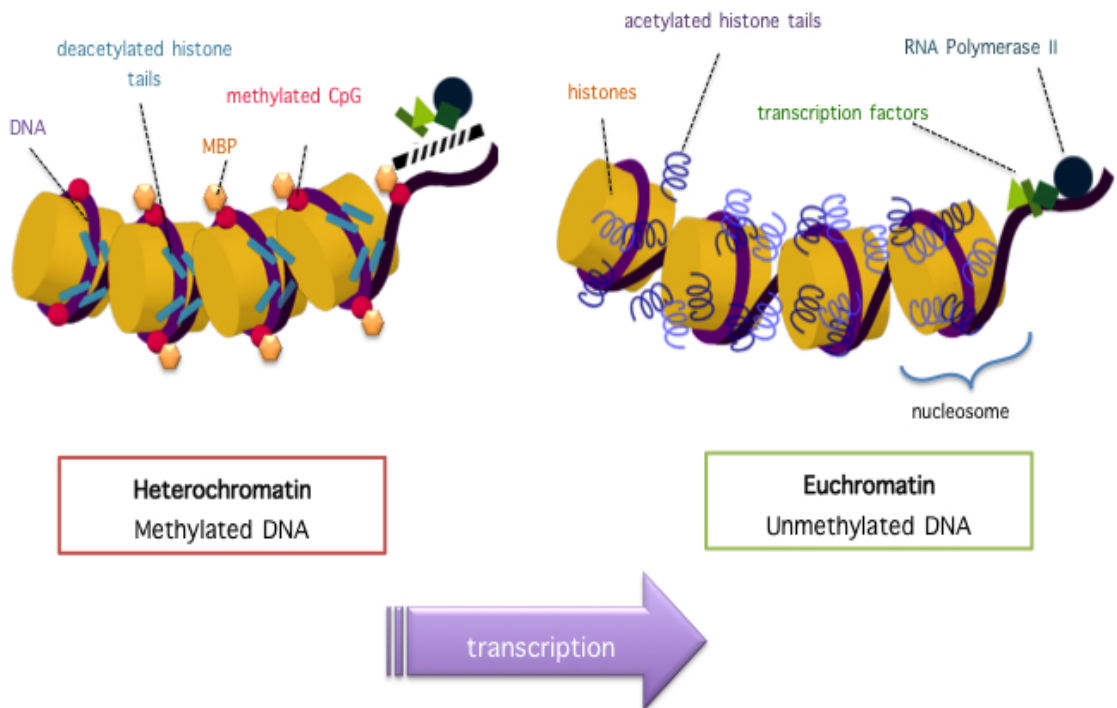
Σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό είναι σαφές πως για την ανάπτυξή του, εκτός από τον αριθμό των γονιδίων που υπάρχουν στην αλληλουχία του DNA, απαραίτητες είναι και οι επιγενετικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν στην αλληλουχία του DNA, οι οποίες ορίζουν το πότε και που θα εκφραστούν τα γονίδια. Η μόνη μελετημένη επιγενετική τροποποίηση του DNA είναι η μεθυλίωση. Η μεθυλίωση του DNA στα θηλαστικά είναι μια χημική διεργασία και αφορά την προσθήκη μιας μεθυλομάδας (-CH₃) στο 5' άτομο άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης στα CpG δινουκλεοτίδια. Εκτός από τη μεθυλίωση-της κυτοσίνης, έχουν βρεθεί και άλλοι δυο τύποι μεθυλίωσης: α) η μεθυλίωση της αδενίνης στο 6' άτομο αζώτου σε βακτήρια και άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (147, 148) και β) η μεθυλίωση της κυτοσίνης στο 4' άτομο αζώτου μόνο σε βακτήρια (149, 150).

Τα CpG δινουκλεοτίδια απαντώνται στο γένωμα των θηλαστικών σε πολύ μικρό ποσοστό, περίπου στο 1%, ενώ το 70% αυτών έχει βρεθεί πως είναι μεθυλιωμένα (151). Τα CpGs δινουκλεοτίδια εμφανίζονται σε πολύ μεγάλη συχνότητα σε περιοχές που ονομάζονται CpG νησίδες (CpGs islands). Ως CpG νησίδες ορίζονται τα επαναλαμβανόμενα CpGs δινουκλεοτίδια το μέγεθος των οποίων ανέρχεται σε 200 έως 2000 ζεύγη βάσεων. Οι νησίδες βρίσκονται σε περιοχές, με υψηλό ποσοστό σε γουανίνη και κυτοσίνη, μεγαλύτερο από 50% (152, 153). Η μεθυλίωση του DNA στις CpG νησίδες πραγματοποιείται από τις μεθυλάσες ή DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNA methyltransferases, DNMTs), μια οικογένεια ενζύμων, η οποία καταλύει την προσθήκη μεθυλομάδας στο DNA. Οι DNMTs χρησιμοποιούν σα δότη της μεθυλομάδας την S-αδενοσινομεθειονίνη (SAM). Στον άνθρωπο έχουν βρεθεί πέντε τύποι DNMTs: η DNMT1, η DNMT2, η DNMT3α, η DNMT3β και η DNMT3L. Η πρώτη μεθυλοτρανσφεράση που περιγράφηκε είναι η DNMT1 και εκφράζεται σε υψηλότερο ποσοστό στα σωματικά κύτταρα σε σχέση με τις άλλες μεθυλοτρανσφεράσες. Ο κύριος ρόλος της είναι η διατήρηση του μοτίβου της μεθυλίωσης στο ημιμεθυλιωμένο DNA κατά την αντιγραφή των χρωμοσωμάτων (154) αλλά και κατά την επιδιόρθωση του DNA (155, 156). Πρόσφατες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα έδειξαν πως η DNMT1 μπορεί να έχει και δράση de novo μεθυλοτρανσφεράσης (νέο πρότυπο μεθυλίωσης) σε ογκοκατασταλτικά γονίδια (157). Η DNMT2 έχει ήπια δράση μεθυλοτρανσφεράσης και συμμετέχει στη μεθυλίωση του RNA (158). Οι μεθυλοτρανσφεράσες DNMT3α και DNMT3β έχουν δράση de novo μεθυλίωσης και εκφράζονται σε υψηλό ποσοστό στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης με σκοπό την εγκαθίδρυση νέου προτύπου μεθυλίωσης στα εμβρυϊκά κύτταρα. Αντίθετα στα διαφοροποιημένα κύτταρα τα επίπεδα έκφρασης των DNMT3α και των DNMT3β είναι χαμηλά (159). Η DNMT3L φαίνεται να αλληλοεπιδρά πυρηνικά και να ενεργοποιεί τις DNMT3α και τις DNMT3β (160, 161). Η DNMT3L ενώ είναι ανενεργή, είναι απαραίτητη για την εγκαθίδρυση της μητρικής γονιδιακής αποτύπωσης.(162)

Η μεθυλίωση του DNA στα θηλαστικά αποτελεί μια δυναμική αλλά και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών και αποτελεί ταυτόχρονα και το σημαντικότερο επιγενετικό παράγοντα στη μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων (gene silencing). Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να καταστείλει τη

μεταγραφή των γονιδίων είτε άμεσα είτε έμμεσα τόσο σε επίπεδο χρωματίνης όσο και σε επίπεδο γονιδίου.

Οι CpGs νησίδες στον άνθρωπο συναντώνται στο 60% των υποκινητών των γονιδίων και συνήθως είναι απομεθυλιωμένες στα φυσιολογικά κύτταρα, αν και έχει βρεθεί πως το 6% των νησίδων είναι μεθυλιωμένο κατά ιστοειδικό τρόπο σε διαφοροποιημένα κύτταρα αλλά και κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη. Η μεθυλίωση των CpGs νησίδων συσχετίζεται με την αποσιώπηση των γονιδίων, μια διαδικασία παρόμοια με αυτή της γονιδιωματικής αποτύπωσης και της αδρανοποίησης του Χ χρωμοσώματος (153, 163). Η μεθυλίωση των CpGs νησίδων στους υποκινητές αποτελεί το έναυσμα για την αποσιώπηση των γονιδίων καθιστώντας τα μεταγραφικά ανενεργά. Τα μεθυλιωμένα CpG μπορούν να καταστείλουν άμεσα τη μεταγραφή γονιδίων, εμποδίζοντας τη σύνδεση μεταγραφικών παραγόντων και ρυθμιστικών πρωτεϊνών στο γονίδιο, αλλά και έμμεσα αλλάζοντας τη δομή της χρωματίνης. Στον έμμεσο τρόπο αποσιώπησης, ειδικές πρωτεΐνες (Methyl Binding CpG Proteins, MBP) αναγνωρίζουν και προσδέονται στις μεθυλιωμένες νησίδες. Εν συνεχεία, στρατολογούν παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως η αποκετυλάση των ιστονών (HDAC-Histone Deacetylases) δημιουργώντας έτσι ένα σύμπλοκο (164). Η αποκετυλίωση των ιστονών είναι ένας μετα-μεταφραστικός μηχανισμός που συμβάλλει στην αποσιώπηση της μεταγραφής και στο σχηματισμό της ετεροχρωματίνης (165). Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από συμπυκνωμένη δομή, με τις CpG νησίδες να είναι μεθυλιωμένες αποτρέποντας τη μεταγραφική ενεργότητα των αλληλουχιών της ενώ οι ιστόνες είναι μερικώς ακετυλιωμένες. Εν αντιθέσει η ευχρωματίνη είναι λιγότερο συμπυκνωμένη, οι CpG νησίδες είναι συνήθως απομεθυλιωμένες, επιτρέποντας έτσι τη μεταγραφή των γονιδίων, ενώ οι ιστόνες της είναι ακετυλιωμένες (Εικόνα 3.1) (166).



Εικόνα 3.1: Απεικόνιση ετεροχρωματίνης και ευχρωματίνης.

Το μεγαλύτερο μέρος της μεθυλίωσης στα κύτταρα, σε ποσοστό 90%, αφορά τη μεθυλίωση των CpGs νησίδων του δορυφορικού DNA αλλά και των μεταθετών στοιχείων LINEs, SINEs, HERVs και των ενδοκυστικών σωματιδίων τύπου A (Intracisternal A Particles, IAPs). Η μεθυλίωση των υποκινητών των ρετρομεταθετών στοιχείων αποτελεί μηχανισμό ασφαλείας για το κύτταρο έναντι της ρετρομετάθεσής τους, αποτρέποντας τη συμμετοχή τους σε φαινόμενα ομόλογου ανασυνδυασμού. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό των HERV, παρόλο που αυτά τα μεταθετά στοιχεία δεν είναι πλούσια σε CpGs νησίδες. Είναι γνωστό ότι το μοτίβο της DNA μεθυλίωσης διαφέρει τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας των HERV-K όσο και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους (167, 168).

3.4 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Στους διπλοειδείς οργανισμούς, τα περισσότερα μητρικά και πατρικά αλληλόμορφα των αυτοσωμικών γονιδίων συνεισφέρουν ισότιμα στον οργανισμό. Υπάρχει όμως και μια ομάδα γονιδίων που η έκφρασή τους εξαρτάται από τη γονεϊκή προέλευση τους, ελεγχόμενη

από επιγενετικούς μηχανισμούς. Ο μηχανισμός που καθορίζει την επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων από το ένα αλληλόμορφο, πατρικής ή μητρικής προέλευσης, λέγεται γονιδιωματική αποτύπωση. Η γονιδιακή έκφραση του ενός μόνο αλληλομόρφου επιτελείται μέσω επιγενετικών μηχανισμών, όπως και η ακετυλίωση των ιστονών, η μεθυλίωση κυτοσινών και ιστονών (169).

Το γονιδίωμα των διπλοειδών κυττάρων φέρουν δυο χρωμοσώματα, ένα μητρικής και ένα πατρικής προέλευσης. Οι περιπτώσεις όπου και τα δυο ομόλογα χρωμοσώματα προέρχονται μόνο από τη μητέρα ή μόνο από τον πατέρα, χαρακτηρίζεται σαν μονογονεϊκή δισωμία (uniparental disomy, UPD). Η μονογονεϊκή δισωμία μπορεί να αφορά ολόκληρο το χρωμόσωμα ή ένα μέρος του (segmental UPD). Στην μονογονεϊκή δισωμία έχουμε ετεροδισωμία εαν υπάρχει ένα αντίγραφο από κάθε ομόλογο χρωμόσωμα του ίδιου γονέα ή ισοδισωμία όταν υπάρχουν δυο αντίγραφα του ίδιου γονεϊκού χρωμόσωματος (170).

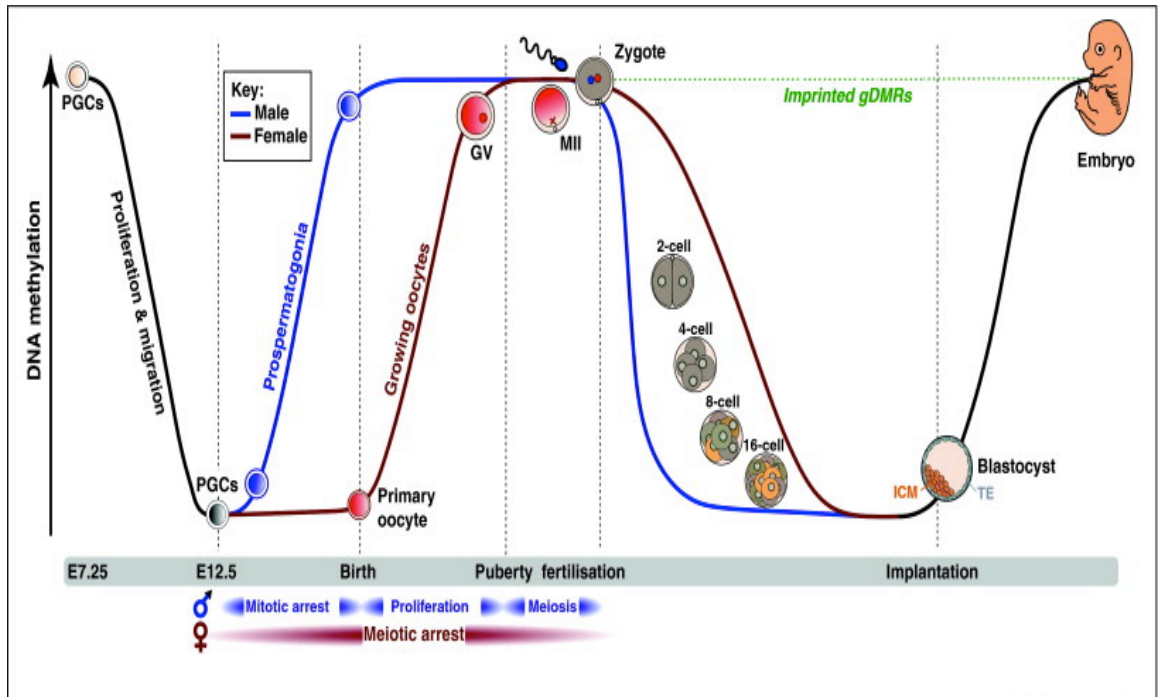
Η παραδοχή πως το μητρικό και πατρικό γένωμα δεν συνεισφέρουν ισότιμα στην ανάπτυξη ενός οργανισμού έγινε το 1984 με μελέτες που στηρίζονταν στη δημιουργία και την ανάπτυξη εμβρύων με πατρικό διπλοειδές γένωμα (androgenotes) και με μητρικό διπλοειδές γένωμα (gynogenotes). Στα μητρικά μονογονεϊκά έμβρυα υπήρξε μικρή ανάπτυξη του εμβρύου αλλά με περιορισμένη έως παντελή ανάπτυξη εξωεμβρυικών ιστών (πλακούντας), εν αντιθέσει με τα πατρικά μονογονεϊκά έμβρυα όπου παρατηρήθηκε ανάπτυξη εξωεμβρυικών ιστών (πλακούντας) αλλά χωρίς καμία ανάπτυξη του εμβρύου. Και στις δυο περιπτώσεις όμως επήρθε ο θάνατος των εμβρύων. Οι δυο αυτοί αντίθετοι φαινότυποι οδήγησαν στην υπόθεση πως το πατρικό γένωμα είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του πλακούντα ενώ το μητρικό γένωμα είναι απαραίτητο για τη δημιουργία του εμβρύου. Οι παρατηρήσεις αυτές οδήγησαν στα εξής συμπεράσματα: α) τα γονεϊκά γονιδιώματα δε συνεισφέρουν ισότιμα στην ανάπτυξη του οργανισμού και β) η παρουσία και των δυο είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου (171-173). Ίσως τα γονίδια τα οποία προέρχονται από το σπερματοζώαριο να προωθούν την ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ αυτά που προέρχονται από το ωάριο να δρουν κατασταλτικά για το έμβρυο (174, 175).

Μέχρι σήμερα στον άνθρωπο ο αριθμός των γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση ανέρχεται στα 100. Τα γονίδια αυτά δεν βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένα στο γονιδίωμα αλλά βρίσκονται σε συστοιχίες (clusters) των 3-15 γονιδίων (176). Η πλειονότητα των γονιδίων κατά την εμβρυογένεση φέρουν το μητρικό αποτύπωμα ενώ το πατρικό αποτύπωμα το φέρουν μόνο τα γονίδια H19, Gtl2 and Rasgrf1 (177). Ο έλεγχος της γονιδιακής αποτύπωσης γίνεται σε χρωμοσωμικό και όχι σε γονιδιακό επίπεδο. Η επιλεκτική έκφραση των γονεϊκών αλληλομόρφων, με γονιδιακή αποτύπωση, βασίζεται σε επιγενετικά σήματα. Η μεθυλίωση του DNA και των ιστονών είναι ένα τέτοιο σήμα. Τα γονεϊκά αλληλόμορφα των αποτυπωμένων γονιδίων φέρουν περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση (Differentially Methylated Regions, DMRs), οι οποίες είναι πλούσιες σε CpGs δινοκλεοτίδια και είναι μεθυλωμένες μόνο στο ένα αλληλόμορφο. Οι DMRs φαίνεται να φέρουν τα κέντρα ελέγχου της γονιδιακής αποτύπωσης (imprinting centre, IC) και δρουν in cis ελέγχοντας τοπικά την εγκατάσταση και τη διατήρηση της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Οι DMRs διακρίνονται στις πρωτογενείς περιοχές, στις οποίες η μεθυλίωση εγκαθιδρύεται κατά τη γαμετογένεση και παραμένει σε όλη την φάση της ανάπτυξης, και στις δευτερογενείς περιοχές όπου η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα στα πρώτα στάδια μετά τη γονιμοποίηση (178-180). Επίσης οι δευτερογενείς περιοχές μπορεί να προκύψουν και από την επέκταση της μεθυλίωσης (spreading) στις πρωτογενείς, όπως συμβαίνει στην αποσιώπηση του X χρωμοσώματος (181). Το σπέρμα συνεισφέρει DMRs στο ζυγωτό οι οποίες συναντώνται κυρίως σε διαγονιδιακές περιοχές (intragenic) ενώ το ωάριο συνεισφέρει DMRs, οι οποίες είναι πλούσιες σε CpGs νησίδες και συναντώνται σε υποκινητές γονιδίων (177). Ένα άλλο επιγενετικό σήμα ρύθμισης της έκφρασης των αλληλομόρφων αποτυπωμένων γονιδίων είναι η μεθυλίωση των ιστονών. Μελέτες έδειξαν πως η μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 σχετίζεται με την έκφραση του αλληλομόρφου, ενώ η μεθυλίωση στη λυσίνη 9 συσχετίστηκε με την αποσιώπηση του αλληλομόρφου (182, 183).

Η πλειοψηφία των γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση έχει βρεθεί πως είναι μεθυλωμένη στο μητρικό γένωμα (184). Τα γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση αντιγράφονται ασύγχρονα, πρώτα αντιγράφονται τα γονίδια πατρικής προέλευσης και έπειτα τα γονίδια μητρικής προέλευσης (185, 186).

3.5 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Στα θηλαστικά ο επαναπρογραμματισμός του γενώματος των γαμετικών κυττάρων είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξή τους. Επιτελείται κυρίως μέσω της μεθυλίωσης του DNA και συμβαίνει στην φάση της γαμετογένεσης και κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Κατά τη γαμετογένεση, αρχικά πραγματοποιείται η διαγραφή των επιγενετικών σημάδιων που φέρουν από την προηγούμενη γενιά, και εν συνεχεία πραγματοποιείται η εγκαθίδρυση των νέων επιγενετικών σημάδιων. Τα επιγενετικά σημάδια που φέρουν τα γαμετικά κύτταρα και συσχετίζονται με το φύλο του γονέα παραμένουν και κληρονομούνται ως έχουν {Scarano, 2005 #509}. Ο δεύτερος επαναπρογραμματισμός του γενώματος συμβαίνει αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, όπου τα αποτυπωμένα γονίδια των γαμετών δεν υπόκεινται σε επαναπρογραμματισμό (187, 188). Η διαδικασία του επαναπρογραμματισμού ρυθμίζεται από τις DNMTs οι οποίες έχουν η κάθε μία και διαφορετικό διαφορετικό ρόλο. Η DNMT1 είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του μοτίβου μεθυλίωσης ενώ η DNMT3a και η DNMT3b συμμετέχουν στην εγκαθίδρυση του προτύπου της μεθυλίωσης.



Εικόνα 3.2: Επαναπρογραμματισμός της μεθυλίωσης των θηλαστικών (ποντίκι) στην διάρκεια της γαμετογένεσης και της εμβρυογένεσης. **Μαύρη** γραμμή: απομεθυλίωση των PGCs κατά τη μετανάστευσή τους στις αρχέγονες γονάδες. **Μπλε** γραμμή: το πρότυπο μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης των αρσενικών γαμετών (σπερματοζωάρια). **Κόκκινη** γραμμή: το πρότυπο μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης θηλυκών γαμετών (ωάριο). **Πράσινη** γραμμή: πρότυπο μεθυλίωσης των περιοχών που υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση (189).

3.5.1 ΕΠΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΣΤΑ ΑΡΡΕΝΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Ο πρώτος κύκλος επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης του DNA των γαμετικών κυττάρων ξεκινάει κατά τη μετανάστευση των PGCs από την αλλαντοΐδα στη γενετική πτυχή. Τα PGCs πριν μεταναστεύσουν είναι μεθυλιωμένα ενώ κατά τη μετανάστευσή τους στις αρχέγονες γονάδες αρχίζουν να απομεθυλιώνονται σταδιακά. Με την ολοκλήρωση της απομεθυλίωσης τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (προσπερματογόνια) εισέρχονται σε μιτωτική παύση (mitotic arrest) (190, 191). Στην απομεθυλίωση των αρρένων γαμετικών κυττάρων συμμετέχει, είτε παθητικά είτε ενεργά, η οικογένεια πρωτεϊνών TET (Ten Eleven Translocation), οι οποίες καταλύουν την 5'-μεθυλοκυτοσίνη (5mC) σε 5'-υδρόξυ-

μεθυλοκυτοσίνη (5hmC) τόσο in vivo όσο και in vitro (192, 193). Η 5hmC μπορεί να διευκολύνει την παθητική απομεθυλίωση του DNA αποκλείοντας πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη συντήρηση της μεθυλίωσης, όπως η DNMT1 (194), ή συμμετέχοντας ενεργά αποτελώντας ένα ενδιάμεσο μονοπάτι στην απομεθυλίωση του DNA (195). Η de novo μεθυλίωση των γονιδίων των γαμετικών κυττάρων που υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση ξεκινάει με την είσοδο των προσπερματογονίων στη φάση της μίτωσης και ολοκληρώνεται στο στάδιο της παχυταινίας. (196) Τα επιγενετικά σήματα προσδίδουν στα ώριμα ανδρικά γαμετικά κύτταρα χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των εμβρυϊκών στελεχειαίων κυττάρων (Embryonic Stem Cells) και των εμβρυϊκών γαμετικών κυττάρων (Embryonic Germ Cells). Μελέτες στα σπερματοζωάρια έδειξαν πως οι υποκινητές των μεταγραφικών παραγόντων (Oct4, SOX2, Nanog,) είναι υπομεθυλιωμένοι και συνδεδεμένοι με ιστόνες (197-199).

Η διαδικασία επαναπρογραμματισμού στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα ακολουθεί παρόμοια πορεία με αυτή των αρρένων με τη διαφορά πως η de novo μεθυλίωση αρχίζει μετά τη γέννηση και καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης του ωαρίου ενώ ολοκληρώνεται στο στάδιο της διπλοταινίας στη μειωτική πρόφαση I. Ταυτόχρονα με την απομεθυλίωση των ωαρίων, η οποία ξεκινάει κατά τη διάρκεια μετανάστευσης στις αρχέγονες γονάδες, πραγματοποιείται και σταδιακή επαναμεθυλίωση του απενεργοποιημένου Χ χρωμοσώματος (200, 201).

Τα ώριμα γαμετικά κύτταρα και των δυο φύλων εμφανίζουν διαφορές στο μοτίβο μεθυλίωσης και οργάνωσης. Η μεθυλίωση στα σπερματοζωάρια είναι ισχυρότερη από ότι στα ωάρια, το μοτίβο μεθυλίωσης στα αποτυπωμένα γονίδια και στις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες των αρσενικών και των θηλυκών γαμετών είναι διαφορετικό και τέλος το γονιδίωμα στα ωάρια είναι οργανωμένο σε ιστόνες ενώ στα σπερματοζωάρια το μεγαλύτερο μέρος των ιστονών έχει αντικατασταθεί από πρωταμίνες.

3.5.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΖΥΓΩΤΟΥ

Ο δεύτερος κύκλος επαναπρογραμματισμού του γενώματος στα θηλαστικά συμβαίνει αμέσως μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο. Όπως και στη

γαμετογένεση, έτσι και στην εμβρυογένεση πραγματοποιείται καθολική απομεθυλίωση σχεδόν ολόκληρου του πατρικού και του μητρικού γονιδιώματος η οποία και ολοκληρώνεται στα πρώτα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και πριν από το δεύτερο κύκλο επαναπρογραμματισμού λαμβάνει χώρα η ανακατάταξη της χρωματίνης του σπερματοζωαρίου, όπου το πατρικό γονιδίωμα αποσυμπυκνώνεται και οι πρωταμίνες αντικαθίστανται από ιστόνες (202). Εν συνεχεία το πατρικό γονιδίωμα απομεθυλιώνεται ενεργά μέχρι την ολοκλήρωση της πρώτης αυλάκωσης ενώ το μητρικό γένωμα απομεθυλιώνεται παθητικά μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων (μορίδιο). Τα γονίδια τα οποία υπόκεινται σε γονιαδή αποτύπωση εξαιρούνται της απομεθυλίωσης διατηρώντας το γονεϊκό μοτίβο μεθυλίωσης (203, 204). Η ευρεία και γρήγορη απομεθυλίωση του πατρικού γονιδιώματος μπορεί να διευκολύνει τη μεταγραφική ενεργοποίησή του (205), η οποία έχει αναφερθεί πως συμβαίνει πριν από τη μεταγραφική ενεργοποίηση του μητρικού γονιδιώματος (206). Η ταχεία ενεργή απομεθυλίωση του πατρικού γονιδιώματος συνδέεται με το σχηματισμό του πατρικού προπυρήνα (207) ενώ η σταδιακή παθητική απομεθυλίωση του μητρικού γονιδιώματος μπορεί να συσχετίζεται με την απουσία της DNMT1 από τον πυρήνα (208).

Στο στάδιο της βλαστοκύστης και αφού έχει ολοκληρωθεί η απομεθυλίωση, ολοκληρώνεται ο επαναπρογραμματισμός της μεθυλίωσης του εμβρυϊκού γονιδιώματος. Οι μεθυλοτρανσφεράσες εισέρχονται στον πυρήνα και εγκαθιδρύουν de novo μεθυλίωση στα κύτταρα της εσωτερικής μάζας (ICM), τα οποία έχουν μητρική προέλευση, ενώ τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος παραμένουν απομεθυλιωμένα (179, 207).

3.6 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Τα μεταθετά στοιχεία των γαμετών υπόκεινται σε επαναπρογραμματισμό της DNA μεθυλίωσης τους. Η πορεία απομεθυλίωσης των μεταθετών στοιχείων συμβαίνει στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο και στους αρσενικούς και στους θηλυκούς γαμέτες εν αντιθέσει με την de novo μεθυλίωση που συμβαίνει σε διαφορετικά στάδια, προγεννητικά για τα σπερματοζωάρια και μεταγεννητικά για τα ωάρια. Κατά τη μετακίνηση των PGCs στις

αρχέγονες γονάδες, τα μεταθετά στοιχεία LINES, IAP αλλά και περιοχές μικροδορυφορικού DNA απομεθυλώνονται σταδιακά και όχι πλήρως διατηρώντας το 16-60% της αρχικής μεθυλίωσης του DNA. Το μοτίβο μεθυλίωσης του DNA των μεταθετών στοιχείων στα γαμετικά κύτταρα διατηρείται μέχρι τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου (209-211). Η de novo μεθυλίωση του DNA των απομεθυλωμένων μεταθετών στοιχείων στα σπερματοζώαρια συμβαίνει στα μη διαιρούμενα EGCs στο αναπτυξιακό στάδιο πριν εισέλθουν στη μείωση, ενώ στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα η de novo μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται μετά την πρόφαση I και πραγματοποιείται μετά τη γέννηση (210, 212).

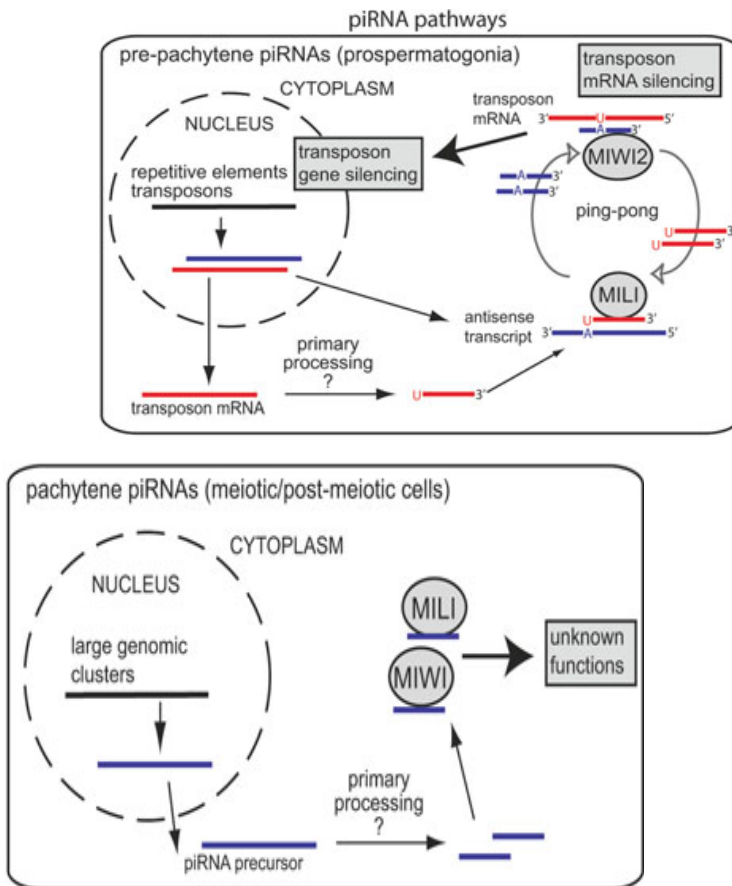
Μελέτες έδειξαν πως μετά τη γονιμοποίηση και μέχρι τα πρώτα προεμφυτευτικά στάδια, τα μεταθετά στοιχεία Alus μητρικής προέλευσης και στοιχεία LINES και IAPs πατρικής προέλευσης παραμένουν μεθυλωμένα. Στα σπερματοζώαρια τα μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία είναι μεθυλωμένα και απομεθυλώνονται σε μεγάλο ποσοστό μετά τη γονιμοποίηση (213, 214). Στα ρετρομεταθετά στοιχεία το καινούργιο πρότυπο μεθυλίωσης εγκαθιδρύεται με την de novo μεθυλίωση του εμβρυϊκού γονιδιώματος (167, 179, 215). Επίσης τα HERV στοιχεία εμφανίζουν μεγάλο ποσοστό μεθυλίωσης (98%) σε όλα τα στάδια επαναπρογραμματισμού και ανάπτυξης ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης εμφανίζονται μετά το στάδιο της βλαστοκύστης (213, 214).

3.7 PIWI RNAs ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Η επιγενετική ρύθμιση των μεταθετών στοιχείων αποτελεί μια δικλείδα ασφαλείας των γαμετικών κυττάρων για τη σταθερότητα του γενώματος. Η καταστολή των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα πραγματοποιείται μέσω αρκετών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις ιστονών και οι αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Τα τελευταία χρόνια βρέθηκε πως η καταστολή τους ρυθμίζεται και από μικρά μόρια RNA (216).

Τα σπερματοζώαρια είναι εξαιρετικά διαφοροποιημένα, μεταγραφικά αδρανή κύτταρα και χαρακτηρίζονται από ένα συμπαγή πυρήνα και ελάχιστο κυτταρόπλασμα. Παρ' όλα αυτά περιέχουν μια σειρά από μοναδικά RNAs τα οποία «παραδίδονται» στο ωάριο μετά τη γονιμοποίηση. Στα σπερματοζώαρια έχουν βρεθεί τρεις κατηγορίες «μικρών» RNAs (small

RNAs): τα microRNAs (miRNAs), τα μόρια RNA σύντομης παρέμβασης (short-interference RNAs, siRNAs) και τα PIWI αλληλεπιδρώντα RNAs (PIWI-interacting RNAs, piRNAs) (217). Τα piRNAs συναντώνται κυρίως σε γαμετικά κύτταρα. Πρόσφατα όμως βρέθηκαν και σε σωματικά κύτταρα (218). Η ονομασία των piRNAs έχει προέλθει από την πρόσδεση small RNAs με τις πρωτεΐνες PIWI (*MIWI*, *MILI*, και *MIWI2*). Οι πρωτεΐνες PIWI ανήκουν στην εξελικτικά συντηρημένη υπερ-οικογένεια των «Αργοναυτών» (Argonaute) (219).



Εικόνα 3.2: Βιογένεση προπαχυταινιακών και παχυταινιακών piRNAs (220).

Τα piRNAs συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες στα γαμετικά κύτταρα με κύριο ρόλο την προστασία του γονιδιώματος από τις ενθέσεις των ενεργών μεταθετών στοιχείων στη διάρκεια της απομεθυλίωσης των PGCs για την εγκαθίδρυση των νέων επιγενετικών σημάτων (221). Η σημαντικότητα των piRNAs καταδεικνύεται από το γεγονός πως έλλειψη αυτών οδηγεί σε παύση της σπερματογένεσης ή σε υπογονιμότητα (222, 223). Πρόσφατες μελέτες έδειξαν πως τα piRNAs συμμετέχουν και στη de novo μεθυλίωση των σπερματοζωαρίων

(218). Μέχρι στιγμής στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα των θηλαστικών έχουν βρεθεί δυο διακριτοί πληθυσμοί piRNAs, τα προπαχυναιικά και τα παχυναιικά, η ονομασία των οποίων προήλθε από το στάδιο εμφάνισής τους στη γαμετογένεση. Τα προπαχυναιικά piRNAs, που επί το πλείστον προέρχονται από μεταθετά στοιχεία, αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες *MILI* και *MIWI2* για την καταστολή των ρετρομεταθών στοιχείων σε επιγενετικό και μεταμεταγραφικό επίπεδο στη φάση των σπερματογονίων (218, 224, 225). Τα παχυναιικά piRNAs συναντώνται στο γονιδίωμα οργανωμένα σε συστάδες (226) ενώ αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες *MILI* *MIWI* (227). Οι piRNAs συστάδες είναι επαναλαμβανόμενες περιοχές πλούσιες σε κατακερματισμένα αντίγραφα ρετρομεταθετών στοιχείων τα οποία αντιπροσωπεύουν όλες τις κύριες κατηγορίες ρετρομεταθετών. Η βιογένεση των προπαχυναιικών piRNAs πραγματοποιείται μέσω του μηχανισμού ring-rong (Εικόνα 3.2) (225, 228). Μέσω αυτού του μηχανισμού, τα μετάγραφα των ρετρομεταθετών στοιχείων ενεργοποιούν την ενίσχυση των piRNAs μέσω ενός «βρόγχου» ενίσχυσης νοηματικού - μη νοηματικού RNA. Αρχικά το mRNA των ρετρομεταθετών στοιχείων αποτελεί το υπόστρωμα για τη δημιουργία των πρωτογενών piRNAs μέσω ενός άγνωστου μέχρι σήμερα μηχανισμού. Έπειτα τα νοηματικά πρωτογενή piRNAs, τα οποία συνδέονται με την πρωτεΐνη *MILI*, μεσολαβούν στην παραγωγή των δευτερογενών piRNAs μέσω της διάσπασης των μη νοηματικών μεταγράφων των piRNAs συστάδων τα οποία συναντώνται στο γονιδίωμα. Τα μη νοηματικά δευτερογενή piRNAs αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη *MIWI2* στοχεύοντας στα μετάγραφα των ρετροτρανσποζονίων (228, 229). Ο μηχανισμός βιογένεσης των παχυναιικών piRNAs δεν είναι ακόμα γνωστός (226).

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Η υπογονιμότητα στη σημερινή εποχή είναι μια διαταραχή που πλήττει το 13-15% των ζευγαριών παγκοσμίως. Τελευταίες μελέτες έδειξαν πως τα υπογόνιμα ζευγάρια που υποβάλλονται σε Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή έχουν κατά τεκμήριο διαταραχή του ανδρικού παράγοντα σε ποσοστό >50%. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, η μη φυσιολογικοί παράμετροι του σπέρματος σχετίζονται με τη μειωμένη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό και είναι αποτέλεσμα ανωμαλιών του ουρογεννητικού συστήματος, συμπεριλαμβανομένης και η δυσλειτουργίας των όρχεων, η κίρσοκήλη, οι λοιμώξεις των γεννητικών οργάνων και η έκθεσή τους σε χημικούς παράγοντες.

Σήμερα η επιγενετική αποτελεί το συνδετικό κρίκο του μεταξύ γονιδιώματος, του γονοτύπου και των περιβαλλοντικών τροποποιητών, το σύνολο των οποίων ορίζει το μεταγραφικό μοτίβο, και κατεπεκταση το φαινότυπο. Ο πιο μελετημένος επιγενετικός μηχανισμός είναι η μεθυλίωση του DNA. Η μεθυλίωση του DNA στα θηλαστικά αποτελεί μια δυναμική αλλά και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών και αποτελεί ταυτόχρονα και το σημαντικότερο επιγενετικό παράγοντα στη μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων (gene silencing). Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων είτε άμεσα είτε έμμεσα τόσο σε επίπεδο χρωματίνης όσο και σε επίπεδο γονιδίου.

Το μεγαλύτερο μέρος της μεθυλίωσης στα κύτταρα, σε ποσοστό 90%, αφορά στη μεθυλίωση των CpGs νησίδων, του δορυφορικού DNA, αλλά και των μεταθετών στοιχείων LINEs, SINEs, HERVs και των ενδοκυστικών σωματιδίων τύπου A (Intracisternal A Particles, IAPs). Η μεθυλίωση των υποκινητών των ρετρομεταθετών στοιχείων αποτελεί μηχανισμό ασφαλείας για το κύτταρο έναντι της ρετρομετάθεσής τους, αποτρέποντας τη συμμετοχή τους σε φαινόμενα ομόλογου ανασυνδυασμού. Η μεθυλίωσή του DNA αποτελεί τον κυριότερο μηχανισμό καταστολής των HERV, παρόλο που αυτά τα μεταθετά στοιχεία δεν είναι πλούσια σε CpGs νησίδες αλλά έχουν LTR. Είναι γνωστό ότι το μοτίβο της DNA μεθυλίωσης διαφέρει τόσο ανάμεσα σε διαφορετικά μέλη της οικογένειας των HERV-K όσο και σε διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους. Στα θηλαστικά ο επαναπρογραμματισμός του γενώματος είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξή τους και επιτελείται κυρίως μέσω της

μεθυλίωσης του DNA κατά την διάρκεια της γαμετογένεσης και στα πρώτα στάδια της προεμφυτευτικής ανάπτυξης του εμβρύου. Οι διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (DMRs) του σπέρματος περιέχουν και τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία LINE-1, το οποία συναντάται στο γένωμα σε 5×10^4 αντίγραφα. Κατά τη γαμετογένεση, η αποσιώπηση των LINE-1 επιτυγχάνεται μέσω της μεθυλίωσης του DNA, της τροποποίησης των ιστονών και των piRNAs (Piwi-interacting RNA). Η ανώμαλη μεθυλίωση των LINE-1 φαίνεται να συσχετίζεται με διάφορες ασθένειες.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και η ποσοτικοποίηση του συνόλου της μεθυλίωσης και των μοτίβων μεθυλίωσης με βάση τη μεθυλιωτική κατάσταση των CpGs των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 και HERV-K10 ανάμεσα σε σπερματοζώαρια από δείγματα σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους και σε σπερματοζώαρια από δείγματα σπέρματος με μη φυσιολογικές παραμέτρους. Επίσης σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 και HERV-K10 στα σπερματοζώαρια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το εξεταζόμενο υλικό μελέτης της παρούσας διδακτορικής διατριβής προήλθε από δείγματα σπέρματος από άνδρες οι οποίοι προσήλθαν για σπερμοδιάγραμμα, Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στη μονάδα Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η συλλογή των δειγμάτων έγινε έπειτα από ενημέρωση και την έντυπη συγκατάθεση των δοτών με τη διαβεβαίωση για την ανωνυμία και την προστασία των προσωπικών στοιχείων. Όταν ολοκληρώθηκε η συλλογή των δειγμάτων κάθε όνομα αντικαταστάθηκε με έναν αύξοντα αριθμό, μοναδικό για το κάθε δείγμα, αποτρέποντας την εμφάνιση των προσωπικών στοιχείων των δοτών από την αρχή μέχρι το τέλος της διαδικασίας.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν με βάση τις οδηγίες της τελευταία έκδοσης του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας- Π.Ο.Υ (World Health Organization, WHO) για την ανάλυση σπέρματος. Συγκεκριμένα οι δότες απείχαν 3-4 ημέρες από εκσπερμάτιση, αλλά όχι λιγότερες από 2 ή περισσότερες από 5 ημέρες, ενώ την ημέρα της λήψης το δείγμα συλλέγει σε αποστειρωμένο συλλέκτη..

4.2 ΕΞΑΓΩΓΗ DNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Η εξαγωγή του DNA έγινε από το αρχικό δείγμα, μετά την εκσπερμάτιση, και αφού παρέμεινε στους 37 °C για 30 λεπτά για να ρευστοποιηθεί. Η εξαγωγή DNA έγινε με το σύστημα QIAmp Mini kit της Qiagen με κάποιες τροποποιήσεις. Συνοπτικά ακολουθήθηκε η διαδικασία:

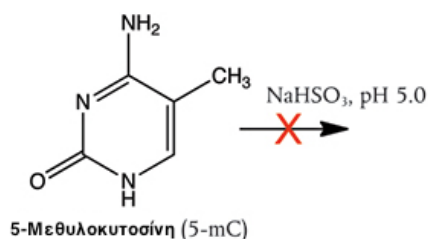
1. Προσθήκη 100-200 μl σπέρματος, ανάλογα με τη συγκέντρωση του δείγματος μετά το swim up, σε σωληνάριο erpendorf 1,5 ml.

2. Προσθήκη 20 μl πρωτεϊνάσης K και 100-200 μl διαλύματος X (20 mM Tris·Cl (pH 8.0), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 80 mM DTT, 4% SDS).
3. Ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα σε vortex και επώαση στους 55°C για τουλάχιστον 1 ώρα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Κατά τη διάρκεια της επώασης γίνονταν συχνές αναδεύσεις σε vortex.
4. Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, για την απομάκρυνση σταγόνων από το πώμα του σωληναρίου.
5. Προσθήκη 200 μl διαλύματος AL και 200 μl απόλυτης αιθανόλης (96-100% EtOH) και ανάδευση σε vortex για 45 sec.
6. Φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα, για την απομάκρυνση σταγόνων από το πώμα του σωληναρίου.
7. Το μείγμα μεταφέρεται στη στήλη διαχωρισμού (QIAmp Mini spin) η οποία τοποθετείται σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Το δοχείο συλλογής απορρίπτεται και τοποθετείται καινούργιο.
8. Προσθήκη 500 μl ρυθμιστικού διαλύματος AW1 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Το δοχείο συλλογής απορρίπτεται και τοποθετείται καινούργιο.
9. Προσθήκη 500μl ρυθμιστικού διαλύματος AW2 στη στήλη διαχωρισμού και φυγοκέντρηση στα $\geq 2000 \times g$ για 3 λεπτά. Το δοχείο συλλογής απορρίπτεται και τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο eppendorf 1.5ml
10. Προσθήκη 80μl ρυθμιστικού διαλύματος AE, επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (20 - 25 °C) και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό.
11. Η στήλη διαχωρισμού απορρίπτεται και το σωληνάριο με το γενωμικό DNA αποθηκεύεται στους -20°C για περαιτέρω χρήση.

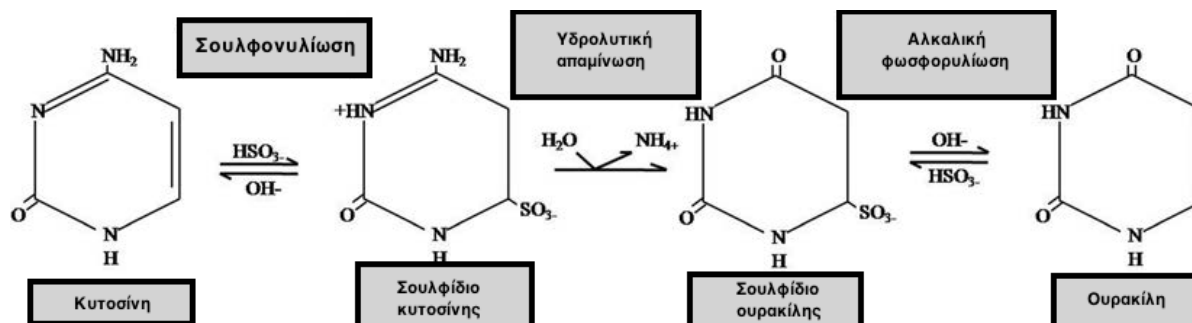
4.3 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ DNA ΜΕ ΟΞΙΝΟ ΘΕΙΩΔΕΣ ΝΑΤΡΙΟ (NaHSO_3)

Μέχρι τα τέλη της δεκαετίας του '80 οι τεχνικές για τη μελέτη της μεθυλίωσης μεμονωμένων νησίδων CpG του γονιδιώματος, απαιτούσαν μεγάλες ποσότητες γενωμικού DNA που έφταναν και τα 10 μg . Η δυσκολία αυτή ξεπεράστηκε στις αρχές του '90 με την χρήση του NaHSO_3 (230).

Η χημική κατεργασία του DNA με τη χρήση του NaHSO_3 , επιδρά στις κυτοσίνες αποδιαταγμένου DNA και όχι στις μεθυλιωμένες κυτοσίνες (Εικόνα 4.1). Συγκεκριμένα οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες ενώ οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μένουν ως έχουν. Η διεργασία της μετατροπής της μη μεθυλιωμένης κυτοσίνης σε ουρακίλη πραγματοποιείται μέσω τριών χημικών αντιδράσεων: της σουλφονυλίωσης, της απαμίνωσης και της φωσφορυλίωσης. Αρχικά πραγματοποιείται σουλφονυλίωση κατά την οποία προστίθενται ιόντα ελεύθερου θειώδους (HSO_3^-). Ακολουθεί υδρολυτική απαμίνωση που ελευθερώνει αμμώνιο (NH_4^+). Τέλος η αλκαλική φωσφορυλίωση απελευθερώνει HSO_3^- (Εικόνα 4.2).



Εικόνα 4.1: Η χημική κατεργασία με NaHSO_3^- δεν τροποποιεί τη μεθυλοκυτοσίνη.



Εικόνα 4.2: Η χημική κατεργασία με NaHSO_3^- τροποποιεί την κυτοσίνη σε ουρακίλη μέσω τριών χημικών αντιδράσεων.

Η πειραματική διαδικασία της χημικής κατεργασίας του DNA είναι η εξής:

Αρχικά 1,5-2 μg DNA τοποθετούνται σε σωληνάριο erpendorf 1,5 ml και προστίθεται δις απεσταγμένο νερό μέχρι ο τελικός όγκος να φτάσει τα 50 μl . Έπειτα προστίθενται 5,5 μl αρχικής συγκέντρωσης 3M NaOH (Merc Millipore) και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 λεπτά και εν συνεχεία πραγματοποιείται αποδιάταξη στους 95°C για 3 λεπτά και άμεση μεταφορά των σωληναρίων στον πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό. Κατόπιν στο διάλυμα προστίθενται 30 μl 10 mM φρέσκου διαλύματος υδροκινόνης (SIGMA - ALDRICH) και 520 μl αρχικής συγκέντρωσης 3M φρέσκου διαλύματος NaHSO₃, pH 5, (SIGMA - ALDRICH). Ακολουθεί ήπια ανάδευση και προστίθενται 100 μl παραφινέλαιου για την αποφυγή εξάτμισης. Έπειτα τα δείγματα επωάζονται στους 55°C για τουλάχιστον 16 ώρες στο σκοτάδι λόγω της ευαισθησίας της υδροκινόνης στο φως. Μετά την επώαση αφαιρείται προσεκτικά το παραφινέλαιο και ακολουθεί ο καθαρισμός του χημικά τροποποιημένου DNA. Ο καθαρισμός έγινε με βάση το σύστημα Wizard DNA clean-up system (Promega). Αρχικά προστίθεται 1 ml καθαριστικού διαλύματος με βάση τη ρετίνη και ακολουθεί ήπια ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωληνάριο αρκετές φορές. Έπειτα το διάλυμα τοποθετείται σε στήλη με ειδικό ηθμό κατακράτησης του DNA και ακολουθεί διήθηση υπό κενό. Μετά τη διήθηση ακολουθεί ξέπλυμα της στήλης με 80% (v/v) ισοπροπανόλης (SIGMA - ALDRICH). Ύστερα ο ηθμός τοποθετείται σε σωληνάριο erpendorf 1,5 ml και φυγοκεντρείται στα 10.000xg για 2 λεπτά για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων ισοπροπανόλης. Τέλος ο ηθμός τοποθετείται σε νέο αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf 1,5 ml και προστίθενται 50 μl ddH₂O, προθερμασμένο στους 70°C, και επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος ακολουθεί η έκλυση του DNA με φυγοκέντρηση για 20 δευτερόλεπτα στα 10.000xg.

Εν συνεχεία προστίθενται 5,5 μl 3M NaOH και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 λεπτά για την πλήρη αποδιάταξη του DNA. Μετά το τέλος της επώασης μεταφέρονται στον πάγο και προστίθενται 17 μl 10 M οξικό αμμώνιο, CH₃COONH₄, (Merc Millipore), 1 μl γλυκογόνο (20mg/ml, Invitrogen) και 220 μl παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (SIGMA - ALDRICH). Τα δείγματα μεταφέρονται στους -20°C για τουλάχιστον 16 ώρες ή στους -80°C για 6 ώρες. έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρούνται στα 15.000 x g για 16 λεπτά. Εν συνεχεία το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά, και το ίζημα (DNA) ξεπλένεται με 500 μl 70% (v/v) για την απομάκρυνση αλάτων που έχουν μείνει. Τέλος ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15.000 x g

για 16 λεπτά, και εν συνεχεία το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και μένει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά περίπου μέχρι να στεγνώσει πλήρως. Αφού αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης προστίθενται 30μl ddH₂O.

4.4 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ανακαλύφθηκε τη δεκαετία του '80 από τον Mullis (231) και αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές με τεράστιο εύρος εφαρμογής αλλά και απεριόριστες δυνατότητες στη μοριακή βιολογία. Με τη τεχνική αυτή δίνεται η δυνατότητα ενίσχυσης συγκεκριμένου τμήματος του γενωμικού DNA ή RNA σε χιλιάδες αντίγραφα. Με την PCR πολλαπλασιάζεται εκθετικά η επιλεγμένη αλληλουχία σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων, από το σύνολο του γενωμικού DNA ή του RNA, χρησιμοποιώντας αλληλουχίες (εκκινητές) εκατέρωθεν του τμήματος ενίσχυσης. Η PCR περιλαμβάνει 3 στάδια:

Αποδιάταξη δίκλωνου μορίου DNA (denaturation)

Υβριδοποίηση των εκκινητών με την αλληλουχία στόχο (annealing) και

Επιμήκυνση των εκκινητών (extension)

Στο πρώτο στάδιο επιτυγχάνεται η αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου DNA με υψηλή θερμοκρασία της τάξεως των 94-95°C σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου ανάμεσα στις αλυσίδες του DNA. Εν συνεχεία, στο δεύτερο στάδιο έχουμε τον υβριδισμό των εκκινητών εκατέρωθεν της αλληλουχίας στόχου. Οι εκκινητές είναι συνθετικές αλληλουχίες, μεγέθους 15-30 βάσεων, συγκεκριμένοι για την κάθε αλληλουχία ενίσχυσης. Επίσης η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι συγκεκριμένη για το κάθε ζεύγος εκκινητών (T_{am}). Τέλος στο τρίτο στάδιο έχουμε την επιμήκυνση των εκκινητών (72°C) μέσω ενός θερμοανθεκτικού ενζύμου της taq πολυμεράσης.

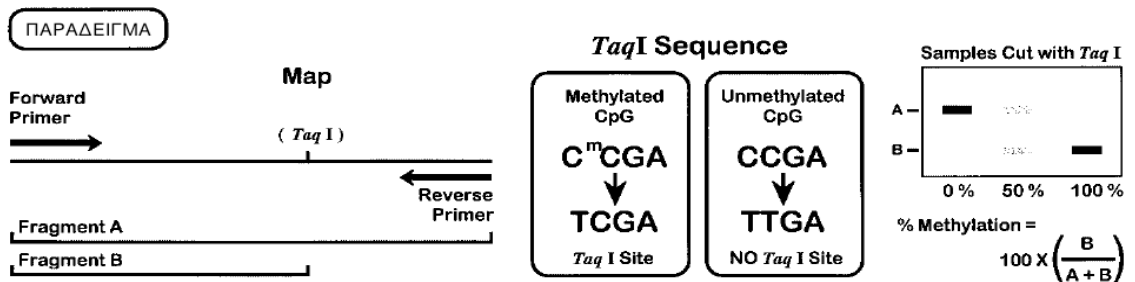
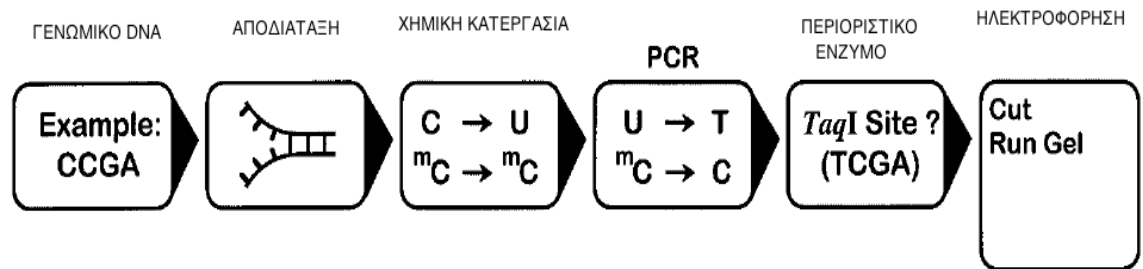
Τα στάδια αυτά επαναλαμβάνονται για 25-40 κύκλους μέχρι να έχουμε τον επιθυμητό αριθμό αντιγράφων. Σε κάθε νέο κύκλο, το επιθυμητό προϊόν που ενισχύθηκε από τον προηγούμενο κύκλο, αποτελεί το υπόστρωμα για τον επόμενο κύκλο.

4.5 ΑΡΧΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕΣΩ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΣΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ (Combined Bisulfite Restriction Analysis, COBRA)

Η τεχνική COBRA αποτελεί μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης διαφόρων αλληλουχιών του γενώματος η οποία ανακαλύφθηκε από τον Xong et. al. το 1997 (232). Κύριο γνώρισμα αυτής της τεχνικής αποτελεί η συνδυαστική χρήση 3 διαφορετικών τεχνικών για τη μελέτη της μεθυλίωσης: τη χημική κατεργασία του DNA με NaHSO_3 , την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τη χρήση περιοριστικών ενζύμων.

Κατά την χημική διεργασία, όπως περιγράφηκε παραπάνω, έχουμε τη μετατροπή των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες ενώ οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες παραμένουν ως έχουν. Εν συνεχεία έχουμε την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπου οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί έτσι ώστε να υβριδοποιούνται σε περιοχές της αλληλουχίας στόχου που δεν έχει CpG δινουκλεοτίδια. Με τον τρόπο αυτό οι εκκινητές μπορούν να ενισχύσουν την αλληλουχία στόχο, ανεξάρτητα από την μεθυλιωτική κατάσταση της αλληλουχίας του DNA. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας δεξαμενής PCR προϊόντων, τα οποία φέρουν το ίδιο μέγεθος και διαφέρουν μόνο στις πιθανές θέσεις μεθυλίωσης του DNA των CpG δινουκλεοτιδίων. Οι πιθανές αυτές θέσεις μπορούν να αναγνωριστούν από περιοριστικά ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν τα μεθυλιωμένα δινουκλεοτίδια CpG. Υστέρα από την πέψη με την χρήση περιοριστικών ενζύμων τα κομμένα τμήματα μπορούν να διαχωριστούν σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου ή αγαρόζης και η ένταση της ζώνης του DNA μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με κατάλληλο λογισμικό επεξεργασίας εικόνας (Εικόνα 4.3).

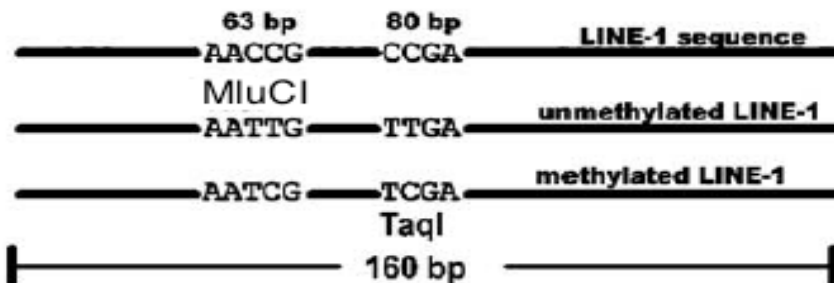
COBRA



Εικόνα 4.3: Σχηματική απεικόνιση της τεχνικής COBRA και παράδειγμα.

4.5.1 ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 (COBRALINE-1)

Για τη μελέτη του μοτίβου μεθυλίωσης για το ρετρομεταθετό στοιχείο LINE-1 χρησιμοποιήθηκε η τεχνική COBRALINE-1 (233) με κάποιες τροποποιήσεις. Το πρωτόκολλο αυτό περιλαμβάνει την χημική κατεργασία του DNA με NaHSO_3^- , την ενίσχυση του LINE-1 με εκκινητές, την πέψη του τελικού προϊόντος PCR με τα περιοριστικά ένζυμα *TaqI* και *MluCI*, τα οποία αναγνωρίζουν μεθυλιωμένες και μη μεθυλιωμένες περιοχές αντίστοιχα (Εικόνα 4.4), και των διαχωρισμό των προϊόντων σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.



Εικόνα 4.4: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων του LINE-1 μετά την χρήση των περιοριστικών ενζύμων *TaqI* και *MluCI*.

Οι εκκινητές υβριδοποιούνται στην 5' UTR περιοχή του LINE-1 και σχεδιάστηκαν με βάση την αλληλουχία LINE-1.2 (Accession Number M80343) από τη βάση δεδομένων NCBI. Το PCR προϊόν ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής:

Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
LINE-1 F	5'-CCGTAAGGGGTTAGGGAGTTTTT-3'	160 bp
LINE-1 R	5'-RTAAAACCCTCCRAACCAAATATAAA-3	

Πίνακας 1: Αλληλουχίες εκκινητών LINE-1.

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την PCR φαίνονται στον Πίνακα 2.

Αντιδραστήρια/Αρχική συγκέντρωση	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Χημικά τροποποιημένο DNA	3 μ l	
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης 10X (Applied Biosystems)	2,5 μ l	1X
Διξοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)/ 2mM	1,5 μ l	120 μ M
5' εκκινητής / 10 μ M (Invitrogen)	1,25 μ l	0,5 μ M
3' εκκινητής / 10 μ M (Invitrogen)	1,25 μ l	0,5 μ M
Χλωριούχο μαγνήσιο(MgCl ₂) / 25m (Applied Biosystems)	1,5	1,5 mM
AmpiTaq Gold DNA πολυμεράση 5U/ μ l (Applied Biosystems)	0,2 μ l	1 Unit
ddH ₂ O	Τελικός όγκος 25 μ l	

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια PCR.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Το πρόγραμμα κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε φαίνεται στον Πίνακα 3.

Πρόγραμμα	Χρόνος	Θερμοκρασία(°C)	
Αρχική αποδιάταξη	7 λεπτά	95 °C	
Αποδιάταξη	45 δευτερόλεπτα	95 °C	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	53 °C	
Επιμήκυνση	45 δευτερόλεπτα	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	7 λεπτά	72 °C	

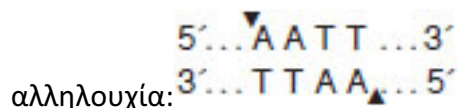
Πίνακας 3: Πρόγραμμα κυκλοποίησης COBRALINE-1.

4.6 ΠΕΨΕΙΣ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ

Οι πέψεις των προϊόντων της PCR έγιναν με τα ένζυμα TaqI (New England Biolabs) και MluCI (New England Biolabs). Το ένζυμο TaqI αναγνωρίζει τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες στα CpGs δινοκλεοτίδια τις οποίες και κόβει στα παρακάτω σημεία:



Το ένζυμο MluCI κόβει μη μεθυλιωμένες περιοχές όταν συναντάει την εξής



Για την πέψη 10μl PCR προϊόντος, πραγματοποιήθηκε αντίδραση με τελικό όγκο 20 μl και με τα δυο περιοριστικά ένζυμα στο κοινό ρυθμιστικό διάλυμα CutSmart (New England Biolabs). Αρχικά το PCR προϊόν επώαστηκε μόνο με 4 units MluCI στους 37 °C για 16 ώρες.

Μετά το πέρας των 16 ωρών προστέθηκε σε κάθε πέψη 2 units TaqI και ακολούθησε επώαση στους 65 °C για 4 ώρες. Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε 8% μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

4.7 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΜΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΙΟΥ (NON-DENATURING POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS, PAGE)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί μια από τις κοινές μεθόδους για το διαχωρισμό μορίων DNA με διαφορετικό μοριακό μέγεθος. Οι ηλεκτροφορήσεις σε πήκτώματα πολυακρυλαμίδιου έχουν υψηλή διαχωριστική ικανότητα καθώς διαχωρίζουν τμήματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μια μόνο βάση. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτρικού πεδίου που εφαρμόζεται στα άκρα του πήκτωματος με αποτέλεσμα να ωθεί το αρνητικά φορτισμένο μόριο του DNA προς την άνοδο. Κατά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου τα μόρια DNA μεγαλύτερου μεγέθους κινούνται πιο αργά από τα μόρια με μικρότερο μέγεθος. Επίσης η μετακίνηση των μορίων μέσα στο πήκτωμα εξαρτάται και από τη συγκέντρωση του πολυακρυλαμίδιου καθώς όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση τόσο πιο δύσκολη είναι η μετακίνηση μεγάλων μορίων DNA .

Η χρώση των πήκτωμάτων πολυακρυλαμίδιου μπορεί να γίνει είτε με βρωμιούχο αιθίδο είτε με Sybr Green είτε με οποιαδήποτε άλλη χρωστική που δημιουργεί σύμπλοκο με το DNA και φθορίζει σε υπεριώδες ακτινοβολία.

Η μελέτη των κλασμάτων της μεθυλίωσης του LINE-1 πραγματοποιήθηκε σε 8% μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου και η χρώση του έγινε με Sybr Green.

Κατά την παρασκευή 8% μη-αποδιατακτικού πήκτωματος πολυακρυλαμίδιου σε ένα δοχείο ζέσεως προστίθενται 35 ml απεσταγμένο νερό, 10 ml 37:1 ακρυλαμίδη-Δις ακρυλαμίδη (Fluka), 5 ml 10X TBE(890 mM Tris base, 890 Boric acid, 20 mM EDTA Na₂), 45μl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) και 450 μl APS (Ammonium Persulfate). Το TEMED και το APS προσθέτονται πάντα στο τέλος αφού αποτελούν τα συστατικά πολυμερισμού του πήκτωματος. Εν συνεχεία το πήκτωμα προστίθεται στα καλούπια με

σύρριγγες, τοποθετούνται οι χτένες για τη δημιουργία πηγαδιών και αφήνεται για τουλάχιστον 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να πήξει. Εν συνεχεία τα καλούπια τοποθετούνται στη συσκευή για τη διαδικασία της φόρτωσης των δειγμάτων στα πηγαδάκια. Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιούνται 15 μl από αντίδραση της πέψης και 8 μl χρωστικής ουσίας μλε της βρωμοφαινόλης 0,4%(w/v). Μετά τη φόρτωση των δειγμάτων εφαρμόζεται τάση 65V για περίπου 6 ώρες.

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης ακολουθεί η χρώση του πηκτώματος με χρωστική Sybr Green. Το πήκτωμα τοποθετείται σε ένα πλαστικό δοχείο στο οποίο προστίθενται 200 ml TBE και 20 μl Sybr Green (10.000x). Αμέσως ακολουθεί μεταφορά σε σκοτεινό χώρο για την αποφυγή εξασθένισης της χρωστικής. Αφού επωαστεί για 35 λεπτά ακολουθεί μεταφορά του πηκτώματος σε transillumination συσκευή. Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου φωτογραφίζεται με το σύστημα φωτογραφίας Edak 290 της εταιρίας Kodak υπό την επίδραση UV. Η ποσοτικοποίηση των κλασμάτων έγινε με το λογισμικό 1D της Kodak (1D image analysis software).

4.8 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ HERV-K10

Η μελέτη της μεθυλίωσης του HERV-K10 έγινε με την ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Methylation Specific Polymerase Chain reaction, MS-PCR). Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται στο σχεδιασμό 2 ζευγών εκκινητών όπου το ένα ζεύγος ενισχύει τη μεθυλιωμένη μορφή της αλληλουχίας, η οποία δεν έχει υποστεί αλλαγές από την χημική τροποποίηση με NaHSO_3^- , ενώ το άλλο ζεύγος ενισχύει τη μη μεθυλιωμένη αλληλουχία που έχει τροποποιηθεί χημικά. Εν συνεχεία τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (234) που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον Πίνακα 4.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Το πρόγραμμα κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε είναι φαίνεται στον Πίνακα 6.

Πρόγραμμα	Χρόνος	Θερμοκρασία(°C)	
Αρχική αποδιάταξη	5 λεπτά	95°C	
Αποδιάταξη	30 δευτερόλεπτα	95 °C	35 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	30 δευτερόλεπτα	59 °C	
Επιμήκυνση	30 δευτερόλεπτα	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C	

Πίνακας 6: Πρόγραμμα κυκλοποίησης μεθυλίωσης HERV-K10.

4.9 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αποτελεί την πιο συνηθισμένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη μοριακή τεχνική για την ανάλυση, το διαχωρισμό και το χαρακτηρισμό μορίων DNA και RNA με βάση το μέγεθός τους. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στο ότι τα μόρια DNA είναι αρνητικά φορτισμένα, έτσι με την εφαρμογή τάσης τα μόρια μετακινούνται προς την άνοδο. Η αγαρόζη είναι ένας πολυσακχαρίτης ο οποίος όταν διαλυθεί σε κατάλληλο διαλύτη δημιουργεί ένα πορώδες πήκτωμα μέσω του οποίου μετακινούνται το αρνητικά φορτισμένο DNA. Η συγκέντρωση της αγαρόζης επηρεάζει το μέγεθος των πόρων που δημιουργούνται αναλογικά. Έτσι όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση της αγαρόζης τόσο μικρότεροι είναι οι πόροι, με αποτέλεσμα την καλύτερη διαχωριστική ικανότητα μικρών μορίων DNA. Αντίθετα όσο μικρότερη η συγκέντρωση τόσο μεγαλύτερη διαχωριστική ικανότητα μεγάλων μορίων DNA.

Η αξιολόγηση των προϊόντων PCR έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 2 % ή 3%. Αρχικά ζυγίζονται 2 ή 3 gr αγαρόζης σε κωνική φιάλη και εν συνεχεία προτίθενται 100 ml 1X TBE. Η κωνική φιάλη τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για λίγα λεπτά μέχρι να δημιουργηθεί

ένα διαυγές διάλυμα και εν συνεχεία προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10 µg/ml. Έπειτα το διάλυμα τοποθετείται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και εφαρμόζονται οι χτένες στις ειδικές υποδοχές για τη δημιουργία των πηγαδιών για τη φόρτωση των δειγμάτων. Αφού πήξει το πήκτωμα 20 µl PCR προϊόντος αναμειγνύονται με 4 µl χρωστικής μπλε της βρωμοφαινόλης 0,4 (w/v). Το πήκτωμα της αγαρόζης μεταφέρεται σε transillumination συσκευή. Και φωτογραφίζεται υπό την επίδραση UV με το σύστημα φωτογραφίας Edak 290 της εταιρίας Kodak.

4.10 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ RNA ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

4.10.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ

Το σπερματικό υγρό, την ίδια μέρα της συλλογής, επεξεργάστηκε έτσι ώστε να αποθηκευθεί για τη μετέπειτα διαδικασία της εξαγωγής RNA. Η διαδικασία αποθήκευσης προτείνεται μόνο για σύντομο χρονικό διάστημα (4 μήνες). Η διαδικασία αποθήκευσης είναι η εξής:

1. Το σπερματικό υγρό το οποίο συλλέγεται μετά από αυνανισμό αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου επί 30 λεπτά έως ότου ρευστοποιηθεί.
2. Αφού ρευστοποιηθεί μετρίεται ο όγκος τους σπερματικού υγρού και μεταφέρεται σε σωληνάριο των 15 ml τύπου Falcon.
3. Εν συνεχεία προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα FSB (50mM HEPES pH 7,5, 10 mM χλωριούχο νάτριο (NaCl), 5 mM οξικό αμμώνιο {Mg(C₂H₃O₂)₂}, 25% γλυκερόλη ίσου όγκου με αυτή του σπερματικού υγρού και αναδεύεται καλά με μια πλαστική πιπέτα Pasteur.
4. Έπειτα το διάλυμα χωρίζεται σε aliquots των 2 ml, και τοποθετούνται σε σωληνάρια των 15 ml τα οποία σημειώνονται ως 1, 2, 3..n.
5. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 500xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

6. Ύστερα αφαιρείται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα όλων των σωληναρλιων 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος FSB. Το ίζημα επαναιωρείται με πλαστική πιπέτα Pasteur.
7. Επαναλαμβάνονται τα βήματα 5 και 6 δυο φορές ακόμα.
8. Μετά την ολοκλήρωση της φυγοκέντρωσης και την αφαίρεση του υπερκείμενου ακολουθεί προσθήκη 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος FSB μόνο στο σωληνάριο 1. Ακολουθεί επαναιώρηση του ιζήματος με πλαστική πιπέτα Pasteur.
9. Εν συνεχεία ακολουθεί διαδοχική επαναιώρηση προσθέτοντας το διάλυμα του σωληναρίου 1 στο σωληνάριο 2, έπειτα το διάλυμα του σωληναρίου 2 στο σωληνάριο 3 κλπ.
10. Τα βήματα 8 και 9 επαναλαμβάνονται με την προσθήκη επιπλέον 0,5 ml ρυθμιστικού διαλύματος FSB.
11. Τέλος το διάλυμα του τελευταίου σωληναρίου τοποθετούνται σε κρυσταλλικό σωληνάριο και αποθηκεύεται για λίγες ώρες στους -20°C εν συνεχεία στους -80°C και τέλος αποθηκεύεται στο υγρό άζωτο (-180°C).

4.10.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΞΑΓΩΓΗ RNA ΑΠΟ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Η εξαγωγή RNA από τα σπερματοζωάρια έγινε με βάση το RNeasy Mini kit (Qiagen). Πριν από την εξαγωγή RNA τα πραγματοποιούνται πλύσεις των δειγμάτων για την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την αποθήκευσή του. Έπειτα γίνονται πλύσεις με διάλυμα λύσης σωματικών κυττάρων όπως λευκά αιμοσφαίρια και επιθηλιακά κύτταρα. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

A. Πλύσιμο σπερματοζωαρίων

- Τα αποθηκευμένα δείγματα από τους -180°C μεταφέρονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να ξεπαγώσουν και τοποθετούνται σε σωληνάριο των 15 ml τύπου Falcon

- Προστίθεται 1ml διαλύματος 1X PBS(Phosphate Buffered Saline). Το διάλυμα επαναιωρείται με πλαστική πιπέτα Pasteur.
- Έπειτα προστίθεται 1X PBS μέχρι τελικό όγκο 13ml.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 500xg για 15 λεπτά στους 4 °C.
- Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απορρίπτεται.
- Επαναλαμβάνονται τα βήματα 2-5.
- Αμέσως μετά ακολουθεί η λύση των σωματικών κυττάρων
- Λύση σωματικών κυττάρων
- Προστίθεται 1 ml διαλύματος SCLB(Somatic Cell Lysis Buffer, SCLB 0,1% SDS και 0,5 triton-X διαλυμένα σε νερό DEPC) και αναδεύεται με πλαστική πιπέτα Pasteur.
- Προστίθεται SCLB μέχρι τελικό όγκο 13ml και ακολουθεί ανάδευση με vortex για 30 δευτερόλεπτα. Έπειτα το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- Στα 20 λεπτά πραγματοποιείται έλεγχος για την απουσία σωματικών κυττάρων με τη συσκευή Makler. Αν δεν υπάρχουν σωματικά κύτταρα υπολογίζεται η συγκέντρωση σπερματοζωαρίων του δείγματός και ακολουθείται το βήμα 13.
- Αν υπάρχουν σωματικά κύτταρα ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200xg για 15 λεπτά στους 4°C.
- Το υπερκείμενο απομακρύνεται και επαναλαμβάνονται τα βήματα 8-10 μέχρι να μην υπάρχουν σωματικά κύτταρα.
 - Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 200xg για 15 λεπτά στους 4°C.
- Έπειτα το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί εξαγωγή RNA.

B. Εξαγωγή RNA

- Για κάθε $1,7 \times 10^7$ σπερματοζωάρια προστίθεται 600μl διαλύματος RLT το οποίο περιέχει β-μερκαπταιθανόλη (10 μl/ml). Το διάλυμα αναδεύεται για 30 δευτερόλεπτα με vortex.
- Για την ομογενοποίηση του δείγματος το διάλυμα μεταφέρεται σε στήλη QIAshredder spin (Qiagen) και φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε μέγιστες στροφές.
- Έπειτα προστίθενται στο ομογενοποιημένο διάλυμα 430 μl απόλυτης αιθανόλη (96-100%). Ακολουθεί ήπια ανάδευση με πιπέτα.
- 700 μl διαλύματος μεταφέρονται σε στήλη RNeasy mini και φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το εναιώρημα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται η διαδικασία εφόσον έχει απομείνει ομογενοποιημένο διάλυμα.
- Στη στήλη προστίθενται 350 μl διαλύματος RW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το εναιώρημα απορρίπτεται.
- Εν συνεχεία προστίθενται 10 μl Dnase I σε 70 μl RDD διαλύματος. Ακολουθεί ήπια ανάδευση με αναστροφή του φιαλιδίου.
- Προστίθενται 80 μl του μείγματος της Dnase I στο κέντρο της στήλης και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
- Προστίθενται 350 μl διαλύματος RW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το εναιώρημα απορρίπτεται μαζί με το φιαλίδιο συλλογής.
- Η στήλη τοποθετείται σε καινούργιο φιαλίδιο συλλογής και προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Η στήλη φυγοκεντρείται για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8000 \times g$. Το εναιώρημα απορρίπτεται.
- Προστίθενται 500 μl διαλύματος RPE. Η στήλη φυγοκεντρείται για 2 λεπτά σε $\geq 8000 \times g$.
- Η στήλη τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο erpendorf 1,5 ml. Προστίθενται 50 μl νερού (65°C) απαλλαγμένο από ριβονουκλεάσες. Για την έκλουση του RNA ακολουθεί φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε $\geq 8000 \times g$.
- Το RNA που απομονώνεται αποθηκεύεται στους -80°C μέχρι την περαιταίρω επεξεργασία του. Όλα τα δείγματα φωτομετρήθηκαν με Nanodrop για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης RNA που απομονώθηκε.

4.10.3 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ cDNA ΜΕΣΩ ΑΝΑΣΤΡΟΦΗΣ ΜΤΑΓΡΑΦΗΣ ΜΕ ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (RT-PCR)

Με τη τεχνική της ανάστροφης μεταγραφής μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Reverse transcription-PCR, RT-PCR) πραγματοποιείται με την χρήση του ενζύμου ανάστροφης μεταφράσης ενζύμου, μέσω PCR, η μετατροπή του RNA σε cDNA.

Για τη σύνθεση cDNA χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προϊόντος SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Σε ένα σωληνάριο 0,5 ml προστίθενται

10 pg–5 μg RNA	≥ 11 μl
50–250 ng τυχαίοι εκκινητές (Invitrogen)	1 μl
10 mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	1 μl
ddH ₂ O	Μέχρι τεκικό όγκο 13 μl

- 2.
3. Ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στους 65°C. αμέσως μετά μεταφέρονται σε πάγο για τουλάχιστον 1 λεπτό.
4. Έπειτα σε κάθε δείγμα προστίθενται τα εξής αντιδραστήρια

5X First-Strand διάλυμα	4 μl
0.1 M DTT	1 μl
Αναστολέας RNase, RNaseOUT 40 units/ (Invitrogen)	1 μl
SuperScript III RT (200 units/μl)	1 μl

5. Αναμιγνύονται ήπια με πιπέτα και ακολουθεί επώαση στους 25 °C για 5 λεπτά έπειτα ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά στους 50 °C και τέλος επώαση για 15 λεπτά

στους 70 °C.

6. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20 °C.

4.11 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ LINE-1 ΚΑΙ HERVK-10

Η μελέτη για τη διαπίστωση έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 και HERV-K10 έγινε με PCR (235). Το cDNA και το RNA από κάθε δείγμα ελέγχθηκε για επιμόλυνση από γενωμικό DNA με PCR με PCR για την πρωταμίνη 2 (PMR2) (236). Οι εκκινητές είναι σχεδιασμένοι έτσι ώστε σε περίπτωση επιμόλυνσης γενωμικού DNA του δείγματος οι εκκινητές υβριδοποιούνται στο ιντόνιο της πρωταμίνης 2. Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%.

Αλληλουχία LINE-1		
Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
LINE-1.3F	5' - CAGGGCAATCAGGCAGGAGA -3'	948 bp/-
LINE-1.3 R	5' -TTGCCACGCCTATGTCCTG-3'	
Αλληλουχία HERV-K10		
Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος
HERV-K10 F	5' - CCAACCCCGTGCTCTCTGAA-3'	606 bp
HERV-K10 R	5' -TTGTGGGGAGAGGGTCAGCA-3	
Αλληλουχία PMR2		
Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος cDNA/RNA(επιμόλυνση)/ RNA(χωρίς επιμόλυνση)
PMR2 F	5' - TATAGGCGCAGACTGC -3'	150 bp/300 bp/-
PMR2 R	5' -GCCTTCTGCATGTTCTCT-3	

Πίνακας 7: Αλληλουχίες εκκινητών.

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της πρωταμίνης φαίνονται στον Πίνακα 8.

Αντιδραστήρια/Αρχική συγκέντρωση	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
cDNA ή RNA	3 μl	
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης / 10X (Invitrogen)	2 μl	1X
Διξοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)/ 2mM	2 μl	200 μM
5' εκκινητής / 10 μM (Invitrogen)	1 μl	0,5 μM
3' εκκινητής / 10 μM (Invitrogen)	1 μl	0,5 μM
Χλωριούχο μαγνήσιο(MgCl ₂) / 50 mM (Invitrogen)	2,5 μl	1,25 mM
DNA πολυμεράση / 5U/μl (Invitrogen)	0,4 μl	2 Units
ddH ₂ O	Τελικός όγκος 20μl	

Πίνακας 8: Αντιδραστήρια PCR PMR2.

Τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της των LINE-1 και HERV-K10 φαίνονται στον Πίνακα 9.

Αντιδραστήρια/Αρχική συγκέντρωση	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
cDNA	3 μl	
Ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης / 10X (Invitrogen)	2,5 μl	1X
Διξοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)/ 2mM	2 μl	200 μM
5' εκκινητής / 10 μM (Invitrogen)	1 μl	0,5 μM
3' εκκινητής / 10 μM (Invitrogen)	1 μl	0,5 μM
Χλωριούχο μαγνήσιο(MgCl ₂) / 50 mM (Invitrogen)	2,5 μl	1,25 mM
DNA πολυμεράση / 5U/μl (Invitrogen)	0,4 μl	2 Units
ddH ₂ O	Τελικός όγκος 25μl	

Πίνακα 9: Αντιδραστήρια PCR LINE-1 και HERV-K10.

Τα προγράμματα κυκλοποίησης που εφαρμόστηκαν είναι τα εξής:

Πρόγραμμα	Χρόνος	Θερμοκρασία(°C)	
Αρχική αποδιάταξη	15 λεπτά	95°C	
Αποδιάταξη	1 λεπτό	94 °C	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	1 λεπτό	62 °C	
Επιμήκυνση	1 λεπτό	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C	

Πίνακας 10: Πρόγραμμα κυκλοποίησης PMR2.

Πρόγραμμα	Χρόνος	Θερμοκρασία(°C)	
Αρχική αποδιάταξη	15 λεπτά	95°C	
Αποδιάταξη	1 λεπτό	94 °C	40 κύκλοι
Υβριδοποίηση εκκινητών	1 λεπτό	62 °C	
Επιμήκυνση	1 λεπτό	72 °C	
Τελική επιμήκυνση	10 λεπτά	72 °C	

Πίνακας 11: Πρόγραμμα κυκλοποίησης LINE-1 και HERV-K10.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΣΜΑΤΑ

5.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

5.2 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η ανάλυση του προτύπου μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών LINE-1 και HERV-K10 πραγματοποιήθηκε σε δείγματα σπερματοζωαρίων από άντρες που προσήλθαν για σπερμοδιάγραμμα. Μελετήθηκαν συνολικά 92 δείγματα, στα οποία μετρήθηκε η συγκέντρωση και η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων σύμφωνα με τα κριτήρια του παγκόσμιου οργανισμού Υγείας (World Health Organization, WHO) (237). Τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν με βάση του αριθμού σπερματοζωαρίων σε:

- Φυσιολογικά, συγκέντρωση <20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ ml
- Ολιγοσπερμικά, συγκέντρωση >20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ ml

Εν συνεχεία τα ολιγοσπερμικά δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε:

- μέτρια ολιγοσπερμικά, συγκέντρωση 5-20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ ml και
- σοβαρά ολιγοσπερμικά, συγκέντρωση >5 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ ml.

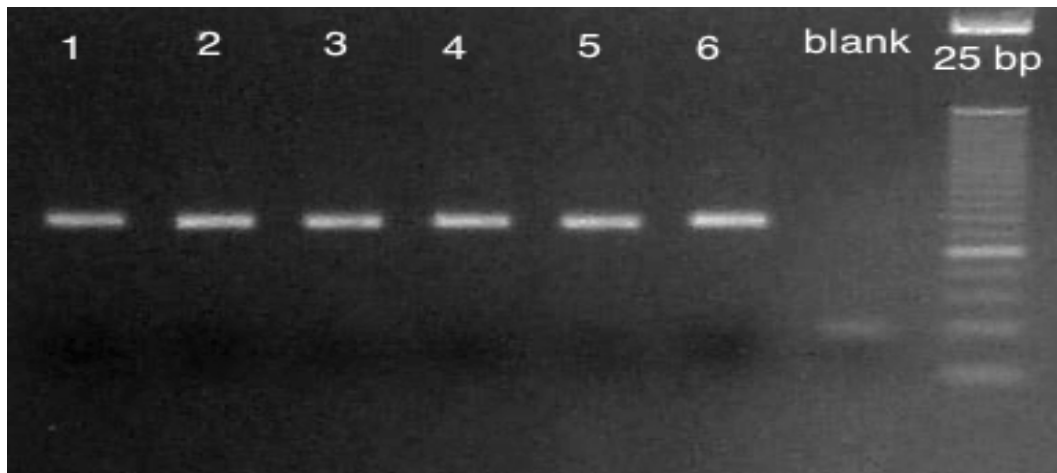
Από το σύνολο των 92 δειγμάτων τα φυσιολογικά δείγματα ανέρχονται σε 70 και τα ολιγοσπερμικά σε 22. Από τα 22 ολιγοσπερμικά τα 13 χαρακτηρίστηκαν μέτρια ολιγοσπερμικά και τα 9 σοβαρά ολιγοσπερμικά.

Αριθμός δειγμάτων			
	Φυσιολογικά δείγματα	Ολιγοσπερμικά δείγματα	ΣΥΝΟΛΟ
n	70	22	92

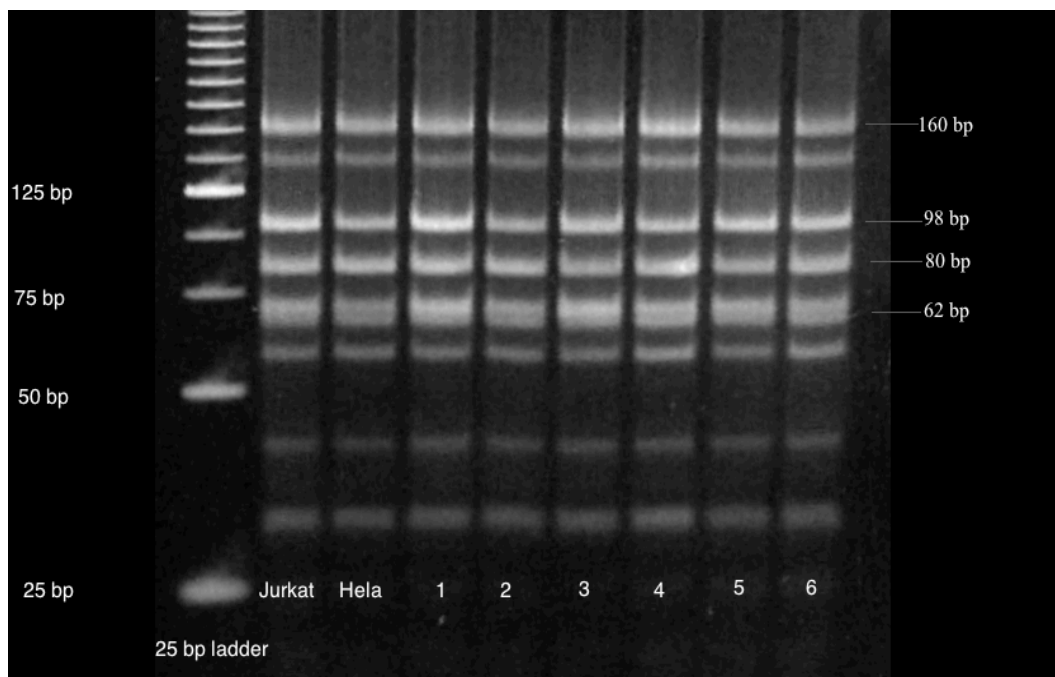
Πίνακας 12: Πίνακας φυσιολογικών και ολιγοσπερμικών δειγμάτων.

5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ LINE-1

Για τη μελέτη του μοτίβου μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών LINE-1 εφαρμόστηκε η τεχνική COBRALINE-1. Αφού έγινε PCR το προϊόν ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αгарόζης 2% για να επιβεβαιωθεί η επιτυχής ενίσχυση του προϊόντος μεγέθους 160 bp (Εικόνα 5.1). Μετά την επιβεβαίωση ακολούθησε πέψη και ηλεκτροφόρηση σε 8% πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Από τη ηλεκροφόρηση πολυακρυλαμιδίου προέκυψαν 4 προϊόντα (ζώνες) μεγέθους 160 bp, 98 bp, 80 bp και 62 bp (Εικόνα 5.2).

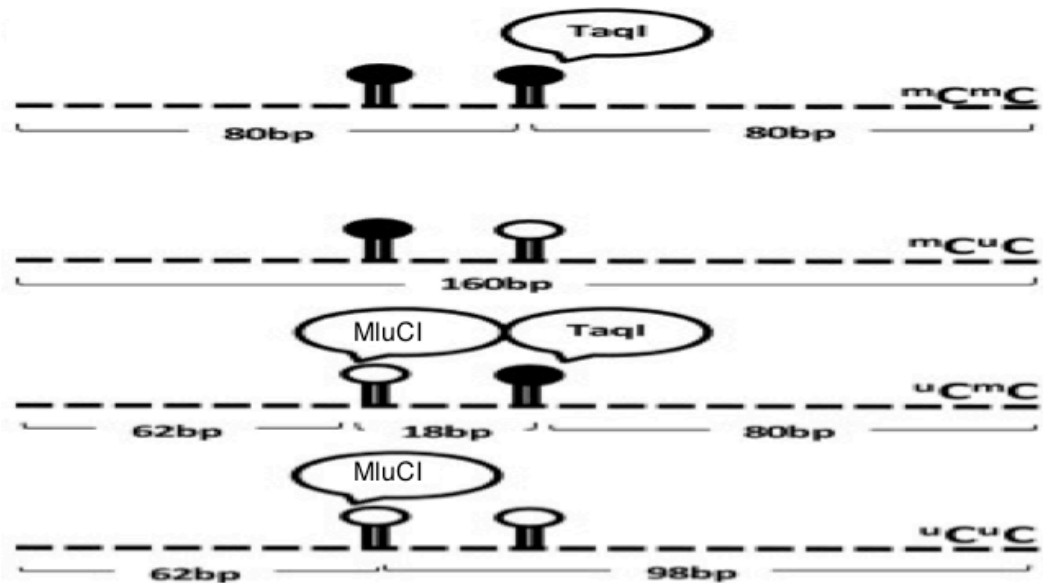


Εικόνα 5.1: Έλεγχος προϊόντων αντίδρασης PCR για την επιτυχή ενίσχυση του LINE-1. Τα δείγματα 1 και 2 αποτελούν τα controls Jurkat και HeLa αντίστοιχα, τα δείγματα 3 και 4 αποτελούν φυσιολογικά δείγματα ενώ τα δείγματα 5 και 6 αποτελούν ολιγοσπερμικά δείγματα. Και στα 6 δείγματα βλέπουμε το επιθυμητό μέγεθος προϊόντος (160 bp), στα οποία και θα πραγματοποιηθεί η πέψη.



Εικόνα 5.2: Ηλεκτοφόρηση δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 8%. Μετά την πέψη παρατηρούνται 4 προϊόντα (ζώνες) μεγέθους 160 bp, 98 bp, 80 bp και 62 bp στα οποία και υπολογίζεται η ένταση της φωτεινότητας της κάθε ζώνης. Jurkat και HeLa: controls της πειραματικής διαδικασίας COBRALINE-1. 1-3: Φυσιολογικά δείγματα. 4-6: Ολιγοσπερμικά δείγματα.

Τα μοτίβα μεθυλίωσης του LINE-1 προσδιορίζονται από την κατάσταση μεθυλίωσης δυο CpG θέσεων οι οποίες αναγνωρίζονται από τα ένζυμα MluCI και TaqI. Συγκεκριμένα τα LINE-1 τα οποία είναι πλήρως μεθυλιωμένα και στις δυο θέσεις (^mC^mC) αναγνωρίζονται από το ένζυμο TaqI το οποίο κόβει μόνο το δεύτερο μεθυλιωμένο CpG δινουκλεοτίδιο δημιουργώντας έτσι δυο ζώνες μεγέθους 80 bp. Τα LINE-1 τα οποία είναι πλήρως απομεθυλιωμένα στις δυο θέσεις (^uC^uC) αναγνωρίζονται από το ένζυμο MluCI το οποίο κόβει το πρώτο μη μεθυλιωμένο CpG δινουκλεοτίδιο δημιουργώντας έτσι 2 ζώνες μεγέθους 62 και 98 bp. Στο μοτίβο των μερικώς μεθυλιωμένων LINE-1 (^uC^mC) το ένζυμο MluCI αναγνωρίζει και κόβει πρώτο μη μεθυλιωμένο CpG και το ένζυμο TaqI αναγνωρίζει και κόβει δεύτερο μεθυλιωμένο CpG με αποτέλεσμα την δημιουργία 3 ζωνών μεγέθους 62, 18 και 80 bp. Η ζώνη των 18 bp δεν λαμβάνεται υπόψιν στη μελέτη. Στο δεύτερο μοτίβο των μερικώς μεθυλιωμένων LINE-1 (^mC^uC) έχουμε το πρώτο CpG μεθυλιωμένο και το δεύτερο CpG μη μεθυλιωμένο τα οποία δεν αναγνωρίζονται από τα περιοριστικά ένζυμα δίνοντας μόνο τη ζώνη των 160 bp (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3: Σχηματική απεικόνιση μοτίβων μεθυλίωσης LINE-1. Στο μοτίβο mCmC έχουμε την δράση του ενζύμου TaqI που δημιουργεί δυο ζώνες μεγέθους 80bp. Στο μοτίβο mCuC δεν έχουμε τη δράση από κανένα ένζυμο και έτσι δημιουργείται μια ζώνη μεγέθους 160bp. Στο μοτίβο ^uC^uC έχουμε τη δράση του ενζύμου MluCI και του ενζύμου TaqI που δημιουργούν τρεις ζώνες μεγέθους 62, 18 και 80 bp. Τέλος στο μοτίβο ^uC^mC έχουμε την δράση του ενζύμου MluCI με αποτέλεσμα τη δημιουργία δυο ζωνών μεγέθους 62 και 98 bp.

Τα επίπεδα μεθυλίωσης των LINE-1, όπως και το μοτίβο μεθυλίωσης, υπολογίστηκαν με βάση το ποσοστό μεθυλίωσης των CpG δινουκλεοτιδίων. Αρχικά η ένταση της κάθε ζώνης διαιρέθηκε με το μήκος (bp) του δίκλωνου μορίου DNA ως εξής: %160/160=A, %98/94=B, %80/78=C και %62/62 =D. Έπειτα υπολογίστηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης των μοτίβων των LINE-1 ως εξής: ποσοστό της συνολικής μεθυλίωσης (%mC)= $100 \times (C+A) / (C+2A+B+D)$, ποσοστό του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου ^mC^uC = $100 \times (A) / \{[(C-D+B)/2]+A+D\}$, ποσοστό του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου ^uC^mC = $100 \times (D-B) / \{[(C-D+B)/2]+A+D\}$, ποσοστό του πλήρως απομεθυλιωμένου μοτίβου ^uC^uC = $100 \times B / \{[(C-D+B)/2]+A+D\}$ και ποσοστό του πλήρως απομεθυλιωμένου μοτίβου (^mC^mC) = $100 \times [(C-D+B)/2] / \{[(C-D+B)/2]+D+A\}$ (238).

5.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ

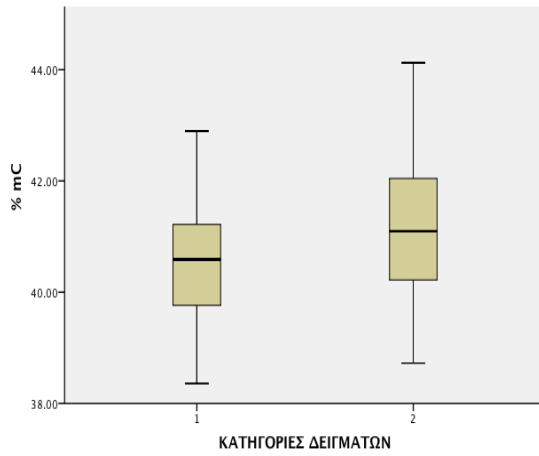
Μετά τον υπολογισμό του ποσοστού εμφάνισης των τεσσάρων διαφορετικών μοτίβων και του συνολικού ποσοστού μεθυλίωσης (mC) των LINE-1 ακολούθησε στατιστική ανάλυση με κριτήριο t για ανεξάρτητα δείγματα (Independent-samples T test). Αρχικά έγινε σύγκριση μεταξύ των σπερματοζωαρίων από δείγματα σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους και των σπερματοζωαρίων από δείγματα σπέρματος με μη φυσιολογικές παραμέτρους για το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης αλλά και του ποσοστού εμφάνισης των μοτίβων. Από την ανάλυση δεν προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά στο συνολικό ποσοστό της μεθυλίωσης ($p=0,061$) αλλά και για την συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων ${}^mC^uC$ ($p=0,365$), ${}^uC^mC$ ($p=0,523$), ${}^uC^uC$ ($p=0,508$) και ${}^mC^mC$ ($p=0,060$) ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων (Πίνακας 13).

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	P value
%mC	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	4 0.62	1.23	0,061
	ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	22	4 1.21	1.46	
%mC ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	2 2.64	1.22	0,365
	ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	22	2 2.37	1.28	
% ^u C ^m C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	2 0.10	2.74	0,523
	ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	22	1 9.68	2.58	
% ^u C ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	3 8.01	1.48	0,508
	ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	22	3 7.76	1.60	
% ^m C ^m C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	1 9.25	1.93	0,060
	ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	22	2 0.19	2.33	

Πίνακας 13: Σύγκριση ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης LINE-1 και των μοτίβων, μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και του συνόλου των ολιγοσπερμικών.

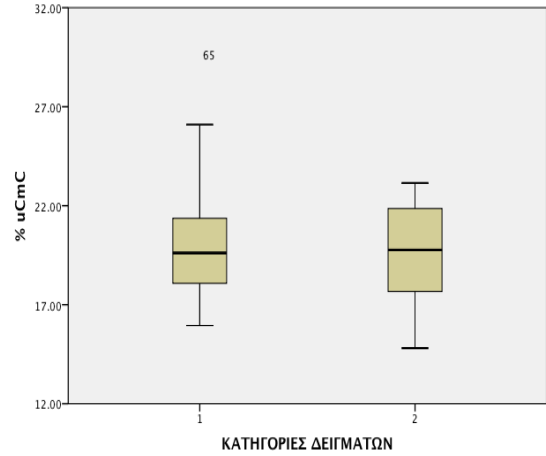
Από την απεικόνιση σε θηκόγραμμα του εύρους της μέσης τιμής για το ποσοστό εμφάνισης του κάθε μοτίβο αλλά και για το σύνολο της μεθυλίωσης του LINE-1 διαπιστώνουμε πως δεν υπάρχει διαφορά ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και στα ολιγοσπερμικά δείγματα (Εικόνα 5.4).

Α) ΕΥΡΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1



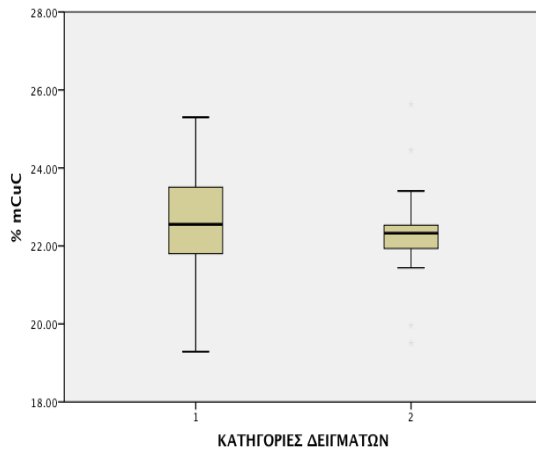
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Β) ΕΥΡΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΟΤΙΒΟΥ uCmC ΤΩΝ LINE-1



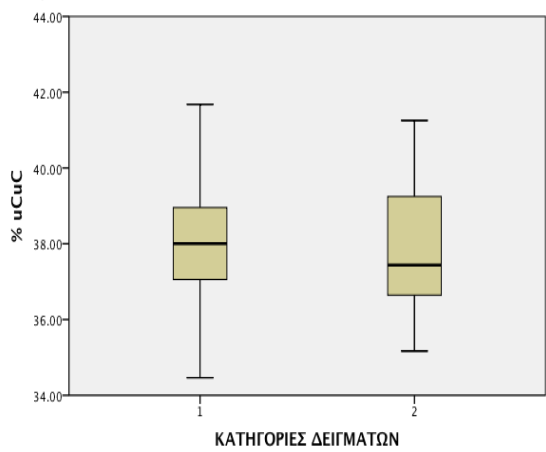
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Γ) ΕΥΡΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΟΤΙΒΟΥ mCuC ΤΩΝ LINE-1



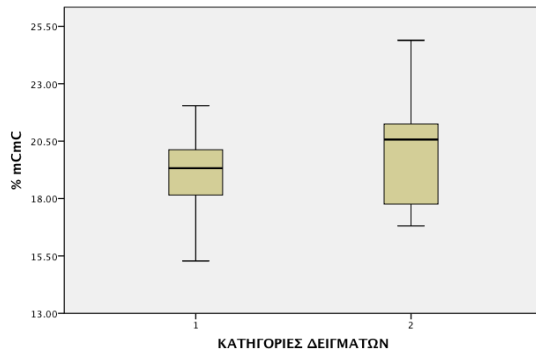
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Δ) ΕΥΡΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΟΤΙΒΟΥ uCuC ΤΩΝ LINE-1



1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Ε) ΕΥΡΟΣ ΠΟΣΟΣΤΟΥ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΟΤΙΒΟΥ mCmC ΤΩΝ LINE-1



1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Εικόνα 5.4: Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης και ποσοστού εμφάνισης μοτίβων σε φυσιολογικά δείγματα (1) και στο σύνολο των ολιγοσπερμικών (2). Α) Θηκόγραμμα εύρους συνολικού ποσοστού μεθυλίωσης (mC). Β) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου uCmC. Γ) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου mCuC. Δ) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου uCuC. Ε) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου mCmC. Η μαύρη γραμμή σε κάθε θηκόγραμμα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή η οποία φαίνεται στον Πίνακα 13.

Έπειτα θελήσαμε να συγκρίνουμε το ποσοστό της συνολικής μεθυλίωσης του LINE-1 αλλά και το ποσοστό εμφάνισης του κάθε μοτίβου των φυσιολογικών δειγμάτων σε σχέση με τα μέτρια ολιγοσπερμικά και με τα σοβαρά ολιγοσπερμικά. Η στατιστική ανάλυση έγινε με κριτήριο t για ανεξάρτητα δείγματα (Independent-samples T test). Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p=0,039$) στο συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης του LINE-1 ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και στα σοβαρά ολιγοσπερμικά δείγματα (Πίνακας 14). Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε πως στα σοβαρά ολιγοσπερμικά τα ρετρομεταθετά LINE-1 εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα μεθυλίωσης, με μέση τιμή 41,52% και μικρότερο εύρος, σε σχέση με τα φυσιολογικά δείγματα που εμφανίζουν μικρότερο ποσοστό μεθυλίωσης, με μέση τιμή 40,62 και μεγαλύτερο εύρος (Εικόνα 5.5). Όσο αφορά το ποσοστό εμφάνισης των μοτίβων του LINE-1 δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p>0,05$). Επίσης δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά τόσο στα επίπεδα της συνολικής μεθυλίωσης όσο και στη συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων του LINE-1 ανάμεσα στα φυσιολογικά δείγματα και στα μέτρια ολιγοσπερμικά (Πίνακας 15) αλλά και ανάμεσα στα σοβαρά και στα μέτρια ολιγοσπερμικά (Πίνακας 16).

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟ Σ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	P value
%mC	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	40.62	1.23	0,039*
	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	41.52	1.03	
%mC ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	22.64	1.22	0,285
	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	22.19	0.94	
% ^u C ^m C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	20.10	2.74	0,600
	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	20.60	2.12	
% ^u C ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	38.01	1.48	0,078
	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	37.09	1.21	
% ^m C ^m C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	19.25	1.93	0,201
	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	20.12	1.80	

Πίνακας 14: Σύγκριση ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης και των μοτίβων του LINE-1 μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και των σοβαρά oligospermικών δειγμάτων.

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	P value
%mC	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	40.62	1.23	0,332
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	41.01	1.70	
%mC ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	22.64	1.22	0,698
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	22.49	1.49	
% ^u CmC	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	20.10	2.74	0,203
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	19.04	2.75	
% ^u C ^u C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	38.01	1.48	0,631
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	38.23	1.72	
% ^m C ^m C	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	70	19.25	1.93	0,227
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	20.24	2.71	

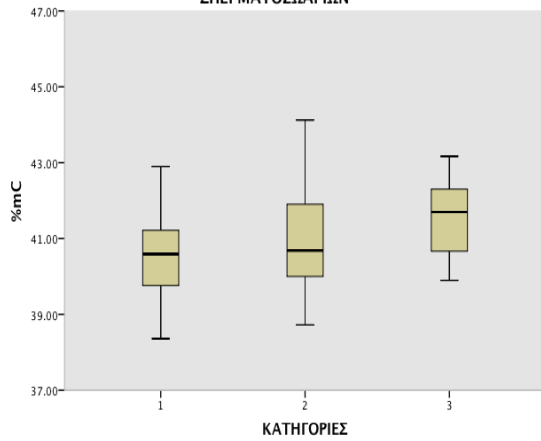
Πίνακας 15: Σύγκριση ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης και των μοτίβων του LINE-1 μεταξύ των φυσιολογικών δειγμάτων και του συνόλου των μέτρια oligospermικών.

	ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ	P value
%mC	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	40.62	1.23	0,432
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	41.01	1.70	
% ^m C ^u C	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	22.64	1.22	0,590
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	22.49	1.49	
% ^u C ^m C	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	20.10	2.74	0,167
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	19.04	2.75	
% ^u C ^u C	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	38.01	1.48	0,102
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	38.23	1.72	
% ^m C ^m C	ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	9	19.25	1.93	0,912
	ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ	13	20.24	2.71	

Πίνακας 16: Σύγκριση ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης και των μοτίβων του LINE-1 μεταξύ των σοβαρά και των μέτρια ολιγοσπερμικών.

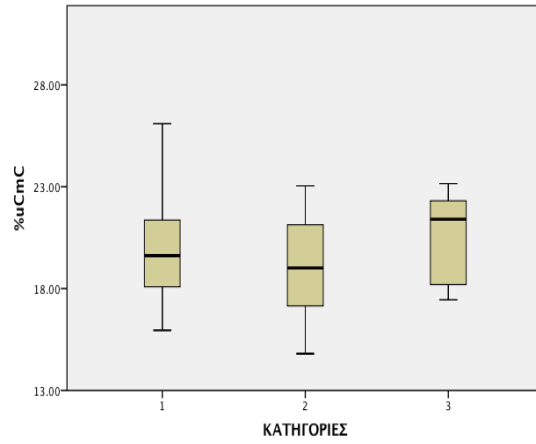
Από την απεικόνιση σε θηκόγραμμα (Εικόνα 5.5), παρατηρούμε ότι το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης των LINE-1, στα σοβαρά ολιγοσπερμικά δείγματα εμφανίζουν μικρότερο εύρος τιμών αλλά μεγαλύτερο μέσο όρο τιμών σε σχέση με τα φυσιολογικά. Επίσης αξιοσημείωτο είναι πως στο μοτίβο μεθυλίωσης mCuC τα σοβαρά ολιγοσπερμικά δείγματα εμφανίζουν πολύ μικρότερο εύρος τιμών σε σχέση με τα φυσιολογικά αλλά χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.

Α) ΕΠΙΠΕΔΑ ΣΥΝΟΛΙΚΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



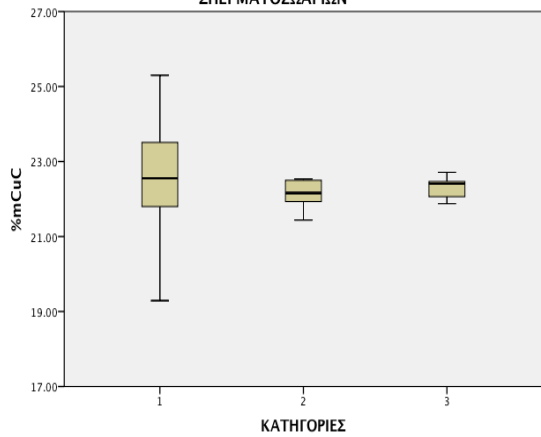
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (5-20 million/ml)
3: ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (>5 million/ml)

Β) ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ uCmC ΤΟΥ LINE-1 ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



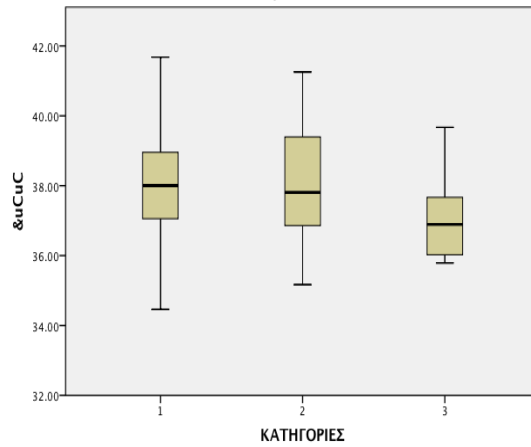
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (5-20 million/ml)
3: ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (>5 million/ml)

Γ) ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ mCuC ΤΟΥ LINE-1 ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



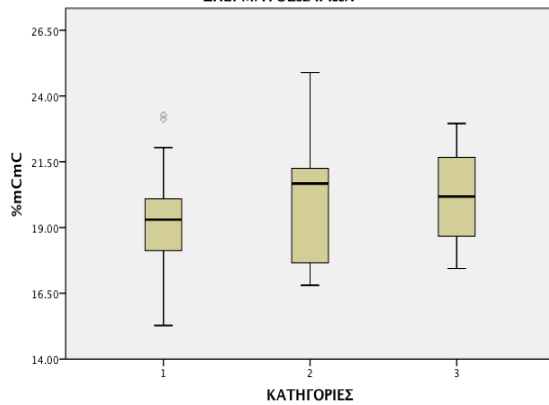
1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (5-20 million/ml)
3: ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (>5 million/ml)

Δ) ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ uCuC ΤΟΥ LINE-1 ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (5-20 million/ml)
3: ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (>5 million/ml)

Ε) ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΠΡΟΤΥΠΟΥ mCmC ΤΟΥ LINE-1 ΚΑΙ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΩΝ



1: ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ
2: ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (5-20 million/ml)
3: ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (>5 million/ml)

Εικόνα 5.5: Α) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού συνολικής μεθυλίωσης και ποσοστού μοτίβων σε φυσιολογικά δείγματα (1) σε μέτρια ολιγοσπερμικά (2) και σοβαρά ολιγοσπερμικά(3). Α) Θηκόγραμμα εύρους συνολικού ποσοστού μεθυλίωσης (mC). Β) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου uCmC. Γ) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου mCuC. Δ) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου uCuC. Ε) Θηκόγραμμα εύρους ποσοστού εμφάνισης μοτίβου mCmC.

5.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1

Για να δούμε αν υπάρχει συσχέτιση των μοτίβων μερικής μεθυλίωσης mCuC και uCmC του LINE-1 με τα μοτίβα μεθυλίωσης και μη μεθυλίωσης στα ολιγοσπερμικά δείγματα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχέτισης του Pearson (Pearson colleration) Η ανάλυση συσχέτισης Pearson για τα μοτίβα, ελέγχθηκε στα φυσιολογικά δείγματα (Πίνακας 16) και στο σύνολο των ολιγοσπερμικών (Πίνακας 17) αλλά και για τα μέτρια (Πίνακας 18) και σοβαρά δείγματα ξεχωριστά (Πίνακας 19).

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ			
		uCuC	mCmC
mCuC	R value (Pearson Correlation)	0.258	0.151
	p value	0.031*	0.212
	N (Συνολικός αριθμός)	70	70
uCmC	R value (Pearson Correlation)	-0.641	-0.625
	p value	0.000**	0.000**
	N (Συνολικός αριθμός)	70	70

*. Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.05$

** . Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.001$

Πίνακας 16: Συσχέτιση μεταξύ μοτίβων μεθυλίωσης LINE-1 στα φυσιολογικά δείγματα

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1 ΣΥΝΟΛΟ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ			
		uCuC	mCmC
mCuC	r value (Pearson Correlation)	0.156	-0.526
	p value	0.488	0.012*
	N (Συνολικός αριθμός)	22	22
uCmC	r value (Pearson Correlation)	0.639	-0.602
	p value	0.001**	0.003**
	N (Συνολικός αριθμός)	22	22

*. Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.05$

** . Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.01$

Πίνακας 17: Συσχέτιση μεταξύ μοτίβων μεθυλίωσης LINE-1 στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1 ΣΤΑ ΜΕΤΡΙΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ			
		uCuC	mCmC
mCuC	r value (Pearson Correlation)	0.175	-0.565
	p value	0.567	0.044*
	N (Συνολικός αριθμός)	13	13
uCmC	r value (Pearson Correlation)	-0.583	-.0592
	p value	0.037*	0.033*
	N (Συνολικός αριθμός)	13	13

*. Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.05$

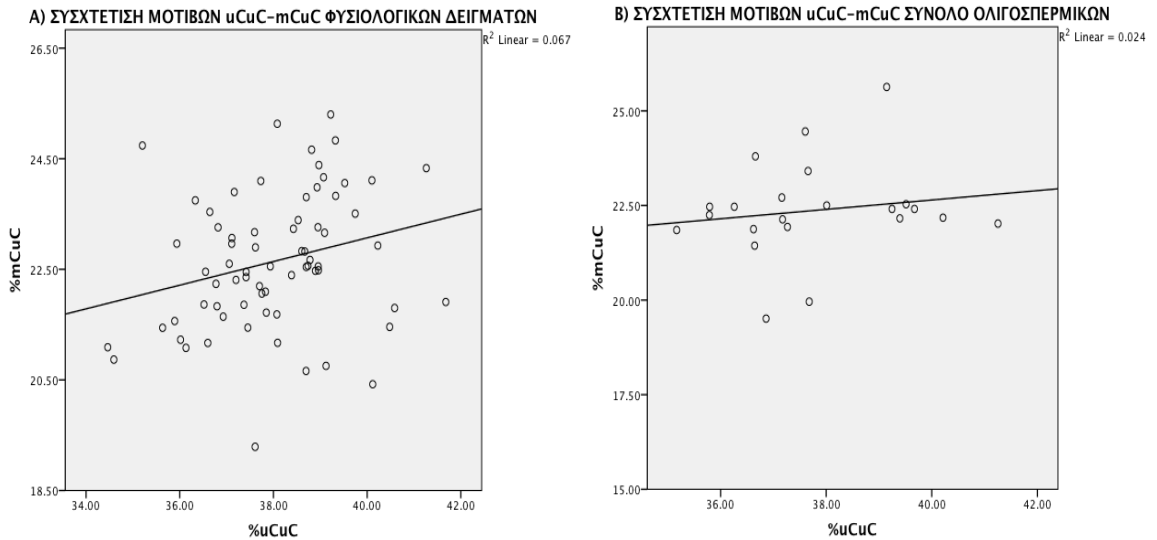
Πίνακας 18: Συσχέτιση μεταξύ μοτίβων μεθυλίωσης LINE-1 στα μέτρια ολιγοσπερμικά δείγματα.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1 ΣΤΑ ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ			
		uCuC	mCmC
mCuC	r value (Pearson Correlation)	-.060	-.419
	p value	.878	.262
	N (Συνολικός αριθμός)	9	9
uCmC	r value (Pearson Correlation)	-.634	-.725
	p value	.067	.027*
	N (Συνολικός αριθμός)	9	9

*. Η Συσχέτιση είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $p < 0.05$

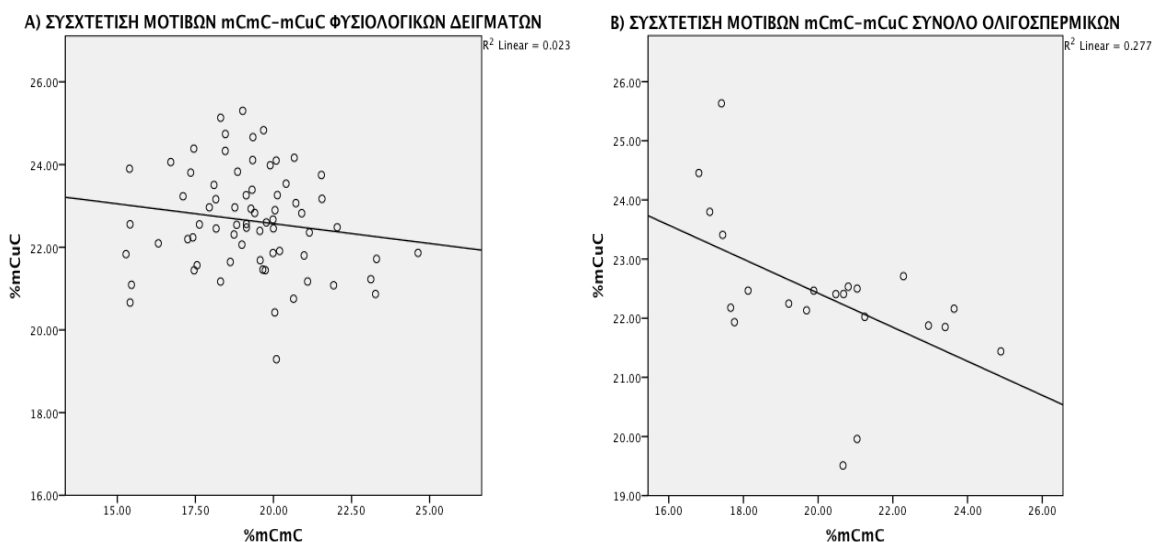
Πίνακας 19: Συσχέτιση μεταξύ μοτίβων μεθυλίωσης LINE-1 των σοβαρών ολιγοσπερμικών δειγμάτων.

Από την ανάλυση συσχέτισης στα φυσιολογικά δείγματα βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ($p=0,031$) μεταξύ των επιπέδων του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου mCuC και του μη μεθυλιωμένου μοτίβου uCuC. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως υπάρχει θετική συσχέτιση ($r=0,258$) μεταξύ των επιπέδων των δυο μοτίβων, καταδεικνύοντας έτσι πως αύξηση του πλήρως υπομεθυλιωμένου μοτίβου του LINE-1 συσχετίζεται με αύξηση του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου uCuC. Ενώ στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 5.6).



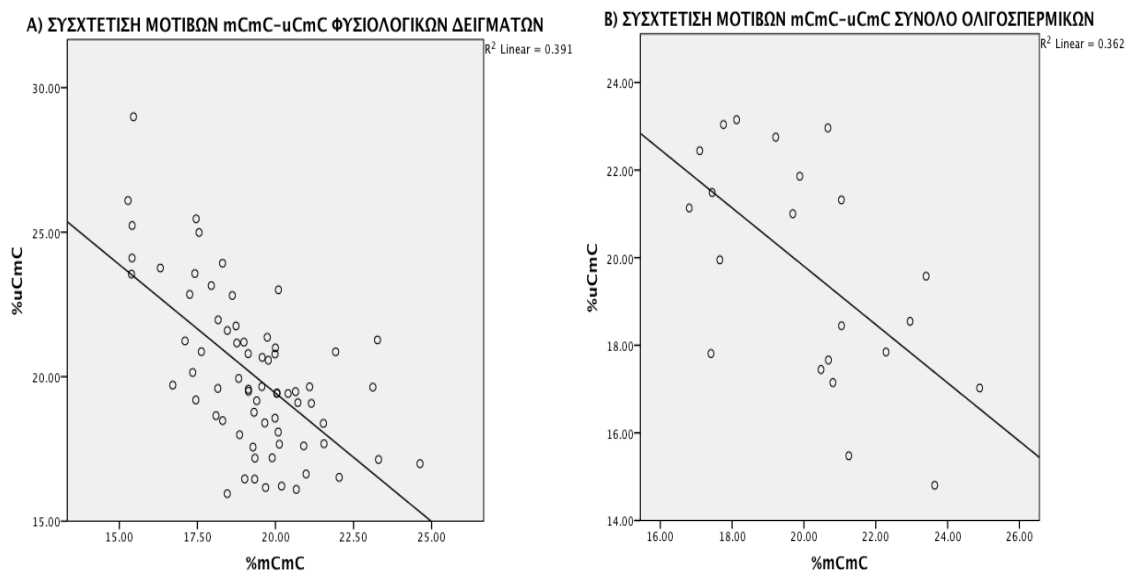
Εικόνα 5.6: Διάγραμμα διασποράς uCuC-mCuC. A) Διάγραμμα διασποράς φυσιολογικών δειγμάτων με θετική συσχέτιση μεταξύ των μοτίβων. B) Διάγραμμα διασποράς ολιγοσπερμικών δειγμάτων χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά.

Από την ανάλυση συσχέτισης στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων βρέθηκε στατιστικά σημαντική σχέση ($p=0,012$) μεταξύ των επιπέδων του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου mCuC και του πλήρως μεθυλιωμένου μοτίβου mCmC. Συγκεκριμένα βρέθηκε πως υπάρχει αρνητική σχέση ($r= -0,526$) μεταξύ των επιπέδων των δυο μοτίβων, υποδηλώνοντας πως αύξηση του πλήρως υπομεθυλιωμένου μοτίβου του LINE-1 mCuC συσχετίζεται με μείωση του μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου mCmC. Εν αντιθέση στα φυσιολογικά δείγματα δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά (Εικόνα 5.7).

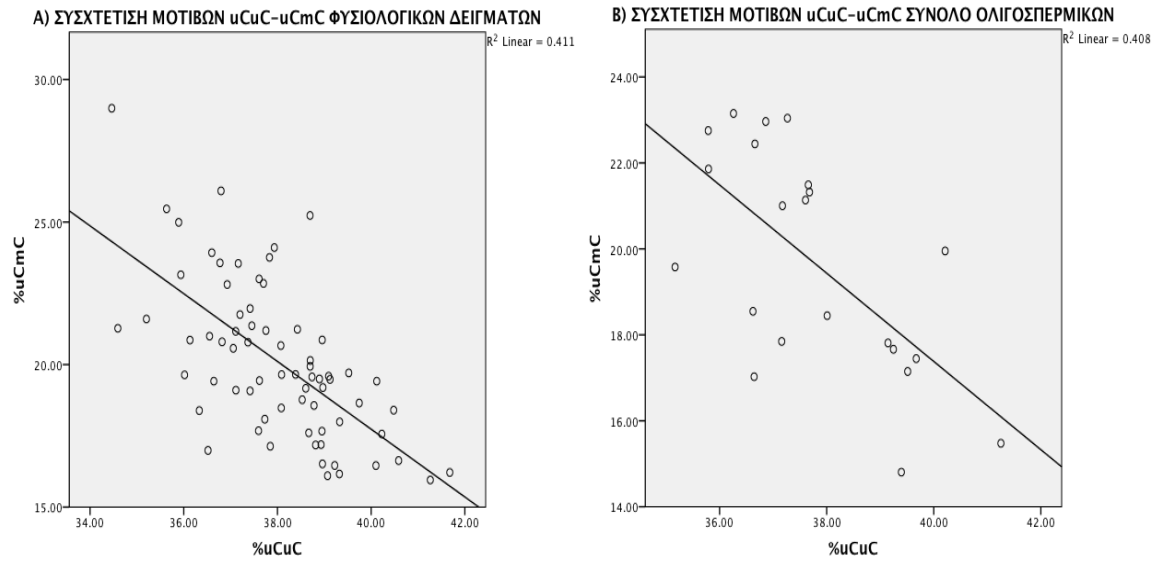


Εικόνα 5.7: Διάγραμμα διασποράς mCmC-mCuC. Α) Διάγραμμα διασποράς φυσιολογικών σπερματοζωαρίων χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά. Β) Διάγραμμα διασποράς ολιγοσπερικών δειγμάτων με αρνητική συσχέτιση. Παρατηρείται ότι όσο αυξάνονται τα επίπεδα του μοτίβου mCmC τόσο μειώνονται τα επίπεδα του μοτίβου mCuC.

Με βάση την ανάλυση συσχέτισης μεταξύ των επιπέδων μερικώς μεθυλιωμένου μοτίβου uCmC και του πλήρως μεθυλιωμένου μοτίβου mCmC (Εικόνα 5.8) αλλά και του πλήρως απομεθυλιωμένου μοτίβου uCuC (Εικόνα 5.9) τόσο στα φυσιολογικά δείγματα όσο και στο σύνολο των ολιγοσπερικών βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,01$) και μάλιστα με αρνητική συσχέτιση ($r < 0$).



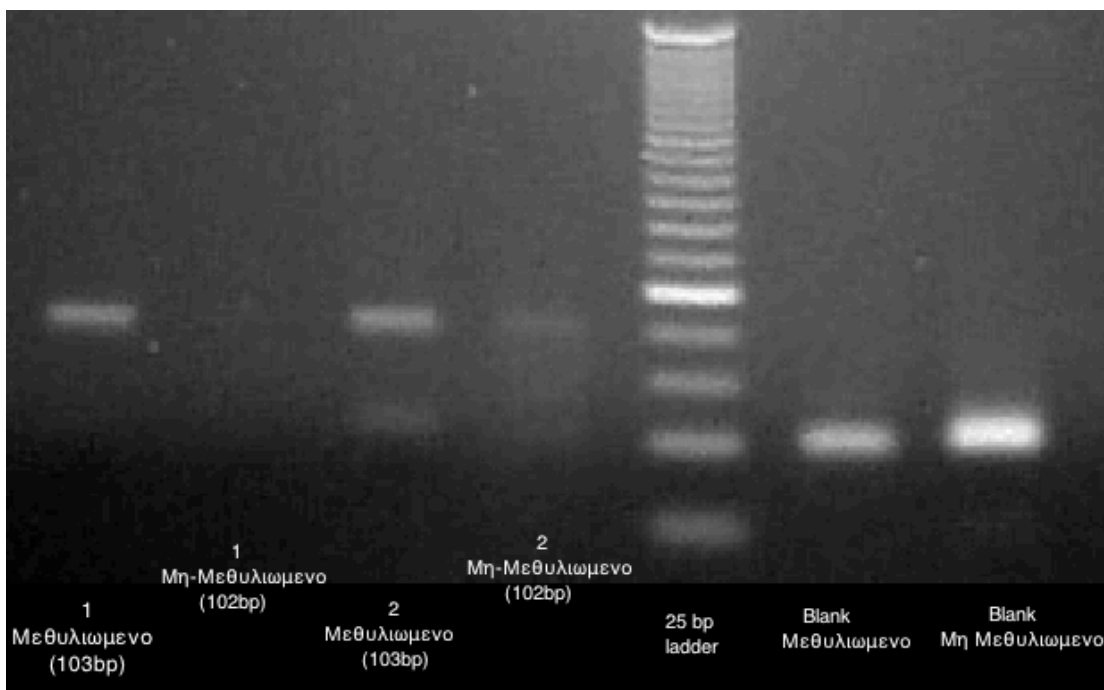
Εικόνα 5.8: Διάγραμμα διασποράς mCmC-uCmC. Α) Διάγραμμα διασποράς φυσιολογικών δειγμάτων. Β) Διάγραμμα διασποράς ολιγοσπερικών δειγμάτων. Και στα δυο διαγράμματα παρατηρούμε αρνητική συσχέτιση των δυο μοτίβων.



Εικόνα 5.9: Διάγραμμα διασποράς uCuC-uCmC. Α) Διάγραμμα διασποράς φυσιολογικών δειγμάτων με στατιστικά σημαντική διαφορά και αρνητική συσχέτιση. Β) Διάγραμμα διασποράς oligospermικών δειγμάτων με αρνητική συσχέτιση.

5.6 ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ HERV-K10

Για την μελέτη των προτύπων μεθυλίωσης του δινουκλεοτιδίου CpG του ρετρομεταθετού HERV-K10 εφαρμόστηκε η τεχνική MS-PCR. Τα PCR προϊόντα μετά την PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 3%. Ανάλογα με την κατάσταση μεθυλίωσης του δινουκλεοτιδίου CpG βρήκαμε ή μόνο μεθυλιωμένα αντίγραφα ή μη μεθυλιωμένα αντίγραφα ή μη μεθυλιωμένα και μεθυλιωμένα αντίγραφα HERV-K10 (Εικόνα 5.10).



Εικόνα 5.10: Ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (MS-PCR) για τα HERV-K10. Το δείγμα 1 έχει μόνο μεθυλιωμένα αντίγραφα (103bp) HERV-K10. Το δείγμα 2 έχει και μεθυλιωμένα (103 bp) και μη μεθυλιωμένα (102 bp) αντίγραφα HERV-K10.

Σε σύνολο 70 φυσιολογικών δειγμάτων βρέθηκε πως 40 δείγματα σε ποσοστό 57,14%, φέρουν μόνο μεθυλιωμένα αντίγραφα, 30 δείγματα σε ποσοστό 45,86% φέρουν μεθυλιωμένα αλλά και μη μεθυλιωμένα αντίγραφα ενώ δεν βρέθηκε κανένα δείγμα με μόνο μη μεθυλιωμένα αντίγραφα. Στο σύνολο των 22 ολιγοσπερμικών δειγμάτων βρέθηκε πως όλα τα δείγματα φέρουν μεθυλιωμένα αλλά και μη μεθυλιωμένα HERV-K10. Σε κανένα δείγμα τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα ολιγοσπερμικά δεν βρέθηκαν μόνο απομεθυλιωμένα στοιχεία HERV-K10 (Πίνακας 13).

Παρατηρούμε πως τα ολιγοσπερμικά δείγματα δεν ακολουθούν το πρότυπο μεθυλίωσης του HERV-K10 των φυσιολογικών υποδεικνύοντας διαταραχή της μεθυλίωσης.

Στατιστική ανάλυση χ^2 ανάμεσα σε φυσιολογικά και ολιγοσπερμικά δείγματα δεν καθίσταται δυνατή αφού δεν βρέθηκε κανένα ολιγοσπερμικό δείγμα που να φέρει μόνο μεθυλιωμένα αντίγραφα HERV-K10.

ΠΡΟΤΥΠΟ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ HERV-K10				
	ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΑ	ΜΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΑ	ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΑ/ ΜΗ ΜΕΘΥΛΙΩΜΕΝΑ	ΣΥΝΟΛΟ
ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΟΙ	57,14% (40)	0% (0)	42,86% (30)	100% (70)
ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΟ	0% (0)	0% (0)	100% (22)	100% (22)

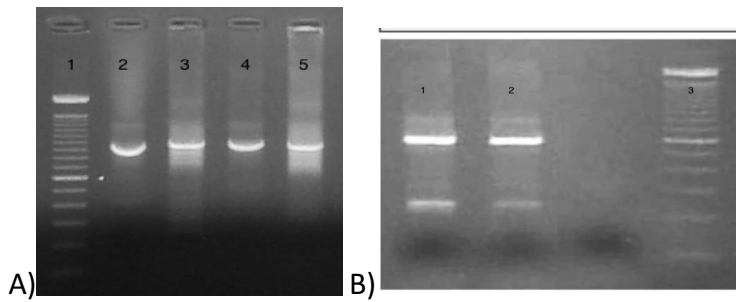
Πίνακας 13: Συγκεντρωτικός πίνακας μελέτης του προτύπου μεθυλίωσης των αντιγράφων HERV-K10.

5.7 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Στα σπερματοζωάρια από δείγματα σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους και σε σπερματοζωάρια από δείγματα σπέρματος με μη φυσιολογικές παραμέτρους που μελετήσαμε τη μεθυλίωση των ρετρομεταθετών LINE-1 και HERV-K10 θελήσαμε να μελετήσουμε και την έκφραση των δύο μεταθετών LINE-1 και HERV-K10. Για την μελέτη έκφρασης των μεταθετών στοιχείων χρησιμοποιήθηκε RNA από φυσιολογικά και ολιγοσπερμικά δείγματα. Για να αποφύγουμε πιθανή επιμόλυνση από το RNA των λευκών αιμοσφαιρίων και των επιθηλιακών κυττάρων, πραγματοποιήσαμε πλύσεις με κατάλληλο διάλυμα ώστε να τα καταστρέψουμε και να απομακρύνουμε. Μετά από κάθε πλύση έγινε έλεγχος στο μικροσκόπιο για τυχόν ύπαρξη σωματικών κυττάρων.

e

Η μελέτη της έκφρασης έγινε με RT-PCR από RNA σπερματοζωαρίων με τη χρήση ειδικών εκκινήτων για την ενίσχυση των ρετροτρανσποζονίων LINE-1 και HERV-K10. Το cDNA και το RNA από κάθε δείγμα ελέγχθηκε για επιμόλυνση από γενωμικό DNA με PCR για την πρωταμίνη 2. Σε όλα τα δείγματα cDNA που αναλύθηκαν, οι εκκινήτες LINE-1 έδωσαν ένα προϊόν των 948 bp, ενώ οι εκκινήτες HERV-K10 έδωσαν ένα προϊόν 606 bp και ένα προϊόν 240 bp το οποίο είναι τμήμα του σύνθετου μεταθετού SVA (Εικόνα 5.11). Η μελέτη έκφρασης έδειξε πως υπάρχουν μετάγραφα LINE-1, HERV-K10 και SVA τόσο στα φυσιολογικά όσο και στα ολιγοσπερμικά δείγματα.



Εικόνα 5.11: Α) Έκφραση LINE-1 σπερματοζωάρια ζώνη στο 948 bp. 1) 100bp ladder 2),3) Ολιγοσπερμικά δείγματα που εκφράζουν το LINE-1, 4) και 5) Φυσιολογικά δείγματα που εκφράζουν το LINE-1. Β) Έκφραση HERV-K10 σπερματοζωάρια ζώνη στο 606 bp. και έκφραση SVA 240bp 1) Ολιγοσπερμικό δείγμα που εκφράζει HERV-K10 και SVA 2) Φυσιολογικό δείγμα που εκφράζει HERV-K10 και SVA 3) 100bp ladder.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

6.1 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Το μεταθετό στοιχείο LINE-1 ανήκει στην ομάδα των ρετροτρανσποζονίων και αποτελεί ένα αυτόνομο ενεργό στοιχείο των ανθρώπινων κυττάρων. Λόγω της ικανότητάς του να μετατίθεται σε διάφορες περιοχές του γενώματος, είναι ικανό να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στη δομή και λειτουργία των γονιδίων και συνεπώς στην έκφραση των πρωτεϊνών τους, με αποτέλεσμα τη δημιουργία μεταλλάξεων και νοσημάτων όπως ο καρκίνος. Συνήθως, τα ρετροτρανσποζόνια είναι υπερμεθυλωμένα για να μη μπορούν να προκαλέσουν την οποιαδήποτε βλάβη στο γονιδίωμα. Όμως, ένας πληθυσμός που ανέρχεται στα 80-100 αντίγραφα παραμένει μεταγραφικά ενεργός και μπορεί να επάγει τη ρετρομετάθεση του ίδιου και άλλων μη αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων (233).

Για τους λόγους που προαναφέρθηκαν είναι ιδιαίζουσας σημασίας η ελεγχόμενη ενεργοποίηση και απενεργοποίηση τέτοιων στοιχείων, διαδικασία που συμβαίνει κατά τον επαναπρογραμματισμό του γενώματος στα PGCs. Συνεπώς, λάθη κατά τον επαναπρογραμματισμό των γαμετών μπορεί να οδηγήσουν σε "παθολογικούς" γαμέτες. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί ότι η μειωμένη συγκέντρωση σπέρματος, η χαμηλή κινητικότητα και η ανώμαλη μορφολογία έχουν συνδεθεί με διαταραχή της μεθυλίωσης σε ένα εύρος περιοχών (239). Γι' αυτό το λόγο μελετήσαμε το σύνολο του ποσοστού μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού LINE-1 καθώς και το ποσοστό μεθυλίωσης των μοτίβων των 2 CpGs νησίδων, τα οποία βρίσκονται στο UTR του ενεργού ρετρομεταθετού L1.2, σε φυσιολογικά και ολιγοσπερμικά δείγματα για τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης μεταξύ φυσιολογικών και μη φυσιολογικών παραμέτρων (όπως η ολιγοσπερμία) και της συνολικής μεθυλίωσης του LINE-1 και των προτύπων των CpGs.

Τα αποτελέσματα εμφανίζουν ότι δεν υπάρχει κάποια στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της ομάδας των ολιγοσπερμικών και φυσιολογικών δειγμάτων ως προς τις

παραμέτρους του σπέρματος (WHO, World Health Organization) (237) τόσο στο σύνολο ποσοστού της μεθυλίωσης (mC) των LINE-1 όσο και στο ποσοστό εμφάνισης των τεσσάρων μοτίβων μεθυλίωσης των CpGs ($^mC^uC$, $^uC^mC$, $^mC^mC$, $^uC^uC$). Σε παρόμοια μελέτη που έγινε για να εξεταστεί η διαφορά της συνολικής μεθυλίωσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο group, για κανένα από τα ρετρομεταθετά που εξετάστηκαν, συμπεριλαμβανομένου του LINE-1 (240). Συνεπώς, ο ολιγοσπερμικός φαινότυπος δε συνδέεται με διαταραχές της μεθυλίωσης και των μοτίβων του LINE-1 ρετρομεταθετού.

Οι μεταβολές στη μεθυλίωση των ρετρομεταθετών στοιχείων, συμπεριλαμβανομένου και του του LINE-1, θεωρούνται αντιπροσωπευτικές της γενική μεθυλίωσης του DNA (241). Η DNA μεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων στοιχείων, κατά τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων, είναι διαφορετική για τα ωάρια και για τα σπερματοζωάρια (242, 243) ενώ ο σημαντικός ρόλος της μεθυλίωσης του DNA των ρετροτρανσποζονίων έχει περιγράψει κυρίως στα σπερματοζωάρια ως μηχανισμός αποτύπωσης του γενετικού υλικού των σπερματοζωαρίων (244) Τα αποτελέσματά της μελέτης, μας σχετικά με το ποσοστό μεθυλίωση του DNA του ρετροτρανσποζονίου LINE-1 ανάμεσα σε ολιγοσπερμικά και φυσιολογικά δείγματα ως προς τις παραμέτρους του σπέρματος, δεν έδειξαν διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων και συμφωνούν με τα αποτελέσματα των ερευνητικών ομάδων που μελέτησαν την μεθυλίωση του DNA ανάμεσα σε ολιγοσπερμικά και φυσιολογικά δείγματα (245, 246). Τέλος, η μελέτη έδειξε πως οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες LINE-1 είναι υπερμεθυλιωμένες, σε ασθενείς με σοβαρές διαταραχές του σπέρματος, που σχετίζονται με την επιγενετική αδρανοποίηση των γονιδίων PIWIL2 και TDRD1, τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των piRNA (247).

6.2 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ LINE-1 ΚΑΙ ΜΟΤΙΒΩΝ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΜΕ ΜΕΤΡΙΑ ΚΑΙ ΣΟΒΑΡΑ ΟΛΙΓΟΣΠΕΡΜΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Εφόσον δε βρέθηκε σημαντική διαφορά τόσο στο σύνολο της μεθυλίωσης όσο και στη συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων μεταξύ φυσιολογικών και ολιγοσπερμικών συνολικά, χωρίσαμε την ομάδα των ολιγοσπερμικών, με βάση τα κριτήρια του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας σε δύο ομάδες σε μέτρια και σοβαρά ολιγοσπερμικά. Με την κατηγοριοποίηση αυτή θέλαμε να δούμε αν υπάρχει διαφορά ανάμεσα σε φυσιολογικά και μέτρια ολιγοσπερμικά

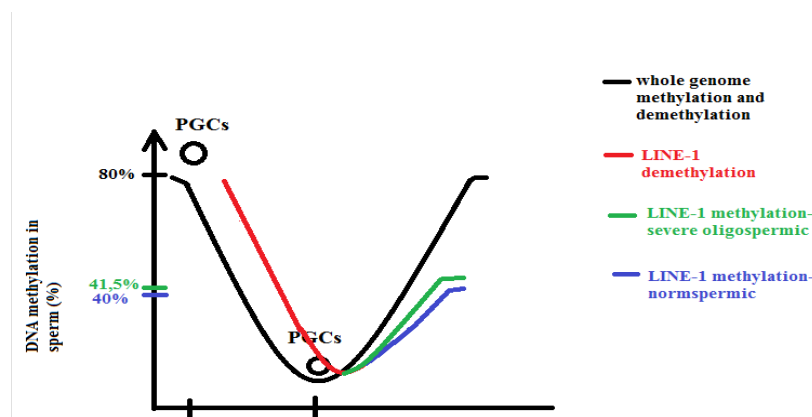
αλλά και μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στο σύνολο της μεθυλίωσης μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων, ενώ δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων. Αντιθέτως, δε βρέθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και μέτρια ολιγοσπερμικών δειγμάτων τόσο ως προς το σύνολο μεθυλίωσης του LINE-1 όσο και στην εμφάνιση του εκάστοτε μοτίβου.

Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν διαταραχή στο σύνολο μεθυλίωσης των σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων σε σχέση με τα δείγματα εντός των φυσιολογικών παραμέτρων. Διαταραχές στο σύνολο της μεθυλίωσης έχουν βρεθεί σε άντρες με σοβαρή ολιγοσπερμία ή προβλήματα κινητικότητας στο σπέρμα, ειδικά όταν εκτίθενται σε παράγοντες που μπορεί να αλλάξουν τα επιγενετικά σήματα μεθυλίωσης. Έπειτα από έρευνα που έγινε για την επίδραση της ουσίας BPA (Bisphenol A) στον ανθρώπινο οργανισμό, μετρήθηκε το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού LINE-1 στο σπέρμα σε εργάτες που δούλευαν σε εργοστάσια και εκτίθονταν σε αυτή και σε άντρες που δεν έρχονταν σε επαφή με τη συγκεκριμένη ουσία. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά στο συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης μεταξύ control ομάδας και εργατών που εκτίθενται σε BPA. Συγκεκριμένα, τα LINE-1 στο σπέρμα των εργατών ήταν υπομεθυλωμένα σε σχέση με αυτά του control group (248).

Τα δεδομένα μας δείχνουν ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και μέτρια ολιγοσπερμικών δειγμάτων στο σύνολο της μεθυλίωσης αλλά υπάρχει μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών, βέβαια, σε παρόμοια μελέτη που έγινε σε υπογόνιμους άντρες, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων **(246)**. Δεν μπορούμε να εξηγήσουμε το λόγο που οδηγηθήκαμε σε διαφορετικά αποτελέσματα από την παραπάνω μελέτη, καθώς τα πειράματα και στις δύο μελέτες έγιναν με την τεχνική COBRALINE-1 και ο αριθμός των δειγμάτων των σοβαρά ολιγοσπερμικών ατόμων ήταν περίπου ο ίδιος.

Αν υποθέσουμε ότι η μελέτη μας απέδωσε αξιόπιστα αποτελέσματα, θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί υπερμεθυλώνουν το σπέρμα των σοβαρά ολιγοασθεντοσπερμικών ώστε να περιορίσουν την ρετρομετάθεση και να μην

προκαλέσει κι επιπρόσθετα προβλήματα στα σπερματοζώαρια, που ήδη είναι λιγοστά. Ένας τέτοιος μηχανισμός μεθυλίωσης θα μπορούσε να αποδοθεί στα piRNA, που αποτελούν έναν από τους μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων. Τα piRNA αποσιωπούν τα mRNA που μεταγράφονται από τα ρετροτρανσποζόνια και τα χρησιμοποιούν ως υπόστρωμα για τη δημιουργία δευτερογενών piRNA, μέσω του μηχανισμού ping-pong. Εκτός από αυτή τους τη δράση, τα piRNA έχουν τη δυνατότητα να μεθυλιώνουν de novo τα ρετρομεταθετά (218). Σε πείραμα που έγινε σε πειραματόζωα που δεν είχαν τις αργοναυτικές πρωτεΐνες Miwi2 και Mili, η έκφραση των ρετροτρανσποζονίων κορυφώθηκε, ενώ μειώθηκε η μεθυλίωσή τους (223). Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι τα φυσιολογικά άτομα έχουν χαμηλότερα επίπεδα συνολικής μεθυλίωσης καθώς και διαφορετικά μοτίβα μεθυλίωσης του LINE-1 σε σχέση με τα ολιγοσπερμικά άτομα. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται σε λάθη στην αρχική διαδικασία της απομεθυλίωσης των πρώιμων γαμετικών κυττάρων (PGCs) και όχι σε ανωμαλίες κατά τον επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης στο στάδιο ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (Εικόνα 6.1). Φαίνεται πως το λανθασμένο πρότυπο της DNA μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού LINE-1 μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα λόγω της ανεξέλεγκτης ρετρομετάθεσής τους.



- **Εικόνα 6.1:** Προτεινόμενο μοντέλο μεθυλίωσης των LINE-1 κατά την σπερματογένεση.

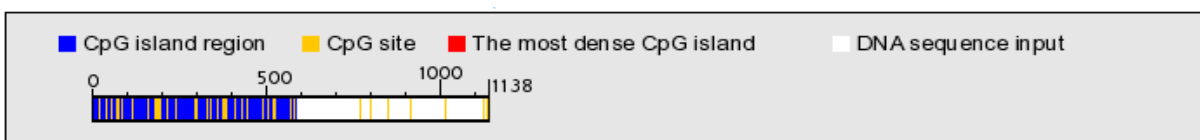
Μία ακόμη αιτία που θα μπορούσε να διαταράξει τα πρότυπα μεθυλίωσης είναι λάθη κατά τα σημεία ελέγχου (checkpoints) του κυτταρικού κύκλου. Τυχόν διαταραχές στην παραγωγή πρωτεϊνών που ελέγχουν τον κυτταρικό κύκλο, έχει ως αποτέλεσμα το λανθασμένο έλεγχο και συνεπώς την παραγωγή παθολογικών κυττάρων. Τέτοιες διαταραχές του κυτταρικού κύκλου συναντώνται στον καρκίνο. Ο κυτταρικός κύκλος ρυθμίζεται από πολλές πρωτεΐνες και κάθε μία από αυτές είναι σημαντική για τη σωστή ολοκλήρωσή του. Ανάμεσα σε αυτές υπάρχουν πρωτεΐνες που επιτελούν ουβικυτινυλίωση και επηρεάζουν το ποιες ιστόνες θα μεθυλιωθούν. Συνεπώς, διαταραχές σε τέτοιες πρωτεΐνες θα μπορούσαν να προκαλέσουν διαταραχές στη μεθυλίωση και στην έκφραση γονιδίων (250).

Η φυσιολογική προτύπωση της μεθυλίωσης των DNA των CpGs των στοιχείων LINE-1 μπορεί να επηρεαστεί από τη δραστικότητα της μεθυλοτρανσφεράσης DNMT3L, η οποία δρα ως συμπαράγοντας με την DNMT3α για την de novo μεθυλίωση του LINE-1 στα σπερματοζωάρια (Chedin et al., 2002). Ο κύριος ρόλος της DNMT3L είναι η αποσιώπηση των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα (244, 249). Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν πως μεταλλάξεις στα γονίδια Dnmt3L και Dnmt3a οδηγούν σε διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης εάν και παρόμοιες μεταλλάξεις δεν έχουν βρεθεί σε μη φυσιολογικά δείγματα σπερματοζωαρίων,

6.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΟΤΙΒΩΝ LINE-1

Η πλειοψηφία των δινουκλεοτιδίων CpG συναντάται σε CpG νησίδες στους υποκινητές γονιδίων και σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Οι νησίδες αυτές μπορούν να διακριθούν σε υψηλής πυκνότητας CpG (high density CpG islands) και σε χαμηλής πυκνότητας (low density CpG islands). Στην πρώτη περίπτωση, τα δινουκλεοτίδια CpG συναντώνται μία φορά κάθε 10 βάσεις και η πλειοψηφία τους είναι υπομεθυλωμένη. Αντιθέτως, στη δεύτερη περίπτωση συναντώνται μία φορά κάθε 100 βάσεις και είναι μεθυλωμένα. Η ύπαρξη τέτοιων νησίδων στους υποκινητές γονιδίων μπορεί να καθορίσει την έκφρασή τους. Αν για παράδειγμα το μεγαλύτερο σύνολο των CpG δινουκλεοτιδίων σε μια νησίδα ενός υποκινητή είναι μεθυλωμένο, τότε είναι πιθανό αυτό να σημαίνει την αποσιώπηση του γονιδίου, καθώς ο υποκινητής είναι απλησίαστος για τους μεταγραφικούς παράγοντες .

Τα διαφορετικά μοτίβα LINE-1 προκύπτουν από τη διαφορετική μεθυλίωση των δύο από τις 36 CpG περιοχές που βρίσκονται εντός της UTR περιοχής του ρετρομεταθετού L1.2. Η UTR περιοχή ανέρχεται στις 909 βάσεις. Οι βάσεις 1 έως 560 πληρούν όλα τα κριτήρια των CpG νησίδων (true CpG island), καθώς η περιοχή είναι μεγαλύτερη από 500 βάσεις και έχει περιεκτικότητα σε C και G μεγαλύτερη από 55%. Η νησίδα αυτή θεωρείται high density καθώς υπάρχει περίπου 1 CpG ανά 10 βάσεις (Εικόνα 6.1) (251). Ενώ περιμένουμε να δούμε ότι η UTR περιοχή θα είναι υπομεθυλιωμένη επειδή είναι high density CpG island, διαπιστώσαμε ότι ισχύει ακριβώς το αντίθετο. Ένα τέτοιο εύρημα υποδηλώνει ότι η UTR περιοχή του L1.2 δρα ως DMR, κάτι που θα εξηγούσε και τη διαφορά στο σύνολο μεθυλίωσης μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων.



Εικόνα 6.1: CpG νησίδα της UTR περιοχής του ρετρομεταθετού LINE-1

Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα για τη συσχέτιση των προτύπων στα φυσιολογικά δείγματα, φαίνεται πως υπάρχει μία θετική συσχέτιση μεταξύ του ημιμεθυλιωμένου προτύπου mCuC και του πλήρως απομεθυλιωμένου προτύπου uCuC. Δηλαδή, η αύξηση του ποσοστού εμφάνισης του συγκεκριμένου μοτίβου συνεπάγεται τη συνακόλουθη αύξηση του μοτίβου uCuC, κάτι που δεν παρατηρείται στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων. Επίσης, φάνηκε ότι στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων, το μερικώς μεθυλιωμένο μοτίβο mCuC συσχετίζεται αρνητικά με το πλήρως μεθυλιωμένο μοτίβο mCmC, κάτι που δε συμβαίνει στα φυσιολογικά. Δηλαδή, η μείωση εμφάνισης του μοτίβου mCmC σχετίζεται με την αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του μοτίβου mCuC. Έπειτα, διαπιστώσαμε ότι το μοτίβο uCmC εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με τα μοτίβα uCuC και mCmC τόσο στα φυσιολογικά όσο και στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων.

Γνωρίζουμε ότι τα LINE-1s είναι ομόλογες περιοχές. Παρά την ομοιότητάς τους, μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης ανάλογα με την περιοχή στην

οποία εισέρχονται. Μάλιστα, κάποιες περιοχές είναι αντιπροσωπευτικές για τη διάκριση μεταξύ φυσιολογικών και καρκινικών κυττάρων. Ενώ γνωρίζουμε ότι η υπομεθυλίωση αυτών των στοιχείων γίνεται συνολικά και μπορεί να προκαλέσει καρκίνο, υπάρχουν περιοχές όπου παρατηρείται υπερμεθυλίωση. Συνεπώς, μπορούμε να πούμε ότι τα δινουκλεοτίδια CpGs αυτών των στοιχείων μεθυλιώνονται διαφορετικά ανάλογα με το σημείο εισαγωγής τους. Η διαφορετική μεθυλίωση ενδέχεται να συμβαίνει *in cis* από παράγοντες που εδράζονται στο ίδιο χρωμόσωμα(252).

Σε παρόμοια μελέτη που έγινε από τους Taungtong Pobsook et al, αποδείχθηκε ότι υπάρχει διαφορετική συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών μοτίβων του LINE-1 σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα. Στα καρκινικά κύτταρα, το μερικώς μεθυλιωμένο μοτίβο mCpC παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με το υπομεθυλιωμένο μοτίβο και θετική συσχέτιση με το υπερμεθυλιωμένο μοτίβο. Επίσης, τα καρκινικά κύτταρα παρουσίαζαν το μερικώς μεθυλιωμένο μοτίβο σε μικρότερο ποσοστό από τα φυσιολογικά, υποδηλώνοντας ότι το υπομεθυλιωμένο μοτίβο έχει προέλθει από απώλεια της μεθυλίωσης στο μερικώς μεθυλιωμένο και στο υπερμεθυλιωμένο μοτίβο. Τα δεδομένα που αποκτήθηκαν από τα πρότυπα μεθυλίωσης στα φυσιολογικά κύτταρα ήταν ακριβώς τα αντίθετα. Το μερικώς μεθυλιωμένο μοτίβο εμφάνιζε αρνητική συσχέτιση με το πλήρως μεθυλιωμένο, πιθανώς λόγω της εναλλαγής των μοτίβων μεθυλίωσης του LINE-1 στα φυσιολογικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά δηλώνουν ότι είναι διαφορετικοί οι μηχανισμοί που ελέγχουν την προσθήκη ή αφαίρεση μεθυλομάδας στα φυσιολογικά κύτταρα απ' ό,τι στην καρκινογένεση (253).

Από τα αποτελέσματα που πήραμε και σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η διαδοχή των μοτίβων στα δύο CpG που μελετήθηκαν δεν είναι τυχαία. Θα μπορούσε η νησίδα που παρατηρείται στο UTR, να δρα σαν DMR και τα δινουκλεοτίδια να μεθυλιώνονται ανάλογα με τη θέση ένθεσής τους. Η διαφορετική συσχέτιση των μοτίβων μεταξύ φυσιολογικών και ολιγοσπερμικών δειγμάτων δηλώνει αφενός τη διαταραχή της συσχέτισης λόγω του παθολογικού φαινότυπου των δεύτερων και αφετέρου τη διαφορετική θέση ένθεσης των LINE-1s στα ολιγοσπερμικά δείγματα κατά την απομεθυλίωση των ρετρομεταθετών και της ενεργοποίησής τους από τα PGCs μέχρι τα ώριμα σπερματοζωάρια. Λόγω της διαφορετικής θέσης ένθεσης, τα LINE-1s αντιμετωπίζονται

διαφορετικά από τους μηχανισμούς μεθυλίωσης και παρουσιάζονται εναλλαγές στη συσχέτιση στα διάφορα πρότυπα μεθυλίωσης.

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί ότι τα δείγματα των ολιγοσπερμικών ήταν πολύ λιγότερα από αυτά των φυσιολογικών. Μάλιστα, τα δείγματα των σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων ανέρχονται μόλις στα 9. Συνεπώς, για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων θα ήταν χρήσιμη η επανάληψη του πειράματος με περισσότερα ολιγοσπερμικά δείγματα, ώστε τα αποτελέσματα να είναι πιο σαφή στατιστικά.

6.4 ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΑ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ

Παρά τον μεγάλο αριθμό ρετρομεταθετών που συναντάμε στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, το ποσοστό έκφρασης RNA και ρετρομετάθεσης περιορίζεται σε ένα πολύ μικρό ποσοστό, καθώς τα περισσότερα από τα ρετρομεταθετά έχουν καταστεί ανενεργά λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων. Τα ρετροτρανσποζόνια LINE-1, που καταλαμβάνουν το 17% του ανθρώπινου γενετικού υλικού, είναι τα περισσότερα ρετροτρανσποζόνια και είναι υπεύθυνα για την πλειονότητα των γεγονότων ρετρομετάθεσης που έχουν παρατηρηθεί μέχρι στιγμής.

Αν και υπάρχουν χιλιάδες αντίγραφα, μόνο ένα μικρός αριθμός αυτών, περίπου 60-100, είναι ρετρομεταθετά ενεργός (56) (254). Τα μετάγραφα των ρετροτρανσποζονίων καθώς και πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά έχουν βρεθεί σε διάφορους τύπους σωματικών κυττάρων αλλά και σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στα φυσιολογικά σωματικά κύτταρα, τα γεγονότα ρετρομετάθεσης είναι περιορισμένα και για αυτό είναι πολύ δύσκολο να προσδιοριστούν. Μέχρι στιγμής, τα γεγονότα ρετρομετάθεσης έχει αποδειχθεί ότι συμβαίνουν στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξη του ποντικού και του ανθρώπου, στα πρόδρομα νευρικά κύτταρα και στα ώριμα κύτταρα του εγκεφάλου. Μέχρι στιγμής ρετρομεταθέσεις σε σωματικά κύτταρα έχουν αναφερθεί λίγες φορές σε ηπατικά κύτταρα (255) (51), σε κύτταρα του οισοφάγου, του στομάχου και του κόλουν (256-258), εν αντιθέσει με τα καρκινικά κύτταρα όπου έχουν καταγραφεί πολλές de novo ενθέσεις ρετρομεταθετών (257, 259, 260).

Η έκφραση των ρετρομεταθετών είναι συνήθως υπό κυτταρικό έλεγχο, εξασφαλίζοντας την κανονική λειτουργία των κυττάρων αποτρέποντας την υπερέκφραση τους. Η συνολική μεθυλίωση του DNA, η οποία αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης των ρετροτρανσποζονίων (168) (261), αναμένεται σε υψηλό ποσοστό στα ώριμα σπερματοζωάρια θηλαστικών και ανθρώπων (189). Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα ρετρομεταθετά LINE-1, HERV-K10 και SVA εκφράζονται στα σπερματοζωάρια ολιγοσπερμικών και φυσιολογικών αντρών. Η έκφρασή τους πιθανώς να αποδίδεται στην υπομεθυλίωση συγκεκριμένων περιοχών των σπερματοζωαρίων ή σε πρόσκαιρη υπομεθυλίωση του γονιδιώματος ορισμένων σπερματοζωαρίων ή μπορεί να είναι διατηρημένα μόρια RNA που έχουν εκφραστεί στα αρχικά στάδια της γαμετογένεσης. Τα ευρήματά μας είναι σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη που δείχνει υψηλά επίπεδα μεταγράφων LINEs και SINEs, σε ανθρώπινα σπερματοζωάρια (262) καθώς και υπομεθυλίωση των SVA στα ανθρώπινα σπερματοζωάρια (72). Επίσης η έκφραση πρωτεϊνών ORF1 και ORF2 σε προσπερματογόνια, σε ώριμα γαμετικά κύτταρα και σε διάφορους τύπους σωματικών κυττάρων, όπως τα Leydig, Sertoli και τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα υποστηρίζει την έκφραση των ρετρομεταθετών σε ώριμα σπερματοζωάρια από εκσπερμάτωση.

Στη μελέτη μας βρέθηκαν φυσιολογικά δείγματα με μόνο μεθυλιωμένα αντίγραφα HERV-K10 αλλά και φυσιολογικά δείγματα με μεθυλιωμένα και απομεθυλιωμένα HERV-K10 ενώ όλα τα ολιγοσπερμικά δείγματα με μη φυσιολογικές παραμέτρους, είχαν μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα αντίγραφα. Αποκλειστικά μεθυλιωμένα HERV-K10 βρεθήκαν μόνο στα φυσιολογικά δείγματα. Παρατηρούμε πως ανάμεσα στα ολιγοσπερμικά και στα φυσιολογικά δείγματα υπάρχει διαταραχή της μεθυλίωσης των HERV-K10. Τελευταίες μελέτες έχουν δείξει πως τα υπογόνιμα ζευγάρια που υποβάλλονται σε Ιατρικώς Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή έχουν κατά τεκμήριο διαταραχή του ανδρικού παράγοντα σε ποσοστό >50%. Μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε μείωση της μεθυλίωσης των ενδογενών ρετροϊών στον πλακούντα παιδιών από εξωσωματική σε σχέση με τον πλακούντα από παιδιά που έγινε η σύλληψη φυσιολογικά. Παρατηρούμε πως σε περιπτώσεις υπογονιμότητας υπάρχει διαταραχή της μεθυλίωσης των ρετρομεταθετών. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τα αποτελέσματά μας στο ότι η μεθυλίωση μπορεί να διαταράσσεται σε περιπτώσεις υπογονιμότητας (263).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Δεν υπάρχει διαφορά στο σύνολο της μεθυλίωσης αλλά και στα μοτίβα μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού LINE-1 μεταξύ φυσιολογικών και ολιγοσπερμικών δειγμάτων.
- Εμφανίζεται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων στο σύνολο της μεθυλίωσης του LINE-1 αλλά όχι στα μοτίβα μεθυλίωσης.
- Στα φυσιολογικά δείγματα εμφανίζεται μία θετική συσχέτιση μεταξύ των μοτίβων mCuC και uCuC.
- Στα ολιγοσπερμικά δείγματα το πρότυπο mCuC παρουσιάζει αρνητική συσχέτιση με το μοτίβο mCmC.
- Διαπιστώθηκε ότι το μοτίβο uCmC εμφανίζει αρνητική συσχέτιση με τα πρότυπα mCmC και uCuC τόσο σε φυσιολογικά όσο και σε ολιγοσπερμικά δείγματα.
- Ενδέχεται να υπάρχει κάποιος μηχανισμός στα σοβαρά ολιγοσπερμικά δείγματα που αναγνωρίζει τα προβλήματα του κυττάρου και υπερμεθυλιώνει το LINE-1 για την πρόληψη επιπλέον προβλημάτων από τη ρετρομετάθεσή του.
- Φαίνεται πως το λανθασμένο πρότυπο της DNA μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού LINE-1 μπορεί να οδηγήσει σε υπογονιμότητα λόγω της ανεξέλεγκτης ρετρομετάθεσής τους.
- Οι διαφορές στη μεθυλίωση στα σοβαρά ολιγοσπερμικά και στα φυσιολογικά δείγματα μπορεί να οφείλονται σε λάθη στην αρχική διαδικασία της απομεθυλίωσης των πρώιμων γαμετικών κυττάρων (PGCs) και όχι σε ανωμαλίες κατά τον επαναπρογραμματισμό της μεθυλίωσης στο στάδιο ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων.
- Οι CpG περιοχές του LINE-1 δρουν ως DMRs και υπόκεινται σε διαφορετική μεθυλίωση ανάλογα με τη θέση ένθεσής τους.
- Ο μηχανισμός μεθυλίωσης και απομεθυλίωσης που δρα στα φυσιολογικά και στα ολιγοσπερμικά δείγματα είναι διαφορετικός.

- Η έκφρασή των ρετρομεταθετών μπορεί να αποδίδεται στην υπομεθυλίωση συγκεκριμένων περιοχών των σπερματοζωαρίων ή σε πρόσκαιρη υπομεθυλίωση του γονιδιώματος ορισμένων σπερματοζωαρίων ή μπορεί να είναι διατηρημένα μόρια RNA που έχουν εκφραστεί στα αρχικά στάδια της γαμετογένεσης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το γένωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών, εκτός από τα γονίδια, αποτελείται και από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA οι οποίες καταλαμβάνουν το 50% του ανθρώπινου γενώματος. Τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια είναι μη κωδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA, οι οποίες έχουν την ιδιότητα να μεταπηδούν σε νέες θέσεις στο γένωμα, μια ιδιότητά τους γνωστή ως μετάθεση. Τα μεταθετά στοιχεία κατηγοριοποιούνται σε δυο κύριες τάξεις, στα DNA τρανσποζόνια και στα ρετροτρανσποζόνια. Τα ρετροτρανσποζόνια είναι ενδογενή στοιχεία των ευκαρυωτικών οργανισμών. Αποτελούν το 90% του συνόλου των μεταθετών στοιχείων στον άνθρωπο.

Τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία, LINEs, είναι τα πιο μελετημένα αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR. Καταλαμβάνουν το 20% του γενώματος στον άνθρωπο με περίπου 700.000 αντίγραφα. Τα LINE-1 παρά το μεγάλο αριθμό αντιγράφων στο ανθρώπινο γονιδίωμα, τα πλήρους μήκους είναι περίπου 3.000 με 5.000 ενώ-τα ενεργά είναι περίπου 100. Άλλη μια σημαντική κατηγορία ρετρομεθετών είναι οι ενδογενείς ρετροϊοί HERV-K10. Οι ανθρώπινοι ενδογενείς ρετροϊοί (Human endogenous retrovirus, HERV) αποτελούν τα κατάλοιπα της μόλυνσης των ανθρώπινων γαμετικών κυττάρων από εξωγενείς ρετροϊούς.

Σε έναν πολυκύτταρο οργανισμό είναι σαφές πως για την ανάπτυξή του απαραίτητες είναι και οι επιγενετικές τροποποιήσεις ορίζουν το πότε και που θα εκφραστούν τα γονίδια. Η μόνη μελετημένη επιγενετική τροποποίηση του DNA είναι η μεθυλίωση. Η μεθυλίωση του DNA στα θηλαστικά αποτελεί μια δυναμική αλλά και αυστηρά ελεγχόμενη διαδικασία, η οποία συμμετέχει σε πληθώρα κυτταρικών διεργασιών και αποτελεί ταυτόχρονα και το σημαντικότερο επιγενετικό παράγοντα στη μεταγραφική αποσιώπηση των γονιδίων (gene silencing). Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή των γονιδίων είτε άμεσα είτε έμμεσα τόσο σε επίπεδο χρωματίνης όσο και σε επίπεδο γονιδίου.

Τα μεταθετά στοιχεία των γαμετών υπόκεινται σε επαναπρογραμματισμό της DNA μεθυλίωσης τους, που συμβαίνει σε δυο στάδια. Στο πρώτο στάδιο έχουμε την απομεθυλίωση των μεταθετών στοιχείων των αρρένων γαμετικών κυττάρων και λαμβάνει χώρα κατά τη μετακίνηση των PGCs στις αρχέγονες γονάδες. Τα μεταθετά στοιχεία LINEs, IAP

αλλά και περιοχές μικροδορυφορικού DNA απομεθυλώνονται σταδιακά και όχι πλήρως διατηρώντας το 16-60% της αρχικής μεθυλίωσης του DNA. Την απομεθυλίωση ακολουθεί η de novo μεθυλίωση του DNA μεταθετών στοιχείων και συμβαίνει στα μη διαιρούμενα EGCs στο στάδιο πριν εισέλθουν στη μείωση.

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και η ποσοτικοποίηση του συνόλου της μεθυλίωσης και των μοτίβων μεθυλίωσης με βάση τη μεθυλιωτική κατάσταση των CpGs των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 ανάμεσα σε σπερματοζωάρια από δείγματα σπέρματος με φυσιολογικές παραμέτρους και σε σπερματοζωάρια από δείγματα σπέρματος με μη φυσιολογικές παραμέτρους. Επίσης σκοπός της διατριβής είναι η μελέτη της έκφρασης των ρετρομεταθετών στοιχείων LINE-1 και HERV-K10 στα σπερματοζωάρια.

Αρχικά μελετήσαμε το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης (mC) των LINE-1 όσο και το ποσοστό εμφάνισης των τεσσάρων μοτίβων μεθυλίωσης των CpGs (mC^uC , uC^mC , mC^mC , uC^uC) μεταξύ της ομάδας των ολιγοσπερμικών και φυσιολογικών δειγμάτων ως προς τις παραμέτρους του σπέρματος. Τα αποτελέσματά μας δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά. Συνεπώς, ο ολιγοσπερμικός φαινότυπος δε συνδέεται με διαταραχές της μεθυλίωσης και των μοτίβων του LINE-1 ρετρομεταθετού. Εν συνεχεία μελετήσαμε το συνολικό ποσοστό μεθυλίωσης των LINE-1 όσο και το ποσοστό εμφάνισης των τεσσάρων μοτίβων μεθυλίωσης των CpGs μεταξύ της ομάδας των σοβαρά ολιγοσπερμικών και φυσιολογικών δειγμάτων ως προς τις παραμέτρους του σπέρματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στο σύνολο της μεθυλίωσης μεταξύ φυσιολογικών και σοβαρά ολιγοσπερμικών δειγμάτων, ενώ δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στη συχνότητα εμφάνισης των μοτίβων.

Επόμενο στάδιο ήταν η συσχέτιση των μοτίβων μεθυλίωσης. Από τα αποτελέσματά μας, φαίνεται φάνηκε ότι στο σύνολο των ολιγοσπερμικών δειγμάτων, το μερικώς μεθυλιωμένο μοτίβο $mCuC$ συσχετίζεται αρνητικά με το πλήρως μεθυλιωμένο μοτίβο $mCmC$, κάτι που δε συμβαίνει στα φυσιολογικά. Δηλαδή, η μείωση εμφάνισης του μοτίβου $mCmC$ σχετίζεται με την αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης του μοτίβου $mCuC$.

Στη μελέτη μας βρέθηκαν φυσιολογικά δείγματα με μονο μεθυλιωμένα αντίγραφα HERV-K10 αλλά και φυσιολογικά δείγματα με μεθυλιωμένα και απομεθυλιωμένα HERV-K10

ενώ όλα τα ολιγοσπερμικά δείγματα με μη φυσιολογικές παραμέτρους, είχαν μεθυλιωμένα και μη μεθυλιωμένα αντίγραφα. Παρατηρούμε πως ανάμεσα στα ολιγοσπερμικά και στα φυσιολογικά δείγματα υπάρχει διαταραχή της μεθυλίωσης των HERV-K10.

Η έκφραση των ρετρομεταθετών είναι συνήθως υπό κυτταρικό έλεγχο, εξασφαλίζοντας την κανονική λειτουργία των κυττάρων αποτρέποντας την υπερέκφραση τους. Η συνολική μεθυλίωση του DNA, η οποία αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή της έκφρασης των ρετροτρανσποζονίων, αναμένεται σε υψηλό ποσοστό στα ώριμα σπερματοζωάρια θηλαστικών και ανθρώπων. Ωστόσο, τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι τα ρετρομεταθετά LINE-1, HERV-K10 και SVA εκφράζονται στα σπερματοζωάρια ολιγοσπερμικών και φυσιολογικών αντρών. Η έκφρασή τους πιθανώς να αποδίδεται στην υπομεθυλίωση συγκεκριμένων περιοχών των σπερματοζωαρίων ή σε πρόσκαιρη υπομεθυλίωση του γονιδιώματος ορισμένων σπερματοζωαρίων ή μπορεί να είναι διατηρημένα μόρια RNA που έχουν εκφραστεί στα αρχικά στάδια της γαμετογένεσης

CHARILAOS A. KOSTOULAS

PhD, THESIS

EPIGENETIC MODIFICATION OF LINE1 AND HERVK-10 METHYLATION IN GAMETES OF IFERTILE MALES

ABSTRACT

We intend to investigate the overall methylation level and the four different patterns on methylation status of two CpGs ($^mC^mC$, $^mC^uC$, $^uC^mC$, $^uC^uC$) of LINE-1 on normozoospermic and oligospermic men.

DNA methylation in mammals is a dynamic and strictly controlled process which is involved in numerous cellular processes, cell differentiation, regulation of gene expression, genome reprogramming and silencing of repetitive elements.

In mammals, the epigenetic reprogramming is crucial for germ cells development. The principal epigenetic regulatory mechanism is DNA methylation and occurs in the phase of gametogenesis and upon early embryo stages. During gametogenesis there are occurred periods of DNA methylation and demethylation. There are 500.00 copies of LINE-1 in the human genome. Aberrant DNA methylation levels of LINE-1 have been implicated in various human diseases.

The study consisted of 92 men. A detailed medical history was obtained from all subjects. The subjects were split into two groups: normozoospermic (70 men) and oligospermic (22 men, $<20 \times 10^6$ spermatozoa). The oligospermic group was classified into Mid (1 man, $10-20 \times 10^6$ spermatozoa), Moderate (12 men, $5-10 \times 10^6$ spermatozoa) and Severe (9 men $<5 \times 10^6$ spermatozoa). Semen was analyzed according to the WHO criteria. LINE-1 overall methylation level and methylation pattern of the oligospermic group were compared to the normozoospermic one.

Methylation level and pattern of LINE-1 was measured via COBRA. DNA was extracted from human sperm and treated with sodium Bisulfite. DNA was amplified using primers which were designed to amplify 5'UTR. Amplicons were digested with enzymes. Products were

electrophoresed in polyacrylamide-gel and the intensities of the bands were measured by a phosphoimager. COBRA assays were performed in duplicate. For intra-inter assay variation DNA from HeLa, Jurkat and Daudi cells as positive controls were used. A major limitation in Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) is that high proportion of DNA is too degraded to be analyzed.

COBRALINE-1 results were sorted into four groups according on the methylation the status of the two CpG dinucleotides from the 5'-3'ends of sequence: hypermethylation (^mC^mC), hypomethylation (^uC^uC), partial methylation of the 5' (^mC^uC) and partial methylation of the 3' (^uC^mC).

From statistical analysis revealed significant differences ($p=0.039$) in the overall methylation levels of LINE-1 in the normozoospermic and severe oligospermia samples. We observed that in the severe oligospermia samples the overall methylation levels (41.52%) were significant higher levels than in normozoospermic samples (40.62%).

From the correlation analysis in normozoospermic samples found statistically significant relationship ($p=0.031$) between the levels of the partially methylated pattern mCuC and hypomethylated uCuC motif. It was found that there is a direct correlation ($r=0.258$) between the two patterns. In oligospermic there was no significant difference.

The correlation analysis in oligospermic samples found statistically significant relationship ($p=0,012$) between the levels of partially methylated pattern mCuC and methylated pattern mCmC. It was found that there is an inversely correlation ($r=-0,526$) between the two patterns. In normozoospermic there was no significant difference.

In addition, the correlation of partially methylated pattern uCmC and hypermethylated pattern mCmC was inverse in both oligospermic and normozoospermic ($p=0,003$, $r=-0,602$ and $p=0,0001$, $r=-0,625$ respectively).

Our data show a difference in the overall methylation level and different correlation in the methylation pattern on normozoospermic and oligospermic men.

Our findings show that in normozoospermic samples the unmethylated sequences derived from partially methylated LINE-1s mCuC motif. Unlike, in oligospermic samples the

inverse correlation indicates change of methylated LINE-1 with partially mCuC pattern. Therefore, the difference in methylation levels show different genomic allocation of LINE-1 methylation between normozoospermic and oligospermic.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

3'UTR, 3' Untranslated Region

5'UTR, 5' Untranslated Region

5hmC, 5' 5-Hydroxymethylcytosine

5mC, 5-methylcytosine

ABP, Androgen binding receptor

AGM, Aorta-Mesonephros-Gonad

AMH, Anti- Müllerian Hormone

Amhr-II, Anti- Müllerian hormone receptor II

cDNA, Complementary DNA

DMRs, Differentially Methylated Regions

DNMT, DNA methyltransferase

DSBs, Double Strand Breaks

EN, Endonuclease

EN_i, endonuclease-indepentant

FSH, Follicie-stimulating Hormone

GnRH, Gonadotropin Releasing Hormone

IC, imprinting centre

ICM, Inner Cell Mass

LH, Luteinizing Hormone

LINES, Long Interspersed Nuclear Elements

LTRs, Long Terminal Repeats

miRNAs, microRNAs

MMTV, Mouse Mammary Tumor Virus

NHEJ, non homologous end joining

non LTRs, Non Long Terminal Repeats

ORF, open reading frame

PBS, primer binding site

PGCs, Promordial Germ Cells

piRNAs, PIWI-interacting RNAs

RMD, recombination-mediated deletions

RNPs, Ribonucleic Particles

RT, reverse Transcriptase

SD, Splice Donor

SINEs, Short Interspersed Nuclear Elements

siRNAs, short-interference RNAs

SRY, sex-determining region

TDF, Testis Determining Factor

TET, Ten Eleven Translocation

TIRs, terminal inverted repeats

TPRT, Target Primed Reverse Transcription

TSD, Target Site Duplications

VLP, virus-like particle

VNTR, Variable Number Tandem Repeats

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological reviews*. 2007;87(1):1-28.
2. MacLaughlin DT, Teixeira J, Donahoe PK. Perspective: reproductive tract development--new discoveries and future directions. *Endocrinology*. 2001;142(6):2167-72.
3. Eicher EM, Washburn LL. Genetic control of primary sex determination in mice. *Annual review of genetics*. 1986;20:327-60.
4. Medvinsky AL, Dzierzak EA. Development of the definitive hematopoietic hierarchy in the mouse. *Developmental and comparative immunology*. 1998;22(3):289-301.
5. Waters BL, Trainer TD. Development of the human fetal testis. *Pediatric pathology & laboratory medicine : journal of the Society for Pediatric Pathology, affiliated with the International Paediatric Pathology Association*. 1996;16(1):9-23.
6. Larsen WJ. Gametogenesis, Fertilization, and First Week. *Human Embryology 4th ed: CHURCHILL LIVINGSTONE*; 2008.
7. Larsen WJ. Development of the Urogenital System. *Human Embryology. 4th ed: CHURCHILL LIVINGSTONE*; 2008.
8. Harley VR, Goodfellow PN. The biochemical role of SRY in sex determination. *Molecular reproduction and development*. 1994;39(2):184-93.
9. Warne GL, Zajac JD. Disorders of sexual differentiation. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1998;27(4):945-67, x.
10. Sadler T. Langman's medical embryology. Lippincott Williams LW, editor. USA: Wolters Kluwer Company,; 2006. pp 11-28, pp 229-56. p.
11. Kobayashi A, Behringer RR. Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(12):969-80.
12. Bullock J, Boyle JI, Wang M. *Physiology*. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Wolters Kluwer Company; 2001. p. 623-44.
13. Naz RK. Endocrine disruptors and male sexual dysfunction. *Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive systems: CRC Press*; 1999. p. 345-78.
14. Pawlina W, Ross MH. Male reproductive system. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology: Lippincott Williams & Wilkins*; 2007.
15. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*. 1972;52(1):198-236.
16. Pawlina W, Ross MH. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology: Lippincott Williams & Wilkins*; 2007.
17. Cobb J, Handel MA. Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Seminars in cell & developmental biology*. 1998;9(4):445-50.
18. Rousseaux S, Caron C, Govin J, Lestrat C, Faure AK, Khochbin S. Establishment of male-specific epigenetic information. *Gene*. 2005;345(2):139-53.

19. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:107.
20. Schulze C. Sertoli cells and Leydig cells in man. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 1984;88:1-104.
21. Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nature genetics*. 1994;7(1):59-63.
22. Kimmins S, Sassone-Corsi P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature*. 2005;434(7033):583-9.
23. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod*. 2005;20(5):1298-306.
24. Oliva R. Protamines and male infertility. *Human reproduction update*. 2006;12(4):417-35.
25. Zamudio NM, Chong S, O'Bryan MK. Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction*. 2008;136(2):131-46.
26. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*. 2002;296(5569):922-7.
27. Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, et al. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nature genetics*. 2001;27(3):271-6.
28. Brehm R, Steger K. Regulation of Sertoli cell and germ cell differentiation. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*. 2005;181:1-93.
29. 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.
30. Bohne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*. 2008;16(1):203-15.
31. McClintock B. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. 1956;21:197-216.
32. Mc CB. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1950;36(6):344-55.
33. Hickey DA. Selfish DNA: a sexually-transmitted nuclear parasite. *Genetics*. 1982;101(3-4):519-31.
34. Doolittle WF, Sapienza C. Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature*. 1980;284(5757):601-3.
35. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*. 1980;284(5757):604-7.
36. Goodier JL, Kazazian HH, Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008;135(1):23-35.
37. Biemont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. *Nature*. 2006;443(7111):521-4.

38. 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.
39. Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annual review of cell biology*. 1992;8:275-306.
40. Smit AF, Riggs AD. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(4):1443-8.
41. Mizuuchi K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annual review of biochemistry*. 1992;61:1011-51.
42. Doring HP, Tillmann E, Starlinger P. DNA sequence of the maize transposable element Dissociation. *Nature*. 1984;307(5947):127-30.
43. Kunze R. The maize transposable element activator (Ac). *Current topics in microbiology and immunology*. 1996;204:161-94.
44. Engels WR. P elements in *Drosophila*. *Current topics in microbiology and immunology*. 1996;204:103-23.
45. Pace JK, 2nd, Feschotte C. The evolutionary history of human DNA transposons: evidence for intense activity in the primate lineage. *Genome research*. 2007;17(4):422-32.
46. Kazazian HH, Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004;303(5664):1626-32.
47. Bennetzen JL. Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant molecular biology*. 2000;42(1):251-69.
48. Wessler SR. Plant transposable elements. A hard act to follow. *Plant physiology*. 2001;125(1):149-51.
49. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome research*. 2002;12(10):1455-65.
50. Kurth R, Bannert N. Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010;126(2):306-14.
51. Rowold DJ, Herrera RJ. Alu elements and the human genome. *Genetica*. 2000;108(1):57-72.
52. 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.
53. Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annual review of genetics*. 2001;35:501-38.
54. 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.
55. 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.
56. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5280-5.
57. Mizrokhi LJ, Georgieva SG, Ilyin YV. jockey, a mobile *Drosophila* element similar to mammalian LINEs, is transcribed from the internal promoter by RNA polymerase II. *Cell*. 1988;54(5):685-91.

58. McLean C, Bucheton A, Finnegan DJ. The 5' untranslated region of the I factor, a long interspersed nuclear element-like retrotransposon of *Drosophila melanogaster*, contains an internal promoter and sequences that regulate expression. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(2):1042-50.
59. Swergold GD. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Molecular and cellular biology*. 1990;10(12):6718-29.
60. Martin SL, Bushman FD. Nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein from the mouse LINE-1 retrotransposon. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(2):467-75.
61. Kolosha VO, Martin SL. High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(10):8112-7.
62. Hohjoh H, Singer MF. Sequence-specific single-strand RNA binding protein encoded by the human LINE-1 retrotransposon. *The EMBO journal*. 1997;16(19):6034-43.
63. 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.
64. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD, Gabriel A. Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science*. 1991;254(5039):1808-10.
65. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nature reviews Genetics*. 2009;10(10):691-703.
66. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, Boeke JD. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *The EMBO journal*. 2002;21(21):5899-910.
67. Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(5):370-9.
68. 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.
69. Shedlock AM, Okada N. SINE insertions: powerful tools for molecular systematics. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2000;22(2):148-60.
70. Weiner AM. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Current opinion in cell biology*. 2002;14(3):343-50.
71. Versteeg R, van Schaik BD, van Batenburg MF, Roos M, Monajemi R, Caron H, et al. The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome research*. 2003;13(9):1998-2004.
72. 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.
73. McCarthy EM, Liu J, Lizhi G, McDonald JF. Long terminal repeat retrotransposons of *Oryza sativa*. *Genome biology*. 2002;3(10):RESEARCH0053.
74. Pelisson A, Mejlumian L, Robert V, Terzian C, Bucheton A. *Drosophila* germline invasion by the endogenous retrovirus gypsy: involvement of the viral env gene. *Insect biochemistry and molecular biology*. 2002;32(10):1249-56.
75. Xiong Y, Eickbush TH. Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *The EMBO journal*. 1990;9(10):3353-62.
76. Malik HS, Eickbush TH. Modular evolution of the integrase domain in the Ty3/Gypsy class of LTR retrotransposons. *Journal of virology*. 1999;73(6):5186-90.

77. Peterson-Burch BD, Voytas DF. Genes of the Pseudoviridae (Ty1/copia retrotransposons). *Molecular biology and evolution*. 2002;19(11):1832-45.
78. Kumar A, Bennetzen JL. Plant retrotransposons. *Annual review of genetics*. 1999;33:479-532.
79. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH, Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(6):651-8.
80. Curcio MJ, Garfinkel DJ. Heterogeneous functional Ty1 elements are abundant in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics*. 1994;136(4):1245-59.
81. de Parseval N, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenetic and genome research*. 2005;110(1-4):318-32.
82. Goff SP. Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. In: D.M. Knipe PMH, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus, editor. *In Field's Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 1999-2069.
83. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101 Suppl 2:14572-9.
84. Gifford R, Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus genes*. 2003;26(3):291-315.
85. Lower R, Lower J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(11):5177-84.
86. Boller K, Schonfeld K, Lischer S, Fischer N, Hoffmann A, Kurth R, et al. Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *The Journal of general virology*. 2008;89(Pt 2):567-72.
87. Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG. A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer research*. 2002;62(19):5510-6.
88. Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N, Ruprecht K. Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences. *Retrovirology*. 2009;6:37.
89. Gimenez J, Montgiraud C, Oriol G, Pichon JP, Ruel K, Tsatsaris V, et al. Comparative methylation of ERVWE1/syncytin-1 and other human endogenous retrovirus LTRs in placenta tissues. *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*. 2009;16(4):195-211.
90. Schulte AM, Wellstein A. Structure and phylogenetic analysis of an endogenous retrovirus inserted into the human growth factor gene pleiotrophin. *Journal of virology*. 1998;72(7):6065-72.
91. Wilhelm M, Wilhelm FX. Reverse transcription of retroviruses and LTR retrotransposons. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(9):1246-62.
92. Repaske R, O'Neill RR, Steele PE, Martin MA. Characterization and partial nucleotide sequence of endogenous type C retrovirus segments in human chromosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983;80(3):678-82.
93. Larsson E, Kato N, Cohen M. Human endogenous proviruses. *Current topics in microbiology and immunology*. 1989;148:115-32.

94. Turner G, Barbulescu M, Su M, Jensen-Seaman MI, Kidd KK, Lenz J. Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Current biology : CB*. 2001;11(19):1531-5.
95. Jurka J. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends in genetics : TIG*. 2000;16(9):418-20.
96. Buscher K, Hahn S, Hofmann M, Trefzer U, Ozel M, Sterry W, et al. Expression of the human endogenous retrovirus-K transmembrane envelope, Rec and Np9 proteins in melanomas and melanoma cell lines. *Melanoma research*. 2006;16(3):223-34.
97. von Sternberg R, Shapiro JA. How repeated retroelements format genome function. *Cytogenetic and genome research*. 2005;110(1-4):108-16.
98. Prak ET, Kazazian HH, Jr. Mobile elements and the human genome. *Nature reviews Genetics*. 2000;1(2):134-44.
99. Awano H, Malueka RG, Yagi M, Okizuka Y, Takeshima Y, Matsuo M. Contemporary retrotransposition of a novel non-coding gene induces exon-skipping in dystrophin mRNA. *Journal of human genetics*. 2010;55(12):785-90.
100. Kaer K, Speek M. Retroelements in human disease. *Gene*. 2013;518(2):231-41.
101. Callinan PA, Batzer MA. Retrotransposable elements and human disease. *Genome dynamics*. 2006;1:104-15.
102. Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, Eichler EE. Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: The Lyon repeat hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(12):6634-9.
103. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of molecular biology*. 2006;357(5):1383-93.
104. 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.
105. Morrish TA, Garcia-Perez JL, Stamato TD, Taccioli GE, Sekiguchi J, Moran JV. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature*. 2007;446(7132):208-12.
106. Gladyshev EA, Arkhipova IR. Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(22):9352-7.
107. Wilder J, Hollocher H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular biology and evolution*. 2001;18(3):384-92.
108. Chauhan C, Dash D, Grover D, Rajamani J, Mukerji M. Origin and instability of GAA repeats: insights from Alu elements. *Journal of biomolecular structure & dynamics*. 2002;20(2):253-63.
109. Arcot SS, Wang Z, Weber JL, Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics*. 1995;29(1):136-44.
110. Li HR, Shagisultanova EI, Yamashita K, Piao Z, Perucho M, Malkhosyan SR. Hypersensitivity of tumor cell lines with microsatellite instability to DNA double strand break producing chemotherapeutic agent bleomycin. *Cancer research*. 2004;64(14):4760-7.
111. Montermini L, Andermann E, Labuda M, Richter A, Pandolfo M, Cavalcanti F, et al. The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles. *Human molecular genetics*. 1997;6(8):1261-6.

112. Justice CM, Den Z, Nguyen SV, Stoneking M, Deininger PL, Batzer MA, et al. Phylogenetic analysis of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *Journal of molecular evolution*. 2001;52(3):232-8.
113. Emanuel BS, Shaikh TH. Segmental duplications: an 'expanding' role in genomic instability and disease. *Nature reviews Genetics*. 2001;2(10):791-800.
114. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *American journal of human genetics*. 2003;73(4):823-34.
115. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature*. 2005;437(7055):69-87.
116. Liu G, Zhao S, Bailey JA, Sahinalp SC, Alkan C, Tuzun E, et al. Analysis of primate genomic variation reveals a repeat-driven expansion of the human genome. *Genome research*. 2003;13(3):358-68.
117. Gilbert N, Lutz-Prigge S, Moran JV. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2002;110(3):315-25.
118. Symer DE, Connelly C, Szak ST, Caputo EM, Cost GJ, Parmigiani G, et al. Human L1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell*. 2002;110(3):327-38.
119. Gilbert N, Lutz S, Morrish TA, Moran JV. Multiple fates of L1 retrotransposition intermediates in cultured human cells. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(17):7780-95.
120. Sen SK, Huang CT, Han K, Batzer MA. Endonuclease-independent insertion provides an alternative pathway for L1 retrotransposition in the human genome. *Nucleic acids research*. 2007;35(11):3741-51.
121. Srikanta D, Sen SK, Huang CT, Conlin EM, Rhodes RM, Batzer MA. An alternative pathway for Alu retrotransposition suggests a role in DNA double-strand break repair. *Genomics*. 2009;93(3):205-12.
122. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Molecular genetics and metabolism*. 1999;67(3):183-93.
123. Han K, Lee J, Meyer TJ, Remedios P, Goodwin L, Batzer MA. L1 recombination-associated deletions generate human genomic variation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19366-71.
124. Sen SK, Han K, Wang J, Lee J, Wang H, Callinan PA, et al. Human genomic deletions mediated by recombination between Alu elements. *American journal of human genetics*. 2006;79(1):41-53.
125. Rudiger NS, Gregersen N, Kielland-Brandt MC. One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic acids research*. 1995;23(2):256-60.
126. Burwinkel B, Kilimann MW. Unequal homologous recombination between LINE-1 elements as a mutational mechanism in human genetic disease. *Journal of molecular biology*. 1998;277(3):513-7.
127. Marillonnet S, Wessler SR. Retrotransposon insertion into the maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing. *The Plant cell*. 1997;9(6):967-78.
128. Leprinc AS, Grandbastien MA, Christian M. Retrotransposons of the Tnt1B family are mobile in *Nicotiana glauca* and can induce alternative splicing of the host gene upon insertion. *Plant molecular biology*. 2001;47(4):533-41.

129. 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.
130. Kim DD, Kim TT, Walsh T, Kobayashi Y, Matise TC, Buyske S, et al. Widespread RNA editing of embedded alu elements in the human transcriptome. *Genome research*. 2004;14(9):1719-25.
131. Athanasiadis A, Rich A, Maas S. Widespread A-to-I RNA editing of Alu-containing mRNAs in the human transcriptome. *PLoS biology*. 2004;2(12):e391.
132. Levanon EY, Eisenberg E, Yelin R, Nemzer S, Hallegger M, Shemesh R, et al. Systematic identification of abundant A-to-I editing sites in the human transcriptome. *Nature biotechnology*. 2004;22(8):1001-5.
133. Li JB, Levanon EY, Yoon JK, Aach J, Xie B, Leproust E, et al. Genome-wide identification of human RNA editing sites by parallel DNA capturing and sequencing. *Science*. 2009;324(5931):1210-3.
134. Chen LL, DeCerbo JN, Carmichael GG. Alu element-mediated gene silencing. *The EMBO journal*. 2008;27(12):1694-705.
135. C.Waddington. The epigenome. *Endeavour*. 1942:18-20.
136. Riggs AD, Martiennssen, R. A. & Russo, V. E. A. . *Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring. 1996.
137. Berger SL, Kouzarides T, Shiekhhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes & development*. 2009;23(7):781-3.
138. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*. 2010;28(10):1057-68.
139. Gunjan A, Singh RK. Epigenetic therapy: targeting histones and their modifications in human disease. *Future medicinal chemistry*. 2010;2(4):543-8.
140. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
141. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(9):662-73.
142. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 2002;108(4):475-87.
143. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431(7011):931-45.
144. Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Current opinion in cell biology*. 2003;15(2):172-83.
145. Behe MJ. Histone deletion mutants challenge the molecular clock hypothesis. *Trends in biochemical sciences*. 1990;15(10):374-6.
146. Wolffe AP. Developmental regulation of chromatin structure and function. *Trends in cell biology*. 1991;1(2-3):61-6.
147. Vanyushin BF. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry-Moscow+*. 2005;70(5):488-99.
148. Vanyushin F. Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes. *Mol Biol+*. 2005;39(4):557-66.
149. Gromova ES, Khoroshaev AV. [Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA]. *Molekuliarnaia biologii*. 2003;37(2):300-14.

150. Buryanov Y, Shevchuk T. The use of prokaryotic DNA methyltransferases as experimental and analytical tools in modern biology. *Anal Biochem.* 2005;338(1):1-11.
151. Jabbari K, Bernardi G. Cytosine methylation and CpG, TpG (CpA) and TpA frequencies. *Gene.* 2004;333:143-9.
152. Crews D, McLachlan JA. Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology.* 2006;147(6 Suppl):S4-10.
153. Straussman R, Nejman D, Roberts D, Steinfeld I, Blum B, Benvenisty N, et al. Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. *Nature structural & molecular biology.* 2009;16(5):564-71.
154. Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Current topics in microbiology and immunology.* 2006;301:179-201.
155. Ting AH, Jair KW, Schuebel KE, Baylin SB. Differential requirement for DNA methyltransferase 1 in maintaining human cancer cell gene promoter hypermethylation. *Cancer research.* 2006;66(2):729-35.
156. Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(25):8905-9.
157. Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, et al. De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer research.* 2006;66(2):682-92.
158. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science.* 2006;311(5759):395-8.
159. Esteller M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human molecular genetics.* 2007;16 Spec No 1:R50-9.
160. Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of cellular biochemistry.* 2005;95(5):902-17.
161. Holz-Schietinger C, Reich NO. The inherent processivity of the human de novo methyltransferase 3A (DNMT3A) is enhanced by DNMT3L. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(38):29091-100.
162. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, Bollman B, Bestor TH. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science.* 2001;294(5551):2536-9.
163. Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nature reviews Genetics.* 2005;6(5):403-10.
164. Hendrich B, Bird A. Mammalian methyltransferases and methyl-CpG-binding domains: proteins involved in DNA methylation. *Current topics in microbiology and immunology.* 2000;249:55-74.
165. Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of biological chemistry.* 2003;278(6):4035-40.
166. Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *The Journal of pathology.* 2001;195(1):97-110.
167. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG.* 1997;13(8):335-40.
168. Lavie L, Kitova M, Maldener E, Meese E, Mayer J. CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2). *Journal of virology.* 2005;79(2):876-83.

169. Kim SJ, Park SE, Lee C, Lee SY, Kim IH, An HJ, et al. Altered imprinting, promoter usage, and expression of insulin-like growth factor-II gene in gestational trophoblastic diseases. *Gynecologic oncology*. 2003;88(3):411-8.
170. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *Journal of medical genetics*. 2001;38(8):497-507.
171. Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*. 1984;311(5984):374-6.
172. Surani MAH, Barton SC, Norris ML. Development of Reconstituted Mouse Eggs Suggests Imprinting of the Genome during Gametogenesis. *Nature*. 1984;308(5959):548-50.
173. Mcgrath J, Solter D. Completion of Mouse Embryogenesis Requires Both the Maternal and Paternal Genomes. *Cell*. 1984;37(1):179-83.
174. Jacobs PA, Wilson CM, Sprenkle JA, Rosenshein NB, Migeon BR. Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. *Nature*. 1980;286(5774):714-6.
175. Surti U, Hoffner L, Chakravarti A, Ferrell RE. Genetics and biology of human ovarian teratomas. I. Cytogenetic analysis and mechanism of origin. *American journal of human genetics*. 1990;47(4):635-43.
176. Khatib H, Zaitoun I, Kim ES. Comparative analysis of sequence characteristics of imprinted genes in human, mouse, and cattle. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*. 2007;18(6-7):538-47.
177. 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.
178. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nature reviews Genetics*. 2005;6(8):597-610.
179. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001;293(5532):1089-93.
180. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Human reproduction update*. 2005;11(5):473-82.
181. Mann JR. Imprinting in the germ line. *Stem Cells*. 2001;19(4):287-94.
182. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *The EMBO journal*. 2007;26(3):720-9.
183. Vu TH, Li T, Hoffman AR. Promoter-restricted histone code, not the differentially methylated DNA regions or antisense transcripts, marks the imprinting status of IGF2R in human and mouse. *Human molecular genetics*. 2004;13(19):2233-45.
184. Arnaud P, Feil R. Epigenetic deregulation of genomic imprinting in human disorders and following assisted reproduction. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2005;75(2):81-97.
185. Kitsberg D, Selig S, Brandeis M, Simon I, Keshet I, Driscoll DJ, et al. Allele-specific replication timing of imprinted gene regions. *Nature*. 1993;364(6436):459-63.
186. Knoll JH, Cheng SD, Lalande M. Allele specificity of DNA replication timing in the Angelman/Prader-Willi syndrome imprinted chromosomal region. *Nature genetics*. 1994;6(1):41-6.
187. Fulka H, Barnetova I, Mosko T, Fulka J. Epigenetic analysis of human spermatozoa after their injection into ovulated mouse oocytes. *Hum Reprod*. 2008;23(3):627-34.

188. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes & development*. 1992;6(5):705-14.
189. Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends in genetics : TIG*. 2012;28(1):33-42.
190. Xu GL, Bestor TH, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, et al. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*. 1999;402(6758):187-91.
191. Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, Sano M, Shigeta M, Matsui Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development*. 2007;134(14):2627-38.
192. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-5.
193. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 2010;466(7310):1129-33.
194. Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer research*. 2007;67(3):946-50.
195. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2010;11(9):607-20.
196. Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, Robaire B, Trasler JM. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(1):228-33.
197. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature*. 2009;460(7254):473-8.
198. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005;122(6):947-56.
199. Farthing CR, Ficz G, Ng RK, Chan CF, Andrews S, Dean W, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS genetics*. 2008;4(6):e1000116.
200. Tam PP, Zhou SX, Tan SS. X-chromosome activity of the mouse primordial germ cells revealed by the expression of an X-linked lacZ transgene. *Development*. 1994;120(10):2925-32.
201. Chuva de Sousa Lopes SM, Hayashi K, Shovlin TC, Mifsud W, Surani MA, McLaren A. X chromosome activity in mouse XX primordial germ cells. *PLoS genetics*. 2008;4(2):e30.
202. McLay DW, Clarke HJ. Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*. 2003;125(5):625-33.
203. Olek A, Walter J. The pre-implantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nature genetics*. 1997;17(3):275-6.

204. Warnecke PM, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Frommer M, Clark SJ. Sequence-specific methylation of the mouse H19 gene in embryonic cells deficient in the Dnmt-1 gene. *Developmental genetics*. 1998;22(2):111-21.
205. Dean W, Santos F, Reik W. Epigenetic reprogramming in early mammalian development and following somatic nuclear transfer. *Seminars in cell & developmental biology*. 2003;14(1):93-100.
206. Aoki F, Worrada DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Developmental biology*. 1997;181(2):296-307.
207. Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology*. 2002;241(1):172-82.
208. Cardoso MC, Leonhardt H. DNA methyltransferase is actively retained in the cytoplasm during early development. *Journal of Cell Biology*. 1999;147(1):25-32.
209. Lees-Murdock DJ, De Felici M, Walsh CP. Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage. *Genomics*. 2003;82(2):230-7.
210. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, et al. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of development*. 2002;117(1-2):15-23.
211. 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*. 2003;35(2):88-93.
212. Kato Y, Kaneda M, Hata K, Kumaki K, Hisano M, Kohara Y, et al. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Human molecular genetics*. 2007;16(19):2272-80.
213. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*. 2004;127(6):643-51.
214. Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W. Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*. 2005;14 Spec No 1:R47-58.
215. 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.
216. Nottke A, Colaiacovo MP, Shi Y. Developmental roles of the histone lysine demethylases. *Development*. 2009;136(6):879-89.
217. Jodar M, Selvaraju S, Sendler E, Diamond MP, Krawetz SA. The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. *Human reproduction update*. 2013;19(6):604-24.
218. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D, Schaefer C, Pezic D, Toth KF, et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Molecular cell*. 2008;31(6):785-99.
219. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*. 2006;442(7099):199-202.
220. Oliver Meikar MDR, Noora Kotaja. Epigenetic Regulation of Male Germ Cell Differentiation. *Epigenetics: Development and Disease*. 612013. p. 119-38.
221. Siomi MC, Sato K, Pezic D, Aravin AA. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2011;12(4):246-58.

222. 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.
223. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, et al. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*. 2004;131(4):839-49.
224. 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.
225. Aravin AA, Sachidanandam R, Girard A, Fejes-Toth K, Hannon GJ. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MILI in transposon control. *Science*. 2007;316(5825):744-7.
226. Gan H, Lin X, Zhang Z, Zhang W, Liao S, Wang L, et al. piRNA profiling during specific stages of mouse spermatogenesis. *RNA*. 2011;17(7):1191-203.
227. Lau NC, Seto AG, Kim J, Kuramochi-Miyagawa S, Nakano T, Bartel DP, et al. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science*. 2006;313(5785):363-7.
228. Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell*. 2007;128(6):1089-103.
229. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science*. 2007;318(5851):761-4.
230. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(5):1827-31.
231. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology*. 1992;24:476-80.
232. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic acids research*. 1997;25(12):2532-4.
233. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*. 2004;23(54):8841-6.
234. Dimitriadou E, Noutsopoulos D, Markopoulos G, Vlaikou AM, Mantziou S, Traeger-Synodinos J, et al. Abnormal DLK1/MEG3 imprinting correlates with decreased HERV-K methylation after assisted reproduction and preimplantation genetic diagnosis. *Stress*. 2013;16(6):689-97.
235. 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.
236. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Diamond MP, Dix DJ, Krawetz SA. Toward using stable spermatozoal RNAs for prognostic assessment of male factor fertility. *Fertility and sterility*. 2005;83(6):1687-94.
237. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human reproduction update*. 2010;16(3):231-45.

238. Sukapan P, Promnarate P, Avihingsanon Y, Mutirangura A, Hirankarn N. Types of DNA methylation status of the interspersed repetitive sequences for LINE-1, Alu, HERV-E and HERV-K in the neutrophils from systemic lupus erythematosus patients and healthy controls. *Journal of human genetics*. 2014;59(4):178-88.
239. Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, Yang A, Laird PW, Sokol RZ. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS one*. 2007;2(12):e1289.
240. Urdinguio RG, Bayon GF, Dmitrijeva M, Torano EG, Bravo C, Fraga MF, et al. Aberrant DNA methylation patterns of spermatozoa in men with unexplained infertility. *Hum Reprod*. 2015;30(5):1014-28.
241. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic acids research*. 2004;32(3):e38.
242. Lees-Murdock DJ, Walsh CP. DNA methylation reprogramming in the germ line. *Epigenetics : official journal of the DNA Methylation Society*. 2008;3(1):5-13.
243. Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature reviews Genetics*. 2008;9(2):129-40.
244. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature*. 2004;431(7004):96-9.
245. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Human molecular genetics*. 2007;16(21):2542-51.
246. Marques CJ, Costa P, Vaz B, Carvalho F, Fernandes S, Barros A, et al. Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod*. 2008;14(2):67-74.
247. Heyn H, Ferreira HJ, Bassas L, Bonache S, Sayols S, Sandoval J, et al. Epigenetic disruption of the PIWI pathway in human spermatogenic disorders. *PLoS one*. 2012;7(10):e47892.
248. Miao M, Zhou X, Li Y, Zhang O, Zhou Z, Li T, et al. LINE-1 hypomethylation in spermatozoa is associated with Bisphenol A exposure. *Andrology*. 2014;2(1):138-44.
249. Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, et al. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(11):4068-73.
250. Lim KH, Song MH, Baek KH. Decision for cell fate: deubiquitinating enzymes in cell cycle checkpoint. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2016;73(7):1439-55.
251. Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(6):3740-5.
252. Phokaew C, Kowudtitham S, Subbalekha K, Shuangshoti S, Mutirangura A. LINE-1 methylation patterns of different loci in normal and cancerous cells. *Nucleic acids research*. 2008;36(17):5704-12.
253. Pobsook T, Subbalekha K, Sannikorn P, Mutirangura A. Improved measurement of LINE-1 sequence methylation for cancer detection. *Clin Chim Acta*. 2011;412(3-4):314-21.
254. Kazazian HH, Jr., Moran JV. The impact of L1 retrotransposons on the human genome. *Nature genetics*. 1998;19(1):19-24.

255. Shukla R, Upton KR, Munoz-Lopez M, Gerhardt DJ, Fisher ME, Nguyen T, et al. Endogenous retrotransposition activates oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. *Cell*. 2013;153(1):101-11.
256. Doucet-O'Hare TT, Sharma R, Rodic N, Anders RA, Burns KH, Kazazian HH, Jr. Somatic Acquired LINE-1 Insertions in Normal Esophagus Undergo Clonal Expansion in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Hum Mutat*. 2016;37(9):942-54.
257. Ewing AD, Gacita A, Wood LD, Ma F, Xing D, Kim MS, et al. Widespread somatic L1 retrotransposition occurs early during gastrointestinal cancer evolution. *Genome research*. 2015;25(10):1536-45.
258. Doucet-O'Hare TT, Rodic N, Sharma R, Darbari I, Abril G, Choi JA, et al. LINE-1 expression and retrotransposition in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(35):E4894-900.
259. Lee E, Iskow R, Yang L, Gokcumen O, Haseley P, Luquette LJ, 3rd, et al. Landscape of somatic retrotransposition in human cancers. *Science*. 2012;337(6097):967-71.
260. Helman E, Lawrence MS, Stewart C, Sougnez C, Getz G, Meyerson M. Somatic retrotransposition in human cancer revealed by whole-genome and exome sequencing. *Genome research*. 2014;24(7):1053-63.
261. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;310:211-50.
262. Miller D. Analysis and significance of messenger RNA in human ejaculated spermatozoa. *Molecular reproduction and development*. 2000;56(2 Suppl):259-64.
263. Choux C, Biquet C, Carmignac V, Bruno C, Chapusot C, Barberet J, et al. The epigenetic control of transposable elements and imprinted genes in newborns is affected by the mode of conception: ART versus spontaneous conception without underlying infertility. *Hum Reprod*. 2018;33(2):331-40.