



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΤΟΜΕΑΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΟΣ
ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΓΟΝΕΪΚΗΣ
ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΩΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΗΣ
ΕΜΒΡΥΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

**ΣΑΚΑΛΟΓΛΟΥ Η. ΠΡΟΔΡΟΜΟΣ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2013

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

Ημερομηνία αίτησης του κ. Σακάλογλου Πρόδρομου: 23-1-2007

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 607^α/29-5-2007

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Γεωργίου Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Μέλη

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας

Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 21-6-2007

«Επαναπροσδιορισμός της γονεϊκής αποτύπωσης στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 752^α/16-5-2013

1. Γεωργίου Ιωάννης, Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Ζηκόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μακρυδήμας Γεώργιος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Παρασκευαΐδης Ευάγγελος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Πασχόπουλος Μηνάς, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Σοφικίτης Νικόλαος, Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Στέφος Θεόδωρος, Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας με έμφαση στην Εμβρυομητρική Ιατρική, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 17-5-2013

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Τζαφλίδου Μαργαρίτα

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



...στους γονείς μου,

Ηλία και Σούλα

*... στον παππού μου Ιωάννη
στη γιαγιά μου Στέλλα
στη γιαγιά μου Κατερίνα*

*“Κανένα πρόβλημα δεν
μπορεί να αντισταθεί στην
επίθεση της δημιουργικής
σκέψης”*

Βολταίρος

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Μάιος 2013. Το ταξίδι φτάνει πλέον στο τέλος του. Ένα ταξίδι γεμάτο αναμνήσεις, συναισθήματα, προκλήσεις, εμπειρίες. Αναπολώντας τις στιγμές που πέρασαν, ένα χαμόγελο ζωγραφίζεται στο πρόσωπό μου. Νιώθω τόσο γεμάτος. Καθ' όλη τη διάρκεια του ταξιδιού είχα το προνόμιο να με συντροφεύουν αγαπημένα πρόσωπα και είχα τη τύχη να γνωρίσω αξιόλογους ανθρώπους. Νιώθω τη ανάγκη να τους εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου.

Θα ήθελα πρώτα απ' όλους να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεωργίου Ιωάννη για το ενδιαφέρον και την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια και την εξαιρετική καθοδήγησή του τόσο σε θεωρητικό όσο και σε πρακτικό επίπεδο. Η συνεργασία μας αποτελεί πηγή έμπνευσης για τη μελλοντική μου πορεία.

Ένα θερμό ευχαριστώ στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Σοφικίτη Νικόλαο, συνυπεύθυνο με τον κ. Γεωργίου του εργαστηρίου Μοριακής Ουρολογίας και Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής, Ιατρικής Σχολής, Παν/μίου Ιωαννίνων όπου εκπονήθηκε η μελέτη, για τα πολύτιμα μέσα που προσέφερε ώστε να ολοκληρωθεί επιτυχώς η διδακτορική διατριβή, καθώς και τον Καθηγητή κ. Παρασκευαΐδη Ευάγγελο, για τις πολύτιμες συμβουλές και τις εύστοχες παρατηρήσεις τους από το ξεκίνημα μέχρι και την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής τον Καθηγητή κ. Ζηκόπουλο Κωνσταντίνο, τον Καθηγητή κ. Μακρυδήμα Γεώργιο, τον Καθηγητή κ. Στέφο Θεόδωρο και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πασχόπουλο Μηνά για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Τζαβάρα Θεόδωρο, για τις συμβουλές του και τις εποικοδομητικές συζητήσεις καθώς και τα μέλη της ερευνητικής του ομάδας. Επίσης ένα θερμό ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Κούκλη Παναγιώτη για τις πολύτιμες συμβουλές του και τα μέσα που προσέφερε απλόχερα καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Μαλάμπε Βιολέττα για την άσογη συνεργασία, την πολύτιμη βοήθεια που προσέφερε, το χρόνο που αφιέρωσε και την υπομονή που έδειξε.

Ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Δρ. Λάζαρο Λέανδρο για την αμέριστη βοήθεια που προσέφερε κατά τη διάρκεια της παρούσης εργασίας, τόσο κατά τη συλλογή των δειγμάτων όσο και σε θεωρητικό επίπεδο. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους φίλους και συναδέλφους μου στο εργαστήριο Μπούμπα Ιωάννα, Χαρίλαο Κωστούλα, Χρύσα Κίτσου, Άρτεμις Μιτσιώνη και

Κατερίνα Γκιάκα για την άψογη συνεργασία, την υπομονή που έδειξαν, τη βοήθειά τους και τις υπέροχες στιγμές που ζήσαμε.

Επιπλέον θα ήθελαν να ευχαριστήσω τους φίλους μου Ελευθερία, Αντώνη, Χάρι, Κώστα και Λάμπρο για τη βοήθεια και τη ψυχολογική συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πατσαλή Φίλιππο, διευθυντή του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου και του τμήματος Κυτταρογενετικής για τη φιλοξενία στο εργαστήριο και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε. Η γνωριμία μας αποτέλεσε κομβικό σημείο στη ζωή μου, από την οποία αποκόμισα πολύτιμα εφόδια για το μέλλον. Είναι ένας ξεχωριστός άνθρωπος και λαμπρός επιστήμονας οποίος αποτελεί πηγή έμπνευσης για τη μελλοντική μου πορεία. Πολλές ευχαριστίες και στην ομάδα του τμήματος Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Νευρολογίας και Γενετικής Κύπρου που μ' αγκάλιασαν και μ' έκαναν μέλος της οικογένειάς τους και τους οποίους θα θυμάμαι για πάντα.

Τέλος, δε βρίσκω λόγια να ευχαριστήσω τους γονείς μου, Ηλία και Σούλα, οι οποίοι έκαναν τα αδύνατα δυνατά να με κάνουν τον άνθρωπο που είμαι σήμερα. Είναι συνεχώς δίπλα μου σε κάθε βήμα και δε σταματούν ποτέ να στηρίζουν και να ενθαρρύνουν κάθε μου προσπάθεια, παραμερίζοντας πολλές φορές τις δικές τους ανάγκες.

Μάκης,

Μάϊος 2013, Ιωάννινα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	5
1.1 ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	5
1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	5
1.3 ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ – ΩΟΓΕΝΕΣΗ.....	9
1.3.1 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (PRIMORDIAL GERM CELLS) ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟΥ (PRIMORDIAL FOLLICLE).....	10
1.3.2 ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟ.....	11
1.3.3 ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟ.....	12
1.3.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟΥ.....	14
1.3.5 ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ.....	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ.....	17
2.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ.....	17
2.1.1 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΦΗ ΓΑΜΕΤΩΝ, ΑΚΡΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ, ΦΡΑΓΜΟΣ ΠΟΛΥΣΠΕΡΜΙΑΣ, ΣΥΓΓΑΜΙΑ ΩΑΡΙΟΥ-ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ.....	17
2.1.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΖΥΓΩΤΟΥ.....	18
2.2 ΠΡΟ-ΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	19
2.2.1 ΑΥΛΑΚΩΣΗ.....	19
2.2.2 ΜΟΡΙΔΙΟ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗ.....	20
2.2.3 ΕΚΚΟΛΑΨΗ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ.....	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ & ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ.....	25

3.1 ΕΜΒΡΥΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	25
3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs	26
3.2.1 Oct4 (POU5F1)	26
3.2.2 Sox2	27
3.2.3 Nanog	27
3.3 ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	28
3.3.1. ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ OCT-4, SOX2 και NANOG	28
3.3.2 ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ OCT-4, SOX2 και NANOG ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	32
3.4 ΕΠΑΓΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, iPS (Induced Pluripotent Stem Cells)	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	37
ΜΕΤΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	37
4.1 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ DNA	37
4.2 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΕΣΗ	38
4.2.1 DNA τρανσποζόνια (DNA transposons)	39
4.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ (RETROTRANSPOSONS)	40
4.2.2.1 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΧΩΡΙΣ LTR (non-LTR retrotransposons) ...	42
4.2.2.1.1 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ LINEs	42
4.2.2.1.2 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ SINEs	44
4.2.2.2 LTR ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ (LTR retrotransposons)	44
4.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ	48
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	57
ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	57
5.1 Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	57
5.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ	58

5.3 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ.....	59
5.4 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ.....	60
5.5 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (GENOMIC IMPRINTING).....	62
5.6 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ.....	64
5.6.1 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ.....	64
5.6.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.....	66
5.7 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	67
5.8 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ.....	71
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	75
ΣΚΟΠΟΣ.....	75
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	77
A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	81
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	81
7.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	81
7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO	81
7.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΠΛΕΥΣΗΣ.....	82
(SWIM UP).....	82
7.2.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΜΕΣΟ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΩΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ (SPERM GRADIENT).	83
7.3 ΩΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO.....	84

7.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	85
7.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	87
7.5.1 ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO (IVF).....	87
7.5.2 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (ICSI).....	88
7.6 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΕΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ L1.....	90
7.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	91
7.8 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΩΑΡΙΑ, ΖΥΓΩΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ.....	96
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	99
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	101
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	101
8.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ OCT-3/4, NANOG, SOX2 ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.....	101
8.1.1 E-Cadherin.....	101
8.1.2 Oct-4	102
8.1.3 Nanog και Sox2.....	103
8.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.	104
8.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ L1 ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.....	107
8.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ L1 ΣΤΟΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ.....	109
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	111
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....	113

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	113
9.1 ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΑΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	113
9.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ	116
9.3 ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΤΟΥ L1 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ	117
9.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ	118
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	123
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10	125
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125
ΙΙΙ. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	127
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	129
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	131
B. ABSTRACT	135
PRODROMOS I. SAKALOGLOU	137
Ph.D. THESIS.....	137
REPROGRAMMING OF PARENTAL IMPRINTING DURING PREIMPLANTATION STAGES OF EMBRYO DEVELOPMENT.....	137
ABSTRACT	137
ΙV. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	141
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	143
V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	145
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

1.1 ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

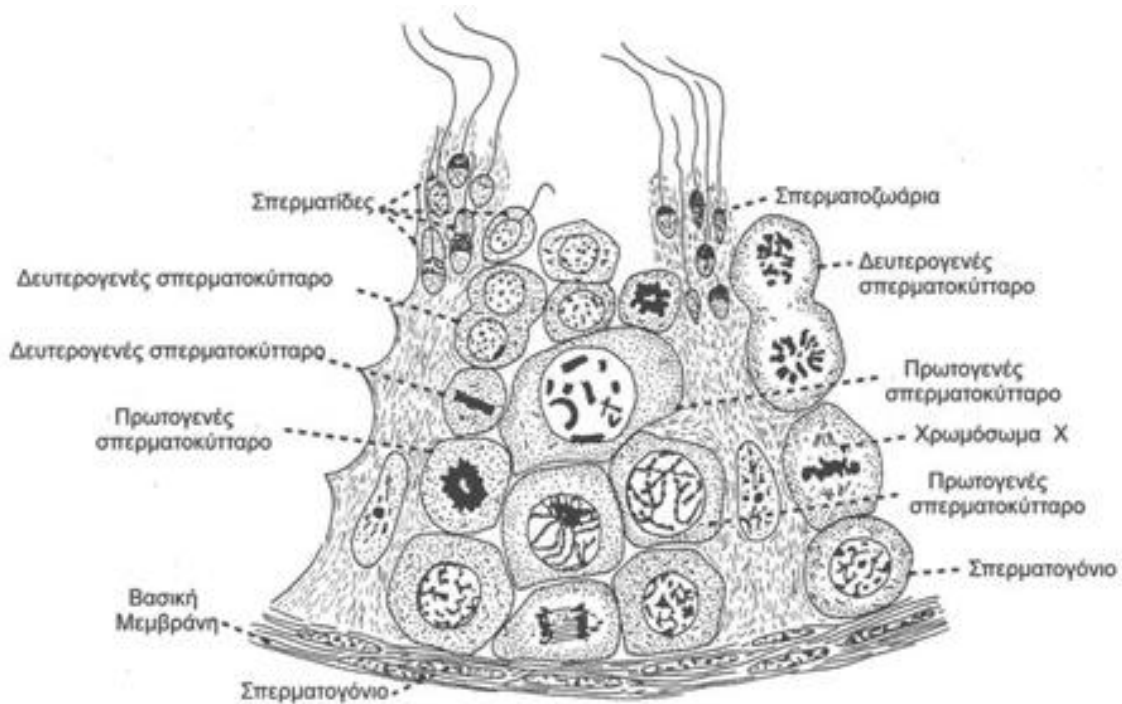
Γαμετογένεση ονομάζεται η διαδικασία κατά την οποία από διπλοειδή κύτταρα παράγονται απλοειδή γαμετικά κύτταρα, ωάρια ή σπερματοζωάρια. Η διαδικασία της γαμετογένεσης ξεκινάει με την παρουσία των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στα τοιχώματα του λεκιθικού ασκού περίπου 24 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα μεταναστεύουν μέσω του ραχιαίου μεσεντέριου στη γεννητική κορυφογραμμή, τη περιοχή όπου θα αναπτυχθούν οι γονάδες [1]. Σε αυτό το στάδιο της ανάπτυξης, η γοναδική περιοχή μπορεί να διαφοροποιηθεί είτε σε όρχι είτε σε ωοθήκη. Αυτό θα εξαρτηθεί από την απουσία (ωοθήκη) ή παρουσία (όρχις) του χρωμοσώματος Y. Πιο συγκεκριμένα, η έκφραση του γονιδίου SRY (sex-determining region) του χρωμοσώματος Y στα προ-Sertoli κύτταρα είναι αυτή που δίνει το έναυσμα για την ανάπτυξη των ανδρικών γονάδων [1]. Τα κύτταρα Sertoli μαζί με τα Leydig είναι δύο τύποι διπλοειδών κυττάρων που έχουν υποστηρικτικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης.

1.2 ΣΠΕΡΜΑΤΟΓΕΝΕΣΗ

Ως σπερματογένεση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται απλοειδή σπερματοζωάρια από διπλοειδή σπερματογόνια, μια διαδικασία η οποία ολοκληρώνεται σε περίπου 74 μέρες [1] και πραγματοποιείται από την έναρξη της ήβης και μετά. Μέχρι την ήβη τα σπερματογόνια παραμένουν ανενεργά. Το στάδιο της σπερματογένεσης κατά το οποίο οι απλοειδείς σπερματίδες διαφοροποιούνται σε ολοκληρωμένα ευκίνητα σπερματοζωάρια χαρακτηρίζεται ως σπερμιογένεση.

Η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων παρατηρείται εντός των ανδρικών γονάδων (όρχις). Οι όρχις είναι σύνθετα όργανα αποτελούμενα από

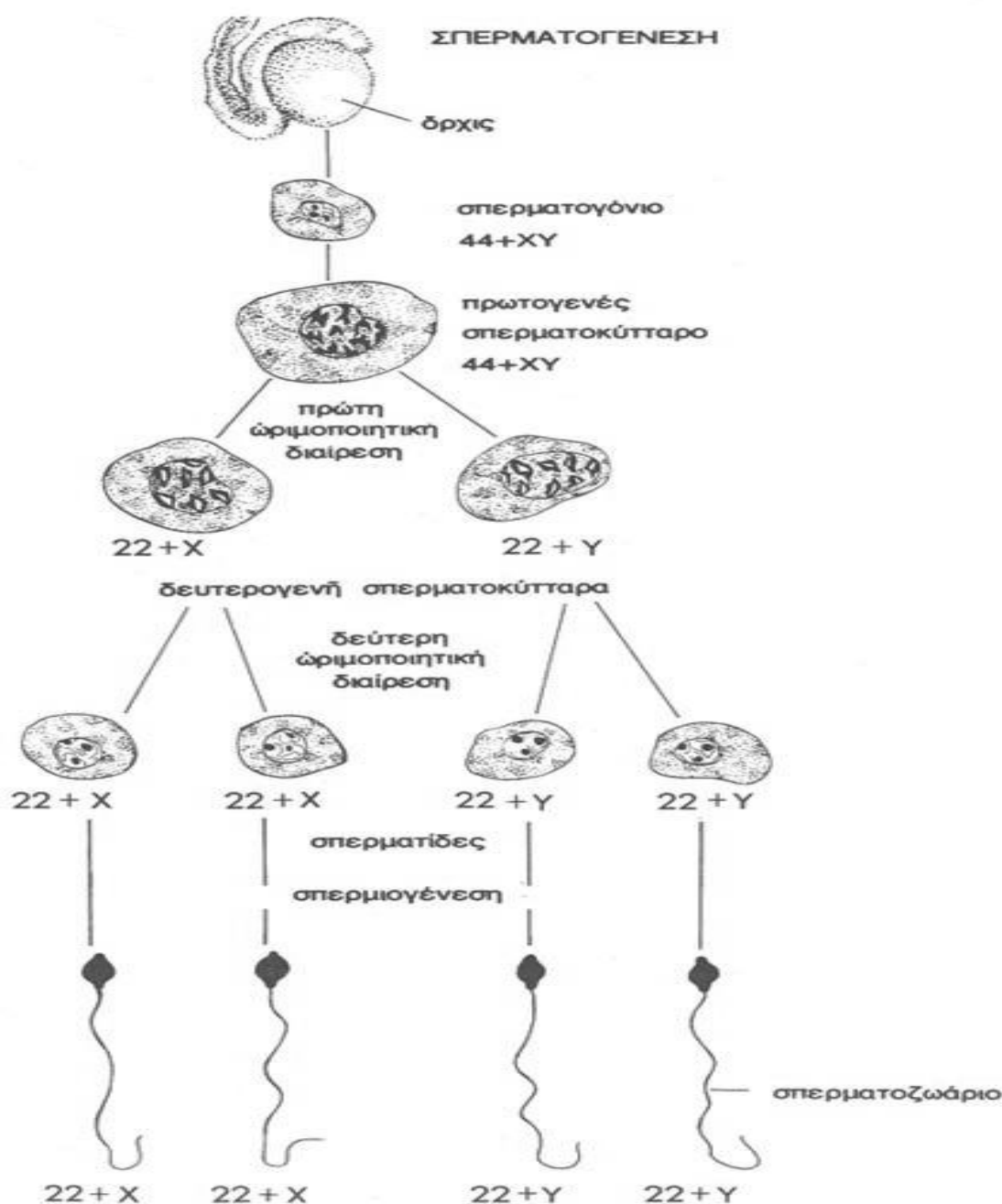
πολυάριθμα σπερματοφόρα σωληνάκια. Τα σωληνάκια φέρουν ακτινωτά κατανεμημένα εξειδικευμένα σωματικά κύτταρα τα οποία είναι γνωστά ως κύτταρα Sertoli. Είναι κολωνοειδούς σχήματος με φαρδιά βάση και στενή κορυφή που εκτείνεται μέσα στον αυλό του σπερματοφόρου σωληναρίου. Όπως προαναφέρθηκε, τα κύτταρα Sertoli μαζί με τα Leydig είναι δύο τύποι διπλοειδών κυττάρων που έχουν υποστηρικτικό ρόλο στη διαδικασία της σπερματογένεσης. Στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, τα κύτταρα Sertoli εκκρίνουν την αντι-Müllerian ορμόνη η οποία καταστέλλει την ανάπτυξη του πόρου του Müller. Ως εκ τούτου, οι θηλυκές γονάδες δεν αναπτύσσονται ενώ αναπτύσσονται πλήρως οι πόροι του Wolff από τους οποίους θα προκύψει το ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα. Μετά τη πλήρη ανάπτυξή τους ακολουθεί η τμηματική τους διαφοροποίηση, από την οποία διαδοχικά έχουμε τη δημιουργία της επιδιδυμίδας από το κεφαλικό τμήμα του πόρου (8η-12η εβδομάδα), του σπερματικού πόρου από το μεσαίο τμήμα και των σπερματοδόχων κύστεων από το τελικό τμήμα (10η εβδομάδα). Τέλος, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι από το μεσονεφρικό πόρο και μετά την εκβλάστηση των σπερματοδόχων κύστεων, δημιουργείται το τμήμα του σπερματικού πόρου, το οποίο βρίσκεται περιφερικά των δύο σπερματοδόχων κύστεων και καλείται εκσπερματιστικός πόρος [2]. Μετά την εφηβεία, τα κύτταρα Sertoli και Leydig λαμβάνουν μέρος αφ' ενός στη φαγοκυττάρωση των σπερματοζωαρίων και αφ' ετέρου στον ορμονικό έλεγχο της σπερματογένεσης. Η σπερματογένεση είναι μια συνεχής διαδικασία. Καθ' όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης τα σπερματογόνια βρίσκονται στην εξωτερική πλευρά των σπερματικών σωληναρίων του όρχεως στη βάση των κυττάρων Sertoli, τοποθετημένα ανάμεσα σ' αυτά και στην υποκείμενη βασική μεμβράνη (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Φυσιολογία της σπερματογένεσης

Τα σπερματογόνια παραμένουν ανενεργά μέχρι την εφηβεία όπου αρχίζουν να διαιρούνται με συνεχείς μιτώσεις. Μερικά από τα θυγατρικά κύτταρα διακόπτουν τον πολλαπλασιασμό τους, διαφοροποιούνται σε πρωτοταγή σπερματοκύτταρα τα οποία ακολουθούν μειωτικές διαιρέσεις. Κάθε πρωτοταγές σπερματοκύτταρο υφίσταται την πρώτη μειωτική διαίρεση και μετατρέπεται σε δύο δευτεροταγή σπερματοκύτταρα (σπερματοκύτταρα δευτέρας τάξης) που είναι μικρά, σφαιρικά, απλοειδή κύτταρα [3]. Κατά τη διάρκεια της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, τα πρωτοταγή σπερματοκύτταρα διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό. Στη πρόφαση I, τα χρωμοσώματα αρχίζουν να συμπυκνώνονται στο στάδιο της λεπτοταινίας και δημιουργούνται θραύσεις διπλής αλυσίδας στην έλικα του DNA. Τα σημεία θραύσης θα αποτελέσουν και σημεία ανασυνδυασμού. Στο στάδιο της ζυγοταινίας, οι αδελφές χρωματίδες ζευγαρώνουν και αρχίζει ο σχηματισμός της σύναψης ο οποίος και θα ολοκληρωθεί στο στάδιο της παχυταινίας όπου ταυτόχρονα λαμβάνει χώρα ο ανασυνδυασμός [4]. Τα χρωμοσώματα θα αρχίσουν να διαχωρίζονται στο στάδιο της διπλοταινίας. Τα δευτεροταγή σπερματοκύτταρα εν συνεχεία υφίστανται τη δεύτερη μειωτική διαίρεση και σχηματίζουν 4 απλοειδείς σπερματίδες. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης αυτής διαίρεσης δεν υπάρχει

άλλη ελάττωση του αριθμού των χρωμοσωμάτων: η διαίρεση αυτή, παρότι ονομάζεται μειωτική ομοιάζει πολύ με μια απλή μιτωτική διαίρεση [3,4] (Εικόνα 2).



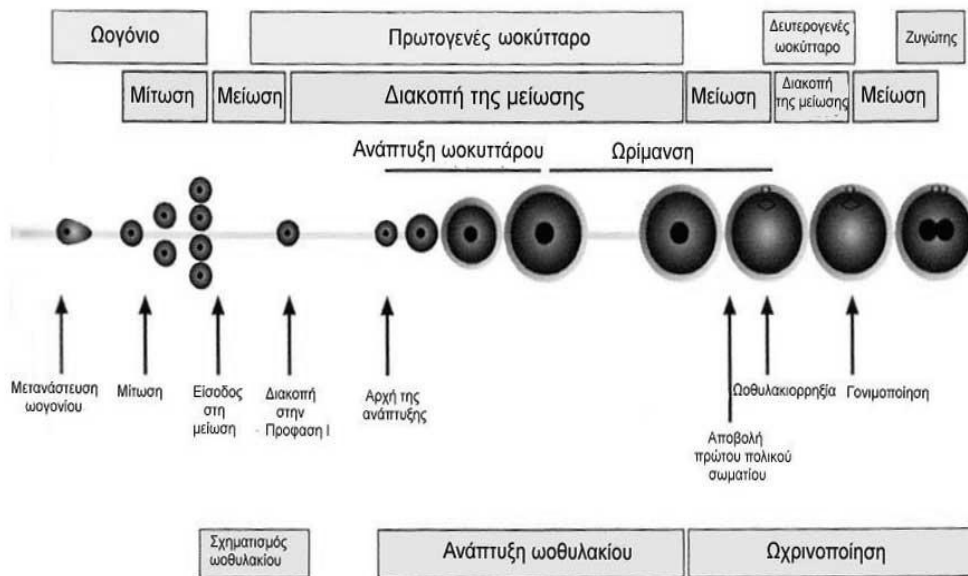
Εικόνα 2. Ανακατάταξη του γενετικού υλικού κατά τη σπερμιογένεση.

Οι σπερματίδες σταδιακά χάνουν το κυτταρόπλασμά τους και μετατρέπονται σε ώριμα σπερματοζώαρια, με μια εκτεταμένη διεργασία διαφοροποίησης, γνωστή ως σπερμιογένεση [5]. Οι ιστόνες σταδιακά αντικαθίστονται από πρωταμίνες ώστε να

επιτευχθεί μέγιστη συμπύκνωση της χρωματίνης, αν και μερικές ιστόνες μπορούν να παραμείνουν [6,7,8]. Στους γόνιμους άνδρες η αναλογία πρωταμίνης 1 προς πρωταμίνη 2 είναι περίπου 1 ενώ απόκλιση από αυτήν έχει συσχετιστεί με υπογονιμότητα και υποψία για βλάβες στο γενετικό υλικό του σπερματοζωαρίου [9,10]. Μόνο μετά την οριστική διαφοροποίησή τους, τα σπερματοζωάρια απελευθερώνονται στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, υπό την επίδραση της τεστοστερόνης, για να καταλήξουν, μέσω του ορχικού δικτύου, στις επιδιδυμίδες όπου θα αποκτήσουν κινητικότητα και την ικανότητα να γονιμοποιούν [1]. Ως μέρος της διαδικασίας της ωρίμανσης, μερικά μη μεθυλιωμένα γονίδια ειδικά για τη σπερματογένεση, υφίστανται αλλαγές της μεθυλίωσής τους στην επιδιδυμίδα [11].

1.3 ΩΟΘΥΛΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ – ΩΟΓΕΝΕΣΗ

Ως ωογένεση ορίζεται η διαδικασία ανάπτυξης και διαφοροποίησης των θηλυκών γαμετών, όπου το ανώριμο ωογόνιο μετατρέπεται σε ώριμο δευτερογενές ωοκύτταρο ή ωάριο (Εικόνα 3). Σκοπός της είναι αφενός η δημιουργία απλοειδών θηλυκών γαμετών και αφετέρου η σύνθεση των απαραίτητων στοιχείων για την έναρξη και διατήρηση της ανάπτυξης στα αρχικά στάδια μετά την γονιμοποίηση (ένζυμα, οργανίδια, θρεπτικά συστατικά κλπ.). Στα ωοκύτταρα οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται στο στάδιο της μειωτικής πρόφασης.



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της ανάπτυξης και ωρίμανσης του ωοκυττάρου

1.3.1 ΑΡΧΕΓΟΝΑ ΓΕΝΝΗΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (PRIMORDIAL GERM CELLS) ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ (PRIMORDIAL FOLLICLE)

Το αρχικό στάδιο του ωαρίου είναι το αρχέγονο γεννητικό κύτταρο. Κατά τη διάρκεια της 5ης εβδομάδας της εμβρυϊκής ζωής, τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, μεταναστεύουν από το τοίχωμα του λεκιθικού ασκού και εγκαθίστανται στην περιοχή των αναπτυσσόμενων γονάδων όπου και σχηματίζουν τα ωογόνια. Τα τελευταία πολλαπλασιάζονται με επαναλαμβανόμενες μιτωτικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα τη ραγδαία αύξηση του αριθμού τους. Τα ωογόνια που παύουν να διαιρούνται μιτωτικά εισέρχονται στη φάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Με την ανάπτυξη των ωοθηκών, κατά τον τέταρτο μήνα της εμβρυϊκής ανάπτυξης και μέχρι τον έβδομο όπου σταματά ο πολλαπλασιασμός των ωογονίων, θα σχηματιστούν περίπου $6-7 \times 10^6$ αρχέγονα ωοθυλάκια [12,13,14]. Το αρχέγονο ωοθυλάκιο αποτελεί τη θεμελιώδη αναπαραγωγική μονάδα της ωοθήκης διότι από αυτό ξεκινά ουσιαστικά η ωοθυλακιογένεση.

Το αρχέγονο ωοθυλάκιο απαρτίζεται από ένα ωοκύτταρο με διάμετρο μόλις 25μm περίπου, η ανάπτυξη του οποίου έχει σταματήσει στο στάδιο της πρόφασης I, από ένα

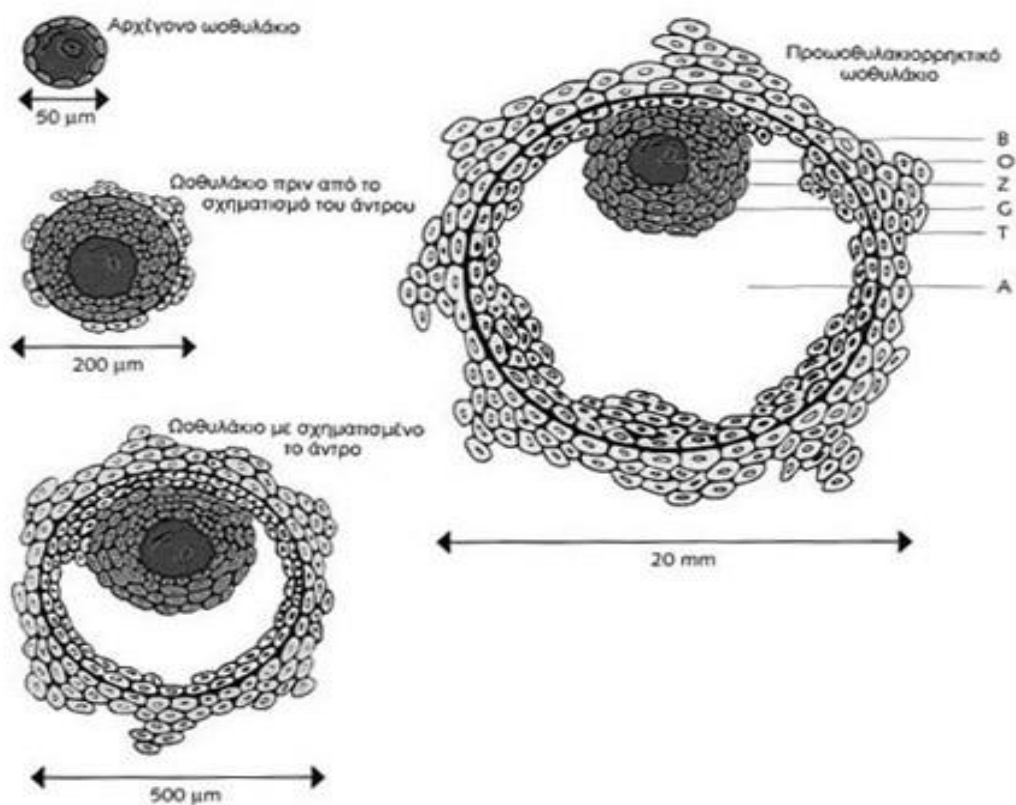
μονό στρώμα επίπεδων κοκκωδών κυττάρων, τα οποία άπτονται του ωοκυττάρου και από μία βασική μεμβράνη.

1.3.2 ΤΟ ΠΡΩΤΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ

Κατά τη διάρκεια των πρώτων τριών δεκαετιών της ζωής μιας γυναίκας, κάποια από τα αρχέγονα ωοθυλάκια θα στρατολογούνται, με σχετικά σταθερό ρυθμό, για να συνεχίσουν περαιτέρω την ανάπτυξή τους και ένα από αυτά θα καταλήγει κάθε φορά σε ώριμο ωοθυλακιορρηκτικό ωοθυλάκιο [15]. Στα αρχέγονα ωοθυλάκια που έχουν στρατολογηθεί, παρατηρούνται αλλαγές στο σχήμα των κοκκωδών κυττάρων από επίπεδο σε κυβοειδές και ανιχνεύεται επανέναρξη της μιτωτικής τους δραστηριότητας. Αποτέλεσμα αυτών των διεργασιών είναι η αύξηση της διαμέτρου του ωοκυττάρου από 25μm σε 120μm και ο σχηματισμός πολλαπλών στρωμάτων κοκκωδών κυττάρων. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης το ωοθυλάκιο αναφέρεται ως πρωτογενές ωοθυλάκιο (primary follicle) [16]. Η υπερβολική ανάπτυξη σε μέγεθος που παρατηρείται στα πρωτογενή ωοθυλάκια οφείλεται στην επανεργοποίηση του γονιδιώματος του ωοκυττάρου. Το DNA διπλασιάζεται, τα ομόλογα χρωμοσώματα ζευγαρώνουν και ανάμεσα στις αδελφές χρωματίδες δημιουργούνται χιάσματα. Στο σημείο αυτό, η πρόφαση της μείωσης I αναστέλλεται στο στάδιο της διπλοταινίας και το ωοκύτταρο που χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη ενός ευμεγέθους πυρήνα, είναι γνωστό ως βλαστικό κυστίδιο (Germinal Vesicle, GV) [17] (Εικόνα 4). Επίσης στη φάση αυτή σχηματίζεται και η διαφανής ζώνη, μια γλυκοπρωτεϊνικής προέλευσης μεμβράνη που περιβάλλει τη μεμβράνη του ωοκυττάρου. Το διάστημα αναστολής της πρόφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Τα πρωτογενή ωοκύτταρα συσσωρεύουν μεγάλες ποσότητες mRNA, θρεπτικών στοιχείων, πρωτεϊνών καθώς και άλλα συστατικά και οργανίδια, αποθέματα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης.

1.3.3 ΤΟ ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΕΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟ

Με την έναρξη της εφηβείας και κατά τη διάρκεια κάθε έμμηνου κύκλου, ένας αριθμός πρωτογενών ωοκυττάρων ολοκληρώνει την πρώτη μειωτική διαίρεση με αποτέλεσμα να πυροδοτείται μία σειρά διεργασιών. Το πρωτογενές ωοθυλάκιο περιβάλλεται από ένα επιπλέον στρώμα κοκκωδών κυττάρων σχηματίζοντας τελικά το δευτερογενές ωοθυλάκιο και κάνει την εμφάνισή του το πρώτο πολικό σωματίο, το οποίο περιλαμβάνει τον απλοειδή πυρήνα που προκύπτει μετά το τέλος της πρώτης μειωτικής διαίρεσης [16]. Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, το ωοκύτταρο εισέρχεται σε δεύτερη μείωση η οποία προχωρεί μέχρι το στάδιο της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης. Η δεύτερη μειωτική διαίρεση θα ολοκληρωθεί μετά την γονιμοποίηση του ώριμου ωαρίου. Καθώς προχωρά η ανάπτυξη του ωοθυλακίου, τα κοκκώδη κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται σχηματίζοντας δύο υποπληθυσμούς οι οποίοι διακρίνονται σε κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας και σε κύτταρα της έσω και της έξω θήκης [18]. Στα κύτταρα της έσω θήκης, που διαφοροποιούνται σε επιθηλιακά, εμφανίζονται υποδοχείς της LH [19], ενώ στα κύτταρα της κοκκιώδους στοιβάδας εμφανίζονται υποδοχείς της FSH. Κατά τη διάρκεια της περαιτέρω ανάπτυξης δημιουργούνται μικρές κοιλότητες μεταξύ των κοκκιωδών κυττάρων που ενώνονται μεταξύ τους σε μία ενιαία κοιλότητα γεμάτη υγρό, η οποία καλείται άντρο [20,21]. Στο στάδιο αυτό τα περισσότερα ωοθυλάκια υφίστανται ατρησία, ενώ ελάχιστα από αυτά, υπό τη δράση των γοναδοτροπινών, φτάνουν στο προ-ωοθυλακιορρηκτικό στάδιο. Σε αυτή τη φάση το ωοθυλάκιο αναφέρεται ως γραφιανό ωοθυλάκιο (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των ωοθυλακίων από το αρχέγονο ως το γραφιανό ωοθυλάκιο.

B= βασική μεμβράνη

O= ωάριο

Z= διαφανής ζώνη

G= κοκκιώδη κύτταρα

T= κύτταρα της θήκης

A= άντρο του ωοθυλακίου

1.3.4 ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΠΙΚΡΑΤΟΥΝΤΟΣ ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΥ

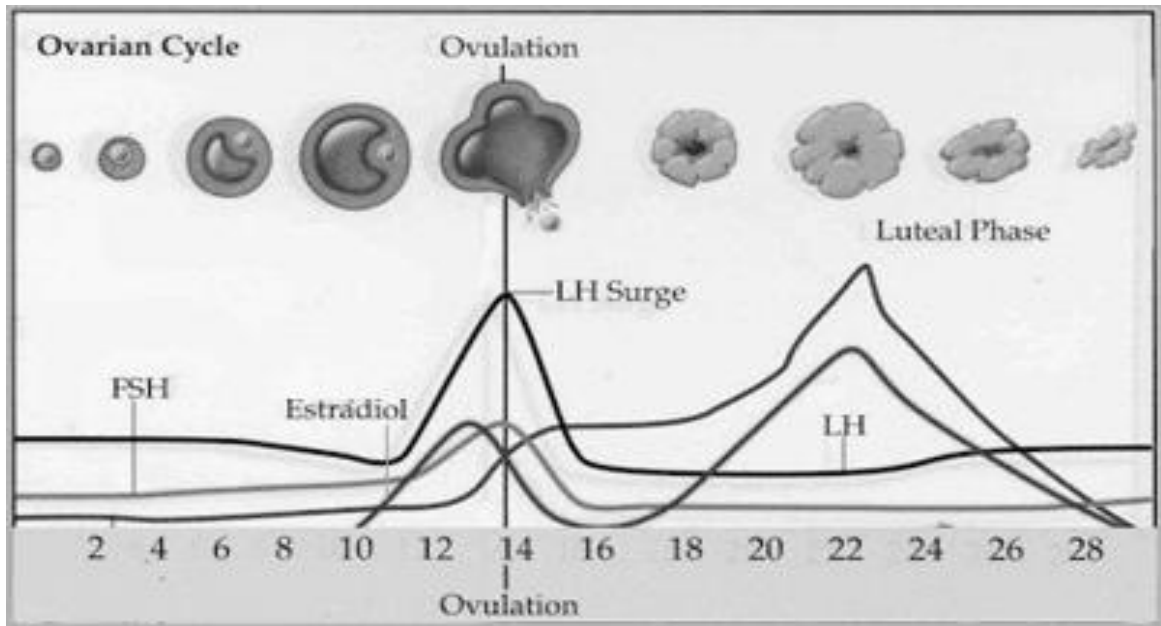
Κατά το τελικό στάδιο ανάπτυξης του ωοθυλακίου, ένα από τα γραφιανά ωοθυλάκια επιλέγεται και επικρατεί έναντι των υπολοίπων που οδηγούνται σε ατρησία. Το επικρατές ωοθυλάκιο υφίσταται ταχεία ανάπτυξη που οφείλεται στη μεγέθυνση των κυττάρων και στην αυξημένη παραγωγή υγρού μέσα στο άντρο (Εικόνα 4). Ακολουθώντας εκθετική μεγέθυνση, το μέγεθος του ωοθυλακίου φθάνει στα 10-20 mm κατά τη διάρκεια των τελευταίων 48 ωρών πριν από το μέσο του καταμήνιου κύκλου, όπου συντελείται η ωοθυλακιόρρηξια (απελευθέρωση του ωαρίου) με ήπια ρήξη του ωοθυλακίου. Η στρατολόγηση των ωοθυλακίων και η επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου εξαρτώνται αποκλειστικά από την FSH. Στην αρχή του γεννητικού κύκλου, ίσως και 1-2 ημέρες πριν το τέλος του προηγούμενου, παρατηρείται αύξηση της FSH για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η αύξηση αυτή ονομάζεται «παράθυρο της FSH» και ωθεί μία ομάδα ωοθυλακίων σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης. Τα ωοθυλάκια που είναι περισσότερο ευαίσθητα στην FSH, είναι αυτά που στρατολογούνται να συνεχίσουν μέχρι το προ-ωοθυλακιόρρηκτικό στάδιο της ανάπτυξής τους και αυτό με τη μεγαλύτερη ευαισθησία είναι αυτό που θα επικρατήσει [22]. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον το γεγονός ότι το μέγεθος του ωοθυλακίου επηρεάζει την επιλογή του επικρατούντος ωοθυλακίου. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι στα μικρά ωοθυλάκια τα επίπεδα οιστραδιόλης είναι χαμηλά σε σύγκριση με τα μεγαλύτερου μεγέθους και επομένως εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στην FSH [23,24,25]. Επιπλέον, η επιλογή του επικρατούς ωοθυλακίου πιθανώς να έχει σχέση αφ' ενός με τον αυξημένο αριθμό υποδοχέων της FSH στα κοκκιώδη κύτταρα, τα οποία με αρωματοποιό σύστημα μετατρέπουν τα ανδρογόνα σε οιστρογόνα και αφ' ετέρου με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη της αγγείωσης της θήκης του ωοθυλακίου, η οποία έχει ως συνέπεια τη μεγαλύτερη προσαγωγή FSH στα κοκκιώδη κύτταρα.

1.3.5 ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΡΡΗΞΙΑ

Ο όρος ωοθυλακιορρηξία χρησιμοποιείται για να περιγράψει την απελευθέρωση του ώριμου ωαρίου από το ωοθυλάκιο . Αποτελεί το τελικό στάδιο ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ωοθυλακίου και σηματοδοτεί την αρχή σχηματισμού του ωχρού σωματίου.

Η φάση της ωοθυλακιορρηξίας , που συμβαίνει στο μέσο του έμμηνου κύκλου, χαρακτηρίζεται από μία πολύ μεγάλη παροδική κορύφωση των επιπέδων της LH του πλάσματος και από μία μικρότερη κορύφωση της FSH. Το ωοθυλακιορρηκτικό κύμα της LH και της FSH εξασπύεται με θετική αναδραστική επίδραση της οιστραδιόλης. Κατά τις δύο προηγούμενες ημέρες σημειώνεται μία κορύφωση της οιστραδιόλης, η οποία φτάνει σ' ένα κρίσιμο επίπεδο, που ακολουθείται από αύξηση των παλμών της GnRH. Την ίδια περίοδο τα επίπεδα της προγεστερόνης του πλάσματος ανέρχονται ελαφρώς. Αυτό επιτελείται ώστε να προκληθεί μία απότομη διέγερση του κυρίαρχου ωοθυλακίου από τις γοναδοτροπίνες. Το γεγονός αυτό αποτελεί το έναυσμα για την ωοθυλακιορρηξία η οποία επέρχεται έπειτα από 12 ώρες περίπου.

Μετά την ωορρηξία, η αρνητική ανάδραση του ωχρού σωματίου προκαλεί την πτώση των επιπέδων της FSH και της LH, τα οποία και φτάνουν στο κατώτατο σημείο τους κατά το τέλος της ωχρινικής φάσης. Αντίθετα παρατηρείται δεκαπλάσια αύξηση της προγεστερόνης του πλάσματος, που προέρχεται από το ωχρό σωματίο, ενώ αυξάνεται επίσης η προερχόμενη από το ωχρό σωματίο οιστραδιόλη. Εάν δεν επέλθει κύηση και εκφυλισθεί το ωχρό σωματίο, τα επίπεδα οιστραδιόλης και προγεστερόνης κατέρχονται στο κατώτατο σημείο τους ενώ αυξάνεται η έκκριση της FSH και αρχίζει η εμμηνορροσία.



Εικόνα 5. Οι ορμονικές μεταβολές κατά τη διάρκεια του εμμηνορρυσιακού κύκλου. Οι ορμόνες της υπόφυσης FSH και LH ελέγχουν τον ωοθυλακικό κύκλο και την παραγωγή οιστρογόνων και προγεστερόνης από τα ενεργοποιηθέντα ωοθυλάκια και το ωχρό σωματίο της ωοθήκης .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

2.1 ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ

2.1.1 ΑΝΑΓΝΩΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΦΗ ΓΑΜΕΤΩΝ, ΑΚΡΟΣΩΜΙΚΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ, ΦΡΑΓΜΟΣ ΠΟΛΥΣΠΕΡΜΙΑΣ, ΣΥΓΓΑΜΙΑ ΩΑΡΙΟΥ-ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΟΥ

Η εμβρυογένεση αρχίζει με τη συγγαμία του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης. Η συγγαμία των δύο απλοειδών γαμετικών κυττάρων είναι σημαντική ώστε να ενεργοποιηθεί το ωάριο και να επιτευχθεί ο σχηματισμός του διπλοειδούς κυττάρου (ζυγωτό) το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του εμβρύου [26-37].

Η γονιμοποίηση στους ανθρώπους και στα άλλα θηλαστικά, ακολουθεί μία σειρά καθορισμένων διαδοχικών γεγονότων τα οποία συντελούνται πριν τη συγγαμία των γαμετών. Η χρονική σειρά με την οποία λαμβάνουν μέρος τα συγκεκριμένα γεγονότα είναι η εξής: (1) Αναγνώριση των γαμετών, έλξη και επαφή του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη (Zona Pellucida, ZP) του ωαρίου. (2) Συνένωση του σπερματοζωαρίου με τη διαφανή ζώνη. (3) Το σπέρμα υπόκειται σε μία διακριτή μορφολογική αλλαγή η οποία ονομάζεται ακροσωμική αντίδραση. Στο στάδιο αυτό, η πλασματική μεμβράνη του σπέρματος συντήκεται κατά διαστήματα με την εξωτερική ακροσωμική μεμβράνη δημιουργώντας πολυάριθμα κυστίδια με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του περιεχομένου του ακροσώματος και την έκθεση της εσωτερικής ακροσωμικής μεμβράνης [32,38,39]. (4) Τα ακροσωμικά ένζυμα απελευθερώνονται μέσα από τα χάσματα που δημιουργούνται και βοηθούν το σπέρμα να διαπεράσει τις προστατευτικές στοιβάδες του ωαρίου. (5) Σύντηξη της πλασματικής μεμβράνης του σπέρματος με τη πλασματική μεμβράνη του ωαρίου και ενεργοποίηση του φραγμού της πολυσπερμίας. Η πολυσπερμία αποφεύγεται χάρη σε δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος είναι άμεσος και παροδικός και παρατηρείται μόλις το σπέρμα

έρθει σε επαφή με το ωάριο. Προκαλείται από την εκπόλωση της πλασματικής μεμβράνης του ωαρίου, η οποία οφείλεται στις ιονικές μεταβολές που επέρχονται στην επιφάνεια. Ο δεύτερος μηχανισμός απαιτεί περισσότερο χρόνο, είναι μόνιμος και οφείλεται στη φλοιώδη αντίδραση. Ως φλοιώδης αντίδραση ορίζεται η απελευθέρωση του περιεχομένου των φλοιωδών κοκκίων στο χώρο μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης και του λεκιθικού φακέλου. Αποτέλεσμα είναι η ανύψωση και απομάκρυνση του λεκιθικού φακέλου από την επιφάνεια του ωαρίου. Καθώς ο λεκιθικός φάκελος ανυψώνεται γίνεται σκληρότερος και ανθεκτικός. Η πρωτεΐνη υαλίνη σχηματίζει ένα προστατευτικό κάλυμμα γύρω από το ωάριο και ο γονιμοποιητικός φάκελος, όπως καλείται πλέον ο λεκιθικός φάκελος, όχι μόνο είναι ανθεκτικός στην είσοδο άλλων σπερματοζωαρίων αλλά προστατεύει και το έμβρυο μέχρι το στάδιο της εκκόλαψης της βλαστοκύστης [40]. (6) Συγγαμία των δύο γαμετών ενεργοποιεί μεταβολικά το ωάριο, προκαλεί ανακατατάξεις κυτταροπλασματικών ουσιών και σύντηξη γενετικού υλικού [38].

2.1.2 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΖΥΓΩΤΟΥ

Η γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζωάριο ενεργοποιεί το ωάριο και πυροδοτεί τις διαδικασίες για την ολοκλήρωση δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, που είχε διακοπεί στην ανάφαση [32]. Ως αποτέλεσμα, εκβάλλεται το δεύτερο πολικό σωματίο και σχηματίζεται ο απλοειδής μητρικός προπυρήνας. Εν τω μεταξύ, η μεμβράνη που περικλείει τον πυρήνα του σπερματοζωαρίου αρχίζει να ρήγνυται υπό την επίδραση κυτταροπλασματικών παραγόντων του ωαρίου. Η χρωματίνη στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται, αναδιοργανώνεται και περιβάλλεται από μεμβράνη, σχηματίζοντας έτσι τον πατρικό προπυρήνα. Αρχικά οι προπυρήνες είναι απομακρυσμένοι μεταξύ τους. Ο μητρικός προπυρήνας βρίσκεται κοντά στο δεύτερο πολικό σωματίο ενώ ο πατρικός στην περιοχή του φλοιού όπου εισχώρησε η κεφαλή του σπερματοζωαρίου. Οι προπυρήνες προσεγγίζουν ο ένας τον άλλον και κατά τη διάρκεια συντίθεται DNA. Τελικά, είκοσι περίπου ώρες μετά την επαφή του σπερματοζωαρίου με το ωάριο, οι προπυρήνες φθάνουν στο κέντρο του ωαρίου αλλά δεν συντήκονται. Οι μεμβράνες των προπυρήνων αποδιατάσσονται, η χρωματίνη οργανώνεται σε χρωμοσώματα και

πραγματοποιείται η πρώτη κυτταρική διαίρεση (first cleavage stage) σχηματίζοντας δύο βλαστομερίδια [32]

2.2 ΠΡΟ-ΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΕΜΒΡΥΪΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

2.2.1 ΑΥΛΑΚΩΣΗ

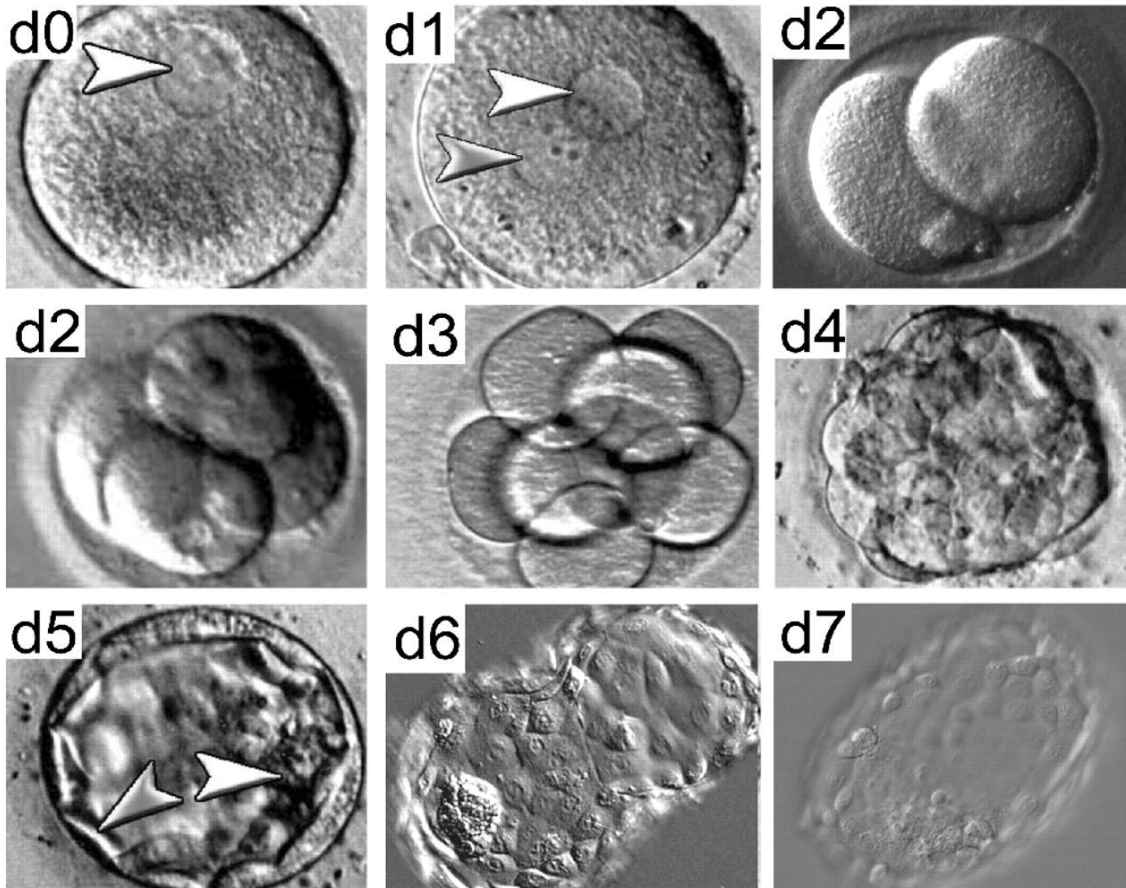
Μετά τη γονιμοποίηση, ο μονοκύτταρος ζυγώτης μετατρέπεται με μια σειρά διαδοχικών διαιρέσεων σε ένα πολυκύτταρο σχηματισμό ο οποίος εσωκλείεται στη διαφανή ζώνη και ο αρχικός μεγάλος όγκος κυτταροπλάσματος διαμοιράζεται σε πολλά μικρότερα ισοδύναμα, εμπύρηνα κύτταρα. Η διαδικασία των μιτωτικών διαιρέσεων είναι γνωστή ως αυλάκωση (cleavage) και τα κύτταρα αυτού του σταδίου ονομάζονται βλαστομερίδια. Κατά τη διαδικασία της αυλάκωσης αυξάνεται ο αριθμός των βλαστομεριδίων χωρίς όμως να παρατηρείται αύξηση του μεγέθους του αναπτυσσόμενου οργανισμού. Στα πρώτα στάδια της αυλάκωσης, οι διαιρέσεις πραγματοποιούνται συγχρονισμένα, δηλαδή η μίτωση και η κυτοκίνηση επιτελούνται σχεδόν ταυτόχρονα στα διαιρούμενα βλαστομερίδια. Για το λόγο αυτό παρατηρούμε έμβρυα με ζυγό αριθμό βλαστομεριδίων (2,4, ή και 8 κύτταρα).

Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, ελάχιστο mRNA συντίθεται. Η αυλάκωση μπορεί να συνεχιστεί ακόμα και αν ανασταλεί η μεταγραφή ή απομακρυνθεί ο πυρήνας. Το 1988 οι Peter Braude et al, προσδιόρισαν το χρόνο ενεργοποίησης του εμβρυϊκού γενώματος και ανίχνευσαν μεταγραφική δραστηριότητα και πρωτεϊνοσύνθεση στο στάδιο μετάβασης από τα τέσσερα στα οκτώ κύτταρα [41]. Μία δεκαετία αργότερα, οι Heikinheimo and Gibbons διατύπωσαν την υπόθεση ότι στα πρώτα στάδια της αυλάκωσης το μητρικό γένωμα είναι αυτό που προγραμματίζει το ρυθμό κυτταρικής διαίρεσης μέσω των πρωτεϊνών και του mRNA που έχουν αποθηκευτεί στο ωοκύτταρο κατά την ωογένεση [42].

2.2.2 ΜΟΡΙΔΙΟ ΚΑΙ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗ

Μετά το στάδιο της αυλάκωσης ακολουθεί το στάδιο του μοριδίου. Τα βλαστομερίδια, που μέχρι το στάδιο των οκτώ κυττάρων ήταν χαλαρά συνδεδεμένα μεταξύ τους, αναπτύσσουν ισχυρές συνδέσεις μέσω της διαδικασίας της πύκνωσης και σχηματίζουν ένα σφαιρικό συμπιεσμένο μόρφωμα που ονομάζεται μορίδιο (morula). Η πύκνωση δημιουργεί τις προϋποθέσεις που θα οδηγήσουν στο πρώτο διαφοροποιητικό γεγονός, δηλαδή στο διαχωρισμό της μάζας των κυττάρων σε εσωτερική και εξωτερική. Το πρώτο γεγονός διαφοροποίησης λαμβάνει χώρα όταν το μορίδιο αποτελείται από δεκαέξι βλαστομερίδια. Στο στάδιο αυτό τα κύτταρα της περιφέρειας διαιρούνται και παράγουν μια στοιβάδα πολωμένων κυττάρων, το τροφοεκτόδερμα (trophoectoderm). Αντιστοίχως, τα κύτταρα στο εσωτερικό του συμπιεσμένου μοριδίου διαιρούνται για να δώσουν τα μη πολωμένα κύτταρα της εσωτερικής μάζας (inner cell mass, ICM).

Την πέμπτη ή έκτη μέρα της εμβρυογένεσης, στο εσωτερικό του μοριδίου σχηματίζεται μία κοιλότητα η οποία ονομάζεται βλαστοκοίλη. Η βλαστοκοίλη γεμίζει με υγρό που παράγεται από τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος, γεγονός το οποίο έχει ως αποτέλεσμα το φυσικό διαχωρισμό των δύο κυτταρικών πληθυσμών και τη περαιτέρω διαφοροποίησή τους. Το έμβρυο στο στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται ως βλαστοκύστη. Τα κύτταρα συνεχίζουν να διαιρούνται και διατάσσονται σε δύο περιοχές: ένα έκκεντρο άθροισμα κυττάρων, που ονομάζεται έσω κυτταρική μάζα ή εμβρυοβλάστη και μια στοιβάδα κυττάρων που περιβάλλει την κοιλότητα της βλαστοκύστης, το τροφοεξώδερμα. Από τα πρώτα θα προέλθουν όλοι οι εμβρυϊκοί ιστοί ενώ τα δεύτερα θα δώσουν την τροφοβλάστη απ' όπου θα προκύψει το εμβρυϊκό τμήμα του πλακούντα.

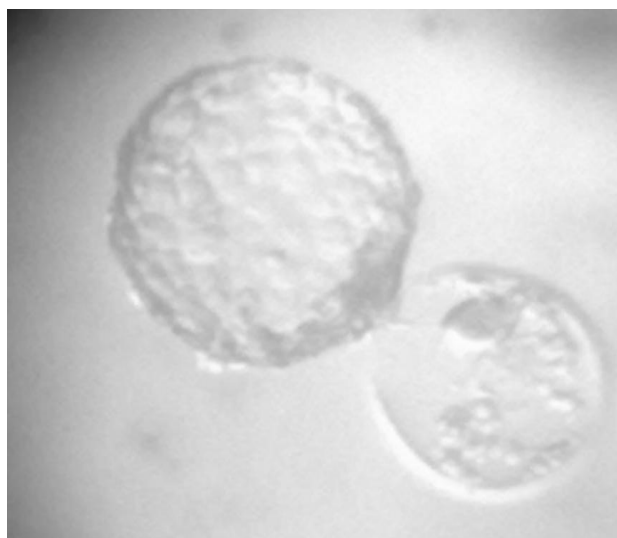


Εικόνα 6. Προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου στον άνθρωπο . (d0) Λίγες ώρες μετά την γονιμοποίηση είναι ορατός ένας προπυρήνας (βέλος). (d1) Την ημέρα μετά τη γονιμοποίηση έχουν σχηματιστεί και οι δύο προπυρήνες (βέλη). (d2,d3) Ακολουθούν μιτωτικές διαιρέσεις με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των βλαστομεριδίων σε 2,4,8 κύτταρα. (d4) Περίπου την τέταρτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση τα βλαστομερίδια αρχίζουν να συμπυκνώνονται σχηματίζοντας το μοριδίο. (d5) Τη πέμπτη μέρα σχηματίζεται η βλαστοκύστη η οποία αποτελείται από μία κοιλότητα γεμάτη υγρό, την έσω κυτταρική μάζα (βέλος δεξιά) και τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος (βέλος αριστερά) .(d6) Την έκτη μέρα πραγματοποιείται η εκκόλαψη της βλαστοκύστης από τη διαφανή ζώνη και την έβδομη μέρα (d7) είναι έτοιμη να εμφυτευθεί στη μήτρα.[43]

2.2.3 ΕΚΚΟΛΑΨΗ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗΣ

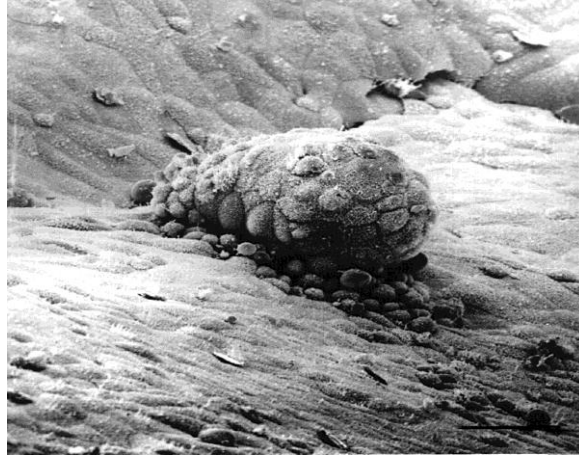
Στα αρχικά στάδια της βλαστοκύστης, καθώς μετακινείται μέσα από τη σάλπιγγα και κατευθύνεται προς την ωοθήκη, το έμβρυο εγκλείεται μέσα στη διαφανή ζώνη. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγεται η προσκόλληση του εμβρύου στα τοιχώματα της σάλπιγγας, γνωστή ως εξωμήτριος κύηση. Πλησιάζοντας προς τη μήτρα, η κοιλότητα της

βλαστοκύστης αυξάνεται με συνέπεια τη διόγκωσή της και η διαφανής ζώνη προοδευτικά εξασθενεί και λεπταίνουν τα τοιχώματά της. Όταν το έμβρυο φτάσει τελικά στη μήτρα πρέπει να αποβάλλει το προστατευτικό του κάλυμμα για να εμφυτευθεί στα τοιχώματά της (Εικόνα 7). Η αποβολή της διαφανούς ζώνης επιτυγχάνεται μέσω μιας διαδικασίας γνωστή ως εκκόλαψη (hatching), κατά την οποία η στρυψίνη, μία πρωτεάση εντοπισμένη στη κυτταρική μεμβράνη, υδρολύει ένα άνοιγμα στη διαφανή ζώνη μέσα από το οποίο περνά το έμβρυο.



Εικόνα 7. Εκκολαφθείσα βλαστοκύστη. Στο κάτω μέρος διακρίνεται η διαφανής ζώνη που περιέκλειε το έμβρυο.

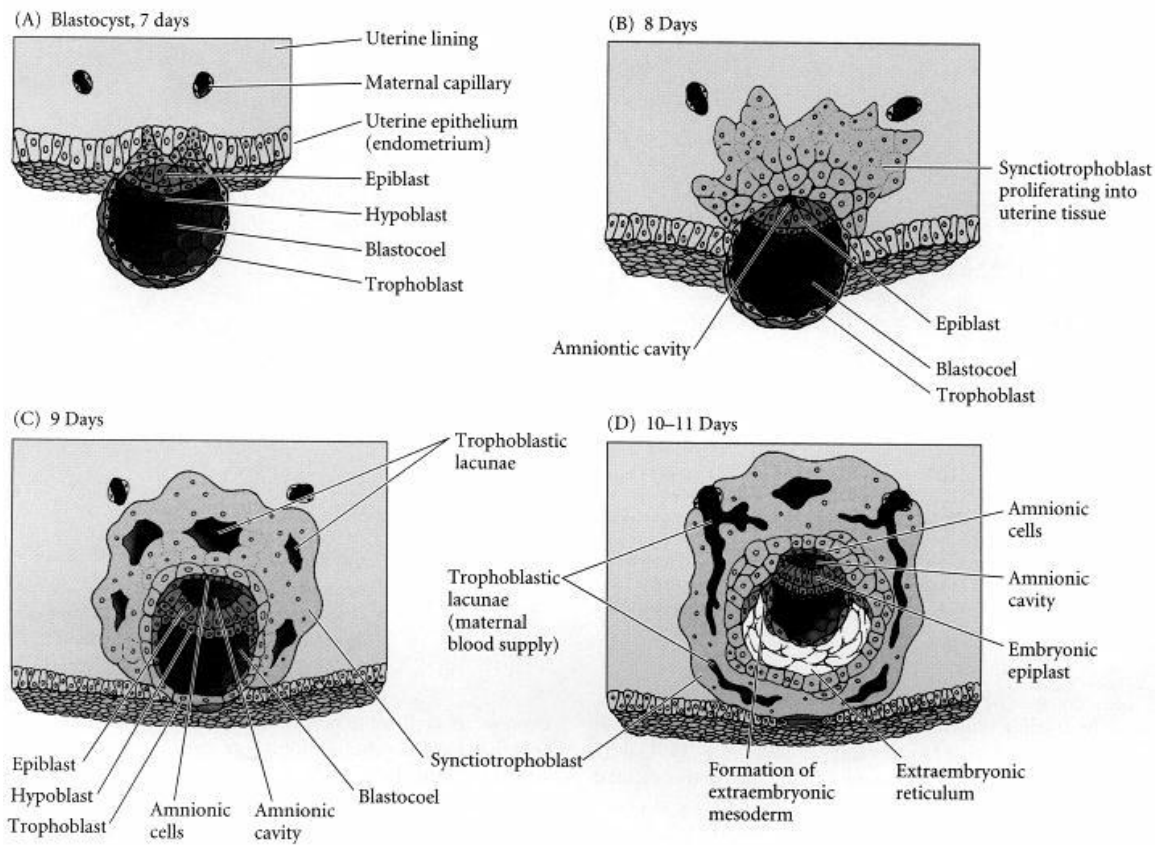
Η εκκολαφθείσα βλαστοκύστη έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια του ενδομητρίου όπου και προσκολλάται (Εικόνα 8). Αμέσως μετά την επαφή της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο, η τροφοβλάστη, διαφοροποιείται σε δύο στιβάδες, την κυτταροτροφοβλάστη και τη συγκυτιοτροφοβλάστη. Η κυτταροτροφοβλάστη απαρτίζεται από το στρώμα κυττάρων που περιβάλλει τη βλαστοκύστη. Εξωτερικά της κυτταροτροφοβλάστης παρατηρείται μία στοιβάδα πολυπύρηνων κυττάρων, που προκύπτουν από τη σύντηξη κυττάρων της κυτταροτροφοβλάστης και τα οποία σχηματίζουν το εξωτερικό τμήμα της τροφοβλάστης, τη συγκυτιοτροφοβλάστη.



Εικόνα 8. Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου όπου απεικονίζεται η εμφυτευμένη βλαστοκύστη στη μήτρα.

Η κυτταροτροφοβλάστη διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εμφύτευσης της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο καθώς και στο σχηματισμό ενός πλήρως λειτουργικού πλακούντα ενώ σημαντικός είναι ο ρόλος της συγκυτιοτροφοβλάστης στις διαδικασίες ανταλλαγής αερίων και θρεπτικών συστατικών μεταξύ του εμβρύου και της μητέρας, καθώς και σε ανοσολογικές και μεταβολικές λειτουργίες.

Μετά την επαφή της βλαστοκύστης με το ενδομήτριο, τα κυτταροτροφοβλαστικά κύτταρα εκκρίνουν πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία αποδομούν τις στιβάδες του ενδομητρίου (decidua) και επιτρέπουν στις τροφοβλαστικές προεκβολές να εισχωρήσουν. Η συγκυτιοτροφοβλάστη εκκρίνει ένζυμα τα οποία αποσυνθέτουν τον ιστό της μήτρας και σε συνεργασία με την κυτταροτροφοβλάστη επιτρέπουν την πλήρη διείσδυση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Επιπλέον, η συγκυτιοτροφοβλάστη έρχεται σε επαφή με τριχοειδή αγγεία του ενδομητρίου δημιουργώντας κατά αυτό τον τρόπο ένα δίαυλο επικοινωνίας μεταξύ του μητρικού αίματος και του εμβρυικού εξωκυττάρου υγρού, επιτρέποντας την παθητική ανταλλαγή συστατικών μεταξύ μητέρας και εμβρύου. Τις επόμενες μέρες, στήλες κυτταροτροφοβλαστικών κυττάρων αρχίζουν να μεγαλώνουν και να επεκτείνονται προς την συγκυτιοτροφοβλάστη και τα υπόλοιπα εξωτερικά στρώματα του εμβρύου και έξω από αυτό. Αυτές είναι οι πρωτογενείς λάχνες, από τις οποίες θα προέλθουν οι υπόλοιπες λάχνες και η τελική δομή του ώριμου πλακούντα (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Τα στάδια εμφύτευσης του εμβρύου στη μήτρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ & ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ

3.1 ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Όπως αναπτύχθηκε εκτενώς στο προηγούμενο κεφάλαιο, η δημιουργία του εμβρύου ξεκινάει με τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο και το σχηματισμό του ζυγωτού κυττάρου. Με διαδοχικές διαιρέσεις του ζυγώτη θα σχηματιστεί αρχικά το μορίδιο (στάδιο των 16 κυττάρων) και στη συνέχεια η βλαστοκύστη (στάδιο 32 κυττάρων). Όπως έχουμε αναφέρει προηγουμένως, η βλαστοκύστη αποτελείται από τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος και από τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας. Τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας ονομάζονται εμβρυϊκά βλαστικά ή στελεχειαία κύτταρα (Embryonic Stem Cells, ESC). Προς το τέλος της πρώτης εβδομάδας της εμβρυϊκής ανάπτυξης, η βλαστοκύστη αποτελείται από 200-250 κύτταρα περίπου, εκ των οποίων 30-34 συνιστούν τα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας [49].

Τα στελεχειαία κύτταρα χαρακτηρίζονται από δύο σημαντικές ιδιότητες, (1) την ικανότητα αυτό-ανανέωσης, από την οποία προκύπτουν θυγατρικά κύτταρα με τις ίδιες αναπτυξιακές δυνατότητες και (2) την πολυδυναμία, δηλαδή την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε όλους τους τύπους των εμβρυϊκών ιστών. Τα πρώτα εμβρυϊκά στελεχειαία κύτταρα απομονώθηκαν από βλαστοκύστη ποντικού το 1981 [44] ενώ ανθρώπινα απομονώθηκαν το 1988 [45].

3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΤΩΝ ESCs

Η πολυδυναμία των εμβρυϊκών στελεχειαίων κυττάρων είναι θεμελιώδους βιολογικής σημασίας για την ανάπτυξη των οργανισμών καθώς περισσότεροι από διακόσιοι τύποι κυττάρων μπορούν να προκύψουν από ένα πολυδύναμο κύτταρο. Ο έλεγχος της πολυδυναμίας και της αυτοανανέωσης των ESCs στηρίζεται σε ένα μοναδικό μεταγραφικό δίκτυο, σε εξωκυτταρικά σήματα αλλά και σε επιγενετικές τροποποιήσεις. Όλες οι σηματοδοτικές οδοί που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και επιβίωση των ESCs καταλήγουν στον πυρήνα και έχουν ως αποτέλεσμα τη μεταγραφική ενεργοποίηση ή καταστολή της έκφρασης γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τη πολυδυναμία των ESCs. Τα κυριότερα γονίδια που ρυθμίζουν τη πολυδυναμία και τη διαφοροποίηση των ESCs είναι τα Oct4, Sox2 και Nanog.

3.2.1 Oct4 (POU5F1)

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο Oct4 (octamer-binding transcription factor 4) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1989 [46,47] ως ένα στοιχείο που εκφράζεται ειδικά στα γεννητικά κύτταρα του ποντικού. Περαιτέρω μελέτη αποκάλυψε ότι πρόκειται για ένα μεταγραφικό παράγοντα της οικογένειας των ομοιοτικών πρωτεϊνών (POU family). Χαρακτηριστικό γνώρισμα των πρωτεϊνών της οικογένειας OCT είναι η αναγνώριση ενός οκταμερούς μοτίβου πρόσδεσης του 5' –ATGCAAAT– 3' [48] μέσω του οποίου ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση κατά τη διαφοροποίηση και την οργανογένεση. Το ενδιαφέρον στην περίπτωση του OCT-4 είναι ότι η πρόσδεσή του στις περιοχές που περιέχουν την αλληλουχία αναγνώρισης μπορεί είτε να καταστείλει είτε να ενεργοποιήσει την μεταγραφή των γονιδίων [49]. Ο διττός αυτός ρόλος εξαρτάται από τη σύσταση των παρακείμενων αλληλουχιών επιτρέποντας κάθε φορά τη διατήρηση της πολυδυναμίας ή την επαγωγή της διαφοροποίησης. Η δράση του OCT-4 στα γονίδια-στόχους διαπιστώθηκε ότι απαιτούσε τη συνέργεια ενός πρόσθετου μεταγραφικού παράγοντα, του SOX2. Ο OCT-4 αρχικά είναι ενεργός στο ωκύτταρο των θηλαστικών, συνεχίζει να εκφράζεται κατά τις πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις και στη συνέχεια περιορίζεται στα κύτταρα της ICM [50]. Όταν τα κύτταρα εισέρχονται σε φάση διαφοροποίησης, ο OCT-4

σχεδόν παύει να εκφράζεται, για το λόγο αυτό έχει καθιερωθεί πλέον ως ο κλασικότερος δείκτης διαφοροποίησης πολυδυναμίας των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων.

3.2.2 Sox2

Ο μεταγραφικός παράγοντας SOX2 γνωστός ως και SRY (sex determining region Y)-box 2, ανήκει στην οικογένεια μεταγραφικών παραγόντων Sox (SRY-related HMG box) οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε αρκετά στάδια της ανάπτυξης των θηλαστικών. Αυτή η οικογένεια πρωτεϊνών φέρει μία HMG (High Mobility Group) περιοχή μέσω της οποίας προσδένονται στο DNA και συμμετέχουν σε φαινόμενα μεταγραφικής ρύθμισης και αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης [51]. Ο Sox2 έχει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση των εμβρυϊκών και νευρικών βλαστικών κυττάρων [52]. Ο χαρακτηρισμός του SOX2 ως παράγοντα πολυδυναμίας έγκειται στο γεγονός ότι συμπλεκόμενος με τον OCT-4 συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων-στόχων [53,54].

3.2.3 Nanog

Η πρωτεΐνη NANOG είναι επίσης ένας μεταγραφικός παράγοντας, ο οποίος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αυτοανανέωση των αδιαφοροποίητων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (Mitsui et al., 2003) και συγκαταλέγεται στην κατηγορία των ομοιοτικών μεταγραφικών παραγόντων. Την πρωτεΐνη NANOG στον άνθρωπο συνθέτουν 305 αμινοξέα και ένα συντηρημένο μοτίβο το οποίο αναγνωρίζει και προσδένει συγκεκριμένες περιοχές του DNA. Εκφράζεται σε περιορισμένο αριθμό κυτταρικών τύπων. Κατά την εμβρυογένεση η μεταγραφή του γονιδίου εντοπίζεται στην εσωτερική κυτταρική μάζα του μοριδίου [55,56], συσσωρεύεται στο στάδιο της βλαστοκύστης [57], ενώ πριν την εμφύτευση η έκφρασή του μειώνεται και τελικά μηδενίζεται. Το πρότυπο έκφρασης που χαρακτηρίζει το Nanog υποδηλώνει ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διατήρηση του αριθμού των πολυδύναμων κυττάρων και αποτρέπει την απορρύθμιση των κυτταρικών διαίρεσεων [49]. Έχει παρατηρηθεί ότι το Nanog εκφράζεται ετερογενώς στα

εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα. Υπερέκφραση του Nanog ωθεί την έκφραση επιπλέον παραγόντων πολυδυναμίας όπως ο OCT-4 με αποτέλεσμα να καθυστερεί τη διαφοροποίηση, χωρίς όμως να τη σταματά. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του Nanog οδηγούν στη διαφοροποίηση των κυττάρων σε ενδόδερμα [58]. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ο NANOG, όπως και οι OCT4 και SOX2, είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της πολυδυναμίας αλλά ο κύριος ρόλος του φαίνεται να είναι η εγκαθίδρυση και ο σχηματισμός της εσωτερικής μάζας κυττάρων και των γαμετικών κυττάρων. Ενώ οι OCT4 και SOX2 είναι υπεύθυνοι για να καθοδηγούν την πορεία διαφοροποίησης ή μη των ESCs, ο NANOG φαίνεται να είναι υπεύθυνος για τη σωστή λειτουργία του μηχανισμού ελέγχου της πολυδυναμίας [59]

3.3 ΤΟ ΜΕΤΑΓΡΑΦΙΚΟ ΔΙΚΤΥΟ ΣΤΑ ΕΜΒΡΥΪΚΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

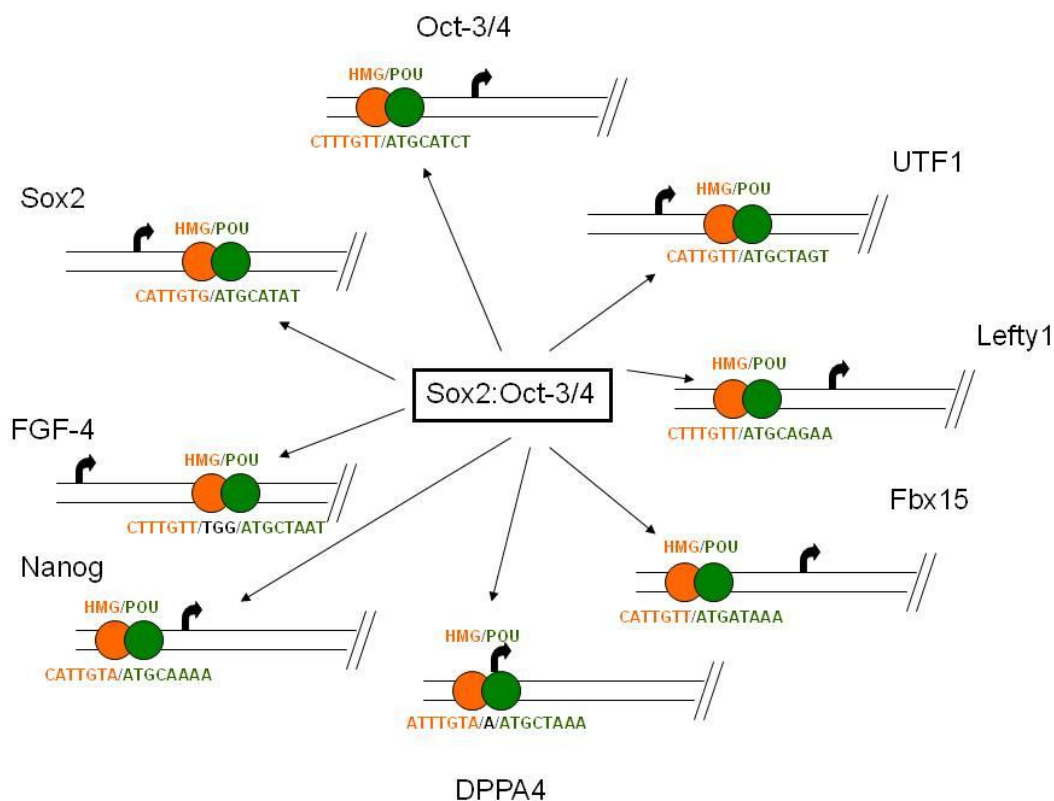
Κανένας από τους παράγοντες που προαναφέρθηκαν δεν είναι σε θέση από μόνος του να ελέγξει τη διαφοροποίηση ή μη των ESCs. Οι μελέτες περί της δράσης των μεταγραφικών παραγόντων αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός δικτύου γονιδίων, η ενδοεπικοινωνία και ο αλληλοπροσδιορισμός των οποίων καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη διάρκεια ζωής και τη πορεία των ESCs [49].

3.3.1. ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ OCT-4, SOX2 και NANOG

Οι παράγοντες Oct-4, Sox2 και Nanog έχουν κυρίαρχο ρόλο στο μηχανισμό της μεταγραφικής ρύθμισης που καθορίζει την πορεία των ESCs λόγω του μοναδικού προτύπου έκφρασης και του καθοριστικού ρόλου στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης [55,56,60-65]. Αναλύσεις του γονιδιώματος τόσο στο ποντίκι όσο και στον άνθρωπο επιβεβαίωσαν τον κυρίαρχο ρόλο των τριών αυτών παραγόντων σ' ένα ιδιαίτερα πολύπλοκο δίκτυο, υπεύθυνο για τη διατήρηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων στην αδιαφοροποίητη κατάσταση [66,67]. Ο ρυθμιστικός μηχανισμός δεν περιορίζεται μόνο στην έκφραση ή μη του κάθε γονιδίου αλλά και τα επίπεδα αυτής καθεαυτής της έκφρασης

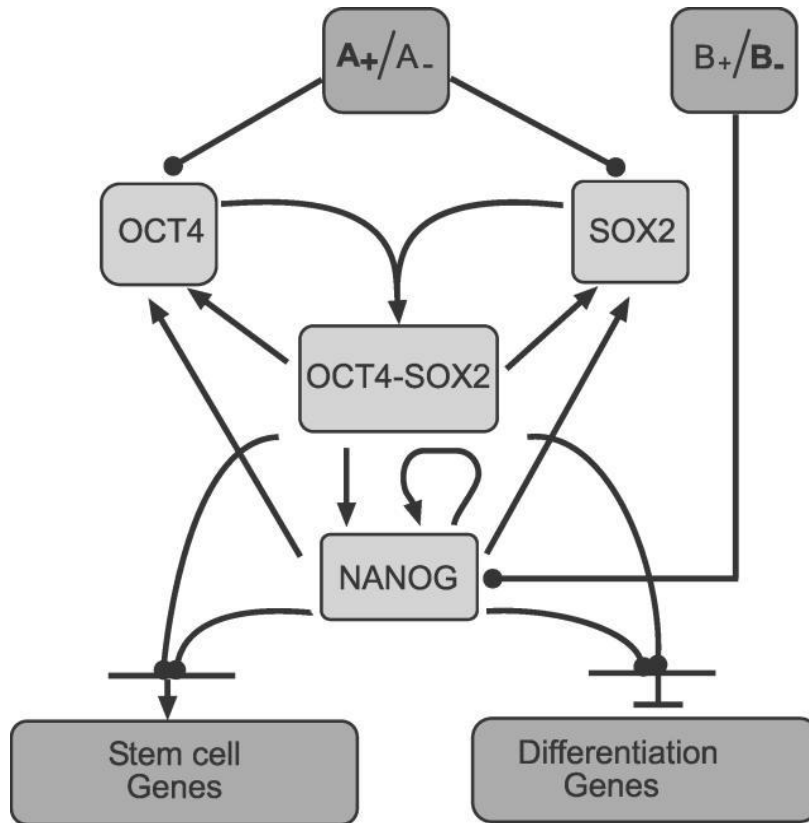
είναι ιδιαίτερης σημασίας. Για παράδειγμα, η αυξημένη έκφραση του Oct-4 έχει σαν αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των ESCs του ποντικού σε κύτταρα μεσοδέρματος και ενδοδέρματος, ενώ η αυξημένη έκφραση του Nanog ενισχύει την αυτοανανέωση των κυττάρων και τη διατήρηση της πολυδυναμίας. Αντίθετα, μειωμένη έκφραση του Oct-4 ωθεί τη διαφοροποίηση σε τροφοεξώδερμα, ενώ η μειωμένη έκφραση του Nanog ενισχύει τη διαφοροποίηση των κυττάρων προς σπλαχνικό ενδόδερμα. Επομένως, τα γονίδια μπορούν να δρουν ανεξάρτητα αλλά θα πρέπει οι δράσεις τους να αλληλοεξαρτώνται. Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι ενώ η κύρια λειτουργία των OCT-4 και NANOG είναι η καταστολή της διαφοροποίησης, είναι απαραίτητη η συνδυαστική δράση τους για τη διατήρηση της ικανότητας αυτοαναγέννησης των ESCs [49].

Οι πρωτεΐνες της οικογένειας POU συχνά συνεργάζονται με τους παράγοντες SOX ως ρυθμιστές θεμελιωδών διαδικασιών κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης [68]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα OCT-4 και SOX2 αλληλεπιδρούν όταν προσδένονται στους υποκινητές των γονιδίων στόχων για να ενεργοποιήσουν την έκφρασή τους καθώς και τη δικιά τους [69,70,71]. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανάλογα με το γονίδιο-στόχο, τα OCT-4 και SOX2 παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα συνεργασίας [72]. Έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι ο SOX2 δρα συνεργατικά με τον OCT-4 για να ενεργοποιήσουν Oct-Sox ενισχυτές ρυθμίζοντας μετέπειτα την έκφραση των γονιδίων πολυδυναμίας συμπεριλαμβανομένων και των ίδιων των Nanog, Oct4 και Sox2 (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Γονίδια-στόχοι των Sox2 και Oct-3/4. Το σύμπλοκο HMG/POU, όπου προσδένονται οι παράγοντες Sox2 και Oct-3/4, εντοπίζεται εντός των ρυθμιστικών περιοχών των γονιδίων-στόχων. Με το μαύρο βέλος απεικονίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής.[73]

Η ανάλυση των υποκινητών των γονιδίων-στόχων των παραγόντων OCT-4, SOX2 και NANOG, αποκάλυψε πως περίπου το 50% των υποκινητών που είχαν καταληφθεί από OCT-4 είχαν προσδεμένο και SOX2, ενώ στο 90% αυτών είχε επιπλέον προσδεθεί και NANOG [74]. Επιπλέον, το γεγονός ότι ο υποκινητής του Nanog περιέχει τις αλληλουχίες αναγνώρισης των OCT-4 και SOX2 διαδοχικά τοποθετημένες [75] και ότι οι θέσεις πρόσδεσης των τριών παραγόντων ήταν πολύ κοντά σε όλα σχεδόν τα γονίδια-στόχους, υποδηλώνει ότι οι τρεις παράγοντες δρουν συνεργατικά. Πρόκειται λοιπόν για ένα ρυθμιστικό σύστημα αποτελούμενο από βρόγχους αυτορρύθμισης και αλληλοεξαρτώμενης μεταγραφικής ρύθμισης μεταξύ των τριών παραγόντων (feedforward control) όπου οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες ρυθμίζουν μεταξύ τους την έκφρασή τους προσδενόμενοι στους υποκινητές των ίδιων των γονιδίων τους (Εικόνα 11).

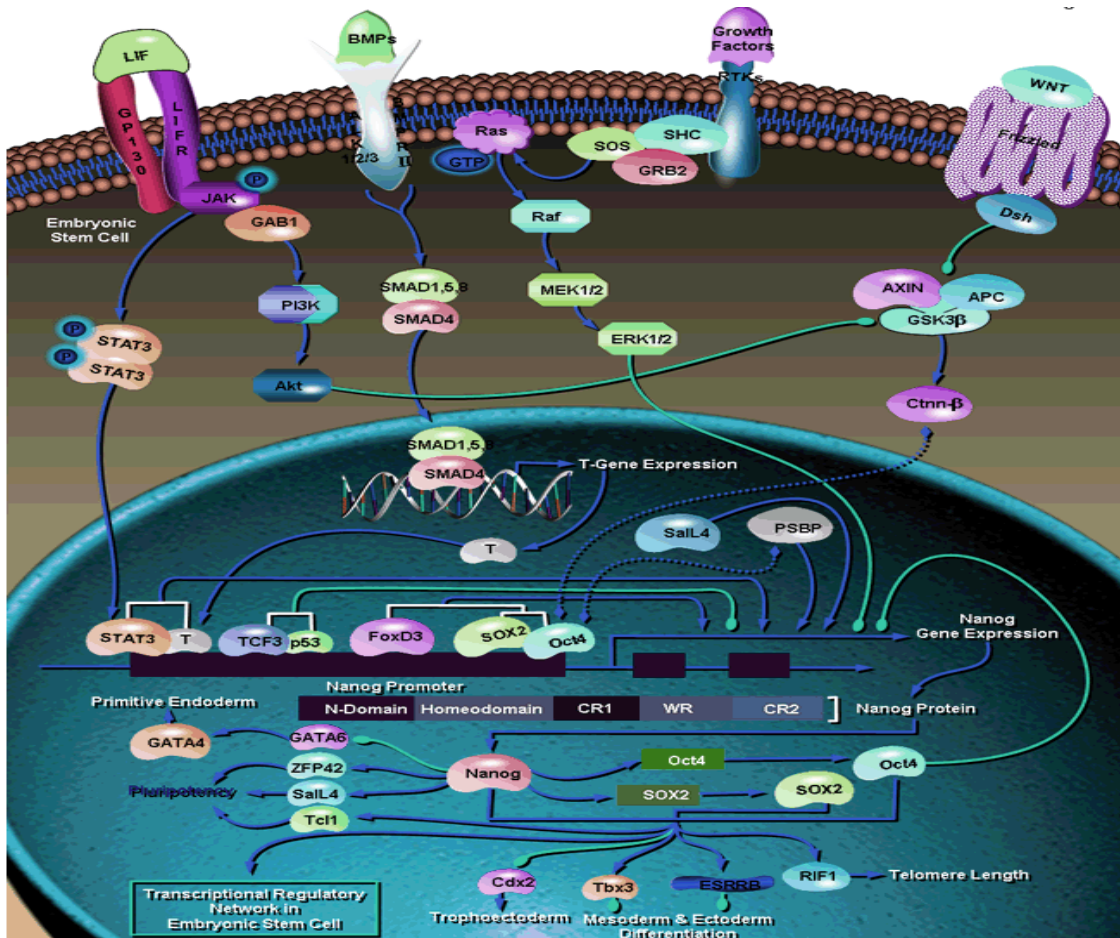


Εικόνα 11. Αυτορρύθμιση των κύριων παραγόντων πολυδυναμίας των ESC. Τα βέλη αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες. Κάθε εισερχόμενο βέλος αναπαριστά μία πρωτεΐνη με δράση μεταγραφικού παράγοντα. Σηματοδοτικά μόρια A⁺ και A⁻, προάγουν ή αναστέλλουν αντίστοιχα, την έκφραση των OCT-4 και SOX2. Ανάλογο τρόπο δράσης έχουν τα σηματοδοτικά μόρια B⁺ και B⁻ όσο αφορά την έκφραση του παράγοντα NANOG. Παραδείγματος χάριν, Παρουσία A⁺ μορίων, όπως η WNT πρωτεΐνη, επάγεται η διατήρηση της πολυδυναμίας και της αυτοανανέωσης των OCT-4 και SOX2 ενώ παρουσία B⁻ σηματοδοτικών μορίων, όπως p53, καταστέλλεται η μεταγραφή του Nanog οδηγώντας στη διαφοροποίηση των κυττάρων [76].

Επί προσθέτως, ο μηχανισμός σηματοδοτεί την έναρξη των γεγονότων που σχετίζονται με τη διατήρηση της αδιαφοροποίητης κατάστασης των ESCs, την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, παραγόντων τροποποίησης της χρωματίνης και τη σηματοδότηση των στελεχιαίων κυττάρων. Τέλος, καταστέλλονται οι παράγοντες που λαμβάνουν μέρος στη διαφοροποίηση των ESCs σε εξώδερμα, μεσόδερμα και ενδόδερμα [74].

3.3.2 ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ OCT-4, SOX2 και NANOG ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Τα βιολογικά συστήματα αποτελούνται από κομβικά σημεία τα οποία αν αφαιρεθούν θα οδηγήσουν σε κατάρρευση του δικτύου. Όταν πρόκειται για συστήματα όπου απαρτίζονται από γονίδια, τα γονίδια που καταλαμβάνουν τις θέσεις-κλειδιά του συστήματος, αλληλεπιδρούν ως επί το πλείστον με πολλαπλούς παράγοντες. Πειράματα ανοσοκατακρίμησης χρωματίνης για τους παράγοντες OCT-4, SOX2, NANOG, για παράγοντες που είναι απαραίτητοι για τον κυτταρικό επαναπρογραμματισμό σωματικών κυττάρων (Myc, Klf4) και για παράγοντες που αλληλεπιδρούν με το Nanog (Dax I, Nac I, Rex I, Zfp281) έδειξαν ότι σε κάθε υποκινητή προσδένονται ταυτόχρονα πολλαπλοί παράγοντες [77]. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι οι παράγοντες δρουν μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων ή σε περιοχές πλούσιες σε cis-ρυθμιστικά στοιχεία (Εικόνα 12). Παραδείγματος χάριν, η περιοχή ενίσχυσης του Oct-4 καταλαμβάνεται τουλάχιστον από 14 μεταγραφικούς παράγοντες (Oct4, Sox2, Nanog, Sall4, Tcf3, Smad1, Stat3, Esrrb, Klf4, Klf2, Klf5, E2f1, n-Myc and Zfx), ενώ η περιοχή ενίσχυσης του Nanog καταλαμβάνεται από τουλάχιστον 9 μεταγραφικούς παράγοντες (Nanog, Klf4, Klf2, Klf5, Sall4, E2f1, Esrrb, Stat3 and Tcfcp211) [78,79,80].

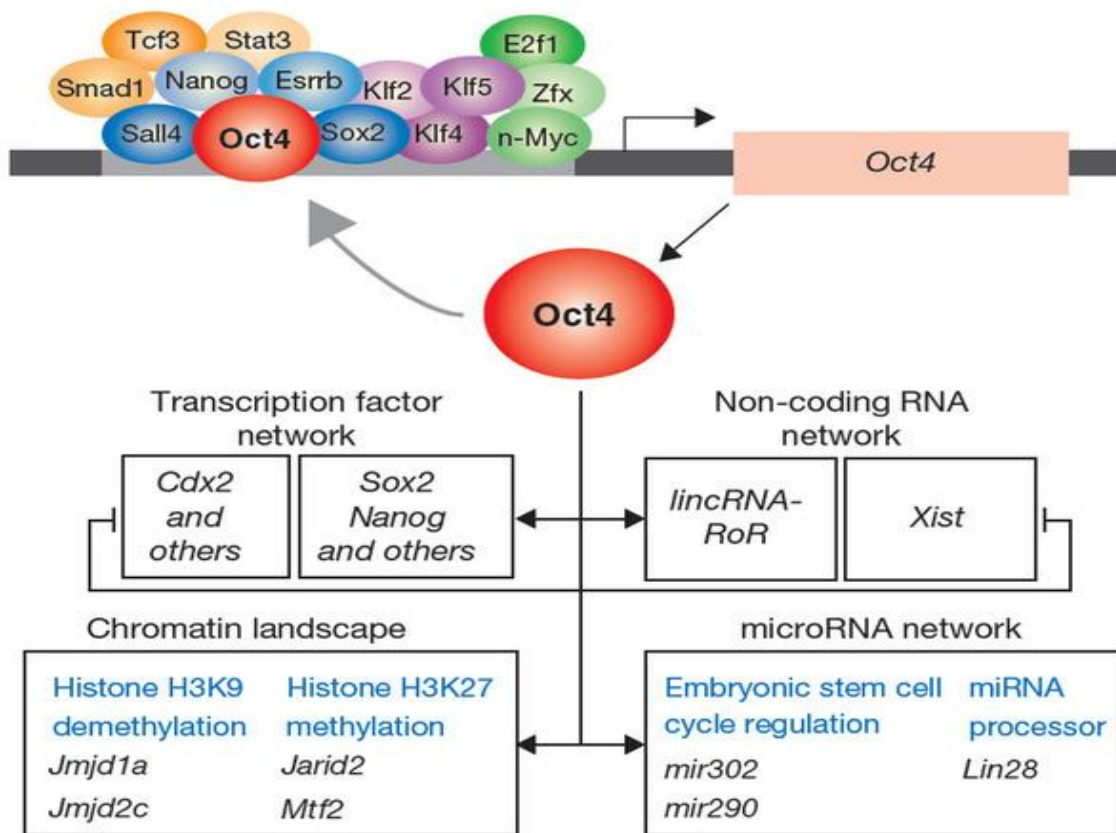


Εικόνα 12. Μεταγραφικό ρυθμιστικό δίκτυο στα ESC [81]

Είναι ενδιαφέρον να αναφέρουμε τη συσχέτιση μεταξύ του βαθμού κατάληψης του υποκινητή ενός γονιδίου και του μεταγραφικού του προφίλ. Παρατηρήθηκε ότι τα γονίδια στα οποία προσδένονται πολλοί μεταγραφικοί παράγοντες είναι μεταγραφικά ενεργά και καταστέλλονται κατά τη διαφοροποίηση, ενώ γονίδια στα οποία προσδέεται μόνο ένας παράγοντας είναι μη ενεργά στα ESCs ενώ εκφράζονται κατά τη διαφοροποίηση [77,78].

Μέσω του ελέγχου των μεταγραφικών παραγόντων, οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες OCT-4, SOX2 και NANOG μπορούν να ενεργοποιήσουν μία αλληλουχία ρυθμιστικών γεγονότων. Πέραν όμως της ρύθμισης της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων, οι κύριοι μεταγραφικοί παράγοντες μπορούν να ελέγξουν τη γονιδιακή έκφραση στα ESCs μέσω του ελέγχου και άλλων γονιδίων-στόχων. Παραδείγματος χάριν, ο OCT-4 ωθεί την έκφραση των παραγόντων τροποποίησης ιστών συμπεριλαμβανομένων των *Imjd1a* and *Imjd2c*. Τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν τις

απομεθυλάσες της λυσίνης 9 της ιστόνης 3 (K9-H3), αποτρέποντας την καταστολή μέσω μεθυλίωσης των υποκινητών των γονιδίων που διατηρούν την πολυδυναμία στα mESCs⁴⁰. Μείωση των επιπέδων των *Jmjd1a* and *Jmjd2c* οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης του *Tcl1* και έκφραση του *NANOG*. Οι παράγοντες πολυδυναμίας OCT-4, SOX2 και NANOG επιπλέον ρυθμίζουν την έκφραση μη-κωδικών RNAs (non-coding RNAs) και microRNAs (miRNAs). Έχουν άμεση δράση στην ενεργοποίηση της έκφραση των miRNAs και στα μονοπάτια επεξεργασίας της οικογένειας των *let-7* miRNA, ώστε επιλεκτικά να διατηρήσουν το ρυθμιστικό μηχανισμό μεταγραφής των γονιδίων που είναι απαραίτητο για να συντηρήσουν τα ESCs (Εικόνα 13).



Εικόνα 13. Αλληλεπίδραση του μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου, με το επιγενετικό δίκτυο και το δίκτυο των μη-κωδικών RNA [82]

Συμπερασματικά λοιπόν, τα δεδομένα που προκύπτουν από όλες τις μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα ρυθμιστικά δίκτυα της μεταγραφής αλληλεπιδρούν με επιγενετικά δίκτυα και δίκτυα των non-coding RNAs με σκοπό να διατηρήσουν την αδιαφοροποίητη κατάσταση των ESCs.

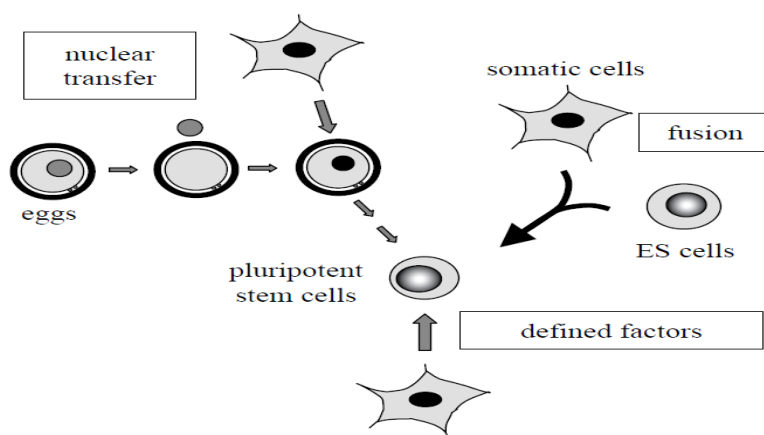
3.4 ΕΠΑΓΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΣΤΕΛΕΧΙΑΙΑ ΚΥΤΤΑΡΑ, *iPS* (*Induced Pluripotent Stem Cells*)

Το γεγονός ότι τα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα έχουν την ικανότητα να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου, αρχικά οδήγησε στην προσπάθεια δημιουργίας κυτταρικών σειρών εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων προερχόμενων από ανθρώπινες βλαστοκύστες [83] και μετέπειτα τη χρήση τους ως πηγή κυττάρων σε μεταμοσχεύσεις ιστών, προσφέροντας δυνητικά πολλές κλινικές εφαρμογές στην αντιμετώπιση εκφυλιστικών ασθενειών, καρδιακών παθήσεων καθώς και παθήσεων του νωτιαίου μυελού.

Η ολοένα αυξανόμενη χρήση των στελεχιαίων κυττάρων στην ιατρική αλλά και τα ηθικά διλήμματα που προκύπτουν σχετικά με τη προέλευση των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων, κατέστησαν αναγκαία την αναζήτηση νέων πηγών στελεχιαίων κυττάρων. Το 1997 αποδεικνύεται ότι τα σωματικά κύτταρα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν μεταφέροντας το γενετικό τους υλικό σε ωάρια [84] και αργότερα μέσω την σύντηξής τους με εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα [85,86], γεγονός που αποδεικνύει ότι τόσο τα ωάρια όσο και τα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα περιέχουν παράγοντες επαναπρογραμματισμού του γενώματος οι οποίοι καθιστούν τα σωματικά κύτταρα ολοδύναμα ή πολυδύναμα. Παρόλα αυτά, η εφαρμογή τους για θεραπευτικούς σκοπούς παρεμποδίζεται από την πολυπλοκότητα των μεθόδων και των ηθικών ζητημάτων που προκύπτουν. Τα επόμενα χρόνια οι προσπάθειες επικεντρώνονται στον προσδιορισμό των παραγόντων που καθιστούν τα σωματικά κύτταρα ολοδύναμα ή πολυδύναμα. Η ερευνητική ομάδα των K. Takahashi, S. Yamanaka διατυπώνει την υπόθεση ότι οι παράγοντες οι οποίοι διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη διατήρηση των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων σε αδιαφοροποίητη κατάσταση είναι αυτοί που επάγουν την πολυδυναμία των σωματικών κυττάρων. Δυο ανεξάρτητες έρευνες αποδεικνύουν πως οι Oct3/4, Sox2 και Nanog αποτελούν τους κύριους μεταγραφικούς παράγοντες υπεύθυνους για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων [74,87]. Το 2006 οι K. Takahashi και S. Yamanaka, επιτυγχάνουν τον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών σε πολυδύναμα κύτταρα (*iPS*, *induced pluripotent stem cells*) μέσω της ενεργοποίησης των μεταγραφικών παραγόντων Oct3/4, Sox2, Nanog, c-Myc και Klf4 [88]. Η υπόθεση των K. Takahashi, S.

Yamanaka ενισχύεται από τις μελέτες έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων στα iPS, καθώς και των επιγενετικών τροποποιήσεων των εν λόγω γονιδίων. Ανάλυση της μεθυλίωσης των Oct4 και Nanog αποκάλυψε ότι οι υποκινητές των γονιδίων ήταν μη μεθυλιωμένοι τόσο στα iPS όσο και στα ESCs, σε αντίθεση με τα σωματικά κύτταρα, ενώ τα επίπεδα έκφρασης των Oct4 και Nanog ήταν παρόμοια. Είναι γνωστό ότι οι μεταγραφικοί παράγοντες Oct4, Nanog και Sox2 αλληλεπιδρούν με γονίδια-στόχους τα οποία αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστικούς παράγοντες της ανάπτυξης. Στα ESCs, οι μη-εκφραζόμενοι αυτοί παράγοντες φέρουν τόσο την H3K4 (histone H3 lysine 4), επιγενετικό σημάδι της μεταγραφικά ενεργού χρωματίνης, όσο και την H3K27 (histone H3 lysine 27), ένδειξη της μεταγραφικά ανενεργού χρωματίνης. Σε αντίθεση, στα διαφοροποιημένα κύτταρα, οι παράγοντες αυτοί φέρουν είτε την H3K4 είτε την H3K27 ανάλογα με το αν εκφράζονται ή όχι αντίστοιχα. Ανάλυση με ανοσοκατακρίμηση της χρωματίνης (ChIP) στα iPS αποκάλυψε ότι τα γονίδια-στόχοι των Oct4, Nanog και Sox2, φέρουν τα ίδια επιγενετικά σημάδια όπως στα ESCs. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι κατά τη δημιουργία των iPS, η χρωματίνη στα σωματικά κύτταρα τροποποιείται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να συνάδει με τα πρότυπα των ESCs.

Συμπερασματικά, με βάση τις μελέτες μέχρι και σήμερα, μπορούμε να επισημάνουμε ότι οι παράγοντες Oct4, Nanog και Sox2 αποτελούν τους κύριους παράγοντες πολυδυναμίας των στελεχειαίων κυττάρων.



Εικόνα 14. Οι τρεις μέθοδοι επαναπροσδιορισμού του γενώματος και επαγωγής της πολυδυναμίας στα σωματικά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΛΑΙΟ 4

ΜΕΤΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΕΤΑ

ΣΤΟΙΧΕΙΑ

4.1 ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ DNA

Η ανάλυση της αλληλουχίας ολόκληρου του ανθρώπινου γενώματος αποκάλυψε ότι το 50% περίπου αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA [89]. Ενώ αρχικά θεωρούνταν ως άχρηστη πληροφορία και μάλιστα είχε χαρακτηριστεί ως «junk DNA», μεταγενέστερες μελέτες απέδειξαν το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζει το μεγαλύτερο ποσοστό του επαναλαμβανόμενου DNA ανατρέποντας την αρχική θεώρηση. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες:

- i. Το επαναλαμβανόμενο DNA της ιδιοστατικής ετεροχρωματίνης ή δορυφορικό DNA (satellite DNA), το οποίο αποτελείται από πολύ υψηλό αριθμό διαδοχικών επαναλήψεων απλών αλληλουχιών. Διακρίνεται σε δύο υποκατηγορίες : (1) Μεγάλες μονάδες αποτελούμενες από τμήματα 234bp με περισσότερα από 10.000 αντίγραφα και (2) Μικρές μονάδες οι οποίες απαρτίζονται από τμήματα 123bp σε περίπου 2.000 αντίγραφα. Συνολικά, το επαναλαμβανόμενο δορυφορικό DNA αντιστοιχεί στο 3% περίπου του ανθρώπινου γενώματος [89].
- ii. Τα επεξεργασμένα γονίδια ή ψευδογονίδια είναι ανενεργά γονίδια τα οποία προέκυψαν μέσα από γεγονότα ρετρομετάθεσης, όταν μετάγραφα mRNA των γονιδίων αυτών, μεταγράφηκαν ανάστροφα σε DNA και ενσωματώθηκαν στο γένωμα. Σε αυτά περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν ριβοσωματικές πρωτεΐνες και μικρά δομικά RNAs. Τα επεξεργασμένα γονίδια αποτελούν περίπου το 0,4% του ανθρώπινου γενώματος [89].
- iii. Τα μεταθετά στοιχεία (transposable elements, TE) ή τρανσποζόνια, είναι μικρές αλληλουχίες DNA (~1Kb) με μέτριο βαθμό επανάληψης και ικανότητα να μετατίθενται μέσα στο γένωμα, είτε με μεταπήδηση των ιδίων σε νέες θέσεις , είτε μέσω αντιγράφων

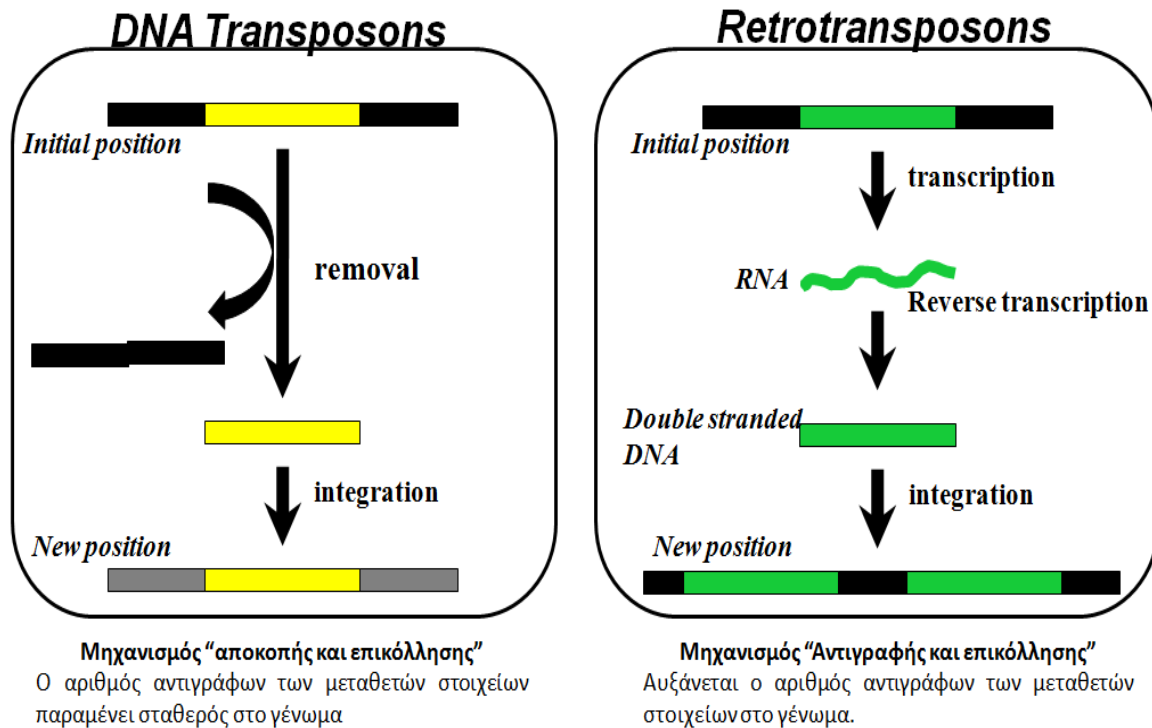
τα οποία στη συνέχεια ενσωματώνονται σε νέες θέσεις στο γένωμα. Τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν περίπου το 46,36% του ανθρώπινου γενώματος [89].

4.2 ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΜΕΤΑΘΕΣΗ

Οι αλληλουχίες DNA που έχουν την ικανότητα να μεταπηδούν σε νέες θέσεις μέσα στο γένωμα ονομάζονται μεταθετά στοιχεία και η ιδιότητά τους αυτή καλείται μετάθεση.

Η πρώτη αναφορά στα μεταθετά στοιχεία έγινε τη δεκαετία του 1940 από τη βιολόγο Barbara McClintock στα πλαίσια της συστηματικής μελέτης της για την ερμηνεία του χρωματικού μωσαϊκισμού στον αραβόσιτο (*Zea Mays*). Το 1956 αναφέρεται σε αυτά ως "στοιχεία ελέγχου" (controlling elements) τα οποία επιδρούν στον φαινότυπο και τα χαρακτήρισε ως γενετικές οντότητες που έχουν τη χαρακτηριστική ιδιότητα της μετακίνησης από και προς τα γονίδια [90,91].

Τα μεταθετά στοιχεία διακρίνονται σε δύο ομάδες, τα DNA τρανσποζόνια (DNA transposons) και τα ρετροτρανσποζόνια (Retrotransposons) βάσει του μηχανισμού μετάθεσής τους (Εικόνα 15). Τα DNA τρανσποζόνια μετατίθενται άμεσα ως μόρια DNA με ένα μηχανισμό «αποκοπής και επικόλλησης» [92]. Όσον αφορά τα ρετροτρανσποζόνια, αυτά μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής και επικόλλησης» όπου ένα ενδιάμεσο μόριο mRNA, με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής, ενσωματώνεται ως συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) σε νέες θέσεις στο γένωμα, ενώ το αρχικό αντίγραφο παραμένει στην αρχική του θέση [93,94].



Εικόνα 15. Οι δύο μηχανισμοί μετάθεσης των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα.

Επιπλέον, τα μεταθετά στοιχεία, ανάλογα με τον αν κωδικεύουν ή όχι τις απαραίτητες για τη μετάθεσή τους πρωτεΐνες, διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα αντίστοιχα.

4.2.1 DNA τρανσποζόνια (DNA transposons)

Η πρώτη αναφορά στα τρανσποζόνια έγινε από τη Barbara McClintock όταν στην προσπάθειά της να ερμηνεύσει το χρωματικό μωσαϊκισμό του αραβοσίτου, ταυτοποίησε δύο γενετικούς τύπους τους οποίους ονόμασε Dissociator (Ds) and Activator (Ac) [90].

Τα DNA τρανσποζόνια στο ευκαρυωτικό γονιδίωμα, είναι αυτόνομα μεταθετά στοιχεία τα οποία κωδικοποιούν τη πρωτεΐνη τρανσποζάση, απαραίτητη για την αποκοπή τους από την αρχική τους θέση στο γονιδίωμα και την ένθεσή τους σε νέα θέση. Μερικά από αυτά μπορούν να κωδικοποιούν και άλλες πρωτεΐνες. Να υπενθυμίσουμε ότι η μετάθεσή τους γίνεται με μηχανισμό που δεν απαιτεί την αντιγραφή του μεταθετού στοιχείου αλλά πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της "αποκοπής και επικόλλησης"

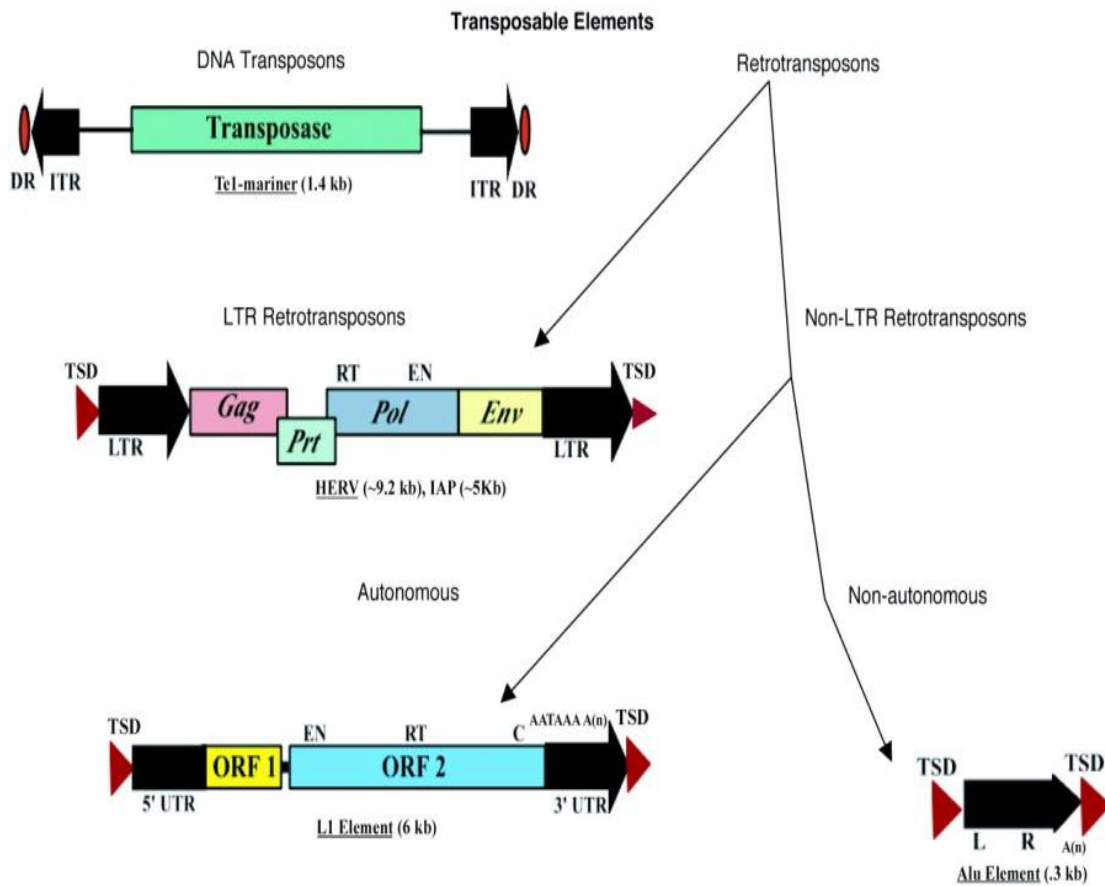
[92]. Το χαρακτηριστικό αυτού του μηχανισμού μετάθεσης είναι ότι ο συνολικός αριθμός αντιγράφων παραμένει σταθερός.

Τα DNA μεταθετά στοιχεία χαρακτηρίζονται δομικά από τη παρουσία (α) μίας κεντρικής περιοχής που περιέχει το γονίδιο που κωδικοποιεί την τρανσποζάση, (β) δύο αντίστροφων τελικών επαναλήψεων (Terminal Inverted Repeats) μεγέθους από 5 έως 500 ζευγών βάσεων και (γ) τις ευθείες επαναλήψεις, οι οποίες βρίσκονται στα άκρα τους μεγέθους 2 έως 8 ζευγών βάσεων (Εικόνα 4.2). Οι αντίστροφες τελικές επαναλήψεις είναι αντίστροφα συμπληρωματικές μεταξύ τους και ένας από τους ρόλους τους είναι να αναγνωρίζονται από την τρανσποζάση. Όσον αφορά τώρα τις ευθείες επαναλήψεις, αυτές στην πραγματικότητα δεν αποτελούν μέρος του μεταθετού στοιχείου ούτε διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην ένθεσή του. Κατά την αποκοπή του μεταθετού στοιχείου, αυτές παραμένουν στην αρχική θέση αποτελώντας ένα "αποτύπωμά". Μερικές φορές, ακόμα και μετά την μετάθεση του τρανσποζονίου μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην έκφραση του γονιδίου. Έχουν παρατηρηθεί και μη αυτόνομα DNA τρανσποζόνια τα οποία έχασαν την ικανότητα κωδικοποίησης της τρανσποζάσης εξαιτίας ελλειμμάτων ή σημειακών μεταλλάξεων εντός του γονιδίου της τρανσποζάσης. Τα DNA τρανσποζόνια αποτελούν περίπου το 2.84% του ανθρώπινου γονιδιώματος [89]. Αυτό σημαίνει ότι το μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματος που αντιστοιχεί στα μεταθετά στοιχεία, αποτελείται από την άλλη μεγάλη κατηγορία μεταθετών στοιχείων, τα ρετρομεταθετά στοιχεία.

4.2.2 ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ (RETROTRANSPOSONS)

Τα ρετροτρανσποζόνια είναι ενδογενή συστατικά των ευκαρυωτικών γενωμάτων και αποτελούν το 90% των μεταθετών στοιχείων και το 42.2% του γενώματος του ανθρώπου [95,96]. Σε αντίθεση με τα DNA τρανσποζόνια, η μετάθεση των ρετρομεταθετών στοιχείων πραγματοποιείται μέσω ενός μηχανισμού "αντιγραφής και επικόλλησης". Η μετάθεση κατά αυτό τον τρόπο επιτελείται μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου mRNA από το οποίο θα προκύψει ένα συμπληρωματικό μόριο DNA (cDNA), με τη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής και το οποίο τελικά θα ενσωματωθεί στη νέα θέση στο γένωμα. Με το μηχανισμό της "αντιγραφής και επικόλλησης" το αρχικό

ρετροτρανσποζόνιο παραμένει στην αρχική του θέση και όπως είναι λογικό ο συνολικός αριθμός αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γένωμα συνεχώς αυξάνεται. Τα ρετροτρανσποζόνια κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες, (α) τα ρετροτρανσποζόνια με μακρές τελικές αλληλουχίες (Long Terminal Repeats (LTR) retrotransposons) ή ιικού τύπου και (β) τα ρετροτρανσποζόνια χωρίς μακρές τελικές αλληλουχίες (non-LTR retrotransposons) ή μη ιικού τύπου(Εικόνα 16).



Εικόνα 16. Η ταξινόμηση των μεταθετών στοιχείων και τα δομικά χαρακτηριστικά τους [97].

4.2.2.1 ΠΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ ΧΩΡΙΣ LTR (*non-LTR retrotransposons*)

Τα ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία ρετρομεταθετών στοιχείων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και αποτελεί περίπου το 34% του ανθρώπινου γενώματος [89]. Τα ρετροτρανσποζόνια χωρίς LTR μπορούν να χωριστούν περαιτέρω σε δύο κατηγορίες, (α) τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (LINEs, Long Interspersed Nuclear Elements) και (β) τα βραχέα διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (SINEs, Short Interspersed Nuclear Elements).

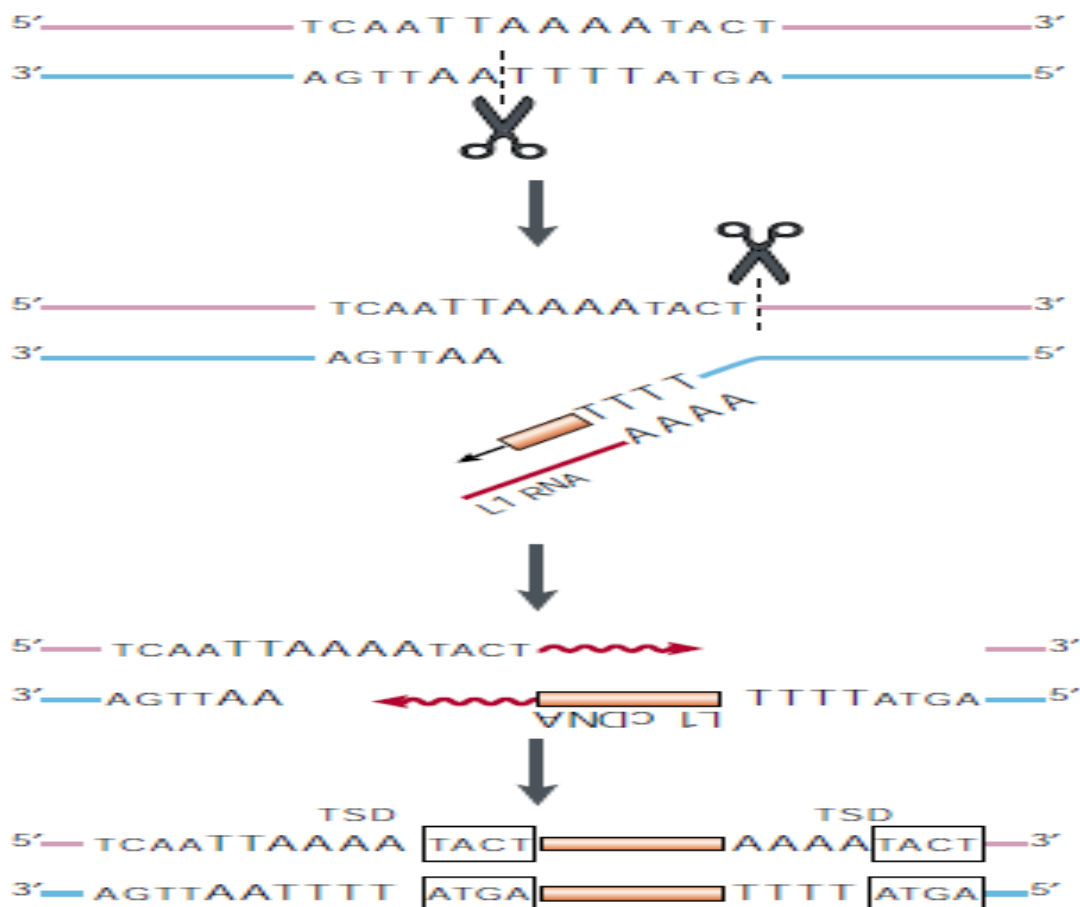
4.2.2.1.1 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ LINEs

Τα LINEs είναι αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία που καταλαμβάνουν το 21% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Διακρίνονται σε τρεις οικογένειες τις LINE-1, LINE-2 και LINE-3 με επικρατέστερη στα θηλαστικά την LINE-1 (L1). Η οικογένεια L1 είναι η πολυπληθέστερη με 520.000 αντίγραφα στο ανθρώπινο γένωμα με τα περισσότερα εκ των οποίων να είναι ανενεργά. Μόνο 80-100 αντίγραφα βρέθηκαν να είναι ενεργά στον άνθρωπο [98].

Ένα τυπικό L1 έχει μήκος περίπου 6Kb. Δομικά, αποτελείται από μία 5' αμετάφραστη περιοχή (5'-UTR) με δράση εσωτερικού υποκινητή, δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frame (ORF) 1 και 2) και μία 3' αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) που περιέχει μία πολυαδενυλιωμένη περιοχή (poly(A) tail). Το ORF 1 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη *gag*, την ORF1p, η οποία σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα [99] και έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο RNA [100]. Το ORF 2 κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη η οποία διαθέτει τρεις συντηρημένες δομικές περιοχές (α) μία αμινοτελική περιοχή με δράση ενδονουκλεάσης (Endonuclease, EN) [101], μία κεντρική περιοχή με ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RT) [102] και μία καρβοξυτελική περιοχή πλούσια σε κυστεΐνες [103]. Οι δράσεις που κωδικοποιούν και τα δύο ανοικτά πλαίσια ανάγνωσης είναι απαραίτητες για τη ρετρομετάθεση. Η δράση της EN δημιουργεί θραύση στη μία έλικα του δίκλωνου μορίου DNA όπου και θα γίνει η ενσωμάτωση του L1. Η αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποιεί ως εκκινητή το γενωμικό DNA. Από τη θραύση

της αλυσίδας που προκαλεί η EN, προκύπτει μία μονόκλωνη προεξοχή, πλούσια σε βάσεις θυμίνης (T), η οποία υβριδοποιείται με την συμπληρωματική polyA ουρά του mRNA του L1 και θα αποτελέσει τον εκκινητή για την αντίστροφη μεταγραφή (Εικόνα 4.4) [104].

Η δράση της καρβοξυτελικής περιοχής φαίνεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής είτε μεσολαβώντας στις αλληλεπιδράσεις ORF 2- DNA κατά τη διαδικασία ενσωμάτωσης του L1 [105], είτε διευκολύνοντας τον πολυμερισμό του L1 από την ανάστροφη μεταγραφάση [106]. Τέλος, στα άκρα των L1 απαντώνται βραχείες ευθείες επαναλήψεις (Target Site Duplications, TSD) μεγέθους 2-20 bp, οι οποίες δημιουργούνται από το διπλασιασμό της θέσης στόχου μετά τη ρετρομετάθεση (Εικόνα 17).



Εικόνα 17. Ανάστροφη μεταγραφή του L1 διαμεσολαβούμενη από το DNA-στόχος.(TPRT, Target-Primed Reverse Transcription) Η ενδονουκλεάση δημιουργεί μία θραύση στο DNA ανάμεσα στις βάσεις A-T. Το DNA-στόχος λειτουργεί ως εκκινητής και με πρότυπο το πολυαδενυλιωμένο RNA του L1, συντίθεται συμπληρωματικό DNA. Μέσω του μηχανισμού, δημιουργούνται βραχείς διπλασιασμοί της θέσης στόχου (*TACT*) [107].

4.2.2.1.2 ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ SINEs

Τα SINEs είναι μη αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία χωρίς LTRs και με 1.500.000 αντίγραφα αποτελούν περίπου το 13% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Έχουν ταυτοποιηθεί αρκετές οικογένειες SINEs όπως είναι οι Alu, B1, B2, SVA (SINE-R, VNTR και Alu) σύνθετα στοιχεία, MIR, DIR και επεξεργασμένα ψευδογονίδια, με σημαντικότερη στον άνθρωπο την οικογένεια Alu με 1.100.000 αντίγραφα. Τα SINEs δεν κωδικεύουν πρωτεΐνες και προκειμένου να ρετρομεταθεθούν χρησιμοποιούν τις ενζυμικές ενεργότητες των αυτόνομων ρετρομεταθετών στοιχείων L1 [97].

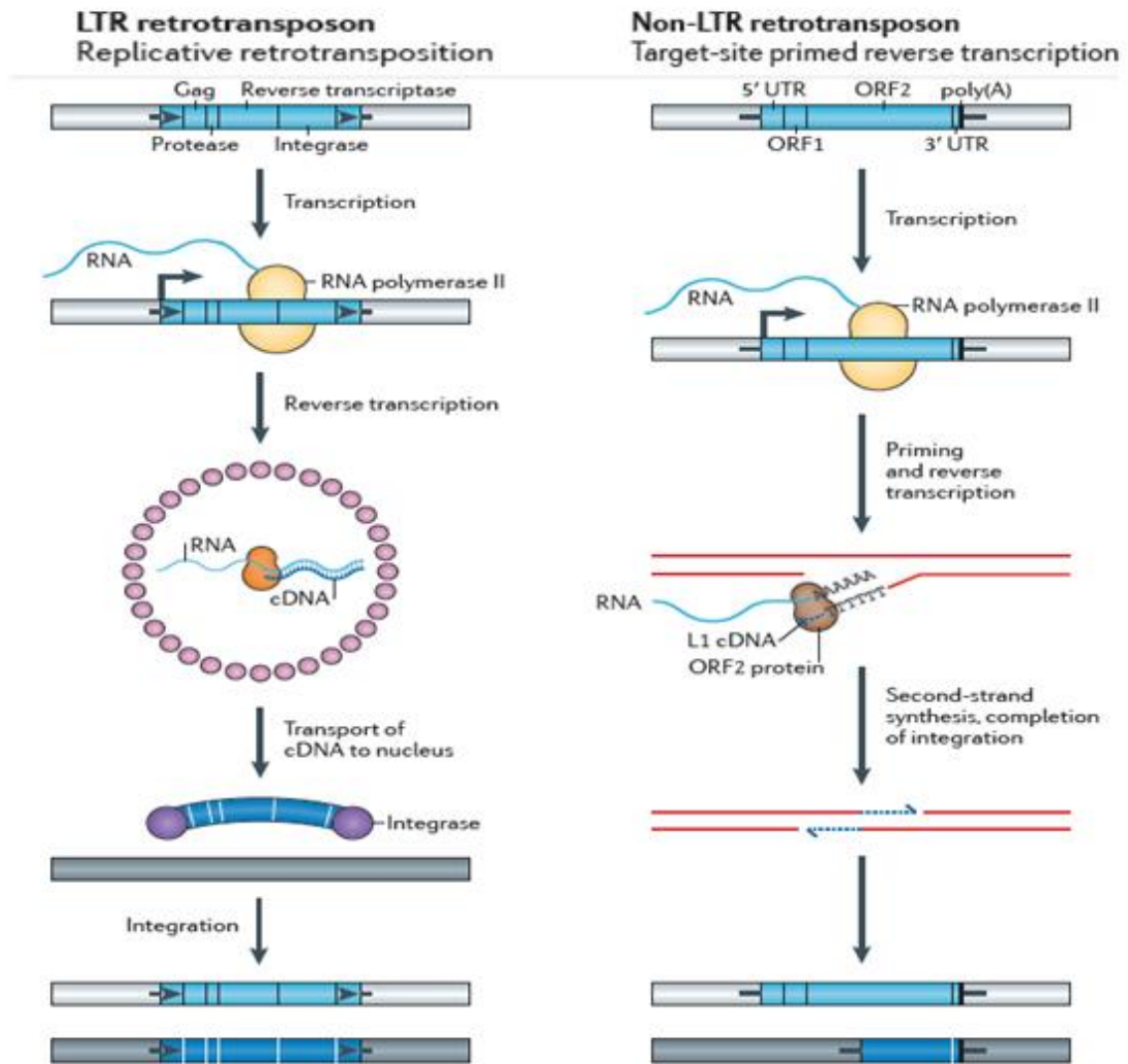
Τα SINEs προέρχονται από αντίστροφα μεταγραφωμένα μόρια RNA, τα οποία αρχικά προήλθαν από τη μεταγραφή γονιδίων tRNA, 7SL RNA και άλλων μικρών πυρηνικών RNAs. Το μέγεθος των SINEs κυμαίνεται μεταξύ 90-300bp. Δομικά, αποτελείται από τη 5' περιοχή, η οποία είναι όμοια με αλληλουχίες κυτταρικών γονιδίων που κωδικοποιούν tRNA, ακολουθεί μία αλληλουχία DNA (unrelated DNA region) και καταλήγει σε μία poly(A) αλληλουχία στο 3' άκρο, παρόμοια με αυτή των LINEs, ενώ όλη η δομή περικλείεται από βραχείες TSD και φέρουν εσωτερικό υποκινητή για την RNA πολυμεράση III [108,109].

4.2.2.2 LTR ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ (LTR retrotransposons)

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια αποτελούν το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος στα περισσότερα φυτά και φαίνεται ότι είναι υπεύθυνα για το μεγάλο μέγεθος ποικιλομορφίας στο μέγεθος του γονιδιώματος. Στους ανθρώπους καταλαμβάνουν περίπου το 8.3% του γονιδιώματος. Το μέγεθός τους κυμαίνεται από 4 έως 10 Kb και εμφανίζουν πολλές ομοιότητες με τους ρετροϊούς ως προς τη δομή και τη γονιδιακή σύσταση. Όπως και οι προΐοι των ρετροϊών διαθέτουν δύο μακρές τελικές επαναλήψεις στα άκρα τους (LTR), μεγέθους 300-1.500 bp, οι οποίες περιέχουν σήματα έναρξης και λήξης της μεταγραφής καθώς βραχείες ευθείες επαναλήψεις στα άκρα τους. Όπως και οι ρετροϊοί, τα LTR ρετροτρανσποζόνια διαθέτουν τουλάχιστον τα γονίδια *gag* και *pol*, τα οποία κωδικεύουν μία πρωτεΐνη που μοιάζει με αυτή του καψιδίου των ρετροϊών (*gag gene*) και μία πολυπρωτεΐνη με ενζυματικές δράσεις πρωτεάσης, αντίστροφης μεταγραφάσης,

RNάσης H (RNase H) και ιντεγκράσης (integrase) ώστε να συντεθεί cDNA από RNA και στη συνέχεια να ενσωματωθεί στο γένωμα. Η διαφορά με τους ρετροϊούς έγκειται στο γεγονός ότι οι ρετροϊοί περιέχουν το γονίδιο *env* το οποίο κωδικεύει πρωτεΐνες της ιϊκής κάψας, ενώ στα LTR τρανσποζόνια είτε απουσιάζει το γονίδιο είτε έχει απομένει μέρος αυτού.

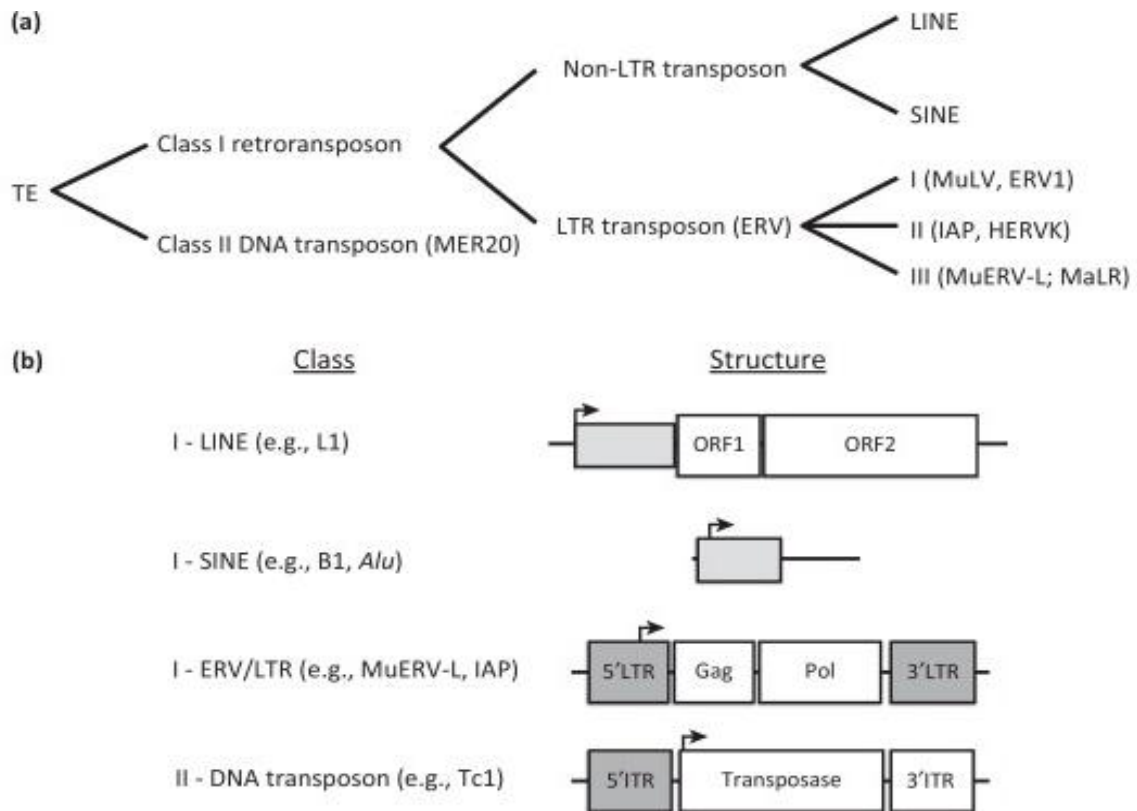
Τα LTR ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα βάσει της δυνατότητά τους να κωδικοποιούν τις απαιτούμενες για τη ρετρομετάθεσή τους πρωτεΐνες. Τα μη αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια συνήθως διαθέτουν στο ακέραιο τα LTR και τη θέση πρόσδεσης του εκκινήτη αλλά είναι ελαττωματικά για ένα μέρος ή και για το σύνολο της κωδικής τους περιοχής (solo-LTR). Παρόλα αυτά ορισμένα μη αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια μπορούν να μετατεθούν χρησιμοποιώντας *in trans* πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια [110] (Εικόνα 18). Πιστεύεται ότι τα solo-LTR ρετροτρανσποζόνια προήλθαν από ομόλογο ανασυνδυασμό βασισμένο στα LTR.



Εικόνα 18. Οι μηχανισμοί μετάθεσης των LTR και non-LTR ρετρομεταθετών στοιχείων. Με μαύρα βέλη συμβολίζονται τα LTRs, τα τεθλασμένα βέλη υποδεικνύουν τη θέση του υποκινητή όπου προσδένεται η RNA πολυμεράση II, οι μικροί μωβ κύκλοι συμβολίζουν πρωτεΐνες Gag οι οποίες σχηματίζουν ιϊκού τύπου σωματίδια τα οποία περικλείουν το mRNA των μεταθετών στοιχείων (γαλάζιο χρώμα), την ανάστροφη μεταγραφή (πορτοκαλί χρώμα) και ιντεγκράση [111].

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια, έχοντας ως κριτήριο τα κοινά χαρακτηριστικά τους με τους ρετροϊούς, κατατάσσονται στις τάξεις I, II, III και MaLR (Εικόνα 19). Στη τάξη I ανήκουν τα μέλη των LTR ρετροτρανσποζονίων που φέρουν ομοιότητες με ρετροϊούς τύπου C και με τα πιο χαρακτηριστικά μέλη αυτής της τάξης στον άνθρωπο να είναι τα HERV-E, HERV-R και HER-H. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης II έχουν κοινά

χαρακτηριστικά με τους ρετροϊούς τύπου Β και με πιο αντιπροσωπευτικά μέλη στον άνθρωπο τα HERV-K και HERV-L. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης III είναι ενδογενή ρετροϊικά στοιχεία τα οποία αποκλίνουν φυλογενετικά από τα υπόλοιπα και σχετίζονται με τους αφρώδεις ρετροϊούς (spuma retroviruses). Τα LTR ρετροτρανσποζόνια της τάξης MaLR είναι μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια, σχετιζόμενα φυλογενετικά με τα μέλη της τάξης I ενώ δεν σχετίζονται φυλογενετικά με μολυσματικούς ρετροϊούς [112].



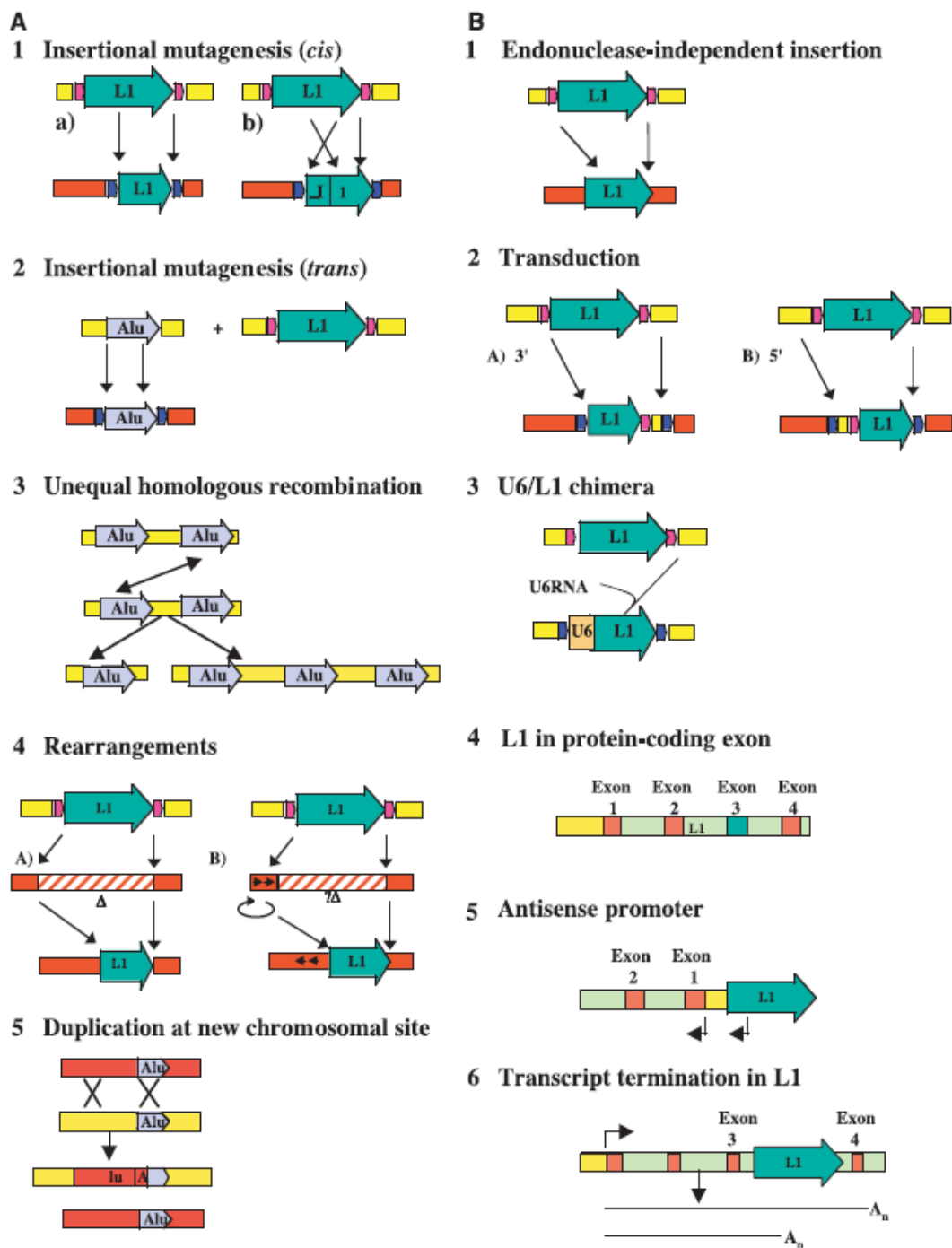
Εικόνα 19. (a) Ταξινόμηση των μεταθετών στοιχείων στα θηλαστικά, (b) δομικές διαφορές μεταξύ των κλάσεων [113].

4.3 Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΟ ΓΕΝΩΜΑ

Το γονιδίωμα συχνά θεωρείται ως ένα σταθερό πρότυπο κληρονομικότητας, σε μεγάλο βαθμό αδρανές και αμετάβλητο, εξαιρουμένων των περιστασιακών σημειακών μεταλλάξεων. Ολοένα και περισσότερο όμως γίνεται φανερό ότι το γενετικό υλικό είναι κάτι δυναμικό παρά στατικό, το οποίο υπόκειται σε ανακατατάξεις, ενθέσεις, διπλασιασμούς και ελλείψεις. Το μεγαλύτερο ποσοστό της πλαστικότητας που χαρακτηρίζει το DNA μπορεί να αποδοθεί στα μεταθετά στοιχεία και τα συγγενικά τους γενωμικά στοιχεία [107]. Η επικρατέστερη άποψη για τη σημασία της παρουσίας των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα τους προσδίδει το κύριο ρόλο των καθοδηγητών της εξέλιξης του γονιδιώματος, των ρυθμιστών της λειτουργίας του αλλά και των καθοριστών του συνολικού του μεγέθους [97]. Η συσσώρευση των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα (αποτελούν περίπου το 45% του ανθρώπινου γονιδιώματος) καθώς και η συνεχής δραστηριότητάς τους και το γεγονός ότι αποτελούν κληρονομήσιμα στοιχεία, έχουν σημαντικό αντίκτυπο στη διαμόρφωση του γονιδιώματος. Στα θηλαστικά, την πλειοψηφία των μεταθετών στοιχείων αποτελούν τα ρετρομεταθετά στοιχεία. Τα DNA τραπεζοζόνια αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των μεταθετών στοιχείων, ενώ η συσσώρευση μεταλλάξεων τα κατέστησε ανενεργά [109].

Τα μεταθετά στοιχεία συμβάλουν στην εξέλιξη και διαμόρφωση του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών μέσω μιας πληθώρας διαδικασιών, εποικοδομητικές ή καταστροφικές. Η πιο εμφανής επίδραση των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα, είναι η σταδιακή αύξηση του μεγέθους του, απόρροια της συνεχούς αύξησης του αριθμού των αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων [114]. Τα L1 και Alu μεταθετά στοιχεία μόνα τους προκάλεσαν την αύξηση του ανθρώπινου γενώματος κατά 750 Mb. Τα τελευταία 6 εκατομμύρια χρόνια έχουν προστεθεί στο ανθρώπινο γονιδίωμα 2.000 L1, 7.000 Alu και 1.000 SVA αντίγραφα, αυξάνοντας το γένωμα περισσότερο από 8 Mb.

Τα μεταθετά στοιχεία επιδρούν στη δομή και λειτουργία του γονιδιώματος με διάφορους τρόπους όπως μέσω της ένθεσης, των ανακατατάξεων λόγω ομόλογων ανασυνδυασμών, των διπλασιασμό τμημάτων ή και ολόκληρων γονιδίων, τη μεταγωγή εξονίων (exon shuffling), τη σύντηξη γονιδίων [97] (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Μηχανισμοί μετάθεσης των non-LTR ρετρομεταθετών στοιχείων που προάγουν την εξέλιξη του γενώματος. (A) Μηχανισμοί που προκαλούν γενωμική αστάθεια: (1),(2) Μεταλλαξιγένεση μέσω ένθεσης, (3) Άνισος ομόλογος ανασυνδυασμός, (4) Ανακατατάξεις, (5) Διπλασιασμοί. (B) Μηχανισμοί με εποικοδομητική δράση (constructive) στο γένομα: (1) Επιδιόρθωση των DSBs μέσω ένθεσης ανεξάρτητης από τη δράση της ενδονουκλεάσης, (2) 3' ή 5' μεταγωγή, (3) σχηματισμός χιμαιρικών ψευδογονιδίων, (4) χρήση των αλληλουχιών L1 ή Alu σε περιοχές που κωσικεύουν πρωτεΐνες, (5) έκφραση γονιδίων με κατεύθυνση 5'-3' μέσω ενός εκκινητή εντός του L1, (6) πρόωρος τερματισμός της έκφρασης γονιδίων λόγω των poly (a) σημάτων τερματισμού της μεταγραφής.[97]

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος με τον οποίον τα ρετροτρανσποζόνια προκαλούν γενωμική αστάθεια είναι με ένθεσή τους σε ρυθμιστικές περιοχές ή περιοχές που κωδικοποιούν γονίδια. Μέχρι σήμερα ένας αριθμός κληρονομούμενων γενετικών διαταραχών, όπως η ινοκυστική νόσος, η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η β-θαλασσαιμία, ο καρκίνος του στήθους και του παχέος εντέρου, έχουν αποδειχθεί ότι οφείλονται σε ενθέσεις των Alu, L1 και SVA μεταθετών στοιχείων [115-118]. Συνολικά εκτιμάται ότι περίπου το 0,3% των μεταλλάξεων στο ανθρώπινο γένωμα προέρχεται από νέες (de novo) ενθέσεις των Alu, L1 και SVA [117]. Είναι ενδιαφέρουσα η παρατήρηση ότι οι μεταλλάξεις που οφείλονται στο L1 σχετίζονται με το χρωμόσωμα X. Πιθανώς, τα στοιχεία L1 να επιλέγουν το χρωμόσωμα X, λόγω της πιθανής συμμετοχής τους στην απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X [117,119,120].

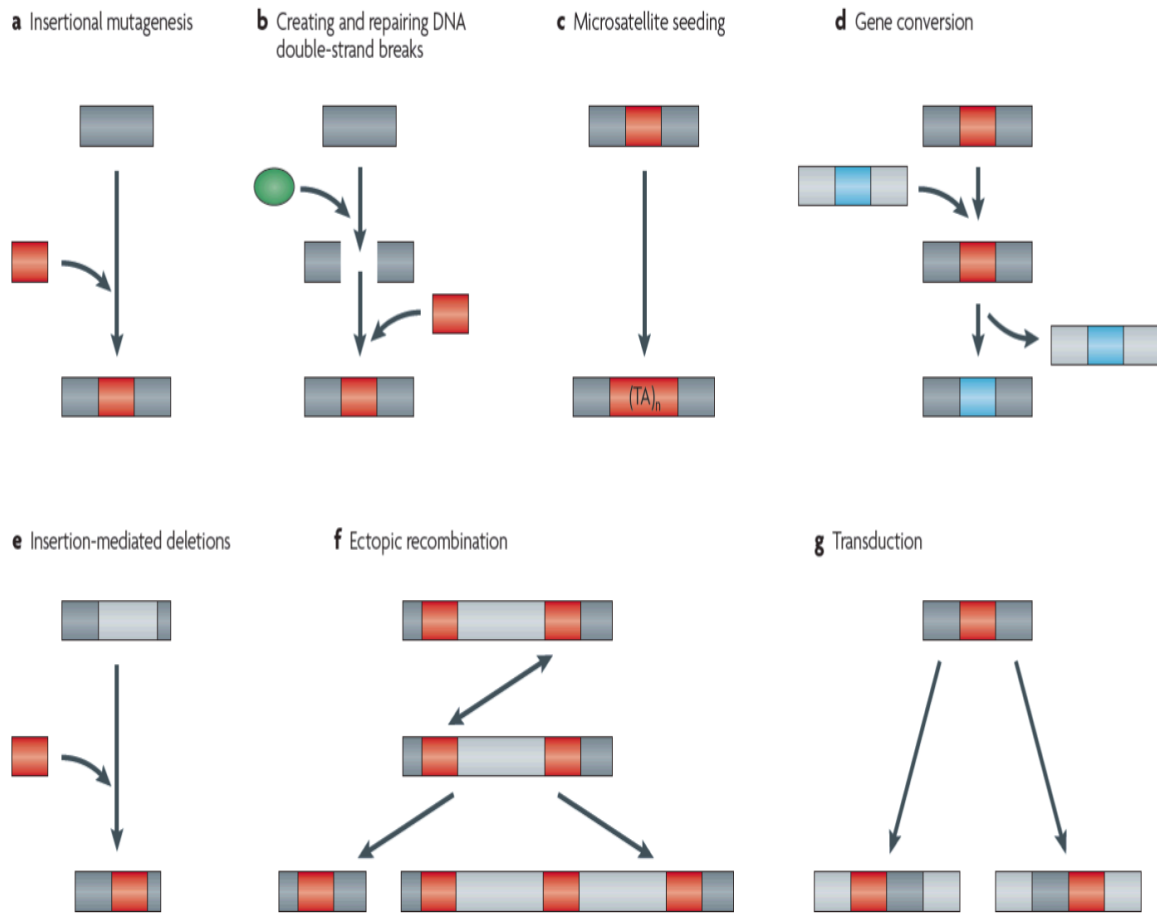
Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ORF2 των L1 στοιχείων και έχει δράση ενδονουκλεάσης, δημιουργεί περισσότερες θραύσεις διπλής αλυσίδας (Double Strand Breaks, DSBs) στο DNA σε σχέση με τον πραγματικό αριθμό των ενθέσεων των L1 στα κύτταρα των θηλαστικών [120]. Εκτός όμως από τη δημιουργία DSBs, τα L1 έχουν συνδεθεί και με την επιδιόρθωσή τους. Πειραματικά δεδομένα αποκαλύπτουν ότι ενθέσεις L1, ανεξαρτήτως της δράσης της ενδονουκλεάσης, πραγματοποιούνται σε κύτταρα που στερούνται της ικανότητας του μη ομόλογου ανασυνδυασμού, ενός κύριου μηχανισμού στην επιδιόρθωση DSBs. Τα L1 αλληλεπιδρούν με τις μονόκλωνες αλυσίδες που δημιουργούνται στις των περιοχές θραύσεων και μέσω της αντίστροφης μεταγραφάσης, τις επιδιορθώνουν. Επιπλέον, δυσλειτουργικά τελομέρη μπορούν να λειτουργούν ως υποστρώματα για ρετρομεταθέσεις των L1, ανεξάρτητες από τη δράση της ενδονουκλεάσης, προτείνοντας τον μηχανισμό αυτό ως ένα προγονικό, RNA μεσολαβούμενου, μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA [122,123]. Πρόσφατες αναλύσεις του ανθρώπινου γονιδιώματος έδειξαν ότι περίπου το 0,7% όλων των ενθέσεων των L1 και Alu στοιχείων, έχουν μη κανονικές δομές, προτείνοντας έτσι ότι τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια μπορούν να λειτουργούν ως ένας μηχανισμός ασφαλείας (fail-safe) διατηρώντας την ακεραιότητα του γενώματος. Λόγω της αφθονίας τους στο γένωμα αλλά και της περιεκτικότητας ομοπολυμερών περιοχών (homopolymeric tracts), τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια έχουν την ικανότητα να δημιουργούν μικροδορυφορικές περιοχές σε πολλά σημεία του γονιδιώματος. Μελέτες σε στοιχεία Alu έδειξαν ότι κάθε νέα αντίγραφο φέρει δύο πιθανές θέσεις για δημιουργία μικροδορυφόρων, τη θέση πρόσδεσης στο κέντρο

του στοιχείου και την πλούσια σε dA ουρά (oligo dA-rich tail) στο 3' άκρο [124,125]. Μεταλλάξεις εντός των ομοπολυμερών περιοχών μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μικροδορυφόρων ποικίλου μεγέθους και πολυπλοκότητας. Υπάρχουν τουλάχιστον δύο περιπτώσεις γενετικών διαταραχών που προέκυψαν από την αύξηση του μεγέθους των μικροδορυφόρων, προερχόμενη από την πλούσια σε αδενίνη περιοχή των Alu στοιχείων [126,127].

Πέραν του ρόλου τους στη γενωμική αστάθεια, τα ρετρομεταθετά στοιχεία μπορούν να προκαλέσουν γενωμικές ανακατατάξεις όπως ελλείψεις, διπλασιασμούς και αναστροφές. Η ένθεση των L1 και Alu στοιχείων σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα μερικές φορές έχουν ως αποτέλεσμα την έλλειψη της παρακείμενης αλληλουχίας. Περίπου 2% των L1 ενθέσεων σχετίζονται με δομικές ανακατατάξεις και ελλείψεις στις θέσεις ένθεσης, το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται 1bp μέχρι και 800bp [128,129]. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι ένα ποσοστό 90% των L1 και Alu ενθέσεων που είναι ανεξάρτητες από τη δράση της ενδονουκλεάσης, σχετίζονται με ελλείψεις σηματοδοτικών αλληλουχιών μεγέθους από 1bp μέχρι και 14bp. Εκτιμάται ότι κατά τη διάρκεια εξέλιξης του γενώματος των πρωτευόντων, 45.000 ελλείψεις λόγω των ενθέσεων των μεταθετών στοιχείων, είχαν ως αποτέλεσμα την εξάλειψη αλληλουχιών συνολικού μεγέθους μεγαλύτερου των 30Mb [130]. Ο μεγάλος αριθμός αντιγράφων των L1 και Alu στοιχείων αποτελεί τη βάση για δομικές αλλαγές στο γονιδίωμα, μετά την ένθεσή τους, μέσω του ανασυνδυασμού μεταξύ μη ομόλογων στοιχείων καθώς και στοιχείων που έχουν εισαχθεί στο γένωμα προ καιρού. Ο ανασυνδυασμός μπορεί να επιφέρει διάφορες γενωμικές ανακατατάξεις όπως ελλείψεις, διπλασιασμούς και αναστροφές. Έχει αποδειχθεί ότι ελλείψεις λόγω ανασυνδυασμού διαμεσολαβούμενου από Alu, είναι υπεύθυνες για ποικίλες μορφές καρκίνου και γενετικών διαταραχών [131,132]. Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει πολλές διπλασιασμένες περιοχές μεγάλου μεγέθους (>10Kb) και υψηλής ομολογίας (>90% ταύτιση) οι οποίες ονομάζονται τμηματικές επαναλήψεις (segmental duplications). Είναι αξιοσημείωτο ότι τα άκρα των τμηματικών επαναλήψεων είναι πλούσια σε στοιχεία Alu [133]. Περίπου 20% των αναστροφών έχουν πραγματοποιηθεί στο ανθρώπινο γένωμα μπορούν να ταυτοποιηθούν ως προϊόντα γεγονότων Alu-Alu και L1-L1 ανασυνδυασμών. Αν και οι αναστροφές δεν οδηγούν σε αύξηση ή μείωση του γενώματος, συνεισφέρουν στη γενωμική ποικιλομορφία, μερικές φορές με λειτουργική σημασία, μιας και στις αναστροφές μπορεί να εμπλέκονται εξόνια [134]. Σημαντικός θεωρείται ότι είναι ο ρόλος

των μεταθετών στοιχείων και σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. Έχει προταθεί ότι ο υψηλός αριθμός αντιγράφων μεταθετών στοιχείων στην κεντρομεριδιακή περιοχή συντελεί στη σωστή κατανομή των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης, καθώς και στο ζευγάρωμα των χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση, ενώ γενικότερα η παρουσία τους στο γένωμα συμβάλλει στην οργάνωση της χρωματίνης [135].

Διαφορές στον αριθμό των γονιδίων μεταξύ των ειδών φανερώνουν ότι νέα γονίδια δημιουργούνται συνεχώς. Μελέτες συσχέτισης των γονιδιωμάτων έδειξαν ότι τα νέα γονίδια συνήθως προκύπτουν από ανασυνδυασμού μεταξύ υπαρχόντων γονιδίων. Κατά τον διπλασιασμό τους, τα L1 και SVA μπορούν να φέρουν 5' ή 3' σηματοδοτικές περιοχές οι οποίες περιέχουν σήματα έναρξης (ανοδικά του 5' άκρου) και λήξης (καθοδικά του 3' άκρου) της μεταγραφής αντίστοιχα. Η μεταγωγή εξονίων (exon shuffling) που οφείλεται στη μεταγωγή των σηματοδοτικών ακολουθιών του 3' ή του 5' άκρο τους και ενσωμάτωσή τους στο εσωτερικό άλλων γονιδίων, μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό νέων γονιδίων. Σε αντίθεση με την μεταγωγή των σηματοδοτικών αλληλουχιών των ρетроμεταθετών στοιχείων, κατά τη ρетроμετάθεση γονιδίου (gene retrotransposition) διπλασιάζονται μόνο οι αλληλουχίες του γονιδίου και όχι του ρетроμεταθετού στοιχείου. Αυτό συμβαίνει γιατί mRNA μετάγραφα του κυττάρου χρησιμοποιούν τον μηχανισμό ρетроμετάθεσης των L1 [136], όπως συμβαίνει και με τα Alu και SVA στοιχεία, χωρίς να διπλασιάζονται και οι ρυθμιστικές αλληλουχίες. Επομένως για να είναι λειτουργικά τα γονίδια χρειάζονται νέα ρυθμιστική περιοχή. Η ρетроμετάθεση γονιδίων θεωρούνταν ότι δημιουργούσε μη λειτουργικά αντίγραφα γονιδίων, τα ρетроψευδογονίδια αλλά στη συνέχεια αποδείχτηκε ότι ο μηχανισμός αυτός είναι απαραίτητος για τη σύντηξη υπαρχόντων γονιδίων [137-139]. Στο 40-60% των ανθρώπινων γονιδίων παρατηρείται εναλλακτικό μάτισμα, ένας μηχανισμός ευρέως διαδεδομένος, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται περισσότεροι από ένα τύποι μορίων mRNA από το ίδιο γονίδιο. Είναι αξιοσημείωτο ότι αλληλουχίες ρетроμεταθετών στοιχείων στρατολογούνται και ενσωματώνονται ως εξόνια σε γονίδια, μια διαδικασία γνωστή ως εξονοποίηση (exonization). Πρόσφατες αναλύσεις εκτιμούν ότι 0.1% των αλληλουχιών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες περιέχουν αλληλουχίες μεταθετών στοιχείων (κυρίως Alu και L1) [140,141]. Πιστεύεται ότι η εξονοποίηση διευκολύνεται από το γεγονός ότι πολλά μεταθετά στοιχεία φέρουν κρυφές περιοχές σύνδεσης (cryptic donor/acceptor sites) [142].



Εικόνα 21. Επίδραση της ρετρομετάθεσης στη δομή του γενώματος. **(a)** Τυπική ενσωμάτωση ενός L1, Alu ή SVA (κόκκινο τμήμα) σε νέα θέση στο γένωμα (μπλε τμήμα), **(b)** Οι πρωτεΐνες που κωδικεύει ένα L1 (πράσινος κύκλος) μπορούν να δημιουργήσουν DSBs ή υπάρχοντα DSBs να επιδιορθωθούν με την ένθεση ενός L1 (κόκκινο τμήμα), **(c)** Δημιουργία μικροδορυφόρων (π.χ $(TA)_n$), **(d)** συγχώνευση γονιδίων, **(e)** έλλειψη περιοχής μέσω ένθεσης ενός ρετρομεταθετού στοιχείου (κόκκινο τμήμα), **(f)** Ανασυνδυασμός μη ομόλογων ρετρομεταθετών στοιχείων οδηγώντας σε έλλειψη(αριστερά) ή διπλασιασμό (δεξιά) ενός τμήματος DNA, **(g)** 3' ή 5' μεταγωγή αριστερά και δεξιά αντίστοιχα [143].

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν δραματική επιρροή στην εξέλιξη του ανθρώπινου σε επίπεδο DNA. Στοιχεία που προκύπτουν συνεχώς από μελέτες, υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των ρετρομεταθετών στοιχείων στην εξέλιξη του ανθρώπου μέσω της δράσης τους και σε επίπεδο RNA. Τα ρετροτρανσποζόνια ρυθμίζουν την έκφραση των παρακαίμενων γονιδίων με μια πληθώρα μηχανισμών. Όπως τα στοιχεία Alu, έτσι και οι αλληλουχίες των L1 μπορούν να αποτελέσουν νέες θέσεις ματίσματος προωθώντας την εξονοποίηση και το εναλλακτικό μάτισμα [144,145]. Οι ενσωματώσεις των L1 σε ιντρόνια μπορούν να μειώσουν ή να διακόψουν την έκφραση γονιδίων λόγω

ανεπαρκούς μεταγραφικής επιμήκυνσης, καθώς η RNA πολυμεράση II αδυνατεί να αναγνωρίσει τις αλληλουχίες των μεταθετών στοιχείων [146], πρώιμης πολυαδενυλίωσης [147-149] ή της παρουσίας περιοχών των ρετρομεταθετών στοιχείων που περιέχουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων [150,151]. Επιπλέον, οι λειτουργικές περιοχές των L1 και Alu στοιχείων που δρουν ως υποκινητές μπορούν να προάγουν τη μεταγραφή της κωδικής ή μη κωδικής αλυσίδας των γονιδίων [152-154]. Ένας ακόμα τρόπος επίδρασης των μεταθετών στοιχείων στο RNA είναι μέσω του μηχανισμού επεξεργασίας του RNA (RNA editing). Μέσω αυτής της διαδικασίας, η νουκλεοτιδική αλληλουχία του RNA τροποποιείται κατά τη διάρκεια ή μετά την ολοκλήρωση της μεταγραφής, όπως για παράδειγμα η αντικατάσταση των βάσεων αδενοσίνης από βάσεις ιοσίνης (A-to-I) στο δίκλωνο RNA. Η A-to-I αντικατάσταση είναι ευρέως διαδεδομένη στον άνθρωπο και σχεδόν πάνω από το 90% αυτών των αντικαταστάσεων πραγματοποιείται σε αλληλουχίες των στοιχείων Alu οι οποίες είναι ενσωματωμένες σε μετάγραφα mRNA. Με την αντικατάσταση της αδενοσίνης με ιοσίνη ίσως να εξαλείφονται οι περιοχές ματίσματος με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι περιοχές εναλλακτικού ματίσματος των Alu που βρίσκονται εντός εξονίων στα γονίδια.

Τα μεταθετά στοιχεία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση και με μηχανισμούς ανεξάρτητους της μετάθεσης. Η επιγενετική ρύθμιση των μεταθετών στοιχείων μέσω της μεθυλίωσης του DNA αποτελεί έναν αμυντικό μηχανισμό του κυττάρου απέναντι στη δράση των μεταθετών στοιχείων [155-159]. Η ένθεση μεταθετών στοιχείων σε συγκεκριμένες περιοχές στο γονιδίωμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση παραγόντων τροποποίησης της χρωματίνης, συνήθως μέσω CpG μεθυλίωσης και επακόλουθης αποακετυλίωσης της ιστόνης, στη περιοχή ένθεσης του μεταθετού στοιχείου. Για παράδειγμα, ο υποκινητής του L1 είναι συνήθως υπερμεθυλιωμένος εξαιτίας της παρουσίας CpG νησίδας [160], ενώ τα Alu και SVA στοιχεία περιέχουν πολλές περιοχές πλούσιες σε CpG [161,162]. Το ένα τρίτο των περιοχών με υψηλή περιεκτικότητα σε CpG εντοπίζονται εντός των αλληλουχιών των Alu στοιχείων [163]. Είναι γνωστό ότι μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία εντοπίζονται σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων στα κεντρομερίδια και στα τελομερή των χρωμοσωμάτων, ετεροχρωματικές περιοχές πλούσιες σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και CpG. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι παράγοντες διαμόρφωσης της χρωματίνης, που προάγουν τη δημιουργία ετεροχρωματίνης, δεν μπορούν να περιορίσουν τη δράση τους μόνο στη περιοχή του μεταθετού στοιχείου, αλλά

εκτείνουν τη δράση τους στην ευρύτερη περιοχή. Για το λόγο αυτό και επειδή τα L1, Alu και SVA στοιχεία εντοπίζονται εντός ή σε γειτονία με γονίδια, παρατηρείται καταστολή της έκφρασης των παρακείμενων γονιδίων [164]. Η ικανότητα του γενώματος να εστιάσει τη δράση των παραγόντων στις επαναλαμβανόμενες περιοχές εξαρτάται από το είδος των επαναλήψεων. Στους ανθρώπους, τα LTR και L1 μεταθετά στοιχεία φαίνεται να προκαλούν πιο έντονα γεγονότα διαμόρφωσης της χρωματίνης, ενώ τα Alu στοιχεία μπορούν να μεθυλιωθούν με πιο εστιασμένο τρόπο [165]. Γίνεται φανερό λοιπόν ότι τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν μέρος του ρυθμιστικού μηχανισμού του γονιδιώματος, ελέγχοντας την έκφραση των γονιδίων. Αποτελεί χαρακτηριστικό το παράδειγμα της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X, όπου το L1 θεωρείται ότι έχει κύριο ρόλο, λόγω του υψηλού αριθμού αντιγράφων που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα. Πιστεύεται ότι οι περιοχές που βρίσκονται συγκεντρωμένα τα στοιχεία L1 αποτελούν τους πυρήνες για την έναρξη της μεθυλίωσης και ως εκ τούτου, της απενεργοποίησης του χρωμοσώματος X. Τέλος, τα μεταθετά στοιχεία πιστεύεται ότι ελέγχουν την έκφραση των γονιδίων κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Στα θηλαστικά, τα ρετρομεταθετά στοιχεία είναι υπομεθυλιωμένα στα γαμετικά κύτταρα και στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, όπου και μπορούν να μετατεθούν, ενώ είναι υπερμεθυλιωμένα στα σωματικά κύτταρα όπου δεν ανιχνεύεται έκφρασή τους και γεγονότα ρετρομετάθεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

5.1 Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Η γενετική από μόνη της δεν μπορεί να εξηγήσει πλήρως το τεράστιο μέγεθος της ποικιλομορφίας των ειδών καθώς και ένα μεγάλο αριθμό διαταραχών στον άνθρωπο. Άτομα με την ίδια γενετική πληροφορία, όπως είναι τα ομοζυγωτικά δίδυμα και τα κλωνοποιημένα ζώα, συχνά εμφανίζουν διαφορές τόσο στο φαινότυπο όσο και στην εμφάνιση και στη διεισδυτικότητα διαταραχών. Ο όρος επιγενετική εξηγεί μερικώς τα παραπάνω φαινόμενα. Ο όρος επιγενετική εισήχθη πρώτη φορά από τον C.H Waddington το 1942, σαν μία σύνθετη λέξη που προήλθε από την γενετική και την επιγένεση, με σκοπό να περιγράψει τις αλληλεπιδράσεις των γονιδίων με τα προϊόντα τους ώστε να προκύψει ο φαινότυπος [166]. Ο ορισμός όμως αυτός εξελίχθηκε και χρησιμοποιείται πλέον για να περιγράψει κληρονομούμενες αλλαγές που επιδρούν στη λειτουργία του γονιδιώματος χωρίς όμως να προκαλούν αλλαγές στην αλληλουχία [167]. Κατά τον Berger η επιγενετική συνδέει το γονιδίωμα με τον γονότυπο και τις περιβαλλοντικές επιρροές, καθορίζοντας έτσι το μεταγραφικό μοτίβο και ως εκ τούτου και τον φαινότυπο του κυττάρου [168]. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις προσφέρουν ένα εύρος επιλογών ερμηνείας της γενετικής πληροφορίας που εμπεριέχεται στο γονιδίωμα. Οι τροποποιήσεις αυτές σηματοδοτούν περιοχές στο γονιδίωμα και αποτελούν σταθερές και κληρονομούμενες πληροφορίες προσδιορισμού της οργάνωσης και δομής της χρωματίνης, η οποία υπαγορεύει τη μεταγραφική δραστηριότητα. Δύο είναι οι κυριότεροι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης, είναι η μεθυλίωση του DNA και οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών. Διαταραχή στην ισορροπία των επιγενετικών μηχανισμών μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στη δομή της χρωματίνης και στη μεταγραφική δραστηριότητα.

5.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ

Το γένωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών υφίσταται υπό την μορφή ενός νουκλεοπρωτεϊνικού συμπλόκου που ονομάζεται χρωματίνη. Επί σειρά ετών επικρατούσε η άποψη ότι μοναδικός ρόλος της χρωματίνης ήταν η χρήση της ως δομικό στοιχείο για το πακετάρισμα του DNA. Η σημερινή επικρατούσα θεωρία είναι ότι εκτός από δομικό ρόλο, η χρωματίνη διαδραματίζει κύριο ρόλο και στη ρύθμιση της λειτουργίας του γενώματος.

Η θεμελιώδης δομική μονάδα οργάνωσης της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα, ένα οκταμερές πρωτεϊνών, τις ιστόνες, γύρω από το οποίο περιελίσσονται 146 ζεύγη βάσεων DNA. Υπάρχουν πέντε τύποι ιστονών, οι τέσσερις ιστόνες H₂A, H₂B, H₃ και H₄ που διαμορφώνουν τον σκελετό του νουκλεοσώματος και η συζευκτική ιστόνη H₁ που συγκρατεί το τυλιγμένο DNA πάνω στο νουκλεόσωμα. Κάθε ιστόνη αποτελείται από μία σφαιρική περιοχή, που αλληλεπιδρά με τις άλλες ιστόνες και το DNA και από ευέλικτες αμινοτελικές ουρές. Κατά κύριο λόγο τροποποιήσεις επιτελούνται στις αμινοτελικές ουρές, όμως έχουν παρατηρηθεί τροποποιήσεις και στα αμινοξικά κατάλοιπα του πυρήνα των ιστονών [169]. Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών ελέγχουν τη δομική διαμόρφωση της χρωματίνης ρυθμίζοντας τη γονιδιακή μεταγραφή μέσω αλληλεπιδράσεων γειτονικών νουκλεοσωμάτων, αλλαγής της τοποθέτησής και διαμεσολάβησης επαφών μεταξύ των ιστονών και του DNA [170]. Ο έλεγχος του βαθμού συμπίκνωσης της χρωματίνης, εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Η συμπαγής χρωματινική δομή, η ετεροχρωματίνη, εμποδίζει τη μεταγραφική ενεργοποίηση, ενώ η ελαφρώς συμπτυκνωμένη χρωματίνη, η ευχρωματίνη είναι πιο προσβάσιμη στους μεταγραφικούς παράγοντες [171]. Έχουν παρατηρηθεί τουλάχιστον οκτώ διαφορετικοί μηχανισμοί τροποποίησης των ιστονών [172], οι οποίοι είναι οι εξής:

- i. Ακετυλίωση της λυσίνης
- ii. μεθυλίωση της λυσίνης και αργινίνης
- iii. φωσφορυλίωση της σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης
- iv. ουβικιτινυλίωση της λυσίνης(ubiquitylation),

- v. SUMOυλίωση της λυσίνης (SUMOylation, Small Ubiquitin-like Modifier or SUMO proteins),
- vi. ADP ριβοσυλίωση του γλουταμινικού οξέος (ADP ribosylation, προσθήκη μίας η περισσότερων ADP-ριβοζών σε μία πρωτεΐνη)
- vii. κιτρουλινίωση (deimination, αντικατάσταση αργινίνης με κιτρουλίνη)
- viii. η δημιουργία ισομερούς της προλίνης (proline isomerization).

Πρωτεΐνες που τροποποιούν τις ιστόνες όπως οι Polycomb (PcG) Trihorax (TrxG) θεωρείται ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση των ιστονών. Οι πρωτεΐνες Polycomb σχηματίζουν σύμπλοκα τα οποία αλληλεπιδρούν με τη περιοχή της αρχικής καταστολής και μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων της δομής της χρωματίνης, προάγουν τη γονιδιακή καταστολή [173-176]. Οι πρωτεΐνες Trihorax έχουν ανταγωνιστική δράση και επάγουν τη διατήρηση της γονιδιακής.

Οι τροποποιήσεις των ιστονών, μετά την εδραίωσή τους σε ένα κεντρικό σημείο, μπορούν να εξαπλωθούν σε μεγάλες περιοχές του γενώματος με αυτό-διαδιδόμενο τρόπο. Το πρότυπο αυτό κληρονομείται στους απογόνους, υποστηρίζοντας τη θεωρία της κληρονομής του επιγενετικού προτύπου [177-182].

5.3 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό επιγενετικής σήμανσης που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων. Έρευνες δεκαετιών αποκάλυψαν το σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης, αποτελώντας βασικό στοιχείο σε μια πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η γονιδιακή αποτύπωση, η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X και η διατήρηση της δομής του χρωμοσώματος. Η μεθυλίωση του DNA αφορά τη προσθήκη μίας μεθυλομάδας στο 5' άτομα άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης που είναι η συνηθέστερη και παρατηρείται σε όλους τους οργανισμούς, ή στο 6' άτομα αζώτου του δακτυλίου της αδενίνης, κυρίως σε βακτήρια και ορισμένους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στα θηλαστικά, η μεθυλίωση εστιάζεται στις κυτοσίνες κυρίως στις 5'-CpG-3' νησίδες

(CpG islands). Στον άνθρωπο, 70-80% των CpG νησίδων είναι μεθυλιωμένες [183]. Περίπου το 90% της μεθυλίωση του γενόματος αφορά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες όπως δορυφορικό DNA και “παρασιτικά” στοιχεία όπως LINEs, SINEs, ενδογενής ρετροϊούς και ενδοκυστικά σωματίδια A (Intracisternal A particles, IAPs) [184]. Η μεθυλίωση των κυτοσινών καταλύεται in vivo από τα ένζυμα DNA μεθυλοτρασφεράσες (DNMTs).

Στα θηλαστικά, έχουν περιγραφεί οι πέντε μεθυλοτρασφεράσες οι DNMT1, DNMT 2, DNMT3a, DNMT3b και DNMT3L. Η DNMT1 αναγνωρίζει τις ημι-μεθυλιωμένες CpG περιοχές στην αντιγραμμένη αλυσίδα DNA και αποκαθιστά το πρότυπο μεθυλίωσης στην νέα αλυσίδα. Η DNMT2 έχει δραστικότητα ήπιας μεθυλοτρασφεράσης και δρα ως tRNA μεθυλοτρασφεράση. Οι DNMT3a και DNMT3b συναντώνται στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και ο ρόλος τους είναι η εγκαθίδρυση νέου προτύπου μεθυλίωσης (de novo methylation) στα εμβρυονικά κύτταρα μετά τη καθολική απομεθυλίωση που παρατηρείται στα προεμφυτευτικά στάδια. Επίσης οι DNMT3a και DNMT3b θεωρείται ότι συνεργάζονται με την DNMT1 στη διατήρηση της μεθυλίωσης και της δομής των χρωμοσωμάτων. Η DNMT3L φαίνεται να αλληλεπιδρά και να ενεργοποιεί τις DNMT3a και DNMT3b. Κύριως ενδοκυτταρικός δότης μεθυλομάδος είναι η s-αδενοσυλομεθειονίνη (SAM).

5.4 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί τον πιο αποτελεσματικό επιγενετικό μηχανισμό μεταγραφικής αποσιώπησης των γονιδίων. Η μεθυλίωση μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή του DNA είτε άμεσα εμποδίζοντας τη σύνδεση των παραγόντων της μεταγραφής στους υποκινητές των γονιδίων, είτε έμμεσα προκαλώντας δομικές αλλαγές στη χρωματίνη. Η δομή της χρωματίνης στην περιοχή ενός γονιδίου μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ενεργότητά του. Βάσει της δομής της, η χρωματίνη μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες, την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από τον υψηλό βαθμό συμπύκνωσης και συνδέεται με την καταστολή της γονιδιακής έκφρασης, οι CpG αλληλουχίες είναι συνήθως μεθυλιωμένες και οι ιστόνες

υπο-ακετυλιωμένες. Η ευχρωματίνη, που αποτελεί την ενεργή μορφή της χρωματίνης, είναι ελαφρά συμπυκνωμένη, οι CpG νησίδες συνήθως δεν είναι μεθυλιωμένες και οι ιστόνες είναι ισχυρά ακετυλιωμένες.

Τα περισσότερα CpG δινουκελοτίδια είναι διασκορπισμένα στο γένωμα ένας αριθμός όμως βρίσκεται σε πολύ υψηλή συγκέντρωση σε περιοχές που ονομάζονται CpG νησίδες (CpG islands). Πρόκειται για περιοχές του γονιδιώματος μήκους 1-2kb. Στον άνθρωπο, περίπου το 60% των υποκινητών των γονιδίων περιέχουν CpG νησίδες. Οι περισσότερες CpG νησίδες δεν είναι μεθυλιωμένες ωστόσο ένα ποσοστό τους φαίνεται να εμφανίζει ιστοειδική μεθυλίωση. Επίσης μεθυλιωμένες CpG νησίδες στους υποκινητές των γονιδίων συναντάμε κατά το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης και κατά την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X [185]

Η μεθυλίωση των CpG νησίδων στους υποκινητές των γονιδίων δρα ως σήμα αποσιώπησης των γονιδίων αυτών. Πρωτεΐνες αναγνωρίζουν και προσδέονται στις μεθυλιωμένες κυτοσίνες οπότε οι παράγοντες μεταγραφής και η RNA πολυμεράση αδυνατούν να αναγνωρίσουν τους υποκινητές. Η πρώτη πρωτεΐνη που χαρακτηρίστηκε ήταν η MeCP1 (Methyl Cytocine Binding Protein). Η MeCP1 χρειάζεται μία αλληλουχία τουλάχιστον 12 συμμετρικά μεθυλιωμένων CpG για να συνδεθεί στο DNA. Η MeCP2 μπορεί να συνδέεται με ένα μόνο συμμετρικά μεθυλιωμένο CpG δινουκλεοτίδιο και καταστέλλει ισχυρά τη μεταγραφή. Μετά τη πρόσδεσή τους στο μεθυλιωμένο DNA, οι MeCPs στρατολογούν κάποιους παράγοντες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως οι αποακετυλάσες των ιστονών (HDAC-Histone Deacetylases) και δημιουργούν ένα σύμπλοκο [186,187]. Η αποακετυλίωση των ιστονών είναι μία μετα-μεταφραστική τροποποίηση που οδηγεί στο σχηματισμό ετεροχρωματίνης και στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Την αποακετυλίωση των ιστονών ακολουθεί η μεθυλίωσή τους [188].

Ορισμένοι παράγοντες μεταγραφής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην μεθυλίωση όπου η παρουσία ενός μόνου μεθυλιωμένου δινουκλεοτιδίου αρκεί για να ανασταλεί η μεταγραφή. Σε άλλους υποκινητές η επίδραση μεθυλίωσης είναι πιο σταδιακή, όσο μεγαλύτερο το ποσοστό μεθυλίωσης τόσο μεγαλύτερη η αναστολή της μεταγραφής.

5.5 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ (GENOMIC IMPRINTING)

Τα κύτταρα των διπλοειδών οργανισμών φέρουν δύο αντίγραφα κάθε χρωμοσώματος, ένα μητρικής και ένα πατρικής προέλευσης. Υπάρχουν όμως περιπτώσεις όπου και τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα προέρχονται από τον ίδιο γονέα γεγονός που χαρακτηρίζεται ως μονογονεϊκή δισωμία (uniparental disomy, UPD). Η UPD μπορεί να αφορά ολόκληρο το χρωμόσωμα ή μέρος αυτού (μερική μονογονεϊκή δισωμία, segmental UPD). Διακρίνονται δύο κατηγορίες UPD, μία όπου κληρονομούνται δύο αντίγραφα του ίδιου γονεϊκού χρωμοσώματος (ισοδισωμία) και μία όπου κληρονομείται ένα αντίγραφο από το κάθε ομόλογο χρωμόσωμα του ενός γονέα (ετεροδισωμία). Η ισοδισωμία προκαλείται από μη διαχωρισμό στη δεύτερη μειωτική διαίρεση ενώ η ετεροδισωμία από μη διαχωρισμό κατά τη πρώτη μειωτική διαίρεση.

Στα θηλαστικά, η πλειοψηφία των αλληλόμορφων γονιδίων εκφράζεται ισότιμα, υπάρχει όμως μια υποομάδα γονιδίων η οποία εμφανίζει επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση από το ένα μόνο αλληλόμορφο, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση. Το φαινόμενο αυτό καλείται γονιδιωματική αποτύπωση και επιτελείται μέσω επιγενετικών μηχανισμών, όπως η μεθυλίωση κυτοσινών και η ακετυλίωση και μεθυλίωση ιστονών. Στον άνθρωπο έχουν εντοπιστεί περίπου 100 γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση, τα οποία τείνουν να οργανώνονται σε συναθροίσεις 3-15 γονιδίων και αντιγράφονται ασυγχρόνως [189].

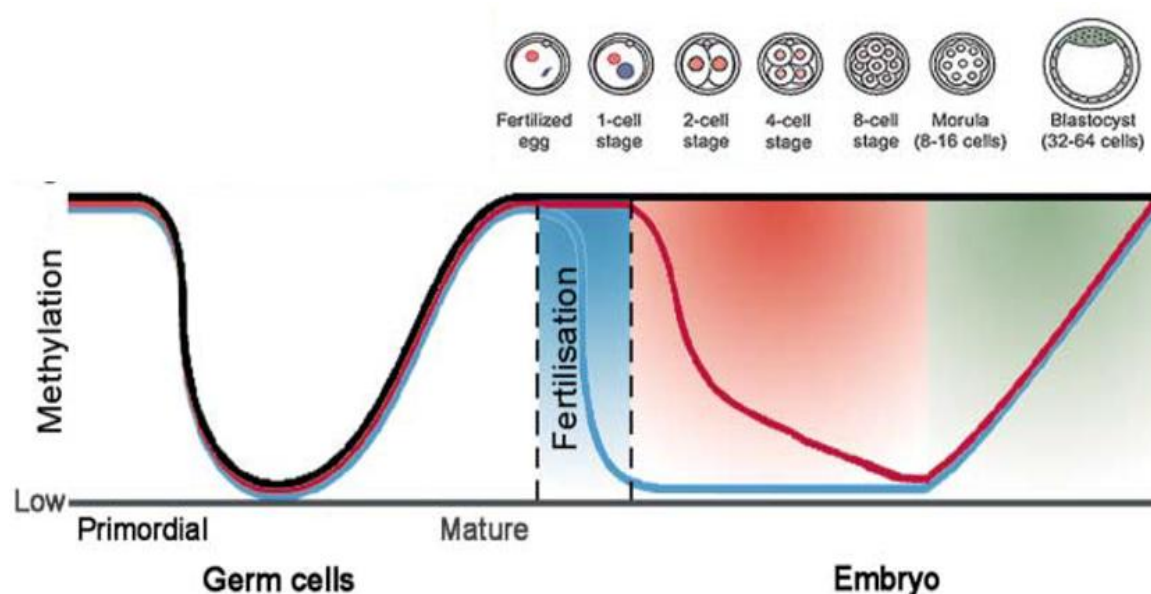
Η επιλεκτική έκφραση που εμφανίζουν τα γονίδια που υπόκεινται στον έλεγχο της γονιδιωματικής αποτύπωσης, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση του αλληλόμορφου, επιτελείται μέσω επιγενετικών μηχανισμών στο γονιδίωμα και σε χρωμοσωματικό επίπεδο. Η επιγενετική σήμανση πολλών αποτυπωμένων γονιδίων είναι η μεθυλίωση του DNA στις διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (differentially methylated regions, DMRs). Οι DMRs, είναι τμήματα DNA πλούσια σε νουκλεοτίδια γουανίνης και κυτοσίνης, τα οποία είναι μεθυλιωμένα μόνο στο ένα αλληλόμορφο. Οι DMRs διακρίνονται σε πρωτογενείς, όπου η μεθυλίωση γίνεται κατά τη γαμετογένεση και παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης και οι δευτερογενείς, όπου η μεθυλίωση επιτελείται μετά τη γονιμοποίηση, στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Μεταξύ των πρωτογενών DMRs φαίνεται να υπάρχουν περιοχές ελέγχου της γονιδιωματικής αποτύπωσης (imprinting control region,

ICR) που δρώντας *in cis* ελέγχουν τόσο την εγκαθίδρυση όσο και τη διατήρηση της γονιδιακής αποτύπωσης [190-192]. Επιπλέον, στα αποτυπωμένα γονίδια έχουν παρατηρηθεί αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης της ιστόνης, μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 4 έχει συσχετιστεί με το εκφραζόμενο αλληλόμορφο ενώ μεθυλίωση της ιστόνης H3 στη λυσίνη 9 έχει συνδεθεί με το ανενεργό αλληλόμορφο [1193,194].

Η παρατήρηση ότι το πατρικό και μητρικό γένωμα δεν συνεισφέρουν ισάξια στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, έγινε στις αρχές του 1980 βάσει των αποτελεσμάτων δύο ανεξάρτητων μελετών, των Surani και Solter. Οι μελέτες στηρίζονταν στη δημιουργία και ανάπτυξη μονογονεϊκών εμβρύων ποντικών. Τα έμβρυα που προέκυπταν είχαν τελείως διαφορετικούς φαινοτύπους. Τα έμβρυα που περιείχαν το διπλοειδές μητρικό γένωμα (gynogenotes) πέθαιναν στο μέσο της κυοφορίας, εμφανίζοντας στοιχεία εμβρυϊκής ανάπτυξης και υποτυπώδη ανάπτυξη πλακούντα. Τα έμβρυα που περιείχαν το διπλοειδές πατρικό γένωμα (androgenotes) στερούνταν εμβρυϊκής ανάπτυξης αλλά σχημάτιζαν ολοκληρωμένο πλακούντα. Όπως προκύπτει λοιπόν, το μητρικό γένωμα είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη του εμβρύου ενώ το πατρικό για τη δημιουργία του πλακούντα [195-197]. Στους ανθρώπους, η ανάπτυξη τέτοιων εμβρύων εμφανίζει παρόμοια πρότυπα ανάπτυξης του πλακούντα ή του εμβρύου [198,199]. Πιθανόν ο μηχανισμός της γονιδιακής αποτύπωσης να ρυθμίζει τις διαφορετικές λειτουργίες του μητρικού και πατρικού γενώματος. Ίσως τα μεταγραφικά ενεργά γονίδια πατρικής προέλευσης να προωθούν την ανάπτυξη του εμβρύου, ενώ τα αντίστοιχα μητρικής προέλευσης να δρουν κατασταλτικά [198,199]. Η πλειοψηφία των γονιδίων υπό γονιδιακή αποτύπωση έχει ταυτοποιηθεί ότι είναι μεθυλιωμένη στο ωάριο. Ελάχιστα είναι τα γονίδια τα οποία είχαν υποστεί γονιδιακή αποτύπωση στο σπερματοζώαριο [200,201].

5.6 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Στα θηλαστικά έχουν διαπιστωθεί δύο κύκλοι επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης του DNA, κατά τη γαμετογένεση και κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη (Εικόνα 22). Τα αποτυπωμένα γονίδια στους γαμέτες διαφεύγουν του επαναπρογραμματισμού κατά τα προεμφυτευτικά στάδια [202,203]. Η διαδικασία ρυθμίζεται από τις DNA μεθυλοτρασφεράσες με την DNMT1 να είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση του προτύπου μεθυλίωσης ενώ τις DNMT3a και DNMT3b να σχετίζονται στην εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης.



Εικόνα 22. Επαναπρογραμματισμός της μεθυλίωσης στα γαμετικά κύτταρα και στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του ποντικού [204].

5.6.1 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗ ΓΑΜΕΤΟΓΕΝΕΣΗ

Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, πριν αυτά εισέλθουν στις γονάδες, είναι ισχυρά μεθυλιωμένα [205]. Κατά την μετανάστευσή τους προς τη γεννητική ταινία, τη περιοχή που θα σχηματιστούν οι γονάδες, υφίστανται τη πρώτη ευρεία απομεθυλίωση σε όλο το γονιδίωμα [191]. Η απομεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, όπως τα μεταθετά στοιχεία και το μικροδορυφορικό DNA, πραγματοποιείται παρατεταμένα και

τμηματικά [205-207]. Σε αυτό το σημείο επιτελείται η επανεργοποίηση του απενεργοποιημένου χρωμοσώματος X στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα, μία διαδικασία που γίνεται σταδιακά [208,209]. Η χρονική στιγμή που διαγράφεται το πρότυπο μεθυλίωσης στα γενετικά αποτυπωμένα γονίδια δεν είναι ακόμα γνωστός, αλλά μπορεί να διαφέρει σε κάθε γονίδιο.

Στα άρρενα γαμετικά κύτταρα, η *de novo* μεθυλίωση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση, ξεκινά στα προσπερματογόνια και ολοκληρώνεται μέχρι το τέλος του σταδίου της παχυταινίας [210].

Η *de novo* μεθυλίωση στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα αρχίζει αμέσως μετά τη γέννηση και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ωοκυττάρου μέχρι το στάδιο της διπλοταινίας της μειωτικής πρόφασης I. Η εγκαθίδρυση του προτύπου μεθυλίωσης των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση δεν γίνεται ταυτόχρονα για όλα, αλλά σε διαφορετικά στάδια κατά την ανάπτυξη του ωοκυττάρου [211-213]. Πριν τη γονιμοποίηση, οι ώριμοι γαμέτες και των δύο φύλων χαρακτηρίζονται από ισχυρά μεθυλιωμένο γονιδίωμα παρουσιάζοντας κάποιες διαφορές στα δύο φύλα. Ενώ η χρωματίνη εμφανίζει υψηλό βαθμό συμπύκνωσης, οι ιστόνες των σπερματοζωαρίων έχουν αντικατασταθεί από πρωταμίνες, το DNA του σπερματοζωαρίου είναι περισσότερο μεθυλιωμένο απ'ότι του ωαρίου, ορισμένες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες εμφανίζονται περισσότερο μεθυλιωμένες στο σπερματοζωάριο και κάποιες άλλες στο ωάριο και τέλος οι δύο γαμέτες εμφανίζουν διαφορετικό καθεστώς μεθυλίωσης στα γενωμικώς αποτυπωμένα γονίδια [49].

5.6.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Κατά τη γονιμοποίηση τα γονιδιώματα των γαμετών εμφανίζουν ασυμμετρία στη μεθυλίωσή τους, απαραίτητη για την φυσιολογική ανάπτυξη του ζυγωτού. Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, οι πρωταμίνες του σπερματοζωαρίου αντικαθίστανται από ιστόνες. Τις δομικές τροποποιήσεις της χρωματίνης του άρρενος γαμέτη ακολουθεί η απομεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιώματος και στους δύο γαμέτες, μια διαδικασία η οποία διενεργείται κατά τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου [214]. Η απομεθυλίωση για το μεγαλύτερο μέρος του γένωματος ολοκληρώνεται στο στάδιο των 16 κυττάρων (μορίδιο) [203], ενώ τα αποτυπωμένα γονίδια διαφεύγουν της απομεθυλίωσης και διατηρούν τα επιγενετικά τους σημάδια [215,216]. Το πατρικό γένωμα υφίσταται πρώτο ενεργή απομεθυλίωση, η οποία ολοκληρώνεται πριν από την πρώτη αυλάκωση, ενώ το μητρικό γένωμα, το οποίο φέρει περισσότερα αποτυπωμένα γονίδια, συνεχίζει τη *de novo* μεθυλίωση [214,217]. Κατά τη διάρκεια των πρώτων κυτταρικών διαιρέσεων και μέχρι το προεμφυτευτικό στάδιο της βλαστοκύστης, το μητρικό γένωμα υφίσταται σταδιακή παθητική απομεθυλίωση κατά τη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων [214]. Στη διάρκεια των κυτταρικών διαιρέσεων η DNMT1 αποκλείεται από τον πυρήνα [218]. Οι μηχανισμοί ή τα ένζυμα που εμπλέκονται στη διαδικασία δεν είναι ακόμα γνωστά.

Μετά το στάδιο του μοριδίου και αφού έχει ολοκληρωθεί η απομεθυλίωση, στο στάδιο της βλαστοκύστης, μεθυλοτρανσφεράσες μετακινούνται στο πυρήνα των κυττάρων της εσωτερικής μάζας (ICM) και διενεργείται *de novo* μεθυλίωση ώστε να προκύψει το νέο πρότυπο μεθυλίωσης στο εμβρυϊκό γονιδίωμα. Στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος τα επίπεδα μεθυλίωσης παραμένουν χαμηλά [219,220]. Η διαφορά αυτή διατηρείται και στα μεταγενέστερα στάδια ανάπτυξης και αντικατοπτρίζεται στους σωματικούς ιστούς οι οποίοι είναι έντονα μεθυλιωμένοι ενώ εξωεμβρυϊκοί ιστοί, όπως ο πλακούντας, είναι υπομεθυλιωμένοι.

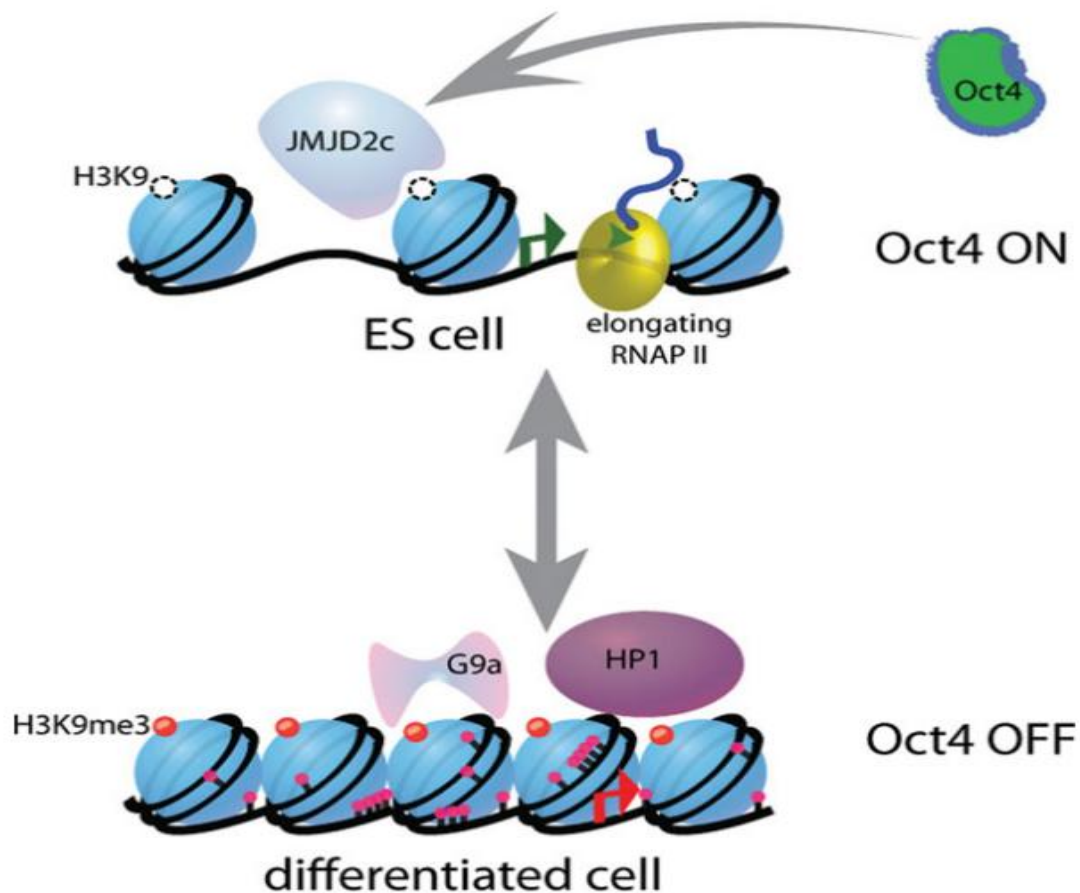
5.7 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΕΜΒΡΥΪΚΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Η ικανότητα αυτοανανέωσης των ESCs προϋποθέτει ένα γονιδίωμα ικανό να διατηρεί μία κυτταρική μνήμη που θα ορίζει την πολυδυναμία. Από την άλλη μεριά, το γονιδίωμα πρέπει να διακρίνεται από υψηλή πλαστικότητα, έτσι ώστε να μπορεί να υποστηρίξει όλες τις αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης που απαιτούνται για την εκκίνηση της διαφοροποίησης. Κατά τη διαφοροποίηση, ο καθορισμός της κατεύθυνσης πραγματοποιείται από την υιοθέτηση του κυττάρου ενός νέου προτύπου γονιδιακής έκφρασης. Αν και οι μηχανισμοί για τις παραπάνω διαδικασίες δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, τα αποτελέσματα μιας πληθώρας μελετών υποδεικνύουν ότι οι επιγενετικοί μηχανισμοί έχουν πρωτεύοντα ρόλο, συμπεριλαμβανομένης της αρχιτεκτονικής του πυρήνα, των τροποποιήσεων των ιστονών και της δομής και δυναμικής της χρωματίνης.

Ως γνωστόν, η δομή της χρωματίνης επηρεάζει τη γονιδιακή έκφραση επιδρώντας στη προσβασιμότητα των ρυθμιστικών παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων, τροποποιώντας τη συγγένεια των μεταγραφικών παραγόντων με τις θέσεις σύνδεσής τους. Στα αδιαφοροποίητα ESCs η χρωματίνη εμπλουτισμένη σε ευχρωματινικές περιοχές (χρωματίνη με μειωμένο βαθμό συμύκνωσης) και καθώς προχωρά η διαφοροποίησή τους εμφανίζουν πιο συμπυκνωμένες ετεροχρωματινικές δομές που είναι μεταγραφικά ανενεργές [221,222]. Η δομή της χρωματίνης διαμορφώνεται μέσω της δέσμευσης δομικών χρωματινικών πρωτεϊνών, όπως οι ιστόνες. Ο τρόπος σύνδεσης των ιστονών στη χρωματίνη παρουσιάζει εντυπωσιακές αποκλίσεις. Ενώ οι κύριες ιστόνες που απαρτίζουν το νουκλεόσωμα προσδέονται με σχετικά σταθερά με τη χρωματίνη, οι υπόλοιπες DNA-δεσμευόμενες πρωτεΐνες, όπως η συνδετική ιστόνη H1, συνδέονται παροδικά με τη χρωματίνη [223,224]. Η έναρξη της διαφοροποίησης προκαλεί συσσώρευση των πρωτεϊνικών αυτών παραγόντων στις περιοχές γονιδίων που πρέπει να αποσιωπηθούν. Η συσσώρευση αυτή αποτελεί το επιγενετικό σήμα που χαρακτηρίζει τις αποσιωπούμενες περιοχές. Η δυναμική φύση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με τη χρωματίνη μπορεί να διευκολύνει τη πρόσβαση των ρυθμιστικών παραγόντων στις ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων προκειμένου να ενεργοποιούν την έκφρασή τους με σκοπό τη διαφοροποίηση [225]. Ο πρωτεϊνικός αυτός πληθυσμός επηρεάζει σημαντικά τη διαμόρφωση και αρχιτεκτονική της χρωματίνης, δημιουργώντας ευχρωματινικές ή ετεροχρωματινικές

περιοχές ανάλογα με τις ανάγκες της γονιδιακής έκφρασης, επηρεάζοντας την κινητική διαφοροποίηση των ESCs [226]. Η μεταβολή του βαθμού συμπύκνωσης της χρωματίνης μπορεί να προσφέρει κατά τη διαφοροποίηση τόσο την αποσιώπηση γονιδίων που διατηρούν την πολυδυναμία όσο και την ενεργοποίηση γονιδίων που προάγουν τη διαφοροποίηση.

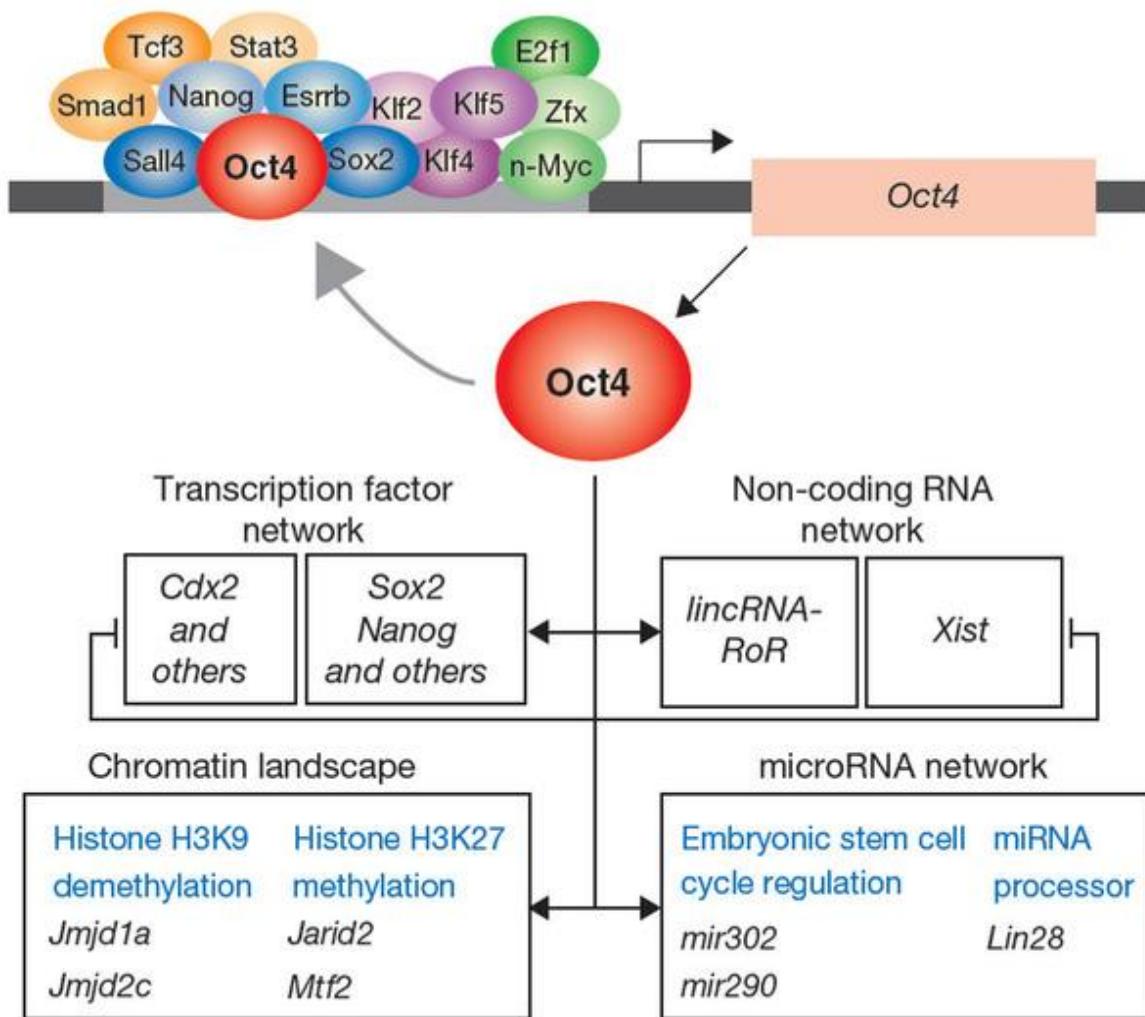
Κατά τη διαφοροποίηση παρατηρούνται τροποποιήσεις στις ιστόνες που μεταβάλλουν την αρχιτεκτονική της χρωματίνης. Για παράδειγμα η πρόοδος της διαφοροποίησης οδηγεί σε αύξηση του πληθυσμού των me_3K9-H3 ιστονών και παράλληλη ελάττωση των επιπέδων ακετυλίωσης των ιστονών H3 και H4 [226-228]. Πέραν όμως από τις τροποποιήσεις των ιστονών που αλλάζουν συνολικά την αρχιτεκτονική της χρωματίνης, πραγματοποιούνται και τοπικές μεταβολές σε γενωμικές περιοχές που περιέχουν γονίδια με καθοριστικό ρόλο στη διατήρηση των ESCs. Ο υποκινητής του γονιδίου Oct4 βρέθηκε να είναι εμπλουτισμένος σε me_3K4-H3 (μεταγραφικά ενεργή) στα ESCs, ενώ κατά τη διαφοροποίηση χάνεται το επιγενετικό αυτό σήμα (Εικόνα 23).



Εικόνα 23. Οι μεθυλοτρασφεράσες και απομεθυλάσες της ιστόνης δρουν ανταγωνιστικά ώστε να ελέγχουν το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων στα ESCs. Στα πολυδύναμα κύτταρα, το γονίδιο Oct-4 παραμένει μεταγραφικά ενεργό μέσω των απομεθυλασών της ιστόνης H3 K9, Jmjd1a και Jmjd2, η έκφραση των οποίων ελέγχεται με τη σειρά της από τον παράγοντα Oct4. Κατά τη διαφοροποίηση, η G9a, προσθέτει τρεις μεθυλομάδες στην ιστόνη H3 K9 στην περιοχή του εκκινήτη του γονιδίου Oct-4 με αποτέλεσμα τη στρατολόγηση των HP1 και DNA μεθυλοτρασφερασών, το μόνιμη καταστολή του γονιδίου και την έναρξη της διαφοροποίησης των κυττάρων [229].

Στις τοπικές μεταβολές τις χρωματίνης φαίνεται να εμπλέκεται μία οικογένεια πρωτεϊνών που ονομάζεται Polycomb (PcG). Οι πρωτεΐνες αυτές σχηματίζουν πολλαπλά κατασταλτικά σύμπλοκα (PRCs). Τα PRCs έρχονται δρουν στην περιοχή της αρχικής καταστολής και δρουν μέσω επιγενετικών τροποποιήσεων της χρωματινικής δομής για να προάγουν τη γονιδιακή καταστολή [173-176]. Μελέτες σχετικά με το ρόλο των πρωτεϊνών αυτών αποκάλυψε ότι είναι απαραίτητη η παρουσία τους για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των ESCs. Περαιτέρω μελέτες απέδειξαν ότι τα δύο συμπλέγματα

καταστολής των PcGs προσδένονται σε ένα ευρύ φάσμα γονιδίων που περιλαμβάνει κυρίως παράγοντες μεταγραφής και σηματοδοτικούς παράγοντες που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση. Είναι γνωστό ότι οι παράγοντες NANOG, SOX2 και OCT4 είναι ικανοί να αλληλεπιδράσουν με επιγενετικούς ρυθμιστές συμπεριλαμβανομένων και των PcGs [57]. Επιπλέον, η μεταγραφική ενεργότητα ενός σημαντικού αριθμού γονιδίων που αποτελούν στόχους των PcGs βρίσκεται υπό τον έλεγχο των παραγόντων μεταγραφής NANOG, SOX2 και OCT4. Συμπερασματικά λοιπόν μπορούμε να υποθέσουμε ότι υπάρχει ένα μηχανισμός με τον οποίο οι παράγοντες NANOG, SOX2 και OCT4 προσελκύουν τα συμπλέγματα PcG προκειμένου να ρυθμίσουν τη γονιδιακή έκφραση.



Εικόνα 24. Αλληλεπίδραση του μεταγραφικού ρυθμιστικού δικτύου, με το επιγενετικό δίκτυο και το δίκτυο των μη-κωδικών RNA [82].

5.8 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Η επιγενετική ρύθμισης δραστηριότητας των μεταθετών στοιχείων αποτελεί ένα μηχανισμό ασφαλείας του οργανισμού για την ενίσχυση της σταθερότητας του γενόματος. Υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί που καταστέλλουν τη δραστηριότητα των μεταθετών στοιχείων με τη μεθυλίωση να αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους.

Ως επί το πλείστον, τα μεταθετά στοιχεία φαίνεται να φέρουν μεθυλιωμένες περιοχές στην αλληλουχία τους. Η μεθυλίωση του DNA περιορίζει τη δυνατότητα των μεταθετών στοιχείων να μεταγράφονται και να λαμβάνουν μέρος σε φαινόμενα ανασυνδυασμού. Επιπλέον, πολύ συχνά εντοπίζονται ρετρομεταθετά στοιχεία εντός ετεροχρωματικών περιοχών, αποτέλεσμα αποσιωπητικών ιστονικών τροποποιήσεων [231]. Πέραν όμως της γενικής ρύθμισης των μεταθετών στοιχείων μέσω της ετεροχρωματίνης, πραγματοποιείται και ειδική ρύθμιση για κάθε τρανσποζόνια χωριστά με τα piRNAs να αποτελούν βασικά στοιχεία. Ο μηχανισμός της RNA παρέμβασης εξαρτάται από την νουκλεοτιδική αλληλουχία και ως εκ τούτου είναι ειδική για κάθε μεταθετό στοιχείο [232].

Παρόλα αυτά φαίνεται ότι μερικές φορές τα μεταθετά στοιχεία να μπορούν να υπερκεράσουν τους κατασταλτικούς μηχανισμούς της έκφρασής τους. Κινητοποίηση των μεταθετών στοιχείων έχει παρατηρηθεί τόσο στα γαμετικά κύτταρα, όσο και κατά την εμβρυογένεση [233].

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΚΟΠΟΣ

Το γένωμα των θηλαστικών χαρακτηρίζεται από τη παρουσία ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων τα οποία υπόκεινται σε επιγενετική τροποποίηση και στο μηχανισμό της γονιδιακής αποτύπωσης, με αποτέλεσμα τον έλεγχο της έκφρασης και την επιλεκτική έκφραση τους ενός εκ των δύο αλληλόμορφων, ανάλογα με τη γονεϊκή (μητρική ή πατρική) προέλευση. Στις αρχές της δεκαετίας του '90 ανακαλύπτονται τα πρώτα αποτυπωμένα γονίδια τα οποία εμφάνιζαν διαφορετική μεθυλίωση ανάμεσα στα αλληλόμορφα μητρικής και πατρικής προέλευσης. Δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης, η μεθυλίωση του DNA και η τροποποίηση των ιστονών.

Η ανάπτυξη των θηλαστικών χαρακτηρίζεται από δύο κύκλους επαναπρογραμματισμού του γενώματος μέσω της απομεθυλίωσης και επαναμεθυλίωσης του DNA. Πρώτη φορά παρατηρείται κατά την ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων και η δεύτερη φορά λαμβάνει χώρα στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου.

Διαταραχές στη γονιδιακή αποτύπωση προκαλεί διαταραχές στην ενδομήτρια ανάπτυξη καθώς και πολλές γενετικές διαταραχές μετά τη γέννηση.

Σκοπός της παρούσης διατριβής είναι η μελέτη του επαναπροσδιορισμού της γονεϊκής αποτύπωσης και ειδικότερα της μεθυλίωσης, στα ωάρια και στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου, σε συνάρτηση με την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας και την επίδραση της επαγόμενης ρετρομετάθεσης στην επιγενετική τροποποίηση και στη σταθερότητα του γενώματος.

Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού εξετάσαμε τους παράγοντες πολυδυναμίας Oct-3/4, Sox2 και Nanog καθώς και της πρωτεΐνης E-Cadherin ώστε να προσδιορίσουμε χρονικά την έκφραση των παραγόντων στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου. Στη συνέχεια με τη χρήση ειδικού αντισώματος για την μεθυλίωση αναλύσαμε αλλαγές στα επίπεδα μεθυλίωσης από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης. Στη συνέχεια επαγάγαμε τη ρετρομετάθεση με την έγχυση μικροποσότητας του ρετρομεταθετού στοιχείου L1 κατά τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης και

μελετήσαμε την επίδραση της ρετρομετάθεσης στο πρότυπο μεθυλίωσης των κυττάρων στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου καθώς και στη σταθερότητα του γενόματος, ανιχνεύοντας θραύσεις της διπλής αλυσίδας του DNA.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.1 ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το υλικό της μελέτης αποτέλεσαν δείγματα γυναικών που υποβλήθηκαν σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τα δείγματα αφορούσαν ανώριμα ωάρια στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV) και στο στάδιο της μετάφασης της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (MI), ανώμαλα, ώριμα ωάρια (MII), καθώς επίσης και ανώμαλα προεμφυτευτικά έμβρυα, από το στάδιο του ζυγώτη μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης, τα οποία ήταν ακατάλληλα για εμβρυομεταφορά. Η επιλογή των κατάλληλων ωαρίων για γονιμοποίηση, η αξιολόγηση των εμβρύων από το στάδιο του ζυγώτη μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης και η επιλογή των καταλληλότερων για εμφύτευση γίνεται βάσει των κριτηρίων που έχουν τεθεί από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας (World Health Organization, WHO).

Έγκριση ερευνητικού πρωτοκόλλου από το Παν/κό Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων, Ιωάννινα 20-12-2005, Αριθμός Πρωτ. 560

Άδεια από την Εθνική Αρχή Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, Αθήνα 6-7-2009, απόφαση αρ. 3/2009

7.2 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO

Η συλλογή του σπέρματος γίνεται την ίδια ημέρα που θα πραγματοποιηθεί η in vitro γονιμοποίηση και αφού έχει μεσολαβήσει ένα χρονικό διάστημα αποχής από σεξουαλική επαφή, κατά προτίμηση 3-5 μέρες. Το σπερματικό υγρό, πλην των ζωντανών σπερματοζωαρίων, περιέχει στοιχεία όπως σπερματικό πλάσμα, νεκρά σπερματοζωάρια, λευκοκύτταρα, ερυθροκύτταρα, επιθηλιακά κύτταρα, μικροοργανισμούς, τα οποία αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα της ενεργοποίησης των σπερματοζωαρίων. Η χρήση του σπέρματος στα πλαίσια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής απαιτεί τη χρήση

τεχνικών προετοιμασίας και καθαρισμού του σπέρματος που θα το καταστήσουν κατάλληλο για γονιμοποίηση. Οι συνηθέστερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι α) η τεχνική διαχωρισμού μέσω διαφορικής πλεύσης (swim up) και β) ο διαχωρισμός με φυγοκέντρηση σε μέσω διαβαθμισμένων πυκνοτήτων (sperm gradient). Η επιλογή της καταλληλότερης μεθόδου εξαρτάται από το ιστορικό του ασθενούς, από τη ποιότητα του σπέρματος και από τη μέθοδο γονιμοποίησης που θα ακολουθηθεί (IVF ή ICSI).

7.2.1 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΦΟΡΙΚΗΣ ΠΛΕΥΣΗΣ

(SWIM UP)

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε δείγματα σπέρματος με φυσιολογική κινητικότητα (πάνω από 60% κινητά, με καλή ή άριστη προωθητική ικανότητα 2-3 ώρες μετά την εκσπερμάτωση) και φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων (20-200 εκατομμύρια/ml). Με τη τεχνική αυτή συλλέγονται τα σπερματοζωάρια με την καλύτερη κινητικότητα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- i. Μετά τη συλλογή του, το δείγμα παραμένει στο θάλαμο βιολογικής ασφάλειας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά, μέχρι να ρευστοποιηθεί.
- ii. Μεταφέρεται μια μικρή ποσότητα στη συσκευή υπολογισμού συγκέντρωσης Makler και εξετάζεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ελέγχεται ο αριθμός, η μορφολογία, η συγκέντρωση και η κίνηση των σπερματοζωαρίων.
- iii. Τοποθετείται το δείγμα στον πυθμένα ενός σωλήνα (Falcon) των 15 ml και προστίθεται καλλιεργητικό μέσο ειδικό για σπερματοζωάρια, αντίστοιχου όγκου (sperm medium preparation, Medicult media, origio, Ref Num. 10695060A).
- iv. Ο σωλήνας τοποθετείται σε πλάγια θέση σε κλίβανο με CO₂ στους 37°C για μία ώρα. Τα κινητά σπερματοζωάρια θα κινηθούν προς την επιφάνεια του καλλιεργητικού μέσου.
- v. Στη συνέχεια, μεταφέρουμε την υπερκείμενη ζώνη που έχει σχηματιστεί, στην οποία βρίσκονται συγκεντρωμένα τα πιο κινητά σπερματοζωάρια, σε νέο σωλήνα

τύπου Falcon, προσθέτουμε περίπου 2 ml καλλιεργητικού μέσου ειδικού για σπερματοζώαρια και φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά περίπου στα 200G.

- vi. Τέλος, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα ώστε να έχει την επιθυμητή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων.

7.2.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΜΕ ΦΥΓΟΚΕΝΤΡΗΣΗ ΣΕ ΜΕΣΟ ΔΙΑΒΑΘΜΙΣΜΕΝΩΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΩΝ (SPERM GRADIENT).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως σε δείγματα σπέρματος κακής ποιότητας, σε μορφολογία, κινητικότητα ή/και σε αριθμό. Η τεχνική στηρίζεται στο γεγονός ότι τα φυσιολογικά σπερματοζώαρια, τα ανώμαλα σπερματοζώαρια, καθώς και τα υπόλοιπα κύτταρα και βακτήρια που υπάρχουν στο σπέρμα, έχουν διαφορετικές πυκνότητες. Τα σπερματοζώαρια επιλέγονται με φυγοκέντρωση μέσω διαβαθμισμένων πυκνοτήτων. Αναλυτικά η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

- i. Μετά τη συλλογή του, το δείγμα παραμένει στο θάλαμο βιολογικής ασφάλειας σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά, μέχρι να ρευστοποιηθεί.
- ii. Μεταφέρεται μια μικρή ποσότητα στη συσκευή υπολογισμού συγκέντρωσης Makler και εξετάζεται στο οπτικό μικροσκόπιο. Ελέγχεται ο αριθμός, η μορφολογία, η συγκέντρωση και η κίνηση των σπερματοζωαρίων.
- iii. Σε ένα σωλήνα Falcon προσθέτουμε 2 ml διαλύματος 80% πυκνότητας, στη συνέχεια 2 ml διαλύματος 55% πάνω από το πρώτο διάλυμα και τέλος στη κορυφή μεταφέρουμε το δείγμα (55/80% Sperm Gradient, SupraSperm, Origio 10922060).
- iv. Φυγοκεντρούμε για 20 λεπτά στα 300 G. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης, αφαιρούμε το υπερκείμενο και μεταφέρουμε το ίζημα των σπερματοζωαρίων σε νέο σωλήνα Falcon.
- v. Επαναιωρούμε τα σπερματοζώαρια σε 2 ml καλλιεργητικού μέσου (sperm medium) και φυγοκεντρούμε για 15 λεπτά στα 300 G.

- vii. Τέλος, απομακρύνουμε το υπερκείμενο και επαναιωρούμε το ίζημα ώστε να έχει την επιθυμητή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων.

7.3 ΩΟΛΗΨΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΓΙΑ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO

Οι γυναίκες που υποβάλλονται σε μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ακολουθούν ειδική φαρμακευτική αγωγή με γοναδοτροπίνες (Pregnyl (hCG με δράση LH), Gonal f (θυλακιοτροπίνη Α, FSH Α), Puregon (θυλακιοτροπίνη βήτα, FSH Β)) με σκοπό τη πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας. Η ανάπτυξη των ωοθυλακίων παρακολουθείται υπερηχογραφικά και όταν αναπτυχθούν πλήρως, πραγματοποιείται ωοληψία με αναρρόφηση με τη χρήση βελόνας και ενδοκολπικού υπέρηχου. Με τη βοήθεια του υπέρηχου ο γιατρός κατευθύνει τη βελόνα στα ωοθυλάκια όπου με τη βελόνα αναρροφά το ωάριο και το ωοθυλακικό υγρό και τα συγκεντρώνει σε ειδικούς σωλήνες. Το υλικό που έχει συλλεχθεί ελέγχεται μικροσκοπικά για να διαπιστωθεί η παρουσία ή όχι ωαρίου. Τα ωάρια που εντοπίζονται μεταφέρονται σε ειδικά τρυβλία (4-well plates) που περιέχουν καλλιεργητικό υλικό (flushing medium, Medicult media, origio, Ref Num. 10840125A) ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα του αίματος και τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν. Τέλος τα ωάρια μεταφέρονται σε ειδικό καλλιεργητικό μέσο (Universal IVF medium with phenol red, Medicult media, origio, Ref Num. 10315060A) και τοποθετούνται σε ειδικό κλίβανο CO₂ στους 37°C μέχρι τη γονιμοποίηση.

7.4 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΩΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΛΟΓΗ ΤΩΝ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΕΡΩΝ ΓΙΑ ΤΙΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ.

Η αξιολόγηση των ωαρίων βασίζεται στη κατάσταση της ωρίμανσης του πυρήνα (nuclear maturation status), της μορφολογίας του κυτταροπλάσματος και των εξωκυτταροπλασματικών δομών. Ένα ωάριο χαρακτηρίζεται ώριμο και κατάλληλο για γονιμοποίηση όταν εμφανίζει μία φυσιολογική εικόνα κυτταροπλάσματος, ένα πολικό σωματίο, ενδιάμεσο πάχος διαφανούς ζώνης και το πρέπον περιλεκκιθικό διάστημα.



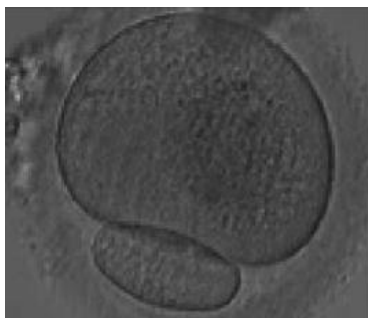
Εικόνα 25. Φυσιολογική μορφολογία ώριμου ωαρίου [234]

Τα ωάρια που προκύπτουν από τη διαδικασία της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, συχνά απέχουν μορφολογικά από το ιδανικό ωάριο που περιγράφεται προηγουμένως. Ανωμαλίες στη μορφολογία του πολικού σωματίου, του περιλεκκιθικού χώρου και του πάχους της διαφανούς ζώνης συχνά σχετίζονται με ωάρια προχωρημένης ηλικίας. Από την άλλη, ανωμαλίες στη μορφολογία του κυτταροπλάσματος, όπως κοκκιώδης μορφολογία ή παρουσία κενοτοπίων, αποδεικνύονται καταστροφικές για τη βιωσιμότητα του ωαρίου. Αποκλίσεις από τη φυσιολογική μορφολογία του ωαρίου μπορούν να υποδεικνύουν γενετικές ανωμαλίες, όπως για παράδειγμα στα υπερμεγέθη ωάρια τα οποία περιέχουν ένα επιπλέον ζεύγος χρωμοσωμάτων. Στη συνέχεια παρατίθενται εικόνες ωαρίων με ανώμαλη μορφολογία (Πίνακας 1).

ΩΑΡΙΑ ΜΕ ΑΝΩΜΑΛΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ



Εικόνα 1. Γιγαντιαίο ωάριο χωρίς PB



Εικόνα 2. ΜΙΙ ωάριο με υπερμεγέθεις PB



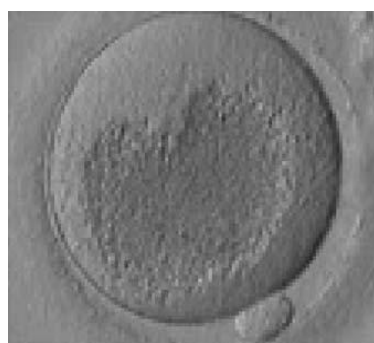
Εικόνα 3. ΜΙΙ ωάριο με υπερμεγέθεις PB και μεγάλα fragments στον PVS



Εικόνα 4. Ωάριο με μεγάλο PVS και αρκετά fragments



Εικόνα 5. Ωάριο με ανώμαλη ΖΡ όπου εμφανίζεται πάχυνση της ζώνης, δύσμορφο κυτταρόπλασμα και απουσιάζει το PB



Εικόνα 6. ΜΙΙ ωάριο όπου στο κέντρο εντοπίζεται μεγάλη περιοχή με κοκκώδες κυτταρόπλασμα



Εικόνα 7. Ωάριο με μεγάλο κενोटόπιο το οποίο καλύπτει σχεδόν το 50% του κυτταροπλάσματος



Εικόνα 8. Ωάριο με πολλά κενोटόπια.

Πίνακας 1. Ωάρια με ανώμαλη μορφολογία [234]

7.5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Η προσέγγιση για την αντιμετώπιση των προβλημάτων υπογονιμότητας είναι πολύπλευρη και περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους ανάλογα με το υπόβαθρο του προβλήματος. Κατά περίπτωση λοιπόν, μπορούν να εφαρμόζονται πιο απλές μέθοδοι αντιμετώπισης της υπογονιμότητας, όπως είναι η σπερματέγχυση (έγχυση σπέρματος στη μήτρα της γυναίκας) σε συνδυασμό με ήπια πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας ή μεταφορά γαμετών στις σάλπιγγες (GIFT), ενώ σε πιο σοβαρές περιπτώσεις επιλέγονται πιο δραστικές μέθοδοι όπως εξωσωματική γονιμοποίηση in vitro (IVF) ή μικρογονιμοποίηση (ICSI, Intra Cytoplasmic Sperm Injection).

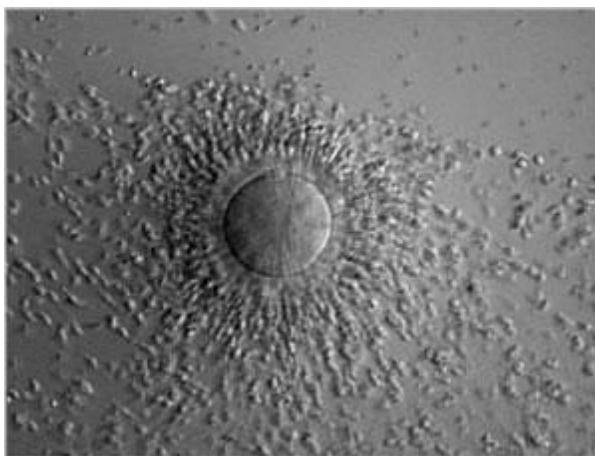
7.5.1 ΕΞΩΣΩΜΑΤΙΚΗ ΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ IN VITRO (IVF)

Αποτελεί τη συχνότερα εφαρμοζόμενη μέθοδο υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις όπου τα σπερματοζώαρια είναι καλής ποιότητας και ικανά να γονιμοποιήσουν τα ωάρια χωρίς παρέμβαση. Η διαδικασία που ακολουθείται περιγράφεται στη συνέχεια:

- i. Μετά την ωοληψία και την αξιολόγηση των ωαρίων (Εικόνα 24, Πίνακας 1), επιλέγονται τα καταλληλότερα ωάρια και μεταφέρονται σε τρυβλία με σταγόνες καλλιεργητικού υλικού (Universal IVF medium) των 50μl οι οποίες καλύπτονται από ειδικό λάδι (liquid paraffin, Medicult media, origio, Ref Num. 10100500A) για να μην οξειδώνονται.
- ii. Σε κάθε σταγόνα, που περιέχει ένα ωάριο, προστίθεται μικροποσότητα από το επεξεργασμένο σπέρμα και το τρυβλίο τοποθετείται στον ειδικό κλίβανο μέχρι την επόμενη μέρα όπου θα ελεγχθούν αν έχουν γονιμοποιηθεί (Εικόνα 25).
- iii. Την επόμενη μέρα (ημέρα 1^η), τα ωάρια απομακρύνονται από τις σταγόνες ώστε να καθαριστούν και μεταφέρονται σε νέο τρυβλίο με σταγόνες καλλιεργητικού υλικού (Universal IVF medium) των 20μl οι οποίες καλύπτονται από ειδικό λάδι (liquid paraffin). Στη συνέχεια, εξετάζονται με το μικροσκόπιο για να διαπιστωθεί αν έχουν γονιμοποιηθεί και ελέγχεται η μορφολογία τους (Πίνακας 2).

Γονιμοποιημένα θεωρούνται όσα εμφανίζουν δύο προπυρήνες. Έπειτα το τρυβλίο μεταφέρεται στον ειδικό κλίβανο.

- iv. Την δεύτερη μέρα μετά τη γονιμοποίηση, τα έμβρυα αξιολογούνται ως προς το βαθμό ανάπτυξης και τη μορφολογία τους (φυσιολογικά βρίσκονται στο στάδιο των 2-4 κυττάρων) (Πίνακας 3). Στη συνέχεια είτε μπορούν να επιλεγθούν τα καλύτερα (Πίνακας 4) για εμβρυομεταφορά στη μήτρα της γυναίκας είτε να συνεχιστεί η ανάπτυξή τους μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης.
- v. Αν δεν πραγματοποιηθεί η εμβρυομεταφορά τη δεύτερη μέρα, τα έμβρυα μεταφέρονται σε νέες σταγόνες καλλιεργητικού μέσου ειδικού για βλαστοκύστες (Sydney IVF Blastocyst Medium, CookMedical, Ref Num. K-SIBM-20/G20722) οι οποίες καλύπτονται από ειδικό λάδι και το τρυβλίο τοποθετείται στον κλίβανο.
- vi. Την πέμπτη μέρα, αξιολογείται η ανάπτυξη και η μορφολογία των εμβρύων, τα οποία θα πρέπει φυσιολογικά να βρίσκονται στο στάδιο της βλαστοκύστης (Πίνακας 3). Τα καταλληλότερα έμβρυα (Πίνακας 4) επιλέγονται για εμβρυομεταφορά στη μήτρα της γυναίκας.



Εικόνα 25. Επώαση ωαρίου παρουσία μικροποσότητας σπέρματος στα πλαίσια της IVF

7.5.2 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ (ICSI)

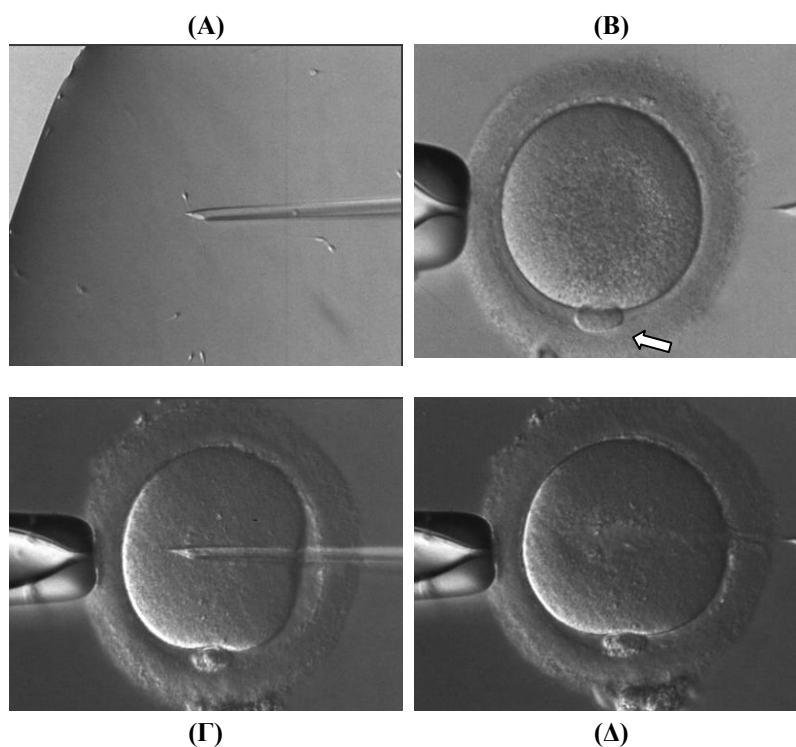
Η μέθοδος ICSI βασίζεται στην έγχυση ενός σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου. Χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου τα σπερματοζώαρια

είναι πολύ κακής ποιότητας (χαμηλός αριθμός $<1 \times 10^6$, ανώμαλη μορφολογία, πρόβλημα κινητικότητας κλπ). Η διαδικασία που ακολουθείται έχει αρκετές ομοιότητες με αυτή της IVF. Αναλυτικότερα,

- i. Μετά την ωοληψία, τα ωάρια μεταφέρονται σε σταγόνες υαλουρονιδάσης (SynVITRO Hyadase (Origio RefNum. 15115001), οι οποίες καλύπτονται με ειδικό λάδι, όπου και παραμένουν για περίπου 20 λεπτά στον ειδικό κλίβανο. Η υαλουρονιδάση είναι ειδικό ένζυμο που διασπά τους δεσμούς μεταξύ των κοκκωδών κυττάρων και επιτρέπει την απομάκρυνση τους από τα ωάρια. Μετά τον καθαρισμό τους, τα ωάρια μεταφέρονται σε τρυβλία με σταγόνες καλλιεργητικού υλικού (IVF medium) των 50μl οι οποίες καλύπτονται από ειδικό λάδι.
- ii. Έπειτα γίνεται η αξιολόγηση των ωαρίων (Εικόνα 24, Πίνακας 1), επιλέγονται τα καταλληλότερα ωάρια και μεταφέρονται σε τρυβλία με σταγόνες καλλιεργητικού υλικού (Universal IVF medium) των 5μl οι οποίες καλύπτονται από το ειδικό λάδι, ενώ μία σταγόνα ειδικού μέσου (PVP Clinical Grade, Origio, Ref Num. 10905000) περιέχει το επεξεργασμένο σπέρμα.
- iii. Το τρυβλίο μεταφέρεται στο ειδικό μικροσκόπιο ICSI όπου θα πραγματοποιηθεί η μικρογονιμοποίηση.
- iv. Με την ειδική μικροπιπέτα μικροέγχυσης (injection), επιλέγεται το κατάλληλο σπερματοζώαριο.
 - i. Το ωάριο συγκρατείται με την ειδική μικροπιπέτα (holding), μέσω αναρρόφησης, προσέχοντας το πολικό σωματίο να βρίσκεται στον κάθετο άξονα του οπτικού μας πεδίου ("ώρα 12" ή "ώρα 6").
 - ii. Φέρνουμε το σπερματοζώαριο στην άκρη της μικροπιπέτας και διαπερνούμε τη διαφανή ζώνη και την κυτταροπλασματική μεμβράνη του ωαρίου μέχρι να φτάσουμε στο 75% του κυτταροπλάσματος. Αναρροφούμε ελαφρώς το κυτταρόπλασμα για να βεβαιωθούμε ότι έχουμε εισχωρήσει και το εκχέουμε μαζί με το σπερματοζώαριο. Το σημείο εισόδου της μικροπιπέτας έγχυσης πρέπει να βρίσκεται στον οριζόντιο άξονα με βάση το οπτικό μας πεδίο ("ώρα 3" ή "ώρα 9").

- iii. Τα ωάρια μεταφέρονται σε τρυβλία με σταγόνες καλλιεργητικού υλικού (IVF medium) των 20μl οι οποίες καλύπτονται από ειδικό λάδι (liquid paraffin) και τοποθετούνται στον ειδικό κλίβανο μέχρι την επόμενη μέρα όπου θα ελεγχθούν για να διαπιστωθεί εάν έχουν γονιμοποιηθεί.

Η διαδικασία περαιτέρω είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται στην IVF.



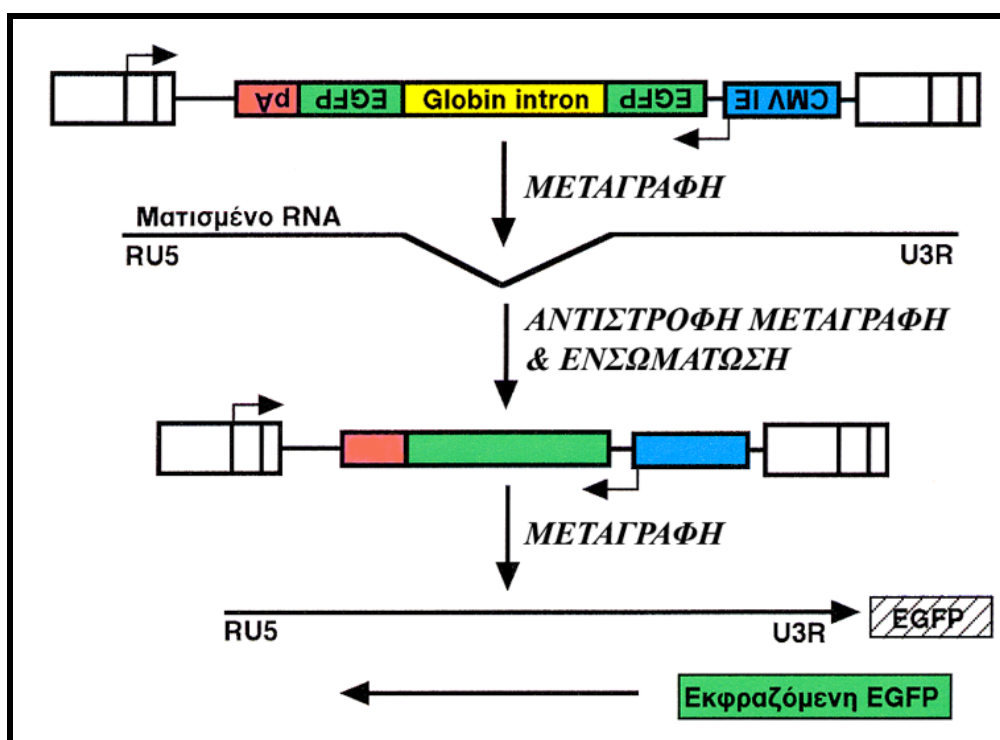
Εικόνα 26. Μικρογονιμοποίηση ωαρίου. **(Α)** Επιλογή σπερματοζωαρίου, **(Β)** Ακινητοποίηση ωαρίου, **(Γ)** Είσοδος του σπερματοζωαρίου στο κυτταρόπλασμα του ωαρίου, **(Δ)** Απομάκρυνση της μικροπιπέτας Με το βέλος υποδεικνύεται η θέση του πολικού σωματίου

7.6 ΜΙΚΡΟΓΟΝΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕ ΕΝΘΕΣΗ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ L1

Για να μελετήσουμε τα αποτελέσματα της επαγόμενης ρετρομετάθεσης στον επιγενετικό μηχανισμό και στη σταθερότητα του γενώματος, χρησιμοποιήσαμε ένα ανασυνδυσασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο L1 (ευγενική χορηγία του καθηγητή κΤζαβάρα, Εργαστήριο Βιολογίας, Ιατρική σχολή Παν/μίου Ιωαννίνων).

Το ρετρομεταθετό στοιχείο επώαστηκε με τα σπερματοζώαρια, για τα οποία πρωτίστως είχε ακολουθηθεί η απαραίτητη διαδικασία προετοιμασίας για ICSI (swim up ή gradient). Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο της μικρογονιμοποίησης με τη μοναδική παραλλαγή να εντοπίζεται στο γεγονός ότι μαζί με το σπερματοζώαριο έγινε έγχυση και μικροποσότητας του ανασυνδυασμένου L1.

Το ανασυνδυασμένο L1 φέρει το γονίδιο EGFP το οποίο εκφράζεται μόνο όταν υπάρχουν ενεργά γεγονότα ρετρομετάθεσης. Η έκφραση της EGFP και κατ'έκταση φαινομένων ρετρομετάθεσης, ανιχνεύεται με φθορίζον μικροσκόπιο.



Εικόνα 26. Σχηματική αναπαράσταση ανασυνδυασμένου ρετρομεταθετού στοιχείου για την ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της εκφραζόμενης EGFP

7.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΩΝ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Όσον αφορά το ζυγωτό, η μορφολογικά ορθή δομή του χαρακτηρίζεται από τη παρουσία δύο ίδιου μεγέθους προπυρήνων στο κέντρο του κυττάρου, με πλήρως ανεπτυγμένες μεμβράνες και δύο ισομεγέθη πολικά σωματίδια (Πίνακας 4). Παρέκκλιση στο μέγεθος μεταξύ των προπυρήνων ($> 4\mu\text{m}$), στη θέση τους στο κυτταρόπλασμα

(απομακρυσμένοι μεταξύ τους ή περιφερειακά τοποθετημένοι) και στον αριθμό των προπυρήνων (1 ή 3 και περισσότεροι) σχετίζεται με ανευπλοειδίες και διακοπή της ανάπτυξης. Το ίδιο ισχύει και για τα πολικά σωμάτια όπου παρέκκλιση στον αριθμό, μέγεθος και στην κατανομή τους οδηγεί σε ανώμαλη ανάπτυξη του εμβρύου (Πίνακας 2).

ΖΥΓΩΤΑ ΑΝΩΜΑΛΗΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ



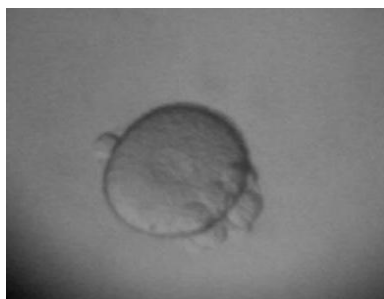
Εικόνα 1. Ζυγωτό με ένα μόνο πολικό σωμάτιο και ένα προπυρήνα.



Εικόνα 2. Ζυγωτό με 3PN, 2PB, μεγάλο PVS και παχιά ΖΡ



Εικόνα 3. Ζυγωτό με κοκκώδες κυτταρόπλασμα στο κέντρο και κατακερματισμένο πολικό σωμάτιο.



Εικόνα 4 Ζυγωτό με ένα προπυρήνα και επτά πολικά σωμάτια.

Πίνακας 2. Ζυγωτά ανώμαλης μορφολογίας [234]

Στα στάδια των μιτωτικών διαιρέσεων (cleavage stage embryo) μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, η αξιολόγηση των εμβρύων γίνεται βάσει του αριθμού των βλαστομεριδίων, του ποσοστού κατάτμησης (fragmentation), της συμμετρίας των βλαστομεριδίων, τις παρουσίας πολλαπλών πυρήνων (multinucleation) και του βαθμού

συμπύκνωσης (compaction status). Ένα καλής ποιότητας έμβρυο διαιρείται συγχρονισμένα περίπου κάθε 18-20 ώρες (stage-specific embryos). Έμβρυα τα οποία διαιρούνται με πιο αργούς ή γρήγορους ρυθμούς πιθανώς να χαρακτηρίζονται από μεταβολικές διαταραχές και χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Επιπλέον το αποτέλεσμα της μιτωτικής διαίρεσης του εμβρύου πρέπει να είναι δύο ισομεγέθη βλαστομερίδια (<25% διαφορά μεγέθους) με ένα πυρήνα το καθένα. Στην περίπτωση που τα κύτταρα δεν διαιρούνται συγχρονισμένα (έμβρυα 3,5,7 βλαστομεριδίων), τότε θα πρέπει ένα ή περισσότερα βλαστομερίδια να έχουν διαφορετικό μέγεθος από τα υπόλοιπα καθώς δεν έχουν ακόμα διαιρεθεί (non-stage-specific embryos). Στο στάδιο των τεσσάρων κυττάρων τα βλαστομερίδια πρέπει να είναι σχηματίζουν τετράεδρο. Συχνά κατά τη διαδικασία της μίτωσης μικρά τμήματα του κυτταροπλάσματος αποκόπτονται από το κύτταρο σχηματίζοντας μικρές απύρηνες δομές περιβαλλόμενος από κυτταροπλασματική μεμβράνη (fragments). Υψηλά ποσοστά κατάτμησης (>10%) στο έμβρυο έχουν συσχετιστεί με ανευπλοειδίες. Τέλος, όσον αφορά το κριτήριο της συμπύκνωσης, η αξιολόγηση βασίζεται στο ποσοστό των βλαστομεριδίων που εμφανίζονται συμπυκνωμένα και στη μορφολογία του συμπυκνωμένου εμβρύου.

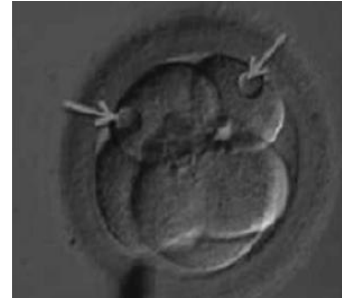
ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ ΜΕ ΑΝΩΜΑΛΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ



Εικόνα 1. Έμβρυο 3-κυττάρων με υψηλά ποσοστά κατακερματισμού και ανισομεγέθη βλαστομερίδια.



Εικόνα 2. Έμβρυο 2-κυττάρων με εμφανή 2 μεγάλα κενोटόπια στα βλαστομερίδια και 15% κατακερματισμό.



Εικόνα 3. Έμβρυο 5-κυττάρων με δύο μικρά βλαστομερίδια, τα οποία φέρουν από ένα κενोटόπιο (επισημαίνονται με βέλη).



Εικόνα 4. Έμβρυο 3-κυττάρων με εμφανείς πυρήνες και απουσία διαφανούς ζώνης.



Εικόνα 5. Έμβρυο 4-κυττάρων με ανισομεγέθη βλαστομερίδια και επιμηκυμένη διαφανή ζώνη.



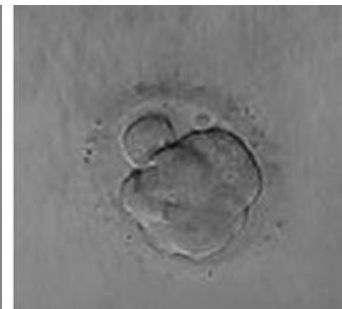
Εικόνα 6. Έμβρυο ωοειδούς σχήματος, αποτελούμενο από 7 κύτταρα διατεταγμένα στο ίδιο επίπεδο και δύσμορφη διαφανή ζώνη.



Εικόνα 7. Έμβρυο 8-κυττάρων με ελλειπή σημάδια συμπίκνωσης.



Εικόνα 8. Έμβρυο 4-κυττάρων όπου διακρίνονται σημάδια πρόωρης συμπίκνωσης



Εικόνα 9. Μορίδιο κακής ποιότητας. Τα όρια των βλαστομεριδίων είναι ακόμα διακριτά ενώ ένα βλαστομερίδιο διέφυγε της διαδικασίας της συμπίκνωσης.

Πίνακας 3. Προεμφυτευτικά έμβρυα με ανώμαλη μορφολογία. [234]

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



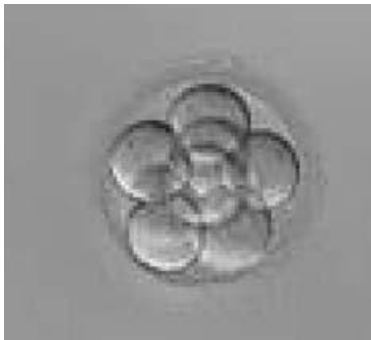
Εικόνα 1. Ζυγωτό 15h μετά τη γονιμοποίηση. Είναι ορατά 2PBs και 2PNs.



Εικόνα 27 Ημέρα 1η. Έμβρυο 2 κυττάρων με ισομεγέθη βλαστομερίδια.



Εικόνα 28 Ημέρα 2η. Μετά τη δεύτερη μιτωτική διαίρεση το έμβρυο αποτελείται από 4 ισομεγέθη βλαστομερίδια.



Εικόνα 429. Ημέρα 3η. Το έμβρυο αποτελείται από 8 ισομεγέθη βλαστομερίδια.



Εικόνα 530. Ημέρα 4η. Μορίδιο άριστης ποιότητας. Όλα τα βλαστομερίδια συμμετέχουν στη διαδικασία της συμπύκνωσης. Δεν διακρίνεται κάποιο κύτταρο.



Εικόνα 6. Ημέρα 5η. Βλαστοκύστη άριστης ποιότητας. Στη θέση "10 o'clock" διαρκίνεται η ICM όπου τα κύτταρα εμφανίζουν υψηλό βαθμό συμπύκνωσης.

Πίνακας 4. Φυσιολογική μορφολογία του εμβρύου στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης. [234]

7.8 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΝΟΣΟΦΘΟΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΩΑΡΙΑ, ΖΥΓΩΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ.

Αφαιρούμε τη διαφανή ζώνη μεταφέροντας τα δείγματα σε σταγόνες 50μL διαλύματος acidic tyrode's (pH 2.5) (Tyrode's Solution, Sigma Aldrich T2145)

- i. Όταν έχει απομακρυνθεί η διαφανή ζώνη, μεταφέρουμε τα δείγματα σε νέες σταγόνες διαλύματος M2 καλλιεργητικού + 0.3% BSA(Universal IVF medium with phenol red, Medicult media, origio, Ref Num. 10315060A, Albumin from bovine serum BSA, A9418 Sigma) ώστε να απομακρυνθεί το προηγούμενο διάλυμα
- ii. Ακολουθεί η μονιμοποίηση των δειγμάτων σε 4% παραφορμαδεύδη (Paraformaldehyde, extra pure, 500g, Scharlau PA00950500, PBS Gibco ref 14190-086) για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- iii. Για να αποκτήσουν τα δείγματα υψηλή διαπερατότητα, τα μεταφέρουμε σε διάλυμα 0.2% Triton-X 100 (Triton X, SIGMA-Aldrich T8787)σε PBS για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- iv. Για να καταστήσουμε τον πυρήνα προσβάσιμο στα αντισώματα, επωάζουμε τα δείγματα σε διάλυμα HCL 4N (Hydrochloric acid 320331, Sigma-Aldrich, ACS reagent, 37%) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Αποτέλεσμα αυτού, είναι η απομάκρυνση των βάσεων πουρίνης (αδενίνη και γουανίνη, depurination) από το DNA και η μετουσίωσή του (denaturation). Το στάδιο αυτό εφαρμόζεται μόνο όταν ελέγχουμε τη μεθυλίωση με τη χρήση του αντισώματος για τη 5-μεθυλοκυτιδίνη
- v. Τα δείγματα μεταφέρονται σε διάλυμα Tris-Cl, pH 8.0, (TrisCl Trizma® hydrochloride, T5941 Sigma) για να εξουδετερωθεί η δράση του HCL.
- vi. Στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται σε διάλυμα 1% BSA, 0.2% Triton X-100 σε PBS, στους 4 °C για όλη τη διάρκεια της νύχτας ώστε να εξουδετερώσουμε μη ειδικές ενδείξεις φθορισμού.

- vii. Την επόμενη μέρα τα δείγματα επωάζονται στα πρωτεύοντα αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είναι ειδικά για τους παράγοντες πολυδυναμίας Oct-4, Nanog, SOX2, την πρωτεΐνη E-Cadherin καθώς επίσης για τη 5-μεθυλοκυτιδίνη και το δείκτη θραύσεων της διπλής έλικας του DNA, γH2AX.
- viii. Απομακρύνουμε τα πρωτεύοντα αντισώματα με διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων σε διάλυμα 0.05% Tween 20 σε PBS (PBST) (Tween-20, Sigma-Aldrich P1379)
- ix. Τα δείγματα επωάζονται στα δευτερεύοντα αντισώματα, τα οποία είναι ειδικά για κάθε πρωτεΐον αντίσωμα, για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου σε απόλυτο σκοτάδι.
- x. Απομακρύνουμε τα δευτερεύοντα αντισώματα με διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων σε διάλυμα 0.05% Tween 20 σε PBS (PBST)
- xi. Τα δείγματα μεταφέρονται σε διάλυμα DAPI 20μg/ml (DAPI, dilactate, D9564 Sigma-Aldrich για 10 λεπτά σε απόλυτο σκοτάδι. Με αυτό το στάδιο επιτυγχάνουμε τη χρώση των πυρήνων των κυττάρων ώστε να είναι ορατοί στο φθορίζον μικροσκόπιο.
- xii. Απομακρύνουμε το DAPI με διαδοχικές πλύσεις των δειγμάτων σε διάλυμα 0.05% Tween 20 σε PBS (PBST)
- xiii. Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε πλακάκια μικροσκοπίου, σε σταγόνες διαλύματος γλυκερόλης (ProLong® Gold Antifade Reagent, Invitrogen, Ref Num P36930) ώστε να περιοριστεί η εξασθένηση των σημάτων φθορισμού και καλύπτονται με καλυπτρίδες.
- xiv. Τέλος, τα σήματα φθορισμού αναλύονται σε φθορίζον και σε ομοεστιακό μικροσκόπιο (confocal microscope) με τη χρήση UV ακτινοβολίας και τα κατάλληλα φίλτρα, ανάλογα με τη σήμανση του δευτερεύοντος αντισώματος (FITC, Cy3, κλπ)

ΠΡΩΤΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- Anti-5-Methylcytidine monoclonal antibody vs 5-Methylcytidine, (Mouse IgG1/λ, Purified Ascites, 100μg, Ref: BI-MECY-0100, Eurogentec)
- Anti-gamma H2A.X(phosphor S139) Rabbit IgG polyclonal antibody (Ref: ab11174, ABCAM)
- Anti-Nanog antibody Rabbit polyclonal to Nanog (Ref: ab80892, ABCAM)
- Oct-3/4 Antibody Mouse monoclonal IgG2b (C-10) (Ref: sc-5279, Santa Cruz)
- Anti-SOX2 antibody Mouse monoclonal [9-9-3] (Ref: ab79351, ABCAM)
- E-cadherin Antibody rat monoclonal IgG1 (DECMA-1): (Ref: sc-59778, Santa Cruz)

ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΝΤΑ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΑ

- Alexa Fluor 488-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Ref: 711-545-152)
- Cy3-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Ref: 715-165-150)
- Cy3 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Ref: 711-165-152)
- Fitc Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Ref: 715-095-150)
- Cy3 Donkey Anti-Rat IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, Ref: 712-165-150)

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

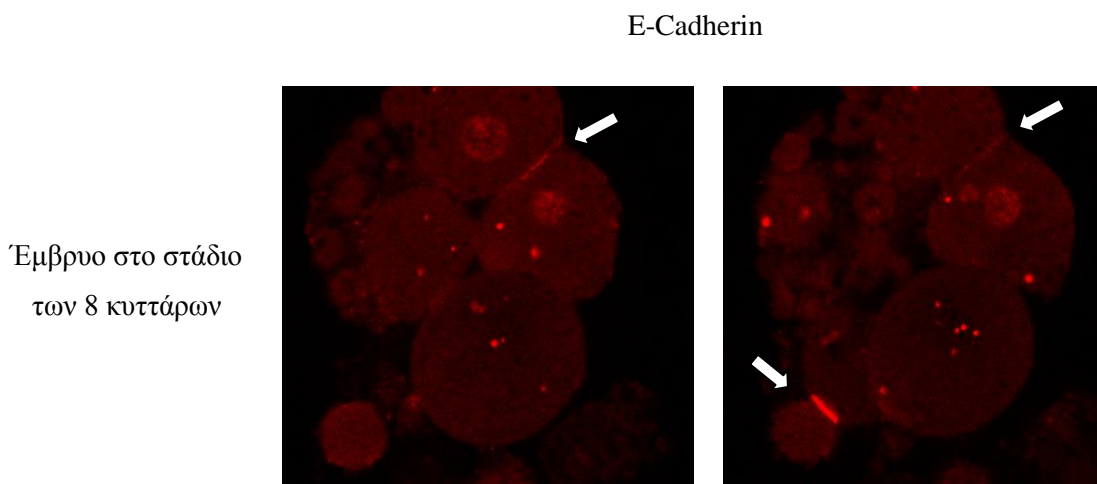
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

8.1 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ OCT-3/4, NANOG, SOX2 ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

Το πρότυπο έκφρασης των παραγόντων πολυδυναμίας μελετήθηκε με την μέθοδο του ανοσοφθορισμού (immunofluorescence, IF) σε ανθρώπινα προεμφυτευτικά έμβρυα καθώς και ανώριμα και ώριμα ωοκύτταρα.

8.1.1 E-Cadherin

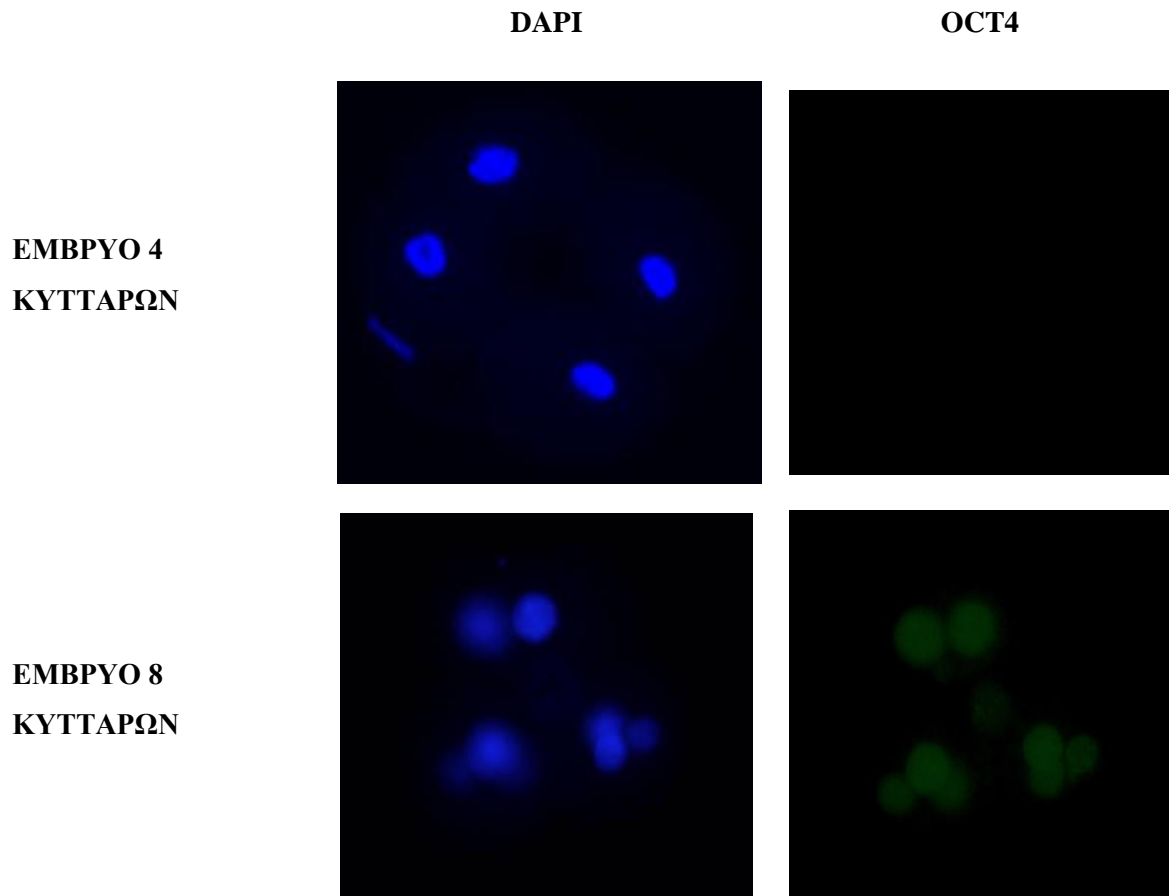
Η παρουσία της πρωτεΐνης E-cadherin εντοπίστηκε για πρώτη φορά σε έμβρυο που βρισκόταν στο στάδιο των 8 κυττάρων, στις περιοχές επαφής μεταξύ των βλαστομεριδίων.



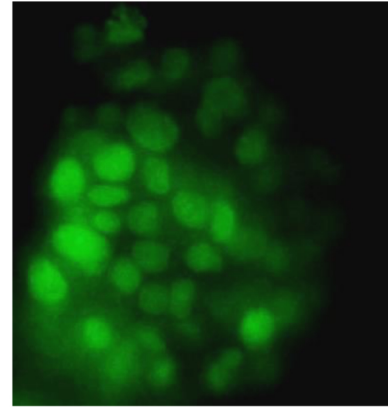
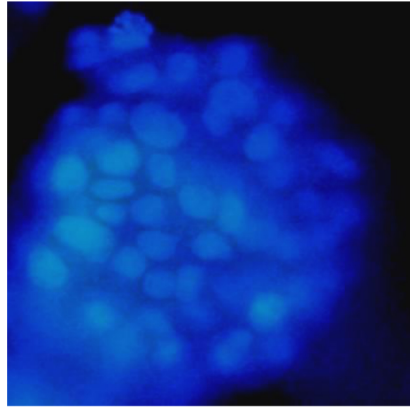
Πίνακας 5. Εικόνες από συνεστιακό μικροσκόπιο (confocal) εμβρύου 8 κυττάρων όπου διακρίνεται η παρουσία της E-Cadherin στα σημεία επαφής των βλαστομεριδίων (υποδεικνύεται με βέλη)

8.1.2 Oct-4

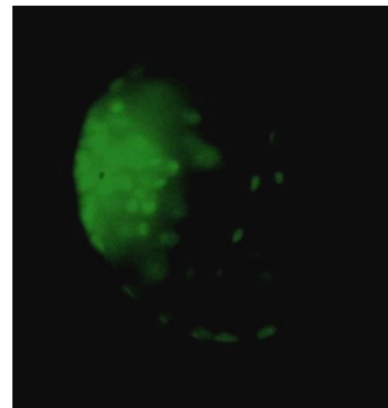
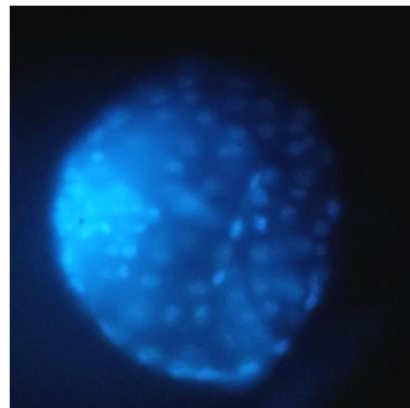
Ο παράγοντας Oct-4 ανιχνεύθηκε να εκφράζεται σε πιο πρώιμα στάδια ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου σε σχέση με τους άλλους δύο παράγοντες, Nanog και Sox2. Στα ανώριμα (GV, MI) και ώριμα ωοκύτταρα (MII) δεν ανιχνεύθηκε κανένα σήμα φθορισμού το οποίο θα αποκάλυπτε την ύπαρξη της πρωτεΐνης OCT-4. Ομοίως, την ίδια εικόνα παρουσίασαν και έμβρυα από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι και το στάδιο των 4 κυττάρων. Τα πρώτα σήματα φθορισμού ανιχνεύθηκαν στο μεταβατικό στάδιο του εμβρύου από τα 4 στα 8 κύτταρα. Στο στάδιο αυτό, τα σήματα ήταν ισχυρά και εντοπιζόνταν στην περιοχή του πυρήνα. Ισχυρά πυρηνικά σήματα παρατηρήθηκαν σε έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων μέχρι και το στάδιο του μοριδίου. Στο στάδιο της βλαστοκύστης, ο φθορισμός περιοριζόταν στα κύτταρα της ICM.



ΜΟΡΙΔΙΟ



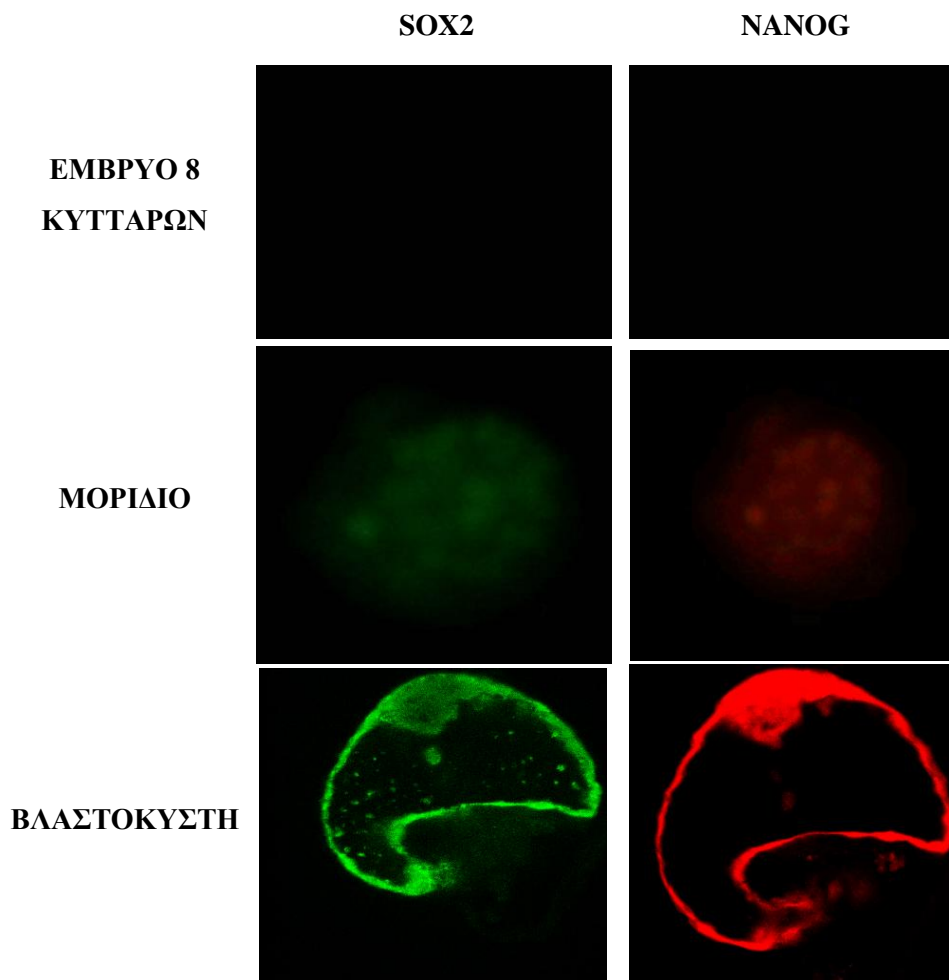
ΒΛΑΣΤΟΚΥΣΤΗ



Πίνακας 6. Πρότυπο έκφρασης του Oct-4 στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου

8.1.3 Nanog και Sox2

Οι παράγοντες πολυδυναμίας Nanog και Sox2, σε αντίθεση με τον παράγοντα Oct-4, δεν ανιχνεύθηκαν να εκφράζονται στα ωοκύτταρα (GV,MI,MIΙ) και στα προεμφυτευτικά στάδια από το ζυγωτό έως το στάδιο του μοριδίου. Για πρώτη φορά ανιχνεύθηκε έκφραση των παραγόντων στο στάδιο του μοριδίου στην περιοχή των πυρήνων. Ομοίως με τον παράγοντα Oct-3/4, στο στάδιο της βλαστοκύστης ο φθορισμός περιορίζονταν στα κύτταρα της ICM.



Πίνακας 7. Πρότυπο έκφρασης των παραγόντων Nanog και Sox2 στο προεμφυτευτικό έμβρυο

8.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

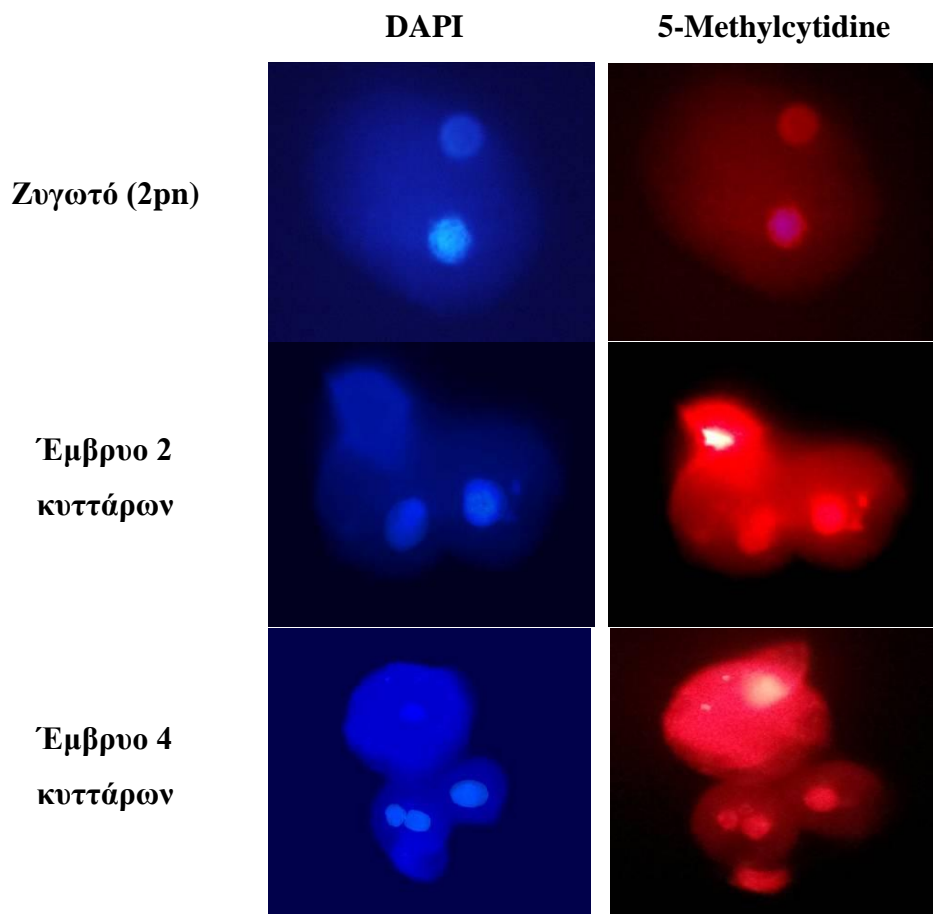
Είναι γνωστό ότι με τη γονιμοποίηση δίνεται το έναυσμα επαναπροσδιορισμού του γονεϊκού προτύπου μεθυλίωσης που φέρουν οι γαμέτες. Τα πρότυπα μεθυλίωσης των γαμετών διαγράφονται, χωρίς όμως να χάνονται τα επιγενετικά σημάδια και εγκαθιδρύεται ένα νέο πρότυπο μεθυλίωσης.

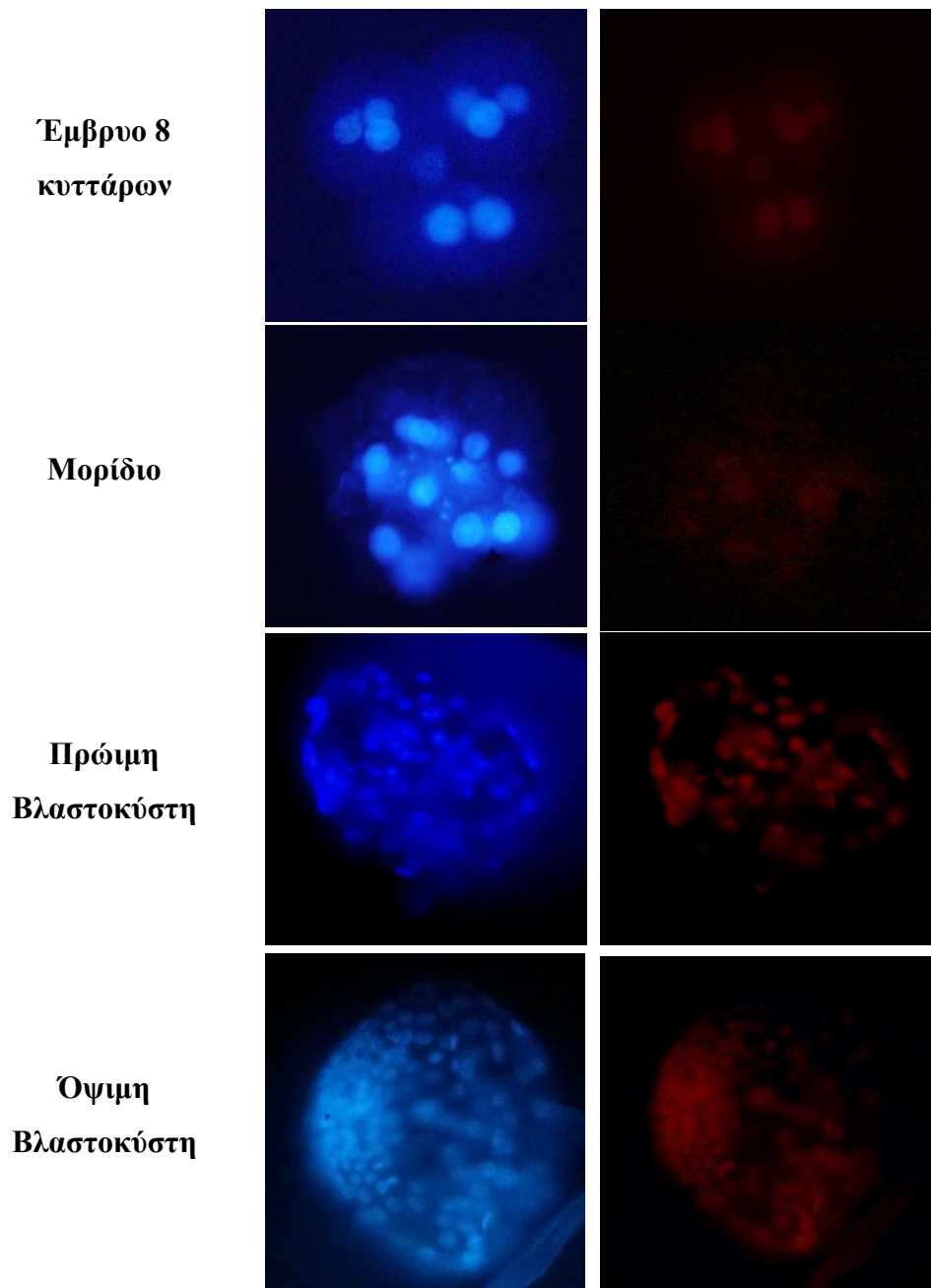
Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και τη χρήση ειδικού φθορίζοντος αντισώματος έναντι της 5-μεθυλοκυτοσίνης, μελετήσαμε τη πορεία της απομεθυλίωσης

και της εκ νέου μεθυλίωσης από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι και το στάδιο της βλαστοκύστης.

Το φθορίζον αντίσωμα που χρησιμοποιήσαμε αναγνωρίζει και προσδενεται στις μεθυλομάδες που υπάρχουν στις μεθυλιωμένες κυτοσίνες του DNA. Έπειτα, με τη χρήση μικροσκοπίου φθορισμού ανιχνεύαμε τα σήματα φθορισμού στα κύτταρα. Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA.

Στους θηλυκούς γαμέτες καθώς και στα στάδια από το ζυγωτό έως και το στάδιο των 8 κυττάρων, ανιχνεύαμε έντονα σήματα φθορισμού υποδηλώνοντας την ισχυρή μεθυλίωση του DNA. Μετά το στάδιο των 8 κυττάρων το σήμα άρχισε να εξασθενεί μέχρι το στάδιο του μοριδίου όπου είχε σχεδόν εξαφανισθεί. Μετά το στάδιο του μοριδίου, τα σήματα άρχισαν πάλι να γίνονται πιο έντονα, με αποκορύφωση το στάδιο της βλαστοκύστης.





Πίνακας 8. Επαναπροσδιορισμός της μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια του εμβρύου

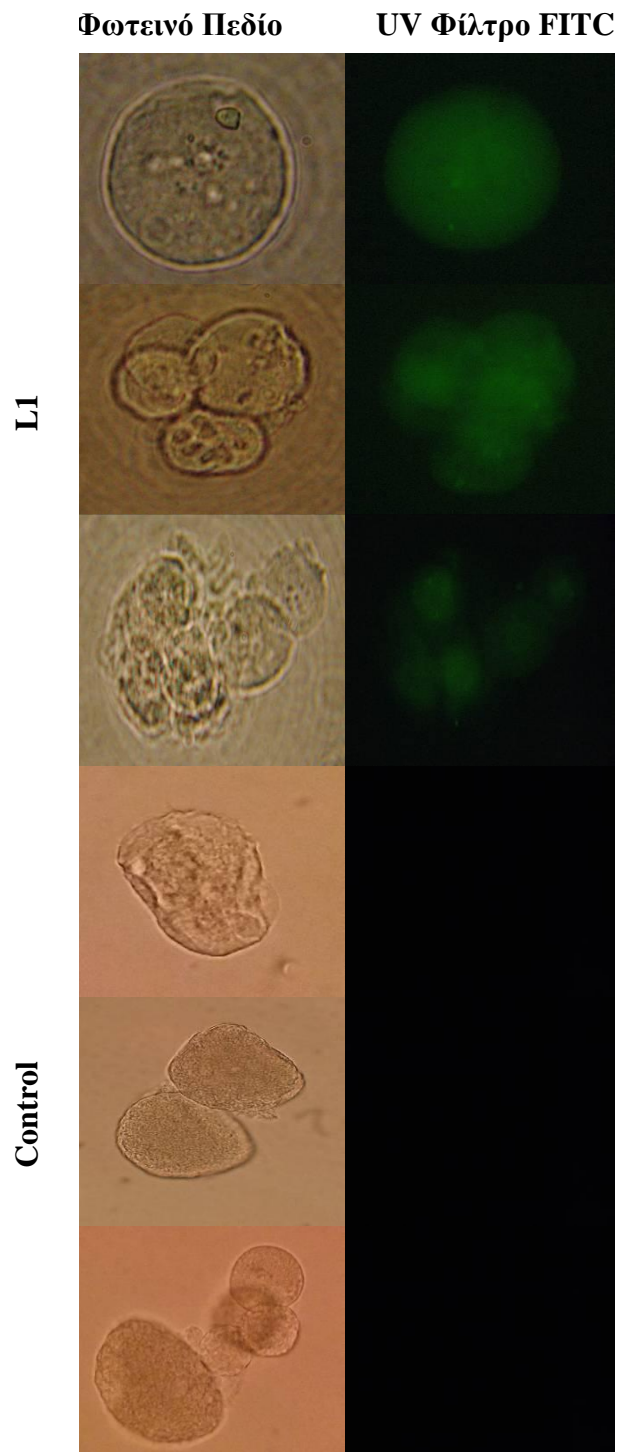
8.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ L1 ΣΤΟΥΣ ΘΗΛΥΚΟΥΣ ΓΑΜΕΤΕΣ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ.

Προκειμένου να καταστεί δυνατή η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης, καθώς ο αριθμός αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων που βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες στα ωάρια και στα προεμφυτευτικά έμβρυα είναι πολύ μικρός, κρίθηκε απαραίτητη η χρήση ανασυνδυασμένων ρετρομεταθετών στοιχείων L1. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήσαμε ανασυνδυασμένο L1 σημασμένο με ειδική κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης, που βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP όταν πραγματοποιείται ένα γεγονός ρετρομετάθεσης.

Η λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης βασίζεται στην κλωνοποίηση της κασέτας σε αντίθετη μεταγραφική φορά σε σχέση με εκείνη του ρετρομεταθετού στοιχείου. Όταν μεταγράφεται το στοιχείο χωρίς την πραγματοποίηση γεγονότος ρετρομετάθεσης, το υβριδικό μεταγράφημα στοιχείου/κασέτας υφίσταται μάτισμα χωρίς να εκφράζεται το γονίδιο της EGFP. Αντίθετα, όταν λαμβάνει χώρα κάποιο γεγονός ρετρομετάθεσης, όπου το μεταγράφημα ενσωματώνεται σε μία νέα θέση στο γένωμα, εκφράζεται η EGFP. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο μας χορηγήθηκε από τον Καθηγητή κ. Τζαβάρα (εργαστήριο γενικής βιολογίας, Ιατρικής σχολής Παν/μίου Ιωαννίνων).

Η επαγωγή της ρετρομετάθεσης επιτεύχθηκε με την μικροέγχυση μικροποσότητας του ανασυνδυασμένου L1 κατά τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης. Συγκεκριμένα, τα σπερματοζωάρια επώαστηκαν σε μία ποσότητα ρετρομεταθετού στοιχείου και στη συνέχεια κατά την εισαγωγή του σπερματοζωαρίου στο ωάριο, εγχέονταν και μικροποσότητα του ρετρομεταθετού στοιχείου. Έπειτα, ακολουθούσαν οι τυπικές διαδικασίες της IVF-ICSI.

Η επιβεβαίωση των γεγονότων ρετρομετάθεσης στα δείγματα πραγματοποιήθηκε μέσω της ανίχνευσης σημάτων φθορισμού που προκύπτουν από την παραγωγή της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP.



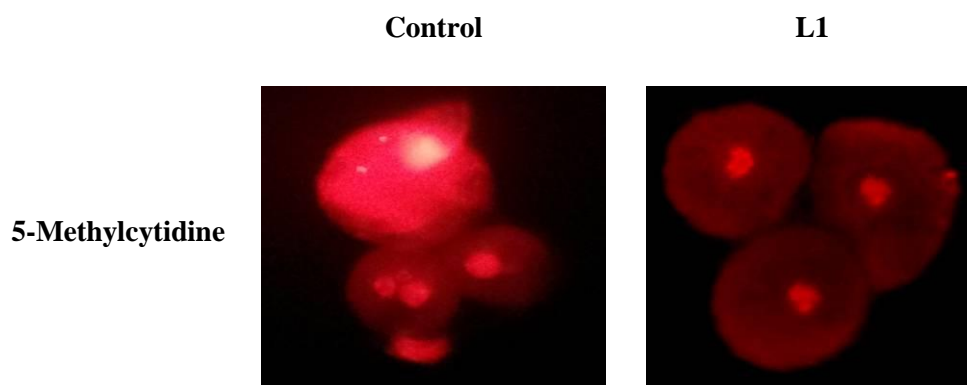
Πίνακας 9. Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης του L1

8.4 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ L1 ΣΤΟΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ.

Κατά κανόνα, ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης βρίσκεται υπό τον έλεγχο επιγενετικών μηχανισμών ώστε να παραμένει σε χαμηλά επίπεδα ο αριθμός αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων στο γένωμα. Για να προσομοιάσουμε την επίδραση της αύξησης των αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων, λόγω αδυναμίας των ελεγκτικών μηχανισμών, στον επιγενετικό μηχανισμό της μεθυλίωσης του DNA και στη σταθερότητα του γενώματος, επαγάγαμε τη ρετρομετάθεση του L1.

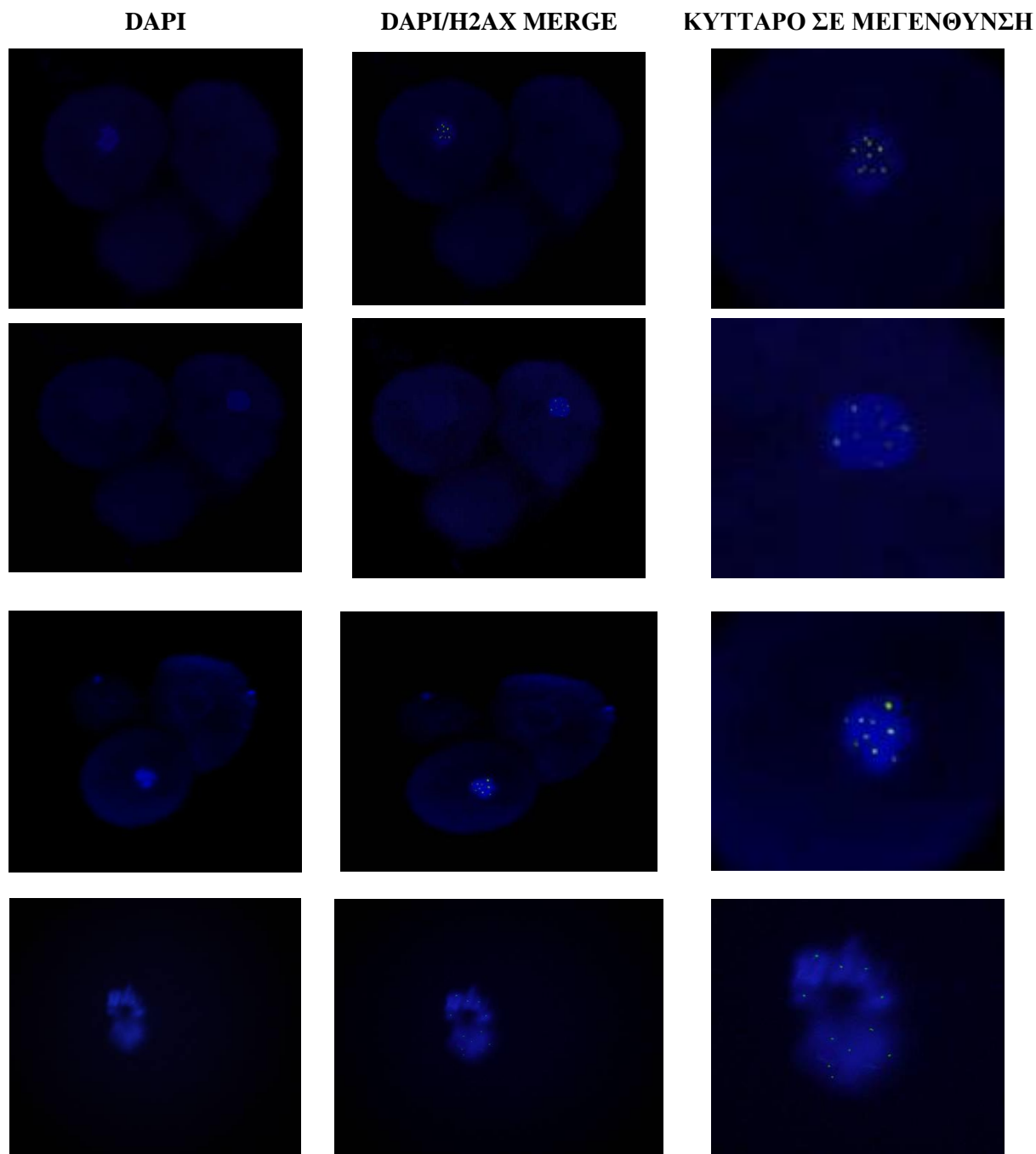
Η επαγωγή της ρετρομετάθεσης επετεύχθη με την εισαγωγή μικροποσότητας ανασυνδυασμένου πλασμιδίου L1 κατά τη διαδικασία της ICSI σε ωάρια. Στη συνέχεια, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού, μελετήσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης και αναζητήσαμε θραύσεις της διπλής έλικας του DNA. Για τη μελέτη της μεθυλίωσης χρησιμοποιήσαμε το αντίσωμα έναντι της 5-μεθυλοκυτοσίνης και για τις θραύσεις τις θραύσεις τις διπλής έλικας τις ανιχνεύσαμε με το αντίσωμα έναντι της γH2AX.

Όσο αφορά τη μεθυλίωση του γενώματος, τα δείγματα στα οποία πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ρετρομετάθεσης του L1, δεν εμφάνιζαν διαφορές - οι οποίες ήταν δυνατόν να ανιχνευθούν με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού - στα επίπεδα μεθυλίωσης συγκριτικά με τα δείγματα ελέγχου (control samples).



Πίνακας 10. Πρότυπο μεθυλίωσης εμβρύων πριν και μετά την επαγωγή της ρετρομετάθεσης του L1

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα σχετικά με την ακεραιότητα του DNA. Ενώ στα δείγματα ελέγχου δεν εντοπίσαμε βλάβες στο γένωμα, στα δείγματα που εισαγάγαμε μικροποσότητα του ανασυνδυασμένου L1, ανιχνεύσαμε σήματα φθορισμού για το αντίσωμα γ H2AX, ένδειξη ύπαρξης θραύσεων στη διπλή έλικα του DNA.



Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

9.1 ΠΡΟΤΥΠΟ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΥΡΙΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΑΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΑΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Η ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου, από το γονιμοποιημένο ωάριο μέχρι και την ώριμη βλαστοκύστη, είναι μία δυναμική διαδικασία η οποία επιτελείται από ένα σύνολο μηχανισμών που ελέγχουν το αναπτυξιακό δυναμικό των κυττάρων. Ήδη από τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης παρατηρούνται επιγενετικές τροποποιήσεις στο γένωμα και αλλαγές στην έκφραση γονιδίων. Στην πορεία ανάπτυξης του εμβρύου, τα κύτταρα καλούνται να διαφοροποιηθούν στις τρεις βλαστικές στοιβάδες, το εμβρυϊκό ενδόδερμα, το εμβρυϊκό μεσόδερμα και το εμβρυϊκό εξώδερμα, απ' όπου θα προκύψουν όλοι οι τύποι ιστών και οργάνων. Η πορεία διαφοροποίησης των πρώιμων εμβρυϊκών κυττάρων ελέγχεται από σηματοδοτικές οδούς οι οποίες ενεργοποιούν τη μεταγραφή ή καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την πολυδυναμία των ESCs.

Ως κύριοι παράγοντες πολυδυναμίας έχουν χαρακτηριστεί οι Oct4, Sox2 και Nanog καθώς είναι απαραίτητοι για τη διατήρηση της πολυδυναμίας και της ικανότητας αυτοαναγέννησης των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων και επιπλέον μπορούν να επαναπρογραμματίσουν διαφοροποιημένα κύτταρα, σε πολυδύναμα. Αλλαγές στα επίπεδα των παραγόντων αυτών στα ESCs έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της πολυδυναμίας και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog, παρουσιάζουν δυναμικά πρότυπα έκφρασης κατά την εμβρυογένεση και κυρίως στα πολυδύναμα κύτταρα του προεμφυτευτικού εμβρύου υποδεικνύοντας τον σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.

Στα πλαίσια της παρούσης διατριβής, μελετήσαμε την έκφραση των παραγόντων πολυδυναμίας Oct4, Sox2 και Nanog στα ωοκύτταρα και στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του ανθρώπινου εμβρύου. Επίσης, μελετήσαμε την έκφραση της πρωτεΐνης E-

Cadherin, υπεύθυνη για τη συγκόλληση των κυττάρων κατά τη διαδικασία της συμπίκνωσης.

Τα πειραματικά δεδομένα αποκάλυψαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης των παραγόντων πολυδυναμίας στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Στο στάδιο των 6-8 κυττάρων εντοπίστηκε για πρώτη φορά έκφραση του παράγοντα Oct4 στον πυρήνα των κυττάρων, με το πρότυπο να διατηρείται σε όλα τα βλαστομερίδια των επακόλουθων σταδίων. Στη φάση της βλαστοκύστης, η έκφραση του Oct4 περιορίζεται στα κύτταρα της ICM. [237, 239]. Η έκφραση του Oct4 σε τόσο πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης υποστηρίζεται από τον ιδιαίτερα σημαντικό διττό ρόλο του παράγοντα. Η σύνδεση του παράγοντα σε γονίδια-στόχους μπορεί είτε να καταστείλει είτε να ενεργοποιήσει την έκφραση των γονιδίων, επιτρέποντας τόσο τη διατήρηση της πολυδυναμίας όσο και την επαγωγή της διαφοροποίησης των ESCs. Αποσιώπηση της έκφρασης του Oct4 στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης είχαν ως αποτέλεσμα την αποτυχία δημιουργίας ICM και διαφοροποίηση των βλαστομεριδίων σε κύτταρα τροφοεξωδέρματος, ενώ καταστολή της έκφρασης του παράγοντα σε ESCs οδήγησε στη διαφοροποίηση των κυττάρων. Σήμερα, ο Oct4 θεωρείται ως ο κύριος παράγοντας πολυδυναμίας.

Σύμφωνα με τη θεωρία των Tarkowski και Wroblewska το 1967, κατά τη μετάβαση του εμβρύου από τα 8 στα 16 κύτταρα, αλλά και από τα 16 στα 32 κύτταρα, η διαίρεσή τους μπορεί να είναι συμμετρική ή ασύμμετρη, με αποτέλεσμα τη δημιουργία δύο πληθυσμών κυττάρων, των εξωτερικών, πολωμένων κυττάρων και των εσωτερικών, μη πολωμένων κυττάρων. Τα εσωτερικά κύτταρα είναι πρόδρομοι της ICM ενώ τα εξωτερικά θα αποτελέσουν τα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος [240]. Στο πρώιμο στάδιο των 8 κυττάρων τα βλαστομερίδια δεν έχουν αποκτήσει ακόμα πολικότητα ενώ στο όψιμο στάδιο των 8 κυττάρων, εμφανίζονται τα πρώτα σημάδια συμπίκνωσης των βλαστομεριδίων [241]. Η συμπίκνωση στο στάδιο αυτό επιβεβαιώνεται και από τα πειράματά μας, όπου ανιχνεύθηκε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού η πρωτεΐνη E-Cadherin, υπεύθυνη για τη συγκόλληση των κυττάρων κατά τη διαδικασία της συμπίκνωσης. Μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων, τα βλαστομερίδια διατηρούν την πλαστικότητα τους, δηλαδή τα μη πολωμένα κύτταρα που προοριζόταν να αποτελέσουν την ICM μπορούν να αποτελέσουν τελικά το τροφοεξώδερμα και αντίστροφα [242]. Η θεωρία των Tarkowski και Wroblewska έχοντας ως δεδομένο ότι ο Oct4 είναι ο κύριος

παράγοντας πολυδυναμίας, δικαιολογεί την έκφραση του Oct4 σε τόσα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του προεμφυτευτικού εμβρύου.

Στο στάδιο του πρώιμου μοριδίου εντοπίζεται για πρώτη φορά η έκφραση του παράγοντα Sox2 στον πυρήνα των βλαστομεριδίων και φτάνει στο μέγιστο στο στάδιο της βλαστοκύστης στα κύτταρα της ICM. Ταυτόχρονα με τον Sox2 εκφράζεται και ο παράγοντας Cdx2, κύριος παράγοντας για τη διαφοροποίηση των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων σε κύτταρα του τροφοεξωδέρματος και τη διατήρησή τους σε αυτή τη κατάσταση. Οι παράγοντες Oct4 και Sox2 δρουν συνεργατικά ως ένα πρωτεϊνικό σύμπλοκο και καταστέλλουν την έκφραση του Cdx2 [235]. Η καταστολή του Cdx2 από το σύμπλοκο Oct4/Sox2 και αντίστροφα οδηγεί στη δημιουργία διακριτών πληθυσμών ICM και τροφοεξωδέρματος. Πέραν του Cdx2, ο Sox2 συμπλεκόμενος με τον Oct4, συμμετέχει στη μεταγραφική ενεργοποίηση αρκετών γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων και των ιδίων καθώς και του Nanog, με σκοπό τη διατήρηση της πολυδυναμίας και της ικανότητας αυτο-αναγέννησης των ESCs.[60, 70, 236]. Μελέτες σε έμβρυα ποντικού αποκάλυψαν ότι απουσία του Sox2, τα έμβρυα αναπτύσσονταν μέχρι την έκτη μέρα της εμβρυογένεσης (μετά το στάδιο της βλαστοκύστης), δημιουργώντας δομές που αποτελούνταν από τροφοεξώδερμα και πρωτογενές ενδόδερμα αλλά στερούνταν πολυδύναμων κυττάρων της επιβλάστης [60]

Ο παράγοντας Nanog, μαζί με τους Oct4 και Sox2, αποτελούν το πυρήνα ελέγχου των μεταγραφικών δικτύων που ρυθμίζουν την πολυδυναμία και τη διαφοροποίηση των ESCs. Η έκφραση του Nanog για πρώτη φορά εντοπίζεται στο στάδιο του μοριδίου με τα μέγιστα επίπεδα να εμφανίζονται στο στάδιο της βλαστοκύστης. Στην πρώιμη βλαστοκύστη εντοπίζεται στα κύτταρα της ICM ενώ στην όψιμη στα κύτταρα του επιβλάστη, παρουσιάζοντας ένα πρότυπο έκφρασης σχεδόν πανομοιότυπο με αυτό του Oct4. Αυτό ερμηνεύεται από το γεγονός ότι ο Nanog ρυθμίζει τα επίπεδα έκφρασης του Oct4 και αντίστροφα. Αυξημένη έκφραση του Oct4 οδηγεί στη διαφοροποίηση σε κύτταρα μεσοδέρματος και ενδοδέρματος, ενώ αυξημένη έκφραση του Nanog ενισχύει την αυτό-αναγέννηση και την πολυδυναμία. Μειωμένη έκφραση του Oct4 θα έχει ως αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση σε κύτταρα τροφοεξωδέρματος, ενώ απουσία Nanog σε ESCs ποντικού οδηγούν σε δημιουργία πρωτογενούς ενδοδέρματος.

Συνοψίζοντας, συμπεραίνουμε ότι η χρονική αλληλουχία έκφρασης των τριών κύριων παραγόντων πολυδυναμίας στα προεμφυτευτικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης

δεν είναι τυχαία. Ο Oct4, ως ο κυριότερος παράγοντας εκ των τριών, εκφράζεται πρώτος για να προάγει την έκφραση του Sox2, ώστε συνεργατικά να ρυθμίσουν την μεταγραφική ενεργότητα του Cdx2 και να καταστείλουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε τροφοεξώδερμα. Στη συνέχεια, η παρουσία των Oct4 και Sox2 είναι απαραίτητη για την έκφραση του Nanog οποίος με τη σειρά του θα καταστείλει τη διαφοροποίηση των κυττάρων της ICM σε πρωτογενές ενδόδερμα. [55, 56, 60, 62, 237].

9.2 ΕΠΑΝΑΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΤΑ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΕΜΒΡΥΟΥ

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η μεθυλίωση αποτελεί ένα κοινό μηχανισμό επιγενετικής σήμανσης που χρησιμοποιούν τα κύτταρα για να ρυθμίσουν την έκφραση των γονιδίων. Έρευνες δεκαετιών αποκάλυψαν το σημαντικό ρόλο της μεθυλίωσης, αποτελώντας βασικό στοιχείο σε μια πληθώρα κυτταρικών διαδικασιών όπως είναι η εμβρυϊκή ανάπτυξη, η γονιδιακή αποτύπωση και η απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X. Η μεθυλίωση μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή του DNA είτε άμεσα εμποδίζοντας τη σύνδεση των παραγόντων της μεταγραφής στους υποκινητές των γονιδίων, είτε έμμεσα προκαλώντας δομικές αλλαγές στη χρωματίνη.

Στα θηλαστικά έχουν διαπιστωθεί δύο κύκλοι επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης του DNA, κατά τη γαμετογένεση και κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη. Αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, οι πρωταμίνες του σπερματοζωαρίου αντικαθίστανται από ιστόνες. Τις δομικές τροποποιήσεις της χρωματίνης του άρρενος γαμέτη ακολουθεί η απομεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιώματος και στους δύο γαμέτες, μια διαδικασία η οποία διενεργείται κατά τα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου [214]. Στον άνθρωπο, εμφανείς ενδείξεις απομεθυλίωσης παρατηρήσαμε για πρώτη φορά στο στάδιο των 8 κυττάρων. Η απομεθυλίωση για το μεγαλύτερο μέρος του γενώματος ολοκληρώνεται στο στάδιο του μοριδίου, γεγονός που συμφωνεί με τα δεδομένα της παρούσης μελέτης (Πίνακας 8) [203].

Μετά το στάδιο του μοριδίου και αφού έχει ολοκληρωθεί η απομεθυλίωση, στο στάδιο της βλαστοκύστης, διενεργείται *de novo* μεθυλίωση ώστε να προκύψει το νέο

πρότυπο μεθυλίωσης στο εμβρυϊκό γονιδίωμα. Στα κύτταρα του τροφοεξωδέρματος τα επίπεδα μεθυλίωσης παραμένουν χαμηλά (Πίνακας 8) [219,220].

Η διαδικασία απομεθυλίωσης και εκ νέου μεθυλίωσης που παρατηρούμε στα προεμφυτευτικά στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης στον άνθρωπο, είναι μείζονος σημασίας για την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου. Κατά την απομεθυλίωση του γενώματος, οι κύριοι παράγοντες πολυδυναμίας, οι οποίοι είναι μεθυλιωμένοι στα διαφοροποιημένα κύτταρα, αποκτούν μεταγραφική ενεργότητα ενώ οδηγούν στην αποσιώπηση παραγόντων που προάγουν τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Ανωμαλίες κατά την εκ νέου μεθυλίωση μπορεί να οδηγήσει σε γενετικές διαταραχές όπως για παράδειγμα νοσήματα που οφείλονται σε μονογονιδιακή δισωμία (π.χ Prader Willi – Angelman) ή σε ανωμαλίες στην απενεργοποίηση του χρωμοσώματος X.

9.3 ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΤΟΥ L1 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ ΚΑΙ ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

Η γονιμοποίηση του ωαρίου αποτελεί το έναυσμα για τον επαναπρογραμματισμό του γενώματος. Από το στάδιο του ζυγωτού μέχρι και το στάδιο του μοριδίου παρατηρείται καθολική απομεθυλίωση του γενώματος ενώ στα επόμενα στάδια επανεγκαθιδρύεται νέο πρότυπο μεθυλίωσης. Η μαζική απομεθυλίωση του γενώματος αποτελεί ένα παράθυρο για πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ενδογενή L1 μεταθετά στοιχεία εκφράζονται στα ανθρώπινα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα και γεγονότα ρετρομετάθεσης πραγματοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [238].

Στα πλαίσια της μελέτης επίδρασης της επαγόμενης ρετρομετάθεσης στη σταθερότητα του γενώματος και του επιγενετικού μηχανισμού, εισήχθη μικροποσότητα ανασυνδυασμένου L1 ρετρομεταθετού στοιχείου κατά τη μικρογονιμοποίηση ωαρίων.

Πράγματι, γεγονότα ρετρομετάθεσης ανιχνεύθηκαν σε δείγματα τόσο στο στάδιο του ζυγωτού όσο και στα στάδια των 2,4 και 8 κυττάρων. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι μηχανισμοί που είναι απαραίτητοι για τη μεταγραφή, αντίστροφη μεταγραφή και μετάφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι ενεργοί ακόμα και στο

ωοκύτταρο [243]. Στηριζόμενοι σε αυτό και αν αναλογιστούμε τον μηχανισμό ρετρομετάθεσης, μπορούμε να υποθέσουμε ότι ενδογενή ρετρομεταθετά στοιχεία στα ωοκύτταρα που διαφεύγουν των μηχανισμών ελέγχου της ρετρομετάθεσης, μπορούν να επηρεάζουν την σωστή ανάπτυξη του προεμφυτευτικού εμβρύου καθώς αυξάνεται ο αριθμός των αντιγράφων τους.

9.4 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΑΓΟΜΕΝΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΣΤΟΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟ ΚΑΙ ΣΤΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΓΕΝΩΜΑΤΟΣ

Συνεχώς αυξάνεται ο αριθμός των δεδομένων τα οποία αποδεικνύουν τη συνεισφορά των μεταθετών στοιχείων στη γενωμική αστάθεια και σε έναν αριθμό γενετικών νοσημάτων. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να συμβάλλουν στην εμφάνιση γενετικών νοσημάτων δημιουργώντας μεταλλάξεις μέσω της ένθεσής τους σε γονίδια και να προκαλέσουν γενωμική αστάθεια μέσω του μη ομόλογου ανασυνδυασμού. Επιπλέον, απόρροια της δράσης των μεταθετών στοιχείων μπορεί να είναι η δημιουργία θραύσεων της διπλής έλικας του DNA ή η αλλοίωση της επιγενετικής κατάστασης των χρωμοσωμάτων.

Η πλειοψηφία των LINE και HERV μεταθετών στοιχείων εμφανίζει έντονα πρότυπα μεθυλίωσης ενώ τα συναντούμε ως επί το πλείστον σε περιοχές του γενώματος που αποτελούνται από ανενεργές μορφές χρωματίνης [231]. Το συντριπτικό ποσοστό των μεθυλιωμένων κυτοσινών εντοπίζεται στις αλληλουχίες των ρετρομεταθετών στοιχείων. Η μεθυλίωση και η δομή της χρωματίνης αποτελούν τους μηχανισμούς ελέγχου των μεταθετών στοιχείων. Η διαδικασία της απομεθυλίωσης που λαμβάνει χώρα στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου επιτρέπει να πραγματοποιηθούν γεγονότα ρετρομετάθεσης.

Ο μηχανισμός της ρετρομετάθεσης απαιτεί μία πληθώρα πρωτεϊνικών προϊόντων, μεταξύ των οποίων είναι οι ανάστροφες μεταγραφάσες και οι ενδονουκλεάσες, προϊόντα που προάγουν τα μεταθετά στοιχεία. Το μοντέλο ρετρομετάθεσης για τα non-LTR στοιχεία είναι το TPRT (target-primed reverse transcription). Σύμφωνα με αυτό, απαιτείται η θραύση και των δύο αλυσίδων του DNA για να ξεκινήσει η διαδικασία της

ρετρομετάθεσης (Εικόνα 17), [107, 121]. Πρόσφατες δημοσιεύσεις, αποκάλυψαν ότι τα προϊόντα ενδονουκλεάσης του L1, είναι ικανά να δημιουργούν DSBs πολλά περισσότερα από τα γεγονότα ένθεσης του L1 [121, 244, 245].

Στηριζόμενοι στα μέχρι σήμερα δεδομένα, μελετήσαμε την επίδραση της επαγόμενης ρετρομετάθεσης στο πρότυπο μεθυλίωσης του γενώματος και διερευνήσαμε την ικανότητα των L1 να προκαλούν DSBs, εντοπίζοντας σήματα ανοσοφθορισμού για την 5-methylcytidine και την γ H2AX. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H2AX σε γ H2AX αποτελεί ένδειξη της ύπαρξης θραύσεων και στις δύο αλυσίδες του DNA.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στα δείγματα που δεν πραγματοποιήθηκε επαγωγή της ρετρομετάθεσης, δεν ανιχνεύσαμε σήματα φθορισμού για την γ H2AX. Αντίθετα, όταν προκαλέσαμε επαγωγή της ρετρομετάθεσης με μικροέγχυση ανασυνδυασμένου L1, διαπιστώσαμε την πραγματοποίηση πολλαπλών γεγονότων DSBs.

Είναι γνωστό ότι η διαδικασία της ρετρομετάθεσης των L1 έχει μεγάλη επίδραση στο γένωμα. Τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν ότι η έκφραση των L1 στον άνθρωπο δημιουργεί DSBs. Τα DSBs οφείλονται στη δράση ενδονουκλεάσης του ORF2 των L1. Η ύπαρξη των θραύσεων της διπλής αλυσίδας του DNA πυροδοτεί την έναρξη μιας αλληλουχίας κυτταρικών διαδικασιών όπως την απόπτωση, τη δημιουργία σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου και την κινητοποίηση των μηχανισμών επιδιόρθωσης του DNA. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, η ρετρομετάθεση των μεταθετών στοιχείων ελέγχεται μέσω επιγενετικών μηχανισμών. Αδυναμία των μηχανισμών ελέγχου της ρετρομετάθεσης ή η απομεθυλίωση που πραγματοποιείται κατά τον επαναπρογραμματισμό του γενώματος στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, θα είχαν ως αποτέλεσμα την έξαρση των γεγονότων ρετρομετάθεσης και τη συσσώρευση DSBs στο γένωμα. Τα DSBs που προκαλούνται από τη δράση των L1 συνεισφέρουν στη γενωμική αστάθεια μέσω της δημιουργίας χρωμοσωματικών βλαβών, όπως μεταθέσεις, ελλείψεις, διπλασιασμούς, καθώς και μέσω του μη ομόλογου ανασυνδυασμού. Για να αντιληφθούμε τη σημαντικότητα των DSBs του DNA φτάνει να αναλογιστούμε το ρόλο της γενωμικής αστάθειας στη γήρανση, στη γονιμότητα καθώς και στον καρκίνο.

Για τη μελέτη της επίδρασης της ρετρομετάθεσης στο πρότυπο μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, αναλύσαμε με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού τα επίπεδα μεθυλίωσης σε δείγματα στα οποία επαγάγαμε τη ρετρομετάθεση και σε δείγματα που δεν πραγματοποιήθηκε μικροέγχυση του ανασυνδυασμένου L1. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν δεν παρατηρήθηκαν ορατές διαφορές στην ένταση φθορισμού ανάμεσα στις δύο ομάδες, οι οποίες να υποδεικνύουν διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης του γενώματος.

Το κοινό πρότυπο μεθυλίωσης που παρατηρήσαμε στις δύο ομάδες δειγμάτων μπορεί να ερμηνευθεί αν αναλογιστούμε τη διαδικασία επαναπροσδιορισμού της γονεϊκής αποτύπωσης στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Μετά τη γονιμοποίηση ενεργοποιείται η διαδικασία της απομεθυλίωσης του γενώματος ενώ νέα μεθυλίωση σημειώνεται μετά το στάδιο του μοριδίου. Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει ότι τα ενδογενή L1 μεταθετά στοιχεία εκφράζονται στα ανθρώπινα εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα και γεγονότα ρετρομετάθεσης πραγματοποιούνται καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυογένεσης [238]. Επιπλέον γνωρίζουμε ότι τα μεταθετά στοιχεία αποτελούν στόχους μεθυλίωσης. Η ρετρομετάθεση των στοιχείων εντός γονιδίων ή σε παρακείμενες περιοχές, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αποσιώπηση των γονιδίων κατά την εγκαθίδρυση του νέου προτύπου μεθυλίωσης. Επιπροσθέτως, η ένθεση μεταθετών στοιχείων σε συγκεκριμένες περιοχές στο γονιδίωμα μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη στρατολόγηση παραγόντων τροποποίησης της χρωματίνης, συνήθως μέσω CpG μεθυλίωσης και επακόλουθης αποακετυλίωσης της ιστόνης, στη περιοχή ένθεσης του μεταθετού στοιχείου προκαλώντας πάλι την απενεργοποίηση των γονιδίων. Αναλογιζόμενοι ότι τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν στόχους επιγενετικής τροποποίησης, μπορούμε να υποθέσουμε ότι καθώς αυξάνονται τα μετάγραφα των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γένωμα, στα πλαίσια του επιγενετικού μηχανισμού καταστολής της ρετρομετάθεσης, θα παρατηρείται αύξηση των μεθυλιωμένων περιοχών του γενώματος, προκαλώντας την αποσιώπηση παρακείμενων γονιδίων.

Η επίδραση της επαγόμενης ρετρομετάθεσης μπορεί να μην είναι άμεσα ορατή λόγω της καθολικής απομεθυλίωσης που σημειώνεται στα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης, αλλά είναι πιθανό να επιδρά στον επιγενετικό μηχανισμό, με τα αποτελέσματα να γίνονται εμφανή κατά την επανεγκαθίδρυση του προτύπου μεθυλίωσης.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε τα πρότυπα έκφρασης των κύριων παραγόντων πολυδυναμίας (Oct4, Sox2, Nanog) και αποτυπώσαμε τις μεταβολές στο πρότυπο μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης στον άνθρωπο. Επιπλέον, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι πολλαπλά γεγονότα ρετρομετάθεσης στο προεμφυτευτικό έμβρυο στον άνθρωπο, προκαλούν εκτεταμένες βλάβες στο γένωμα, ένα φαινόμενο που δύναται να επάγει τη γενωμική αστάθεια, παρεμποδίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την ομαλή ανάπτυξη του εμβρύου.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Για πρώτη φορά ανιχνεύεται πυρηνική έκφραση του παράγοντα Oct-4 στα βλαστομερίδια του εμβρύου στο στάδιο των 8 κυττάρων. Η έκφραση φτάνει στο μέγιστο στο στάδιο της βλαστοκύστης και περιορίζεται στα κύτταρα της έσω κυτταρικής μάζας.
- Η έκφραση του Sox2 εντοπίζεται για πρώτη φορά στο στάδιο του πρώιμου μοριδίου και φτάνει στο μέγιστο στο στάδιο της βλαστοκύστης, στην ICM.
- Ο παράγοντας Nanog εκφράζεται για πρώτη φορά στο στάδιο του όψιμου μοριδίου και ακολουθεί το πρότυπο έκφρασης του Oct-4.
- Ο Oct-4 ρυθμίζει την έκφραση του Sox2 και δρώντας συνεργατικά ελέγχουν την έκφραση του Nanog. Οι τρεις παράγοντες αποτελούν τον πυρήνα του ρυθμιστικού δικτύου εγκαθίδρυσης και διατήρησης της πολυδυναμίας και της ικανότητας αυτό-ανανέωσης των ESCs.
- Η γονιμοποίηση αποτελεί το έναυσμα για τη καθολική απομεθυλίωση του γενώματος. Από το στάδιο των 6-8 κυττάρων έως και το μοριδίο παρατηρείται έντονη απομεθυμίωση ενώ στο στάδιο της βλαστοκύστης το γένωμα μεθυλιώνεται εκ νέου.
- Για πρώτη φορά συσχετίζεται το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου με τη θραύση του δίκλωνου DNA η οποία ενδεχομένως να οδηγεί σε αδυναμία επιδιόρθωσης και γενωμική αστάθεια.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο επιγενετικός μηχανισμός της μεθυλίωσης του DNA διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του κυττάρου, στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, στον επαναπρογραμματισμό του γενώματος και στην καταστολή των μεταθετών στοιχείων. Στα θηλαστικά, ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός επιτελείται στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου. Μετά τη γονιμοποίηση, λαμβάνει χώρα καθολική απομεθυλίωση του πατρικού και μητρικού γενώματος με σκοπό τη διαγραφή της γενωμικής αποτύπωσης που φέρουν οι γονείς. Την απομεθυλίωση ακολουθεί η εκ νέου μεθυλίωση στο στάδιο της βλαστοκύστης η οποία εγκαθιδρύει ένα νέο πρότυπο μεθυλίωσης. Ο επαναπροσδιορισμός του προτύπου μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου αποτελεί ένα “παράθυρο ευκαιρίας” για την έκφραση των κύριων παραγόντων πολυδυναμίας Oct-4, Sox 2 και Nanog, απαραίτητοι για την εγκαθίδρυση και διατήρηση της πολυδυναμίας και της ικανότητας αυτό-αναγέννησης των εμβρυϊκών στελεχιαίων κυττάρων στο προεμφυτευτικό έμβρυο. Επιπροσθέτως, τα έως τώρα ανενεργά ρετρομεταθετά στοιχεία έχουν τη δυνατότητα να επανενεργοποιηθούν και να ρετρομετατεθούν στο γένωμα. Τα LINE-1 είναι ενεργά ρετρομεταθετά στοιχεία τα οποία σχετίζονται με αρκετά νοσήματα στον άνθρωπο, εμπλέκονται σε χρωμοσωματικές ανακατατάξεις και στην αποσιώπηση γονιδίων και έχει διαπιστωθεί ότι είναι ενεργά στα αδιαφοροποίητα ESCs του ανθρώπου. Σκοπός της παρούσης μελέτης ήταν να μελετήσουμε έκφρασης των παραγόντων Oct-4, Sox2 και Nanog καθώς και να προσδιορίσουμε το πρότυπο μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια ανάπτυξης του εμβρύου στον άνθρωπο καθώς και να ερευνήσουμε την επίδραση της επαγόμενης ρετρομετάθεσης του L1 στον επιγενετικό μηχανισμό της μεθυλίωσης και στη σταθερότητα του γενώματος.

Αρχικά, με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων για τους παράγοντες Oct-4, Sox2 και Nanog μελετήσαμε την έκφρασή τους στα προεμφυτευτικά έμβρυα. Η έκφραση του παράγοντα Oct-4 ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά σε έμβρυα στο στάδιο των 8 κυττάρων και ήταν ίδια σε όλα τα βλαστομερίδια μέχρι το στάδιο του μοριδίου. Στη βλαστοκύστη, σήματα φθορισμού ανιχνεύθηκαν μόνο στα κύτταρα της ICM. Η έκφραση του Sox2 ανιχνεύθηκε στο στάδιο του πρώιμου μοριδίου και ακολούθησε η έκφραση του Nanog στο στάδιο του όψιμου μοριδίου. Στη βλαστοκύστη, η έκφραση των Sox2 και Nanog περιορίστηκε στην ICM ακολουθώντας το

πρότυπο έκφρασης του Oct-4. Οι παράγοντες Oct-4, Sox2 και Nanog αποτελούν τον πυρήνα του ρυθμιστικού δικτύου που είναι υπεύθυνο για τη διατήρηση της πολυδυναμίας των κυττάρων και της ικανότητάς τους για αυτο-αναγέννηση. Τα πρότυπα έκφρασης των παραγόντων υποδεικνύουν ότι ο Oct-4 αποτελεί τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα μεταξύ των τριών, ο οποίος ρυθμίζει την έκφραση του Sox2 και στη συνέχεια οι δύο παράγοντες συνεργατικά ελέγχουν την έκφραση του Nanog.

Η δεύτερη φάση της μελέτης αφορούσε τη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και χρησιμοποιώντας ειδικό αντίσωμα έναντι της 5-μεθυλοκυτιδίνης καταφέραμε να ανιχνεύσουμε τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες στο γένωμα. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ισχυρή μεθυλίωση στο ζυγωτό και μέχρι το στάδιο των 4 κυττάρων. Σταδιακή απομεθυλίωση διαπιστώθηκε από το στάδιο των 8 κυττάρων και μέχρι το μοριδίο όπου η μεθυλίωση έφτασε στο κατώτατο επίπεδο. Στο στάδιο της βλαστοκύστης ανιχνεύθηκαν και πάλι σήματα φθορισμού υποδηλώνοντας την εκ νέου μεθυλίωση του γενώματος.

Στα πλαίσια μελέτης της επίδρασης της ρετρομετάθεσης στον επαναπροσδιορισμό της μεθυλίωσης και τη σταθερότητα του γενώματος, επαγάγαμε τη ρετρομετάθεση του L1 ρετρομεταθετού στοιχείου μέσω της έγχυσης μικροποσότητας ανασυνδυασμένου L1 σε ανθρώπινα ωάρια κατά τη διαδικασία της μικρογονιμοποίησης. Με τη μέθοδο του ανοσοφθορισμού και τη χρήση ειδικών αντισωμάτων έναντι της 5-μεθυλοκυτιδίνης και της γH2AX είχαμε τη δυνατότητα να ανιχνεύσουμε αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης και θραύσεις του δίκλωνου μορίου DNA. Όσο αφορά τη μεθυλίωση, δεν εντοπίσαμε διαφορές στα ζυγωτά και προεμφυτευτικά έμβρυα στα οποία εισήχθη το L1 σε σύγκριση με τα δείγματα που χρησιμοποιήσαμε ως μάρτυρες (controls). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να αναφερθεί ότι τα δείγματα αφορούσαν έμβρυα μέχρι το στάδιο των 6 κυττάρων. Μία υπόθεση η οποία θα μπορούσε να ερμηνεύσει την έλλειψη διαφοράς στα επίπεδα μεθυλίωσης είναι ότι τα έμβρυα μέχρι το στάδιο του μοριδίου ακολουθούν μία διαδικασία καθολικής απομεθυλίωσης καθιστώντας αδύνατο να ανιχνεύσουμε την επίδραση της ρετρομετάθεσης στην εκ νέου μεθυλίωση. Τα ρετρομεταθετά στοιχεία αποτελούν στόχους μεθυλίωσης και ως εκ τούτου αναμένεται ότι η αύξηση των αντιγράφων L1 στο γένωμα θα έχουν ως αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης του γενώματος.

Τέλος, σε ζυγωτά και προεμφυτευτικά έμβρυα στα οποία επαγάγαμε τη ρετρομετάθεση του L1 ανιχνεύσαμε σήματα ανοσοφθορισμού για τη γH2AX. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η έκφραση του L1 ρετρομεταθετού στοιχείου προκαλεί θραύσεις στο δίκλωνο μόριο του DNA , προκαλώντας ενδεχομένως γενωμική αστάθεια λόγω αδυναμίας επιδιόρθωσης στα κύτταρα του εμβρύου.

Στην παρούσα μελέτη προσδιορίσαμε τα πρότυπα έκφρασης των κύριων παραγόντων πολυδυναμίας (Oct4, Sox2, Nanog) και αποτυπώσαμε τις μεταβολές στο πρότυπο μεθυλίωσης στα προεμφυτευτικά στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης στον άνθρωπο στα πλαίσια του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού. Επιπλέον, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι πολλαπλά γεγονότα ρετρομετάθεσης στο προεμφυτευτικό έμβρυο στον άνθρωπο, προκαλούν θραύσεις στο δίκλωνο μόριο του DNA.

B. ABSTRACT

Ph.D. THESIS

***REPROGRAMMING OF PARENTAL IMPRINTING
DURING PREIMPLANTATION STAGES OF EMBRYO
DEVELOPMENT***

ABSTRACT

The epigenetic regulatory mechanism of DNA methylation plays crucial role in cell differentiation, regulation of gene expression, genome reprogramming and silencing of repetitive elements. In mammals, epigenetic reprogramming occurs during early development. After fertilization, massive DNA demethylation of paternal and maternal genome takes place in order to reset parent-of-origin based genomic imprinting, followed by de novo methylation at the blastocyst stage, establishing a new methylation pattern. This methylation reprogramming during preimplantation stages of embryo development creates a window of opportunity for the expression of transcriptional factors Oct-4, Sox 2 and Nanog, crucial for the establishment and maintenance of pluripotency and self-renewal of Embryonic Stem Cells in preimplantation embryo. In addition, until now suppressed retroelements can be reactivated and amplify themselves in the genome. LINE-1 are active retroelements which have been implicated in many human diseases, chromosome rearrangements and gene silencing and found to be expressed in undifferentiated human ESCs. Aim of this study was the determination of stage-specific expression of the three major transcriptional factors (Oct-4, Sox2, Nanog), the study of DNA methylation reprogramming during preimplantation stages of embryo development and to investigate the correlation of L1 retrotransposition with the epigenetic mechanism of methylation and genome instability.

At first, we used specific antibodies against Oct4, Nanog and Sox2 in order to determine their expression during human preimplantation development. Indirect immunofluorescence analysis of preimplantation embryos revealed that the Oct4 is the factor expressed first at 8-cell embryos. The expression was the same at all blastomeres up

to morula stage. In blastocyst, fluorescence signals were restricted to ICM. Sox2 expression was detected at early morula followed by Nanog expression at late morula stage. In blastocyst, Nanog and Sox2 expression was restricted to ICM following Oct-4 expression pattern. Oct-4, Sox2 and Nanog comprise the core of the regulatory network for the maintenance of pluripotency and self-renewal. The expression patterns of the three factors indicate that Oct-4 is the major transcriptional factor which regulates the expression of Sox2 and synergistically regulate the expression of Nanog.

The second stage of our study was to examine the methylation pattern during human preimplantation development. Indirect immunofluorescence using specific antibody against 5-methylcytidine revealed that strong methylation from zygote to 4-cell embryo. Methylation was weak at 8-cell embryo and reached at its nadir at morula stage. Strong fluorescence signals were detected at blastocyst, indicating de novo methylation.

In order to investigate the impact of retrotransposition on methylation reprogramming and genome stability, we induced L1 retrotransposition through microinjection of recombinant L1 plasmids in spare human oocytes matured in vitro via ICSI. Then, indirect immunofluorescence of zygotes and preimplantation embryos using antibodies against 5-methylcytidine and γ H2AX allowed us to observe changes to methylation patterns and DNA DSBs. As it concerns the methylation status, zygotes and preimplantation embryos positive to L1 retrotransposition have shown no differences to methylation patterns in comparison with control samples. It has to be mentioned that the embryos were up to 6-cell. A hypothesis that could explain the lack of differences in methylation status is that the embryos up to morula stage are under massive demethylation process so it couldn't be able to detect the impact of induced retrotransposition to de novo methylation process. Retroelements are considered to be marks for methylation, so rising of L1 sequence copies into the embryo genome should result to higher methylation levels.

In the final step, immunofluorescence signals for γ H2AX were detected at zygote and preimplantation embryos after induction of L1 retrotransposition. The formation of γ H2AX foci demonstrate that expression of the human L1 retroelement creates DSBs and subsequent genomic instability probably due to inefficient repair in all cells of the embryo.

Our results demonstrate the expression patterns of pluripotency factors Oct-4, Sox2, Nanog during human preimplantation development. Exhibit the epigenetic reprogramming through methylation changes that occur from zygote to blastocyst. Finally, our data provide evidence for the first time that L1 retrotransposition in human preimplantation embryos induce double strand breaks.

IV. ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

cDNA, Complementary DNA

DMRs, Differentially Methylated Regions

DNMTs, DNA μεθυλοτρανσφεράσες

DSBs, Double Strand Breaks

EN, Endonuclease

ESCs, Embryonic Stem Cells

FSH, Follicle-stimulating hormone

GnRH, Gonadotropin-releasing hormone

GV, Germinal Vesicle

H3K27, histone H3 lysine 27

H3K4, histone H3 lysine 4

HMG, High Mobility Group

ICM, Inner Cell Mass

iPS, induced Pluripotent Stem Cells

LH, Luteinizing hormone

LINEs, Long Interspersed Nuclear Elements

LTRs, Long Terminal Repeats

MeCP1, Methyl Cytocine Binding Protein

MI, Metaphase I oocytes

MII, Metaphase II oocytes

Oct4, Octamer-binding transcription factor 4

ORF, Open Reading Frame

PB, Polar Body

PcG, Polycomb Group

PN, Pronucleus

poly(A) tail, πολυαδενυλιωμένη περιοχή

POU family, Οικογένεια ομοιοτικών πρωτεϊνών

RT, Reverse Transcriptase

SINEs, Short Interspersed Nuclear Elements

SRY, Sex-determining region

TE, Transposable Elements

TSDs, Target Site Duplications

UPD, Uniparental Disomy

ZP, Zona Pellucida

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sadler TW. Langman's medical embryology. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Wolters Kluwer Company, 2006, pp 11-28, pp 229-256.
2. Bullock J, Boyle J III and Wang MB. Physiology. Lippincott Williams and Wilkins. USA. Wolters Kluwer Company, 2001, pp 623-644.
3. Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 52:198-236.
4. Cobb J, Handel MA (1998) Dynamics of meiotic prophase I during spermatogenesis: from pairing to division. *Semin Cell Dev Biol.* 9:445-450.
5. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. (2003) Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reprod Biol Endocrinol*, 1: 107
6. Gusse M, Sautière P, Bélaiche D, Martinage A, Roux C, Dadoune JP, Chevaillier P. (1986) Purification and characterization of nuclear basic proteins of human sperm. *Biochim Biophys Acta.* 884:124-134.
7. Vu TH, Li T, Hoffman AR (2004) Promoter-restricted histone code, not the differentially methylated DNA regions or antisense transcripts, marks the imprinting status of IGF2R in human and mouse. *Hum Mol Genet.* 13:2233-2245.
8. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R (2007) Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO* 26:720-729.
9. Aoki VW, Liu L, Carrell DT (2005) Identification and evaluation of a novel sperm protamine abnormality in a population of infertile males. *Hum Reprod.* 20:1298-1306.
10. Oliva R. (2006) Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update.* 12:417-435
11. Ariel M, Cedar H, McCarrey J (1994) Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet.* 7:59-63.
12. Baker, T.G. and O W.W. (1976). *Clin. Obstet. Gynecol.* 3, 1.

13. Guraya, S.S. (1998a). Cellular and Molecular Biology of Gonadal Development and Maturation in Mammals: Fundamentals and Biomedical Implications. Narosa Publishing House, New Delhi.
14. N S Macklon; Bart CJM Fauser Aspects of ovarian follicle development throughout life. *Hormone research* 1999;52(4):161-70.
15. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod.* 1992 Nov;7(10):1342-6.
16. Macklon NS, Fauser BC. Follicle development during the normal menstrual cycle. *Maturitas.* 1998 Oct 12;30(2):181-8.
17. Sandra S Cecconi, Carmen C Ciccarelli, Marzia M Barberi, Guido G Macchiarelli, Rita R Canipari Granulosa cell-oocyte interactions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2004), PMID 15196711
18. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocr Rev.* 1985 Summer;6(3):371-99.
19. Channing CP, Kammerman S. Characteristics of gonadotropin receptors of porcine granulosa cells during follicle maturation. *Endocrinology.* 1973 Feb;92(2):531-40.
20. A A Gougeon *Hum Reprod* 1(2):81-7 (1986), PMID 3558758 Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results.
21. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Nov;82(11):3748-51.
22. Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev.* 1997 Feb;18(1):71-106.
23. S G SG Hillier Sex steroid metabolism and follicular development in the ovary. *Oxf Rev Reprod Biol* (1985), PMID 3001616
24. van Dessel HJ, Schipper I, Pache TD, van Geldorp H, de Jong FH, Fauser BC Normal human follicle development: an evaluation of correlations with oestradiol, androstenedione and progesterone levels in individual follicles. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1996 Feb;44(2):191-8.

25. S Brailly, A Gougeon, E Milgrom, O Bomsel-Helmreich, E Papiernik Androgens and progestins in the human ovarian follicle: differences in the evolution of preovulatory, healthy nonovulatory, and atretic follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 53(1):128-34 (1981)
26. Jones, R. E. (1984). *Human Reproduction and Sexual Behaviour*. Prentice-Hall INC., Englewood Cliffs. N. J
27. Cooper, T.G. (1986). *The Epididymis Sperm Maturation and Fertilization*. Springer Verlag, Berlin
28. Dietl. J. (1989). *The Mammalian Egg Coat. Structure and Function*. Springer Verlag, Heidelberg, New York.
29. Feichtinger, W., and Kemetger, P. (Eds). (1987). *Future Aspects of Human in vitro Fertilization*. Springer-Verlag. Heidelberg.
30. Dunbar, B.S. and O' Rand, M.G. (Eds.). (1991). *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, Plenum Press, New York.
31. De Martino, C., Froncavilla, S., Fabbrini, A., and Accinni, L. (1989). In: *Ultrastructure of Human Gametogenesis and Early Embryogenesis* (V. Van Blerkom and P.M. Motta, eds.). pp. 1-32. Kluwer Academic Publishers, Boston.
32. Fauser, B.C.J.M. (Editor-in-chief) and Rutherford A.J., Strauss, J.F. and Van Steirteghem (co-eds.) (1999). *Molecular Biology in Medicine*. The Parthenon Publishing Group, New York and London.
33. Yen, S.S.C., Jaffe, R.B., and Barbieri, Kurukshetra, R.L. (Eds.) (1999). *W.B. Saunders Company*, Philadelphia
34. Tevelde, E.R., Pearson, P.L., and Broekma, F.J. (Eds.) (2000). *Studies in Profertility Series Volume 9, Female Reproductive Aging*, The Parthenon Publishing Group, New York.
35. Menezo, Y., and Borak, V. (2000). *Human Reprod.*, Oxford, 15, 1776.
36. Bulletti, C., de Ziegler, D., Guller, S., and Levitz, M. (Eds.) (2001). *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, Vol. 943, pp. 1-376.
37. Wolf, D.P. and Zelinoobi, Wooten, M. (Eds.) (2001). *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*, Human Press, Totowa, New Jersey.
38. Gossler, A. (1992). In: *Early Embryonic Development of Animals* W. Henning (ed). pp. 151-202. Springer-Verlag, Berlin.
39. Guraya, S.S. (2000b). *Inter. Rev. Cytol.* 199, 1.

40. Guraya, S.S. (1985). *Biology of Ovarian Follicles in Mammals*. Springer-Verlag (Heidelberg, Berlin, New York).
41. Braude, P., Bolton, V. and Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332, 459-461.
42. Heikinheimo, O., and Gibbons, W.E. (1998). *Mol. Hum. Reprod.* 4, 745.
43. Niakan KK, Han J, Pedersen RA, Simon C, Pera RA. Human pre-implantation embryo development. *Development*. 2012 Mar;139(5):829-41.
44. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
45. Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, Jonsdottir GA, Stewart R, Thomson JA. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):299-312.
46. Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor. *EMBO J*. 1989 Sep;8(9):2543–2550.
47. Schöler HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P. Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *EMBO J*. 1989 Sep;8(9):2551–2557.
48. Petryniak B, Staudt LM, Postema CE, McCormack WT, Thompson CB (1990). "Characterization of chicken octamer-binding proteins demonstrates that POU domain-containing homeobox transcription factors have been highly conserved during vertebrate evolution". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (3): 1099–103
49. “Τα βλαστικά κύτταρα”. Σπύρος Γεωργάτος, Πάνος Δ. Κούκλης, Γιάννης Α. Λαζαρίδης, Άννα Ν. Μελιδώνη. Ιωάννινα, Εφύρα, 2008.
50. Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Oct;13(5):463-71.
51. Pevny LH, Lovell-Badge R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*. 1997 Jun;7(3):338-44.

52. Graham, V.; Khudyakov, J.; Ellis, P.; Pevny, L. (2003). "SOX2 functions to maintain neural progenitor identity". *Neuron* 39 (5): 749–765.
53. Chambers I, Tomlinson SR (July 2009). "The transcriptional foundation of pluripotency". *Development* 136 (14): 2311–22.
54. Rizzino A (2009). "Sox2 and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells". *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 1 (2): 228–36.
55. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):643-55
56. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 2003 May 30;113(5):631-42.
57. Wang SH, Tsai MS, Chiang MF, Li H. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr Patterns*. 2003 Mar;3(1):99-103.
58. Singh AM, Hamazaki T, Hankowski KE, Terada N (2007) A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25:2534–2542
59. Manal Bosnali, Bernhard MÜnst, Marc Thier, Frank Edenhofer, Deciphering the stem cell machinery as a basis for understanding the molecular mechanism underlying reprogramming, *Cell. Mol. Life Sci.* (2009) 66:3403–3420
60. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003 Jan 1;17(1):126-40.
61. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*. 2004 Jan;38(1):32-8.
62. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998 Oct 30;95(3):379-91.

63. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6.
64. Schöler HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P. Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J.* 1990 Jul;9(7):2185-95.
65. Dirk Schübeler, David M. MacAlpine, David Scalzo, Christiane Wirbelauer, Charles Kooperberg, Fred van Leeuwen, Daniel E. Gottschling, Laura P. O'Neill, Bryan M. Turner, Jeffrey Delrow, Stephen P. Bell, and Mark Groudine The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev.* 2004 June 1; 18(11): 1263–1271.
66. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006 May 18;441(7091):349-53. Epub 2006 Apr 19.
67. Mathur D, Danford TW, Boyer LA, Young RA, Gifford DK, Jaenisch R. Analysis of the mouse embryonic stem cell regulatory networks obtained by ChIP-chip and ChIP-PET. *Genome Biol.* 2008;9(8):R126. doi: 10.1186/gb-2008-9-8-r126. Epub 2008 Aug 13.
68. Dailey L, Basilico C (2001) Coevolution of HMG domains and homeodomains and the generation of transcriptional regulation by Sox/POU complexes. *J Cell Physiol* 186:315–328
69. Okumura-Nakanishi S, Saito M, Niwa H, Ishikawa F (2005) Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem* 280:5307–5317
70. Chew JL, Loh YH, Zhang W, Chen X, Tam WL, Yeap LS, Li P, Ang YS, Lim B, Robson P, Ng HH (2005) Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 25:6031–6046.
71. Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, Muramatsu M, Okuda A (2002) Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct 3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 30:3202–3213
72. Remenyi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Scholer HR, Wilmanns M (2003) Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* 17:2048–2059

73. Harini Chakravarthy, Angie Rizzino. Sox2: Mus musculus SRY-box containing gene 2. Transcription Factor Encyclopedia, Updated October 23rd, 2009
74. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*. 2005 Sep 23;122(6):947-56.
75. Kuroda, T. et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2475–2485 (2005).
76. Vijay Chickarmane, Carl Troein, Ulrike A. Nuber, Herbert M. Sauro, Carsten Peterson, Transcriptional Dynamics of the Embryonic Stem Cell Switch, *PLoS Computational Biology*, September 2006 | Volume 2 | Issue 9 | e123
77. Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. & Orkin, S. H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132, 1049–1061 (2008)
78. Chen, X. et al. Integration of external signalling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133, 1106–1117 (2008)
79. Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H. & Young, R. A. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev.* 22, 746–755 (2008)
80. Feng, B. et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat. Cell Biol.* 11, 197–203 (2009)
81. www.SABiosciences.com
82. Huck-Hui Ng & M. Azim Surani The transcriptional and signalling networks of pluripotency *Nature Cell Biology* 13, 490–496 (2011)
83. Thomson, J. A., Itskovitzeldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
84. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3.
85. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.

86. Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):1553-8.
87. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2006 Apr;38(4):431-40. Epub 2006 Mar 5.
88. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.
89. Lander, E. S., L. M. Linton, et al. "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature*, 2001,409(6822): 860-921.
90. McClintock B. "The origin and behavior of mutable loci in maize." *PNAS* 1950 36(6): 344-355.
91. McClintock B. "Chromosome organization and genic expression." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* ,1951,16: 13-47.
92. Mizuuchi K. Transpositional recombination: mechanistic insights from studies of mu and other elements. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:1011-51.
93. Smit A F and Riggs A D Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 February 20; 93(4): 1443–1448.
94. 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 Feb 26;72(4):595-605.
95. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Res*. 2002 Oct;12(10):1455-65.
96. Kurth R, Bannert N. Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer*. 2010 Jan 15;126(2):306-14.
97. Haig H. Kazazian Jr. Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution, *Science* **303**, 1626 (2004)
98. Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):527-39.

99. Kolosha VO, Martin SL. In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Sep 16;94(19):10155-60.
100. 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). *J Biol Chem*. 2003 Mar 7;278(10):8112-7. Epub 2002 Dec 27.
101. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996 Nov 29;87(5):905-16.
102. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, Boeke JD, Gabriel A Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* [1991, 254(5039):1808-1810]
103. Fanning T, Singer M. The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Res*. 1987 Mar 11;15(5):2251-60.
104. Ding W, Lin L, Chen B, Dai J. L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *UBMB Life*. 2006 Dec;58(12):677-85.
105. Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 2001;35:501-38.
106. Piskareva O, Schmatchenko V. DNA polymerization by the reverse transcriptase of the human L1 retrotransposon on its own template in vitro. *FEBS Lett*. 2006 Jan 23;580(2):661-8. Epub 2006 Jan 3.
107. Eline T. Luning Prak and Haig H. Kazazian Jr , Mobile elements and the human genome. *Nature*, November 2000, Vol 1
108. Weiner AM. SINEs and LINEs: the art of biting the hand that feeds you. *Curr Opin Cell Biol*. 2002 Jun;14(3):343-50.
109. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, Kazazian HH Jr. Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Dec;13(6):651-8.
110. M. J. Curcio and D. J. Garfinkel Heterogeneous Functional Ty1 Elements Are Abundant in the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome *Genetics*. 1994 April; 136(4): 1245–1259.
111. Henry L. Levin and John V. Moran. Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nature reviews, genetics* vol. 12 2011

112. N. de Parseval, T. Heidmann, Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes, *Cytogenet Genome Res* 110:318–332 (2005).
113. Wesley D. Gifford, Samuel L. Pfaff, Todd S. Macfarlan. Transposable elements as genetic regulatory substrates in early development. *Trends Cell Biol.* 2013
114. Liu G, et al. Analysis of primate genomic variation reveals a repeat-driven expansion of the human genome. *Genome Res* 2003;13:358–68.
115. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999
116. Chen JM, Stenson PD, Cooper DN, Ferec C. A systematic analysis of LINE-1 endonuclease-dependent retrotranspositional events causing human genetic disease. *Hum Genet* 2005
117. Callinan PA, Batzer MA. Retrotransposable elements and human disease. *Genome Dyn* 2006
118. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse, in sickness and in health. *Genome Res* 2008
119. Lyon MF. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenet Cell Genet* 1998
120. 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 U S A* 2000
121. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J Mol Biol* 2006
122. Morrish TA, et al. Endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition at mammalian telomeres. *Nature* 2007
123. Gladyshev EA, Arkhipova IR. Telomere-associated endonuclease-deficient Penelope-like retroelements in diverse eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007
124. Arcot SS, Wang Z, Weber JL, Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats: a source for the genesis of primate microsatellites. *Genomics* 1995
125. Jurka J, Pethiyagoda C. Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J Mol Evol* 1995
126. Justice CM, et al. Phylogenetic analysis of the Friedreich ataxia GAA trinucleotide repeat. *J Mol Evol* 2001

127. Kurosaki T, Ninokata A, Wang L, Ueda S. Evolutionary scenario for acquisition of CAG repeats in human SCA1 gene. *Gene* 2006
128. Callinan PA, et al. Alu Retrotransposition-mediated Deletion. *J Mol Biol* 2005.
129. Han K, et al. Genomic rearrangements by LINE-1 insertion-mediated deletion in the human and chimpanzee lineages. *Nucleic Acids Res* 2005.
130. Cordaux R. The human genome in the LINE of fire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
131. Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Genet Metab* 1999
132. Callinan PA, Batzer MA. Retrotransposable elements and human disease. *Genome Dyn* 2006
133. Bailey JA, Liu G, Eichler EE. An Alu transposition model for the origin and expansion of human segmental duplications. *Am J Hum Genet* 2003
134. Lee J, Han K, Meyer TJ, Kim HS, Batzer MA. Chromosomal inversions between human and chimpanzee lineages caused by retrotransposons. *PLoS ONE* 2008
135. Shapiro JA. Genome system architecture and natural genetic engineering in evolution. *Ann N Y Acad Sci.* 1999
136. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet* 2000
137. Sayah DM, Sokolskaja E, Berthoux L, Luban J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* 2004
138. Babushok DV, et al. A novel testis ubiquitin-binding protein gene arose by exon shuffling in hominoids. *Genome Res* 2007
139. Kaessmann H, Vinckenbosch N, Long M. RNA-based gene duplication: mechanistic and evolutionary insights. *Nat Rev Genet* 2009
140. Nekrutenko A, Li WH. Transposable elements are found in a large number of human protein-coding genes. *Trends Genet* 2001
141. Gotea V, Makalowski W. Do transposable elements really contribute to proteomes? *Trends Genet* 2006
142. Sorek R, Ast G, Graur D. Alu-containing exons are alternatively spliced. *Genome Res* 2002
143. Cordaux R. and Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution, *Nat Rev Genet.* 2009

144. Belancio VP, Hedges DJ, Deininger P. LINE-1 RNA splicing and influences on mammalian gene expression. *Nucleic Acids Res* 2006
145. Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger P. The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene* 2008
146. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 2004
147. Perepelitsa-Belancio V, Deininger P. RNA truncation by premature polyadenylation attenuates human mobile element activity. *Nat Genet* 2003
148. Lee JY, Ji Z, Tian B. Phylogenetic analysis of mRNA polyadenylation sites reveals a role of transposable elements in evolution of the 3'-end of genes. *Nucleic Acids Res* 2008
149. Chen C, Ara T, Gautheret D. Using Alu elements as polyadenylation sites: A case of retroposon exaptation. *Mol Biol Evol* 2009
150. Shankar R, Grover D, Brahmachari SK, Mukerji M. Evolution and distribution of RNA polymerase II regulatory sites from RNA polymerase III dependant mobile Alu elements. *BMC Evol Biol* 2004
151. Polak P, Domany E. Alu elements contain many binding sites for transcription factors and may play a role in regulation of developmental processes. *BMC Genomics* 2006
152. Speek M. Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Mol Cell Biol* 2001
153. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006
154. Faulkner GJ, et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet* 2009
155. L. Lavie, M. Kitova, E. Maldener, E. Meese, J. Mayer, CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML-2), *J. Virol.* 79 (2005)
156. H.R. Li, E.I. Shagisultanova, K. Yamashita, Z. Piao, M. Perucho, S.R. Malkhosyan, Hypersensitivity of tumor cell lines with microsatellite instability to DNA double strand break producing chemotherapeutic agent bleomycin, *Cancer Res.* 64 (2004)

157. G.F. Richard, B. Dujon, J.E. Haber, Double-strand break repair can lead to high frequencies of deletions within short CAG/CTG trinucleotide repeats, *Mol. Gen. Genet.* 261 (1999)
158. L. Montermini, E. Andermann, M. Labuda, A. Richter, M. Pandolfo, F. Cavalcanti, L. Pianese, L. Iodice, G. Farina, A. Monticelli, M. Turano, A. Filla, G. De Michele, S. Cocozza, The Friedreich ataxia GAA triplet repeat: premutation and normal alleles, *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997)
159. F. Yu, N. Zingler, G. Schumann, W.H. Stratling, Methyl- CpG-binding protein [2] represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001)
160. Hata K, Sakaki Y. Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 1997
161. Wang H, et al. SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *J Mol Biol* 2005
162. Xing J, et al. Alu element mutation spectra: molecular clocks and the effect of DNA methylation. *J Mol Biol* 2004
163. Rubin CM, VandeVoort CA, Teplitz RL, Schmid CW. Alu repeated DNAs are differentially methylated in primate germ cells. *Nucleic Acids Res* 1994
164. M.S. Turker, Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation, *Oncogene* 21 (2002)
165. M.I. Kang, M.G. Rhyu, Y.H. Kim, Y.C. Jung, S.J. Hong, C.S. Cho, H.S. Kim, The length of CpG islands is associated with the distribution of Alu and L1 retroelements, *Genomics* (2006).
166. C.Waddington. The epigenome, *Endeavour*, 1:18-20,1942
167. R. Holliday. Epigenetics: An Overview. *Dev Genet.*, 15:453-457,1994.
168. SL. Berger. The Complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007.
169. Zhang L, Eugeni EE, Parthun MR, Freitas MA Identification of novel histone post-translational modifications by peptide mass fingerprinting. *Chromosoma.* 2003
170. Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* 2002
171. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001

172. T. Kouzarides. Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007.
173. Levine SS, King IF, Kingston RE. Division of labor in polycomb group repression. *Trends Biochem Sci*. 2004
174. Lund AH, van Lohuizen M. Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*. 2004
175. Pirrotta V. Polycombining the genome: PcG, trxG, and chromatin silencing. *Cell*. 1998
176. Ringrose L, Paro R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet*. 2004
177. Cavalli G, Paro R. Epigenetic inheritance of active chromatin after removal of the main transactivator. *Science*. 1999
178. Ira M. Hall, Gurumurthy D. Shankaranarayana, Ken-ichi Noma, Nabieh Ayoub, Amikam Cohen, Shiv I. S. Grewa, Establishment and Maintenance of a Heterochromatin Domain, *Science* 2002
179. Koyanagi M, Baguet A, Martens J, Margueron R, Jenuwein T, Bix M.
180. EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells. *J Biol Chem*. 2005
181. Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 2001
182. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. *Science*. 2003
183. Ehrlich, M.. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res.*, 1982
184. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*. 1997
185. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996
186. R. Holliday. Epigenetics: An Overview. *Dev Genet.*, 15:453-457,1994.
187. X. Nan et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683):386-9, 1998.

188. Fuks et al, The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation, *J. Biom. Chem.*, 278:4035-4040, 2003.
189. Wood AJ., Oakey RJ. Genomic Imprinting in Mammals: Emerging Themes and Established Theories *PLoS Genet* 2(11): e147, 2006
190. Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective *Hum Reprod Update*. 2005
191. Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*. 2001
192. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet*. 2005
193. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, Rousseaux S, Khochbin S, Feil R. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO*, 2007
194. 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. *Hum Mol Genet*. 2004
195. Barton SC, Surani MA, Norris ML. Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*. 1984.
196. McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*. 1984
197. Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*. 1984
198. Jacobs PA, Wilson CM, Sprenkle JA, Rosenshein NB, Migeon BR. Mechanism of origin of complete hydatidiform moles. *Nature*. 1980
199. Surti U, Hoffner L, Chakravarti A, Ferrell RE. Genetics and biology of human ovarian teratomas. I. Cytogenetic analysis and mechanism of origin. *Am J Hum Genet*. 1990
200. Geuns E, De Temmerman N, Hilven P, Van Steirteghem A, Liebaers I, De Rycke M. Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet*. 2007

201. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Pa`ldi A, Jouannet P & Jeanpierre M. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Human Molecular Genetics* 9 2183–2187, 2000
202. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999
203. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*. 1992
204. Santos F. and Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals *Reproduction* 127 643–651, 2004
205. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*. 117:15-23. 2002
206. Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, Reik W. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis*. 35:88-93. (2003)
207. Lees-Murdock DJ, De Felici M, Walsh CP. Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage. *Genomics*. 82:230-237. (2003)
208. 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*. 120:2925-2932. (1994)
209. 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 Genet*. 4:e30. (2008)
210. Oakes CC, La Salle S, Smiraglia D, Robaire B, Trasler J. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci* 104(1):228-233, 2007.
211. Bao S, Obata Y, Carroll J, Domeki I, Kono T. Epigenetic modifications necessary for normal development are established during oocyte growth in mice. *Biol Reprod*. 62:616-621(2000)
212. Obata Y, Kono T. Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem*. 277:5285-5289. (2002)

213. Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod.* 22:26-35. (2007)
214. Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R, Haaf T. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature.* 403:501-502. (2000)
215. Olek A, Walter J The preimplantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 17:275-276. (1997)
216. Tremblay KD, Duran KL, Bartolomei MS (1997) A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol Cell Biol.* 17:4322-4329.
217. Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J.(2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol.* 10:475-478.
218. Grohmann M, Spada F, Schermelleh L, Alenina N, Bader M, Cardoso MC, Leonhardt H. (2005) Restricted mobility of Dnmt1 in preimplantation embryos: implications for epigenetic reprogramming.*BMC Dev Biol.* 5:18.
219. Dean W, Santos F, Stojkovic M, Zakhartchenko V, Walter J, Wolf E & Reik W 2001 Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *PNAS* 98 13734–13738.
220. Santos F, Hendrich B, Reik W & Dean W 2002 Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology* 41 172–182.
221. Arney KL, Fisher AG. Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci.* 2004
222. Francastel C, Schübeler D, Martin DI, Groudine M. Nuclear compartmentalization and gene activity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000
223. Phair RD, Scaffidi P, Elbi C, Vecerová J, Dey A, Ozato K, Brown DT, Hager G, Bustin M, Misteli T. Global nature of dynamic protein-chromatin interactions in vivo: three-dimensional genome scanning and dynamic interaction networks of chromatin proteins. *Mol Cell Biol.* 2004.
224. Kimura H, Cook PR. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J Cell Biol.* 2001
225. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006

226. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T *Dev Cell*. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. 2006
227. Lee JH, Hart SR, Skalnik DG. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*. 2004
228. Keohane AM, O'Neill LP, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol*. 1996
229. Ky Sha, Laurie A. Boyer. The chromatin signature of pluripotent cells. *Stembook*, 2009
230. Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH (2006) A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444:364–368
231. R. Keith Slotkin & Robert Martienssen Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome *Nature Reviews Genetics* 8, 272-285 (April 2007)
232. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ, Carmell MA A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442(7099):199-202, 2006
233. Goodier JL, Kazazian HH Jr. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell*. 2008
234. M. Cristina Magli, Gayle M. Jones, Kersti Lundin, Etienne Van den Abbeel and The Special Interest Group on Embryology Human Reproduction. *Atlas of Human Embryology: from Oocytes to Preimplantation Embryos*. Human Reproduction Volume 27 Supplement 1, 2012
235. Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123, 917–929.
236. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24731-7
237. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Schöler HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*. 1994 Nov;166(1):259-67.

238. Garcia-Perez JL, Marchetto MC, Muotri AR, Coufal NG, Gage FH, O'Shea KS, Moran JV. LINE-1 retrotransposition in human embryonic stem cells. *Hum Mol Genet.* 2007 Jul 1;16(13):1569-77.)
239. Mitalipov SM, Kuo HC, Hennebold JD, Wolf DP. Oct-4 expression in pluripotent cells of the rhesus monkey. *Biol Reprod.* 2003 Dec;69(6):1785-92
240. Tarkowski K. A. and Wróblewska J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *J Embryol Exp Morphol*, August 1967, 18, 155-180
241. Fleming TP, Sheth B, Fesenko I. Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci.* 2001 Aug 1;6:D1000-7.
242. Suwinska A, Czolowska R, Ozdzanski W, Tarkowski AK. Blastomeres of the mouse embryo lose totipotency after the fifth cleavage division: expression of Cdx2 and Oct4 and developmental potential of inner and outer blastomeres of 16- and 32-cell embryos. *Dev Biol.* 2008;322:133–144.
243. Georgiou I, Noutsopoulos D, Dimitriadou E, Markopoulos G, Apergi A, Lazaros L, Vaxevanoglou T, Pantos K, Syrrou M, Tzavaras T. Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet.* 2009 Apr 1;18(7):1221-8
244. Farkash EA, Kao GD, Horman SR, Prak ET: Gamma radiation increases endonuclease-dependent L1 retrotransposition in a cultured cell assay. *Nucleic Acids Res* 2006, 34:1196-1204
245. Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A: Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells.