



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΤΟΥ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ Χ ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ**

**ΔΑΣΟΥΛΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ



026000336956



Αρ. εγρ.:.....11011.2013..

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ, ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΕΚΔΟΣΕΩΝ ΔΙΔΑΚΤΙΚΩΝ ΒΙΒΛΙΩΝ (ΙΤΥΣΣΕ)



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ-ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΓΕΩΡΓΑΤΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΤΟΥ
ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ X ΣΤΗΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

ΔΑΣΟΥΛΑ ΑΓΓΕΛΙΚΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2007



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 της κ. Δασούλα Αγγελικής: 2-10-2002

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 484^ο/15-10-2002

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας- Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλανταρίδου Σοφία Λέκτορας Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-10-2002

«Μελέτη της μεθυλίωσης του DNA του χρωμοσώματος X στην ανθρώπινη αναπαραγωγή»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 605^ο/15-5-2007

Γεωργάτος Σπυρίδων Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Παρασκευαΐδης Ευάγγελος Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Γεωργίου Ιωάννης Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Γενετικής και Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καλανταρίδου Σοφία Επίκουρη Καθηγήτρια Μαιευτικής –Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μακρυγιαννάκης Αντώνης Επίκουρος Καθηγητής της Μαιευτικής και Γυναικολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Κρήτης

Σύρρου Μαρίκα Επίκουρη Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας –Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 20-6-2007

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Επαμεινώνδας Τσιάνος

Καθηγητής Παθολογίας



Επικεφαλής της Σχολής
[Handwritten signature]
ΤΣΑΓΓΑΛΑ



[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.]

Στους γονείς μου

[Faint, illegible text.]

Απόστολο και Ερασμία

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page.]



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Αρχικά, θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Σύρρρου Μαρίκα για την ανάθεση της διατριβής, την πολύπλευρη στήριξη και την αμέριστη συμπαράστασή της καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Η συμβολή της υπήρξε καθοριστική. Την ευχαριστώ ειλικρινά για όλη τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια. Ευχαριστώ θερμά το Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας κύριο Γεωργάτο Σπυρίδωνα και την Επίκουρο Καθηγήτρια κυρία Καλανταρίδου Σοφία, μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής για τη στήριξη και το ενδιαφέρον τους για την εξέλιξη της διατριβής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμη τον Αναπληρωτή Καθηγητή Ιατρικής Γενετικής και μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής κύριο Ιωάννη Γεωργίου για το ενδιαφέρον του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής μου, καθώς και την πολύ σημαντική του συμβολή στη συγγραφή των επιστημονικών συγγραμάτων.

Απευθύνω τις ευχαριστίες μου για τη συμβολή τους στην επιτυχή έκβαση της διατριβής μου στα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κύριο Παρασκευαΐδη Ευάγγελο, τον Καθηγητή Ουρολογίας κύριο Σοφικίτη Νικόλαο και τον Επίκουρο Καθηγητή Μαιευτικής-Γυναικολογίας κύριο Μακρυγιαννάκη Αντώνη.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη ΔΕΠ και ΕΤΕΠ του εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για τη βοήθεια και την φιλική συμπεριφορά τους. Ευχαριστώ θερμά τους συναδέλφους μου Αθανασία Σαλμά, Γιολάντα Μαρκάκη, Σουλτάνα Μαρκοπούλου, Χρόνη Κοτόγλου για την ηθική στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε τους ζητήθηκε. Σίγουρα χωρίς αυτούς όλα αυτά τα χρόνια θα περνούσανε λιγότερο



ευχάριστα. Ευχαριστώ θερμά την κυρία Ανδρομάχη Τσουμάνη-από τα παλαιότερα και βασικά μέλη του εργαστηρίου- για όλες τις συμβουλές και τη στήριξη που μου προσέφερε όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ θερμά τις νεότερες συναδέλφους του εργαστηρίου μου Λάλου Ηλιάνα και Δημητριάδου Ευτυχία και τους εύχομαι καλή συνέχεια στο έργο τους.

Θα ήθελα να εκφράσω ειλικρινά την ευγνωμοσύνη μου σε ένα από τα πρώτα άτομα που συνάντησα στο εργαστήριο και που δυστυχώς δεν βρίσκεται πια κοντά μας, στην κυρία Βασιλεία Γιώτη-Οικονόμου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους συναδέλφους Φαίνια Κάβουρα και Άγγελο Σκύρλα για την ουσιαστική συμβολή τους σε πολύ εξειδικευμένα θέματα της εργασίας μου.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Φίλιππο τον Πατσαλή και όλο το εργαστήριο Κυτταρογενετικής του Ινστιτούτου Γενετικής και Νευρομυϊκών Παθήσεων Λευκωσίας για την πολύ σημαντική τους συμβολή στην εξέλιξη της διατριβής μου.

Θα ήθελα ακόμη να αναφέρω ότι το παρόν ερευνητικό έργο συγχρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση –Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ) & Εθνικούς Πόρους, στα πλαίσια του προγράμματος με τίτλο «ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ» το οποίο εντάσσεται στο ΕΠΕΑΕΚ II του 3^{ου} Κοινοτικού Πλαισίου Στήριξης του ΥΠ.Ε.Π.Θ

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου, την αδελφή μου για όλη την υπομονή που έδειξαν και την ουσιαστική ψυχική συμπαράστασή τους στο δύσκολο έργο που ανέλαβα.



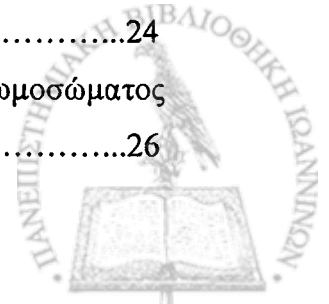
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

σελ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

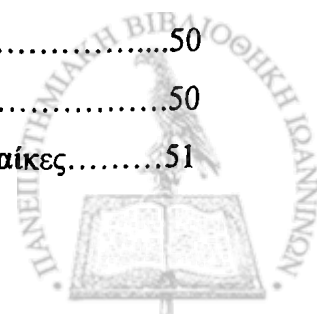
Προίμιο.....	1
1.Γονιδιωματική Αποτύπωση- Γενικά.....	2
2. Μεθυλίωση του DNA.....	3
2.1 Μεθυλίωση και εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	4
2.2Μεθυλίωση του DNA και γονιδιωματική αποτύπωση.....	5
2.3 Μεθυλίωση και διαμόρφωση χρωματινικής δομής.....	6
2.4 Μεθυλίωση του DNA και κλινικές εφαρμογές.....	7
2.4.1 Σύνδρομα και νοσήματα στον άνθρωπο σχετιζόμενα με τη μεθυλίωση του DNA.....	7
2.4.2 Μελλοντικές θεραπευτικές προοπτικές.....	8
3. Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.....	9
3.1 XIC/XIST.....	10
3.2 Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X κατά τη γαμετογένεση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε θηλαστικά.....	12
3.3 Γονίδια στο χρωμόσωμα X που διαφεύγουν της αδρανοποίησης.....	14
3.4 Μη τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.....	15
4. Συνεχείς αυτόματες αποβολές.....	19
4.1 Λόγοι που μπορεί να προκαλέσουν συνεχείς αυτόματες αποβολές.....	20
4.1.1 Γενετικές ανωμαλίες.....	20
4.1.2 Ορμονικές και μεταβολικές δυσλειτουργίες.....	22
4.1.3 Ανατομικά προβλήματα της μήτρας.....	23
4.1.4 Θρομβοφιλικοί παράγοντες.....	23
4.1.5 Παράγοντες μόλυνσης, περιβαλλοντικοί παράγοντες, σύνδρομο αντι-φωσφολιπιδίων κ.ά.....	23
4.1.6 Συνεχείς αυτόματες αποβολές αδιευκρίνιστης αιτιολογίας.....	24
4.2 Ιδιοπαθείς αποβολές και εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.....	24
4.3 Μέθοδοι μελέτης του προτύπου αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.....	26



5. Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (ΠΕΔ).....	28
5.1 Κλινικές εφαρμογές της ΠΕΔ.....	29
5.2 ΠΕΔ και διαταραχή του προτύπου αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.....	30
6. Ανδρική Υπογονιμότητα.....	30
6.1 Σπερματογένεση και διαταραχές αυτής.....	32
6.2 Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X κατά τη σπερματογένεση.....	33
6.3 Γονιδιωματική Αποτύπωση.....	34
6.3.1 Γονιδιωματική Αποτύπωση κατά τη γαμετογένεση και εμβρυϊκή ανάπτυξη.....	34
6.4 Γονιδιωματική Αποτύπωση και διαταραχές κατά τη σπερματογένεση.....	35
6.5 Γονιδιωματική Αποτύπωση και SNRPN γονίδιο.....	36
6.5.1 Σύνδρομα με Γονιδιωματική Αποτύπωση και Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή.....	37
6.5.2 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στο φαινόμενο της Γονιδιωματικής Αποτύπωσης.....	39
7. Σχεδιασμός ανιχνευτών κατά μήκος του χρωμοσώματος X για χρήση του στη μεθοδολογία του πολλαπλού υβριδισμού με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές που είναι τοποθετημένοι επάνω σε πρωτότυπη μικροσυστοιχία.....	40

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης.....	43
2. Υλικό της μελέτης.....	44
3. Κυτταρογενετικές εξετάσεις.....	45
3.1 Καρυότυπος από κύτταρα περιφερικού αίματος.....	46
3.1.1 Δημιουργία παρασκευασμάτων.....	47
3.1.2 Χρώση των παρασκευασμάτων με Giemsa.....	47
3.1.3 Ανάλυση καρυότυπου.....	48
3.2 Κυτταρογενετική εξέταση αποβληθέντων εμβρύων.....	48
3.2.1 Καλλιέργεια των κυττάρων.....	48
3.2.2 Συγκομιδή των κυττάρων.....	50
3.3 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα.....	50
4. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες.....	51



5. Χρησιμοποιούμενες τεχνικές.....	52
5.1 Απομόνωση DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα.....	52
5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	53
5.3 Ραδιενεργός Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	56
5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου και Αυτοραδιογραφία.....	57
5.4.1 Παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 6% (w/v).....	57
5.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων.....	58
5.4.3 Ηλεκτροφόρηση-Αυτοραδιογραφία.....	58
5.4.4 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα.....	59
5.5 Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X.....	60
5.5.1 Επάση με το HpaII.....	61
5.5.2 Ραδιενεργός αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά την πέψη.....	62
6. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X και της γονιδιωματικής αποτύπωσης του γονιδίου SNRPN στο DNA ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών.....	63
6.1 Δειγματοληψία ορχικού ιστού και φύλαξη αυτού.....	63
6.2 Απομόνωση DNA από ιστό.....	63
6.3 Χημική κατεργασία με NaHSO ₃ (bisulfite modification).....	64
6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά από χημική κατεργασία.....	67
6.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο HUMARA	67
6.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο SNRPN	68
6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	70
7. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια μετά από προεμφυτευτική διάγνωση.....	71
8. Σύνθεση ανιχνευτών κατά μήκος του χρωμοσώματος X.....	72
8.1 Πολλαπλασιασμός των ανιχνευτών.....	74
8.2 Κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών.....	75

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9. Αποτελέσματα κυτταρογενετικών εξετάσεων.....	81
9.1 Ανάλυση καρυότυπου σε ζευγάρια με καθέξιν αποβολές.....	81



10. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με καθέξιν αποβολές.....	84
10.1 Αποτελέσματα συλλογής πληροφοριακών-ετερόζυγων γυναικών.....	84
10.2 Ποσοτική εκτίμηση της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X.....	84
10.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	85
10.4 Αποτελέσματα από την εκτίμηση των ποσοστών αδρανοποίησης.....	85
11. Αποτελέσματα κυτταρογενετικής εξέτασης σε ιστούς από προϊόντα αποβολών.....	90
12. Αποτελέσματα από τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση.....	91
12.1 Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε περιπτώσεις οικογενειών με αποβολές.....	91
13. Αποτελέσματα από τη μελέτη της μεθυλίωσης σε DNA ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών.....	92
13.1 Αποτελέσματα των τριών μεθόδων μελέτης (μικροσκοπική, SNRPN και HUMARA ανάλυση) στους ιστούς ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία.....	92
13.2 Αποτελέσματα των τριών μεθόδων μελέτης (μικροσκοπική, SNRPN και HUMARA ανάλυση) στους ιστούς ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.....	95
14. Σύνθεση ανιχνευτών για μικροσυτοιχίες.....	96
14.1 Πολλαπλασιασμός των DNA ανιχνευτών.....	96
14.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	98
14.3 Κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών.....	100
14.4 Πολλαπλασιασμός των κλώνων που επιλέχθηκαν με τη μέθοδο της PCR και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης.....	101

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

15. Μεθυλίωση του DNA και ανθρώπινη αναπαραγωγή- Γενικά.....	105
ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΘΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ (ΟΜΑΔΑ Α)	
16. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε ελληνικό πληθυσμό γυναικών με ιδιοπαθείς αποβολές.....	107
16.1 Αιτίες συνεχών αποβολών γενετικής φύσεως.....	110



16.2 Λόγοι για τους οποίους το ποσοστό αδρανοποίησης στη μελέτη μας δεν είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με εκείνο των μαρτύρων.....	111
ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΙ ΑΝΔΡΕΣ (ΟΜΑΔΑ Β)	
17. Μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων SNRPN και HUMARA, σε βιοψίες ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών.....	113
18. ΚΟΡΙΤΣΙΑ ΠΟΥ ΓΕΝΝΗΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΔ(ΟΜΑΔΑ Γ)	
18.1 Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση (ΠΕΔ).....	116
19. Κυτταρογενετικές εξετάσεις σε ζευγάρια με καθέξιν αποβολές.....	117
19.1 Καρυότυπος Γονέων- Πολυμορφισμοί των χρωμοσωμάτων.....	117
19.2 Κυτταρογενετική εξέταση σε προϊόντα αποβολών.....	119
20. Σύνθεση ανιχνευτών.....	120
20.1 Μέθοδος πολλαπλού υβριδισμού με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές (ΜΑΡΗ- multiplex amplifiable probe hybridization)-Γενικά.....	120
20.2 Συζήτηση της πειραματικής διαδικασίας και των αποτελεσμάτων.....	121
20.2.1α)Πολλαπλασιασμός των DNA-ανιχνευτών με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR).....	121
20.2.2 β)Κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών.....	122
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125
ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ.....	127
Ελληνική Περίληψη.....	127
Αγγλική Περίληψη.....	129
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	131



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Προοίμιο

Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν από τους συνηθέστερους επιγενετικούς μηχανισμούς που μαζί με τις χημικές τροποποιήσεις των ιστονών εμπλέκονται σε μια σειρά φαινομένων, όπως εμβρυϊκή ανάπτυξη, μεταγραφική διαδικασία, διαμόρφωση χρωματινικής δομής, αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, φαινόμενο γονιδιωματικής αποτύπωσης και διατήρηση χρωμοσωμικής σταθερότητας (Robertson et al., 2005).

Παράλληλα με όλες αυτές τις σημαντικές διαδικασίες, σήμερα είναι γνωστό ότι ένας μεγάλος αριθμός συνδρόμων και γενετικών νοσημάτων στον άνθρωπο σχετίζονται με διαταραχές του προτύπου μεθυλίωσης.

Τελευταία, το ενδιαφέρον στρέφεται στην εμπλοκή του φαινομένου της μεθυλίωσης του DNA και των διαταραχών αυτής στη διαδικασία της ανθρώπινης αναπαραγωγής. Αναφέρεται πως το μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X μπορεί ενδεχομένως να σχετίζεται με υπογονιμότητα σε ζευγάρια που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν.

Επιπλέον, στο πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής πλήθος εργασιών αναφέρουν διαταραχές στην εγκατάσταση και τη διατήρηση του επιγενετικού σήματος, κυρίως λόγω των χειρισμών που γίνονται κατά τη διάρκεια της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, με αποτέλεσμα το μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA που ενδεχομένως μπορεί να σχετίζεται με την εμφάνιση γενετικών διαταραχών στα παιδιά που θα γεννηθούν.



1. Γονιδιωματική Αποτύπωση-Γενικά

Γονιδιωματική αποτύπωση είναι η επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση ενός γονιδίου που προέρχεται μόνο από το ένα γονεϊκό αλληλόμορφο (Walter and Paulsen, 2003-Review). Η γονιδιακή έκφραση του ενός μόνο αλληλομόρφου εξασφαλίζεται με μια σειρά επιγενετικών τροποποιήσεων (επιγενετικά σήματα), όπως η μεθυλίωση των κυτοσινών και ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών.

Στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα τα επιγενετικά σήματα εξαφανίζονται για να εμφανιστούν αργότερα κατά τη γαμετογένεση ανάλογα με το φύλο του γονέα που δίνει το συγκεκριμένο αλληλόμορφο και να διατηρηθούν στη συνέχεια και μετά τη γονιμοποίηση (Scarano et al.;2005-Review).

Τα γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση δεν βρίσκονται ομοιόμορφα κατανεμημένα στο γονιδίωμα, αλλά σχηματίζουν συσσωματώματα (clusters). Έτσι φαίνεται ότι το φαινόμενο του ελέγχου της γίνεται σε επίπεδο χρωμοσωμικής περιοχής (domain) και όχι γονιδιώματος (Horsthemke and Ludwing, 2005-Review). Ένα κέντρο γονιδιωματικής αποτύπωσης (imprinting centre-IC) που δρα in cis ελέγχει τοπικά την εγκατάσταση, καθώς και τη διατήρηση του γονιδιωματικού «σήματος» (Horsthemke and Ludwing, 2005-Review).

Τα γονεϊκά αλληλόμορφα των γονιδίων που υφίστανται γονιδιωματική αποτύπωση παρουσιάζουν διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης και οι περιοχές αυτές καλούνται περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση (ΠΔΜ) [differentially methylated regions (DMRs)]. Οι ΠΔΜ διακρίνονται σε πρωτογενείς, όπου η εγκατάσταση της μεθυλίωσης γίνεται κατά τη γαμετογένεση και διατηρείται κατόπιν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, και σε δευτερογενείς όπου η μεθυλίωση συμβαίνει κατά την εμβρυογένεση. Οι πρωτογενείς ΠΔΜ φαίνεται ότι περιέχουν τα κέντρα ελέγχου της γονιδιωματικής αποτύπωσης (IC) (Robertson, 2005-Review).

Απαραίτητα για τη διαδικασία της εγκατάστασης και διατήρησης της μεθυλίωσης είναι μια σειρά ενζύμων (μεθυλοτρανσφεράσες). Εδώ θα πρέπει να τονιστεί ότι όλη η διαδικασία της γονιδιωματικής αποτύπωσης είναι πολύπλοκη και ότι ο μηχανισμός εξακολουθεί να είναι μην είναι πλήρως διευκρινισμένος.

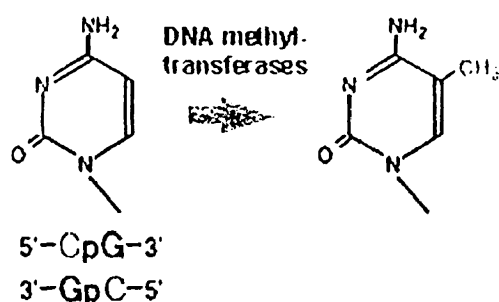


2. Μεθυλίωση του DNA

Η εισαγωγή του όρου μεθυλίωση των νουκλεϊνικών οξέων έγινε πριν από περισσότερο από 40 χρόνια, όταν η ομάδα των Fleissner και Borek περιέγραψε για πρώτη φορά το φαινόμενο (Fleissner and Borek, 1963). Λίγα χρόνια αργότερα ο Scarano (Scarano, 1973) αναφέρει ότι επιγενετικές τροποποιήσεις του γονιδιώματος, όπως η μεθυλίωση των κυτοσινών που ακολουθείται από απαμίνωση για να προκύψει τελικά η νουκλεοτιδική βάση θυμίνη, σχετίζονται με την γονιδιακή έκφραση και τη διαφοροποίηση.

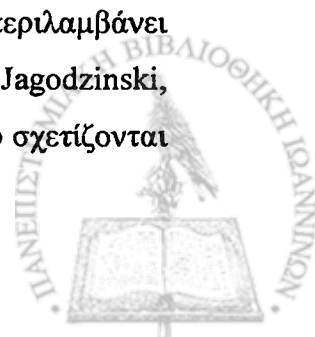
Η μεθυλίωση του DNA που είναι η βιοχημική προσθήκη μεθυλομάδας (-CH₃) σε μια νουκλεοτιδική βάση, είναι η σημαντικότερη ίσως χημική τροποποίηση του γονιδιώματος και συμβαίνει σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς: από βακτήρια μέχρι φυτά και μύκητες και από τα ασπόνδυλα μέχρι τα σπονδυλωτά (Scarano et al.;2005-Review). Υπάρχουν τρία γνωστά είδη μεθυλίωσης νουκλεοτιδικής βάσης: η αδενίνη μπορεί να τροποποιηθεί στην θέση N-6 (σε βακτήρια και πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς) (Baniushin, 2005), η κυτοσίνη στις θέσεις N-4 (κυρίως σε θερμοφιλα βακτήρια) (Gromona and Khoroshaev, 2003) και C-5, και τέλος η συνηθέστερη χημική τροποποίηση μεταξύ όλων των οργανισμών είναι αυτή της κυτοσίνης στην θέση C-5 (Bestor, 2000).

Αναλυτικά, ο τελευταίος τύπος μεθυλίωσης περιλαμβάνει την προσθήκη -CH₃ στη θέση 5C του δακτυλίου της κυτοσίνης (σχήμα 1) και απαιτεί τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων, των μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferases-DNMT's) (σχήμα 1).



(Σχήμα 1) : Δράση των μεθυλοτρανσφερασών για την προσθήκη -CH₃ στον 5-C του δακτυλίου της κυτοσίνης. (Taylor, 2006)

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η οικογένεια των μεθυλοτρανσφερασών περιλαμβάνει πέντε μέλη: DNMT2, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L και DNMT1 (Turek and Jagodzinski, 2005-Review). Καλύτερα χαρακτηρισμένες είναι οι DNMT3A και DNMT3B που σχετίζονται



με τη *de novo* μεθυλίωση και η DNMT1 για τη διατήρηση της μεθυλίωσης. Όλες οι μεθυλοτρανσφεράσες χρησιμοποιούν έναν κοινό καταλυτικό μηχανισμό και δρουν παρουσία του συνενζύμου AdoMet (S-adenosylmethionine) ως πηγή προέλευσης των $-CH_3$. Επίσης, στη διαδικασία της μεθυλίωσης εμπλέκονται και οι CpG πρωτείνες πρόσδεσης (methyl CpG binding proteins –MBD's) για την «αναγνώριση» της μεθυλιωμένης περιοχής (Feinberg et al.,2001).

Στα φυσιολογικά κύτταρα η μεθυλίωση είναι συχνότερη σε περιοχές με ελαττωμένη συχνότητα CG δινουκλεοτιδίων (CG poor). Οι περιοχές με αυξημένη συχνότητα CG δινουκλεοτιδίων (CG rich), όπως οι CpG νησίδες που έχουν συνήθως μέγεθος 1-2kb, εντοπίζονται στους υποκινητές πολλών γονιδίων και γενικά δεν είναι μεθυλιωμένες. Εξαιρέση αποτελούν το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης (genetic imprinting) και η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X στα θήλεα θηλαστικά άτομα, όπου οι CpG νησίδες των υποκινητών είναι μεθυλιωμένες (Herman et al,1996). Μεθυλίωση σε φυσιολογικά μη-μεθυλιωμένες CpG νησίδες έχει αναφερθεί σε αθανατοποιημένα και μετασχηματισμένα κύτταρα και συνδέεται με καρκινογένεση. Επίσης είναι γνωστό ότι εκατοντάδες CpG νησίδες εμφανίζουν υπερμεθυλίωση σε κακοήθεις όγκους (Siedlecki and Zielenkiewicz, 2006-Review).

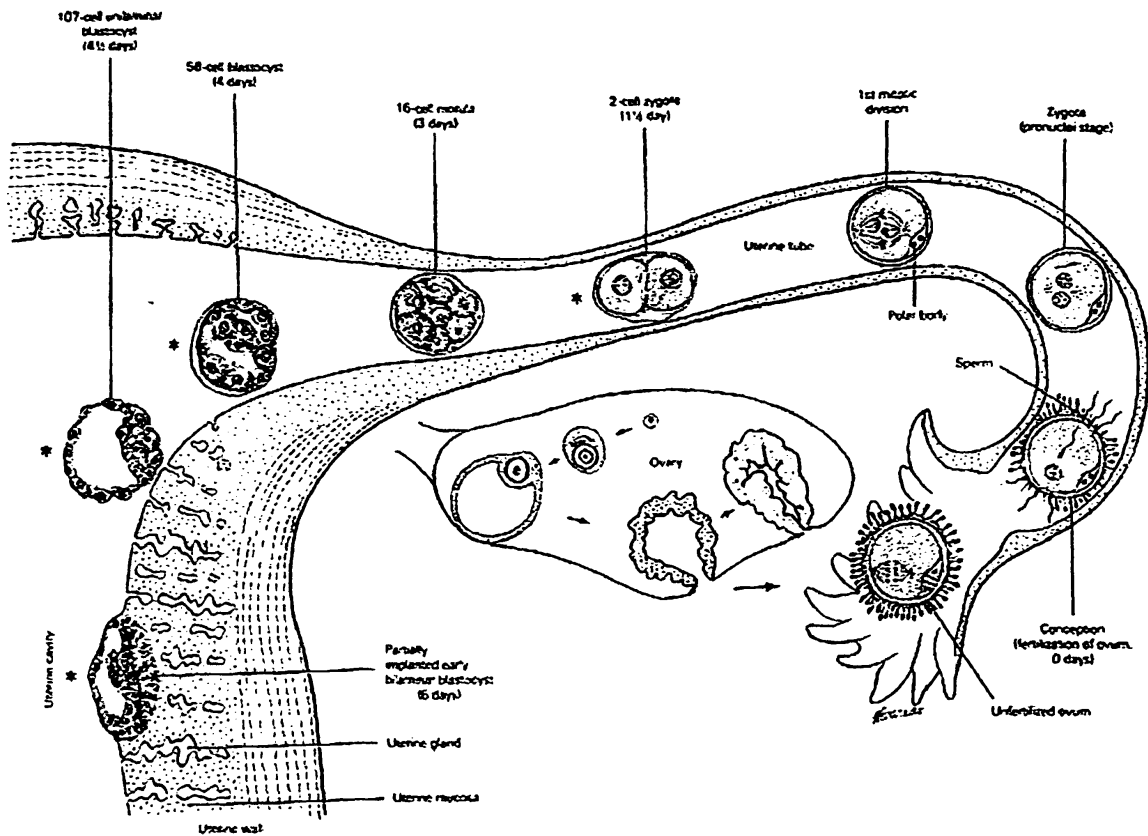
Ο ρόλος της μεθυλίωσης του DNA κατά τη γονιδιακή ρύθμιση μελετάται εκτενώς τις τελευταίες δεκαετίες.

2.1 Μεθυλίωση και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Στον άνθρωπο κατά τα αρχικά στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης (από τη δημιουργία του ζυγωτού έως το στάδιο 8 κυττάρων) (σχήμα 2) το γονιδίωμα είναι απομεθυλιωμένο. Από το στάδιο των 8 κυττάρων και μέχρι το στάδιο των 16 κυττάρων πραγματοποιείται *de novo* μεθυλίωση του γονιδιώματος, τροποποιώντας το και προσθέτοντας με αυτό τον τρόπο επιγενετικές πληροφορίες (Fulka et al.,2004).

Μέχρι το στάδιο του βλαστίδιου η διαδικασία της μεθυλίωσης έχει ολοκληρωθεί. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως επιγενετικός επανα-προγραμματισμός (epigenetic reprogramming). Η σπουδαιότητα της μεθυλίωσης φαίνεται από το γεγονός ότι σε πειράματα knockout mutants σε ποντίκια που πραγματοποιήθηκαν απουσία μεθυλοτρανσφερασών (Dnmt3α και Dnmt3β)(Okano et al.,1999), όλα τα έμβρυα πέθαναν στο στάδιο του μοριδίου. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη σπουδαιότητα της μεθυλίωσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη.





(Σχήμα 2). Στάδια εμβρυϊκής ανάπτυξης στον άνθρωπο

2.2 Μεθυλίωση του DNA και γονιδιωματική αποτύπωση

Η γονιδιωματική αποτύπωση-όπως ήδη αναφέρθηκε- είναι η επιλεκτική έκφραση γονιδίου που προέρχεται μόνο από το ένα γονεϊκό αλληλόμορφο. Πρόκειται για έναν επιγενετικό μηχανισμό ελέγχου της γονιδιακής έκφρασης χωρίς αλλαγές στην αλληλουχία DNA. Γονιδιωματική αποτύπωση έχει παρατηρηθεί στα ευθήρια θηλαστικά, τα μαρσιποφόρα καθώς και τα ανώτερα φυτά (Scarano et al.;2005-Review).

Η επιλεκτική έκφραση του ενός αλληλομόρφου των γονιδίων με γονιδιωματική αποτύπωση βασίζεται σε επιγενετικές τροποποιήσεις που λέγονται επιγενετικά σήματα. Η μεθυλίωση των CpG δινοκλεοτιδίων είναι ένα τέτοιο επιγενετικό σήμα (Scarano et al.;2005-Review).

Διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης των δύο αλληλομόρφων (μητρικού, πατρικού) στους γαμέτες ή το ζυγωτό οδηγούν στη διαφορετική έκφραση αυτών των γονιδίων στα σωματικά κύτταρα των απογόνων. Η διαφορετική έκφραση μπορεί να αφορά όλα τα κύτταρα ή συγκεκριμένους ιστούς ή ακόμη και αναπτυξιακά στάδια. Μέχρι σήμερα περίπου 80 γονίδια



πιστεύεται ότι υπόκεινται στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης, αλλά ο αριθμός τους συνεχώς αυξάνεται (Robertson, 2005, Review).

Οι περιοχές των γονιδίων που χαρακτηρίζονται από διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης λέγονται περιοχές με διαφορετική μεθυλίωση [differentially methylated regions (DMRs)]. Οι CpG νησίδες των περιοχών με διαφορετική μεθυλίωση είναι συνήθως μεθυλιωμένες στο ένα χρωμόσωμα, ενώ δεν είναι στο άλλο (Mann, 2001, Review). Υπάρχουν δύο τύποι περιοχών με διαφορετική μεθυλίωση: οι πρωτογενείς περιοχές που περιλαμβάνουν αλληλουχίες DNA διαφορετικά μεθυλιωμένες στα ωοκύτταρα και τα σπερματοζώαρια και δευτερογενείς DMRs που προκύπτουν μετά τη γονιμοποίηση, ή μετά από το «κύμα» *de novo* μεθυλίωσης σε πρώιμα στάδια μετά τη γονιμοποίηση.

Δευτερογενείς περιοχές διαφορετικής μεθυλίωσης μπορεί να προκύψουν και από πρωτογενείς με επέκταση της μεθυλίωσης (spreading). Συχνά, οι υποκινητές των αποσιωπημένων αλληλομόρφων των γονιδίων που υφίστανται τη γονιδιωματική αποτύπωση είναι μεθυλιωμένοι, πιθανώς για να σημάνουν την έναρξη ή να βοηθήσουν στη διατήρηση της κατάστασης αποσιώπησης (Mann, 2001, Review).

Ελλείψεις και ακατάλληλη μεθυλίωση των περιοχών ελέγχου της γονιδιωματικής αποτύπωσης (IC) σχετίζονται με απώλεια της γονιδιωματικής αποτύπωσης (loss of imprinting-LOI) δηλαδή απώλεια της φυσιολογικής έκφρασης των αλληλομόρφων (Scarano et al.;2005-Review). Φαίνεται ότι η μεθυλίωση του DNA παίζει καθοδηγητικό μοριακό ρόλο κατά τη διαδικασία της γονιδιωματικής αποτύπωσης (Scarano et al.;2005-Review), αν και ο μηχανισμός που είναι πολύπλοκος δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί.

2.3 Μεθυλίωση και διαμόρφωση χρωματινικής δομής

Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από συμπυκνωμένη δομή και καταστολή της γονιδιακής έκφρασης (Paulsen and Ferguson-Smith; 2001- Review).

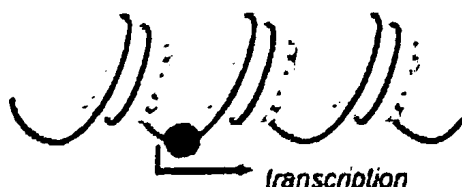
Στην ετεροχρωματίνη οι CpG αλληλουχίες είναι συνήθως μεθυλιωμένες και οι ιστόνες υποακετυλιωμένες, σε αντίθεση με την μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη που περιέχει ακετυλιωμένες ιστόνες και αντιγράφεται νωρίς κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου.

Methylated DNA



● Methylation
○ Acetylation

Unmethylated



(Σχήμα 3). Η από-μεθυλίωση του DNA επιτρέπει την ακετυλίωση των ιστονών καθώς και την πρόσδεση μεταγραφικών συμπλόκων, σε αντίθεση με το μεθυλιωμένο DNA που περιέχει υπο-ακετυλιωμένες ιστόνες και δεν παρουσιάζει μεταγραφική ενεργότητα. (Taylor, 2006)

Στις περιοχές με γονιδιωματική αποτύπωση παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στην χρωματινική διαμόρφωση μεταξύ των δύο αλληλομόρφων που φαίνονται από τις διαφορές στην ακετυλίωση των ιστονών, αλλά και το μη-συγχρονισμένο διάστημα διπλασιασμού. Για παράδειγμα στην περίπτωση του γονιδίου με αποτύπωση SNRNP, το ένα αλληλόμορφο είναι μεθυλιωμένο (μητρικό) και επίδραση της ουσίας 5-αζακυτιδίνη (5-azadeoxycytidine) επιτυγχάνει απομεθυλίωση και αυξάνει τα επίπεδα ακετυλίωσης της ιστόνης H4 στον υποκινητή του (Paulsen and Ferguson-Smith, 2001, review).

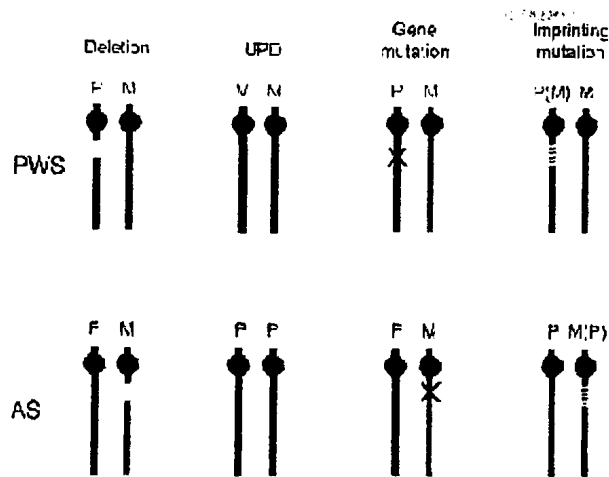
2.4 Μεθυλίωση του DNA και κλινικές εφαρμογές

2.4.1 Σύνδρομα και νοσήματα στον άνθρωπο σχετιζόμενα με μεθυλίωση του DNA

Τα τελευταία χρόνια όλο και μεγαλώνει ο αριθμός γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου όπως π.χ. καρκίνος, τα σύνδρομα Prader-Willi, Angelman, Beckwith-Wiedemann, Silver-Russel, κλπ. που έχουν σχέση με διαταραχές του φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης του DNA (Walter and Paulsen, 2003). Έτσι σήμερα, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι διάγνωσης που στηρίζονται στην ύπαρξη αλλαγών του προτύπου μεθυλίωσης (π.χ. ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης –methylation specific PCR).

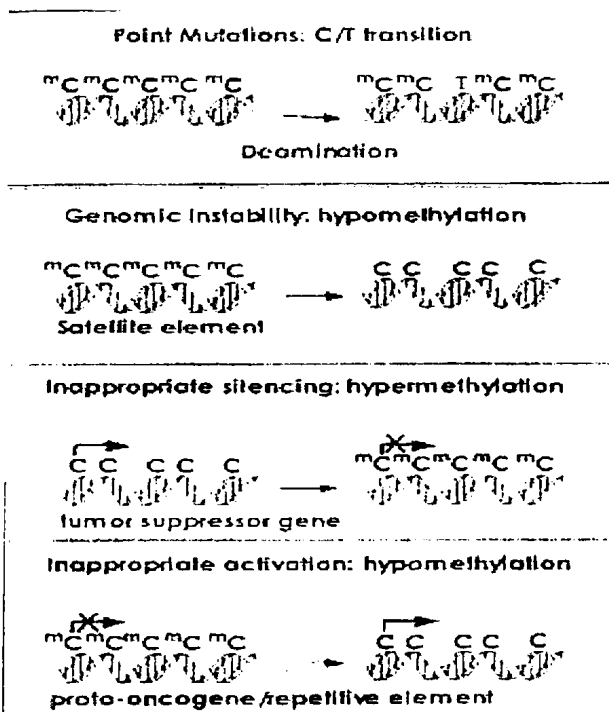
Στα σύνδρομα τα οφειλόμενα σε διαταραχές του προτύπου της γονιδιωματικής αποτύπωσης η μεθυλίωση αφορά συγκεκριμένες περιοχές γονιδίων (σχήμα 4α), στον καρκίνο όμως παρουσιάζεται συνήθως υπερ-μεθυλίωση υποκινητών συγκεκριμένων γονιδίων ή και υπο-μεθυλίωση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών σε μεγάλη έκταση του γονιδιώματος (σχήμα 4β), οι οποίες προκαλούν τελικά αλλαγές στην χρωματινική δομή (σχήμα 4α) (Scarano et al., 2005-Review). Η υπερ-μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων οδηγεί σε αναστολή της έκφρασης αυτών (αποσιώπηση ογκο-κατασταλτικών γονιδίων), ενώ η υπο-μεθυλίωση σε ενεργοποίηση και έκφραση γονιδίων που φυσιολογικά είναι αποσιωπημένα (πρωτο-ογκογονίδια) ή και σε χρωμοσωμική αστάθεια (Scarano et al., 2005-Review).





(Σχήμα 4α). Τα σύνδρομα PW και Angelman οφείλονται σε 1) ελλείμματα (deletion), 2) σε μονογονεϊκή ισοδισωμία (uniparental disomy-UPD) ή 3) σε αλλαγές του προτύπου μεθυλίωσης.

(P: πατρικό αλληλόμορφο, M: μητρικό αλληλόμορφο).



(Σχήμα 4β). Μεταβολές του προτύπου μεθυλίωσης του DNA μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης. Στην περίπτωση του καρκίνου η μεθυλίωση του DNA μπορεί να οδηγήσει σε: (1) σημειακή μετάλλαξη (μέσω απαμίνωσης η 5-μέθυλο-κυτοσίνη μετατρέπεται σε θυμίνη), (2) αστάθεια του γονιδιώματος μετά από υπομεθυλίωση των δορυφορικών αλληλουχιών 3) καταστολή της έκφρασης γονιδίων μετά από υπερ-μεθυλίωση και 4) ακατάλληλη ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης πρωτο-ογκογονιδίων/επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών μετά από υπομεθυλίωση (Scarano, 2005)

2.4.2 Μελλοντικές θεραπευτικές προοπτικές

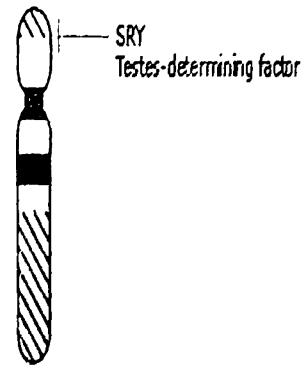
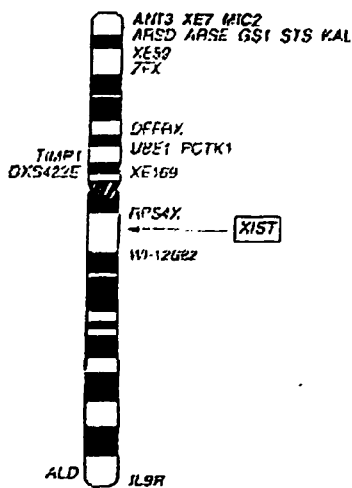
Όπως προαναφέρθηκε η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης του DNA είναι αιτία πολλών σοβαρών ασθενειών στον άνθρωπο. Πολλές προσπάθειες καταβάλλονται για την ανάπτυξη νέων θεραπευτικών μεθόδων που να βασίζονται στην αλλαγή της κατάστασης μεθυλίωσης του DNA ή και την χημική τροποποίηση των ιστονών του. Οι σύγχρονες θεραπείες στοχεύουν σε αποκατάσταση της γονιδιακής έκφρασης με αλλαγές στην κατάσταση μεθυλίωσης, κυρίως απομεθυλίωση. Μεγάλες ελπίδες εναποτίθενται σε θεραπείες που



βασίζοντα στην εξουδετέρωση της δράσης των μεθυλοτρανσφερασών και των αποκετυλασών των ιστονών (Scarano et al., 2005-Review).

3. Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X

Είναι γνωστό ότι το χρωμόσωμα X (σχήμα 5α) είναι ένα μεγάλο σε μέγεθος χρωμόσωμα (150 Mbp) με περίπου 1400 γονίδια που ελέγχουν σημαντικές λειτουργίες (HGP, 2006). Για παράδειγμα μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 24 γονίδια, μεταλλάξεις των οποίων είναι υπεύθυνες για τη φυλοσύνδετη νοητική υστέρηση. Αντίθετα το χρωμόσωμα Y (σχήμα 5β) είναι μικρότερο σε μέγεθος (50Mbp) και διαθέτει 200 περίπου γονίδια τα περισσότερα από τα οποία σχετίζονται με τη σπερματογένεση. Συνήθως με τον όρο φυλοσύνδετα νοσήματα εννοούμε κυρίως νοσήματα των οποίων τα υπεύθυνα γονίδια βρίσκονται στο χρωμόσωμα X.



(Σχήμα 5α). Χρωμόσωμα X

(Σχήμα 5β). Χρωμόσωμα Y

Τα θηλυκά θηλαστικά άτομα έχουν δύο φυλετικά χρωμοσώματα X, σε αντίθεση με τα αρσενικά που έχουν ένα μοναδικό X. Αυτή η διαφορά θα μπορούσε να δημιουργήσει πρόβλημα «γενετικής δόσης» μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων, όσον αφορά στα γονίδια του χρωμοσώματος X.

Ο μηχανισμός αυτός εξισορρόπησης των γονιδιακών προϊόντων των γονιδίων του χρωμοσώματος X στα δύο φύλα υπάρχει και είναι η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Δηλαδή το ένα από τα δύο χρωμοσώματα X στα θηλυκά αδρανοποιείται νωρίς κατά την εμβρυϊκή ζωή (όψιμο στάδιο βλαστοκύστης -late blastocyst stage). Η αδρανοποίηση είναι τυχαία, δηλ. σε κάθε κύτταρο η πιθανότητα αδρανοποίησης του μητρικού ή πατρικού χρωμοσώματος X είναι 50%-50%.



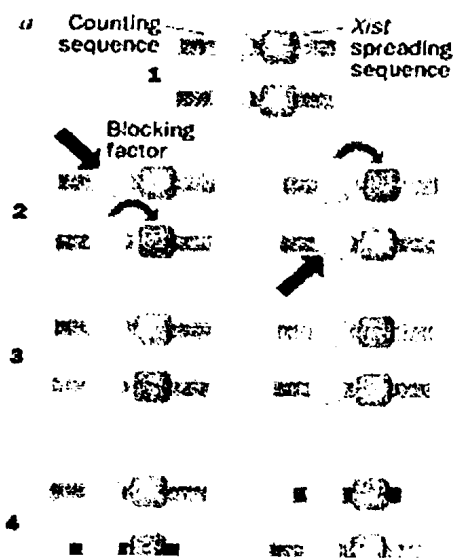
Η διατήρηση της αναλογίας αδρανοποίησης (1:1) μητρικού ή πατρικού χρωμοσώματος σε όλες τις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις έχει ως αποτέλεσμα το γεγονός ότι στις γυναίκες υπάρχει στην πραγματικότητα μωσαϊκισμός δηλαδή ο μισός κυτταρικός πληθυσμός εκφράζει το πατρικό χρωμόσωμα X και ο άλλος μισός το μητρικό X. Επιπλέον, η αδρανοποίηση είναι πλήρης (μερικές εξαιρέσεις γονιδίων υπάρχουν που αναφέρονται αργότερα) και είναι μη αντιστρεπτή.

Η πρώτη φορά που έγινε αναφορά στην αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X είναι 45 χρόνια πριν από την Mary Lyon (1961, Mary Lyon). Στο αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X έχουμε αυξημένη συμπύκνωση, καταστολή της έκφρασης των γονιδίων, τα CpG δινοκλεοτίδια είναι μεθυλιωμένα, η ιστόνη H4 υπο-ακετυλιωμένη, το DNA αντιγράφεται αργά στο τέλος της φάσης S του κυτταρικού κύκλου και δεν παράγεται mRNA (Ke and Collins, 2003).

Το κέντρο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X (X inactivation center –XIC) που βρίσκεται στην περιοχή Xq13.3 και έχει μέγεθος ~100kb είναι απαραίτητο για το φαινόμενο της αδρανοποίησης και αν η συγκεκριμένη περιοχή ή μόνο το XIC χαθούν λόγω ελλείμματος ή άλλης αιτίας το X δεν αδρανοποιείται (Lyon, 1996). Η διαδικασία της αδρανοποίησης ξεκινά από το XIC και στη συνέχεια εξαπλώνεται και προς τις δύο κατευθύνσεις.

3.1 XIC / XIST

Στις γυναίκες ένα μόνο από τα δύο χρωμοσώματα X είναι ενεργό κι ισχύει κάθε φορά ο κανόνας n-1 για να καθορίσει τον αριθμό των αδρανοποιημένων X, (όπου n ο αριθμός των χρωμοσωμάτων X). Από την M.Lyon (Lyon, 1996) προτάθηκε ένα υποθετικό μοντέλο, το οποίο ερμηνεύει τον τρόπο με τον οποίο γίνεται κάθε φορά η «καταμέτρηση» των χρωμοσωμάτων X (counting mechanism), η επιλογή εκείνου που θα αδρανοποιηθεί και η διάδοση του σήματος της αδρανοποίησης (spreading). Το υποθετικό αυτό μοντέλο περιγράφεται στο σχήμα (σχήμα 6) και σύμφωνα με αυτό εντός του XIC υπάρχει η αλληλουχία η υπεύθυνη για την καταμέτρηση και την επιλογή του X που θα αδρανοποιηθεί.



Επιπλέον, προτείνεται ότι ένας αυτοσωματικός παράγοντας που δρα ως παράγοντας αναστολής (blocking factor) βρίσκεται σε περιορισμένες ποσότητες εντός του κυττάρου και επιδρά στο XIC του ενός X παρεμποδίζοντας έτσι την αδρανοποίησή του.



(Σχήμα 6α). Όπως φαίνεται και στο σχήμα το ΧΙC περιλαμβάνει την αλληλουχία «καταμέτρησης» που σχετίζεται με τον μηχανισμό καταμέτρησης των χρωμοσωμάτων X (counting sequence-συμβολίζεται με κύκλο) και την αλληλουχία εξάπλωσης της αδρανοποίησης κατά μήκος του χρωμοσώματος (Xist spreading sequence-τετράγωνο στο σχήμα). Η αλληλουχία «καταμέτρησης» φυσιολογικά αλληλεπιδρά με τον αυτοσωμικό παράγοντα (blocking factor) που συμβολίζεται με βέλος στο σχήμα α2, ενώ η αλληλουχία εξάπλωσης που βρίσκεται στο άλλο κέντρο ΧΙC ενεργοποιείται (κόκκινο βέλος) και μεταγράφεται εξαπλώνοντας την αδρανοποίηση κατά μήκος του χρωμοσώματος όπως δείχνουν τα λευκά βέλη (3 α). Τελικά, το χρωμόσωμα X με το

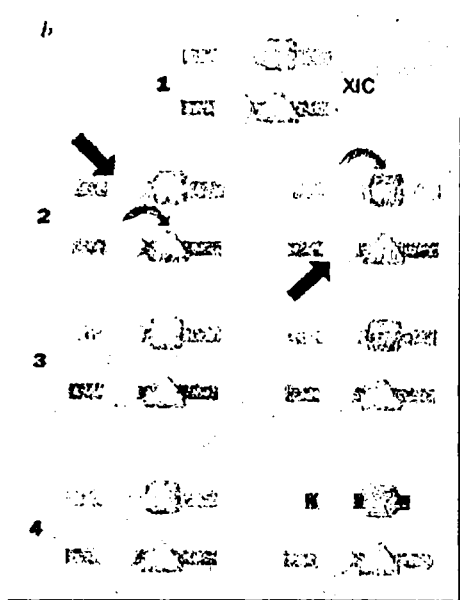
μπλοκαρισμένο

ΧΙC

παραμένει

ενεργό

(4α).



(Σχήμα 6b). Σε κύτταρα όπου το ΧΙC φέρει κάποιο έλλειμμα (6b αριστερά –συμβολίζεται με τρίγωνο η έλλειψη) ο αυτοσωματικός παράγοντας (blocking factor) θα αντιδράσει φυσιολογικά με το ΧΙC, όμως το άλλο ΧΙC που φέρει το Xist με την έλλειψη δεν μπορεί να μεταγραφεί άρα δεν αδρανοποιείται αυτό το X και τα δύο X παραμένουν ενεργά (3,4 b αριστερά). *In vivo* τέτοια κύτταρα συνεχώς μειώνονται μέχρι την τελική εξαφάνισή τους, λόγω δράσης της φυσικής επιλογής. Σε κύτταρα όπου το Xist με την έλλειψη συνδέεται με τον παράγοντα αναστολής (b2 –δεξιά) το άλλο Xist χωρίς την έλλειψη μεταγράφεται κανονικά, άρα και το μήνυμα της αδρανοποίησης μεταφέρεται κατά μήκος του χρωμοσώματος X (Lyon, 1996).

Καθοριστικής σημασίας υπήρξε η ανακάλυψη του XIST γονιδίου (X inactive specific transcript-μετάγραφο ειδικό για το ανενεργό X), το οποίο βρίσκεται μέσα στο κέντρο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X (XIC) και εκφράζεται μόνο από το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X (Brown et al., 1991). Στα ποντίκια υπάρχει αντίστοιχο γονίδιο και είναι το Xist το οποίο εκφράζεται νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη και πριν από την έναρξη της διαδικασίας αδρανοποίησης.

Σε αρχέγονα θηλυκά εμβρυϊκά κύτταρα (embryonic stem cells –ES) που περιέχουν δύο χρωμοσώματα X ανά κύτταρο και είναι σε αδιαφοροποίητη κατάσταση και τα δύο χρωμοσώματα X είναι ενεργά και το XIST εκφράζεται και από τα δύο σε πολύ χαμηλά ποσοστά (Willard, 1996, Minireview). Αργότερα και με την έναρξη της διαφοροποίησης ξεκινά και η αδρανοποίηση, οπότε αυξάνεται και το επίπεδο έκφρασης του XIST από το αδρανοποιημένο X και μειώνεται έως μηδενισμού στο ενεργό. Επίσης και σε αδιαφοροποίητα



εμβρυϊκά κύτταρα άρρενος ατόμου που φέρουν ένα χρωμόσωμα X υπάρχει χαμηλό ποσοστό έκφρασης του XIST (Willard, 1996, Minireview,).

Τα γονίδια XIST/Xist δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη και το μεταγραφικό τους προϊόν μεγέθους 15-17 kb παραμένει στον πυρήνα και επικαλύπτει το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X (Brown et al., 1992; Brockdorff et al., 1992). Αντίθετα, στο ενεργό χρωμόσωμα X παράγεται το antisense RNA (TSIX) που προκαλεί καταστολή της έκφρασης του XIST.

Η αναγκαιότητα ύπαρξης του Xist γονιδίου στη διαδικασία της αδρανοποίησης φαίνεται από πείραμα των Penny και συνεργατών (Penny et al., 1996), οι οποίοι αφαίρεσαν τμήμα του πρώτου εξωνίου του υποκινητή του Xist γονιδίου στο ένα μόνο από τα δύο χρωμοσώματα X σε θήλεα εμβρυϊκά κύτταρα. Μετά από *in vitro* διαφοροποίηση το χρωμόσωμα X που έφερε τη μετάλλαξη δεν μπορούσε να αδρανοποιηθεί πράγμα που επιβεβαιώνει την αναγκαιότητα έκφρασης του Xist για την αδρανοποίηση.

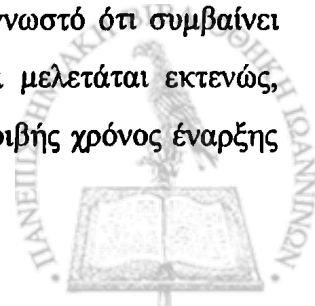
Οι Plenge και συνεργάτες (Plenge et al., 1997) πρώτοι ανέφεραν σημειακή μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου XIST, η οποία δεν επιτρέπει την μεταγραφή του και γυναίκες που κληρονομούν αυτή τη μετάλλαξη εμφανίζουν εκλεκτική και όχι τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (το χρωμόσωμα που φέρει τη μετάλλαξη αδρανοποιείται εκλεκτικά).

3.2 Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X κατά τη γαμετογένεση και την εμβρυϊκή ανάπτυξη σε θηλαστικά

Είναι γνωστό ότι κατά τον αναπαραγωγικό κύκλο ζωής ενός θηλαστικού, το χρωμόσωμα X πραγματοποιεί το δικό του κύκλο αδρανοποίησης και επανεργοποίησης (Gartler et al., 1976). Αναλυτικά, τα πρόδρομα θηλυκά γαμετικά κύτταρα επανενεργοποιούν το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X και καταλήγουν με δύο ενεργά χρωμοσώματα X, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η φυσιολογική σύζευξη των χρωμοσωμάτων κατά την ωογένεση.

Στα σπερματογόνια, το μοναδικό χρωμόσωμα X αδρανοποιείται λίγο πριν εισέλθει στην πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και «ζευγαρώνει» (χωρίς να ανασυνδυάζεται) με το χρωμόσωμα Y που βρίσκεται ήδη σε συμπυκνωμένη μορφή. Και τα δύο βρίσκονται σε μεταγραφική καταστολή και με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αποφυγή του ανασυνδυασμού μεταξύ των μη ομόλογων χρωμοσωμικών περιοχών (Huynh και Lee, 2003).

Αν και η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X-ως φαινόμενο- είναι γνωστό ότι συμβαίνει στα σωματικά κύτταρα των θηλαστικών εδώ και πολλά χρόνια και μελετάται εκτενώς, εξακολουθούν πολλά πράγματα να παραμένουν αδιασαφήνιστα. Ο ακριβής χρόνος έναρξης



της διαδικασίας δεν είναι γνωστός, αφού φαίνεται ότι διαφέρει από ιστό σε ιστό (Tan et al., 1993). Εκείνο που είναι βέβαιο είναι ότι η διαδικασία της αδρανοποίησης στον άνθρωπο ξεκινά από τα κύτταρα της τροφοβλάστης (Gardner and Lyon, 1971).

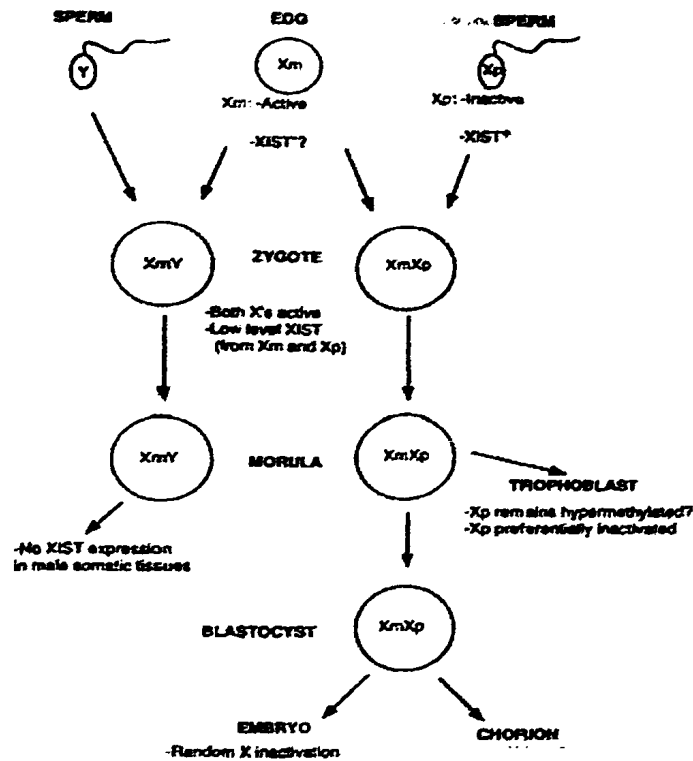
Από τους Brown και Robinson (Brown and Robinson, 1997) προτάθηκε το εξής μοντέλο (σχήμα 7), σύμφωνα με το οποίο τη στιγμή της γονιμοποίησης το μητρικής προέλευσης X χρωμόσωμα είναι ενεργό, ενώ το πατρικής αδρανοποιημένο. Στο στάδιο του ζυγώτη και πιο συγκεκριμένα στο στάδιο των 4 με 8 κυττάρων, αν και τα δύο X είναι ενεργά, εντούτοις υπάρχει σε χαμηλό ποσοστό έκφραση του XIST γονιδίου και από τα δύο X χωρίς όμως αυτό να είναι αρκετό για να προκαλέσει την αδρανοποίηση του X.

Λίγο αργότερα στην τροφοβλάστη το πατρικό X εμφανίζεται αδρανοποιημένο, ενώ στην έσω κυτταρική μάζα (ΕΚΜ) και τα δύο χρωμοσώματα X (μητρικό και πατρικό) είναι ενεργά. Από την ομάδα των Brown και Robinson προτείνεται ότι ίσως αυτό να οφείλεται στο γεγονός ότι το πατρικό X είναι ήδη μεθυλιωμένο και αδρανοποιημένο κατά τη στιγμή της μεταβίβασής του με το σπερματοζώαριο, άρα και πιο επιρρεπές στο να αδρανοποιηθεί και πάλι. Αργότερα και αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία εμφύτευσης στο ενδομήτριο (9^η ημέρα για το άνθρωπο), ξεκινά η τυχαία αδρανοποίηση στο κυρίως έμβρυο και το χόριο, όπου τόσο το πατρικό X όσο και το μητρικό έχουν την ίδια πιθανότητα αδρανοποίησης.

Μελέτες που έχουν γίνει σε ποντίκια δείχνουν τα πράγματα πιο ξεκαθαρισμένα. Εκεί η κατάσταση αδρανοποίησης του πατρικού χρωμοσώματος X διατηρείται και μετά τη γονιμοποίηση.

Στο στάδιο των 32 κυττάρων, στους μεν έξω-εμβρυϊκούς ιστούς το πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα X παραμένει αδρανοποιημένο, ενώ μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο στην ΕΚΜ γίνεται επανεργοποίηση του μέχρι τώρα αδρανοποιημένου πατρικού X. Η τυχαία αδρανοποίηση του X ξεκινά στο κυρίως έμβρυο στη συνέχεια (Okamoto, 2004; Mak, 2004; Huynh και Lee, 2003).





(Σχήμα 7). Διαδικασία έναρξης της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στον άνθρωπο. Xm:maternal X chromosome (μητρικό χρωμόσωμα X), Xp:paternal X chromosome (πατρικό χρωμόσωμα X). (Brown and Robinson, 1997)

3.3 Γονίδια στο χρωμόσωμα X που διαφεύγουν της αδρανοποίησης

Τα αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X δεν είναι απόλυτα αδρανοποιημένο. Πρόσφατες έρευνες επιβεβαιώνουν ότι ένα μικρό ποσοστό γονιδίων μένουν ενεργά (περίπου 10%) (Carrel et al, 1999). Τα γονίδια που διαφεύγουν της αδρανοποίησης είναι εκείνα που είτε βρίσκονται στην ψευδο-αυτοσωματική περιοχή του X που έχει ομολογία με περιοχή του χρωμοσώματος Y εξασφαλίζοντας έτσι ισοζυγισμένη έκφρασή τους και στα δύο φύλα (Lyon , 1962), είτε αυτά που βρίσκονται στην περι-κεντρομεριδιακή περιοχή που αντιγράφεται νωρίς (Therman et al, 1976).

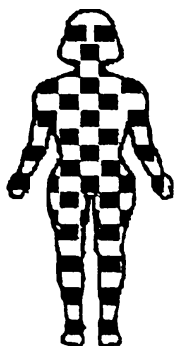
Από τους Ke και Collins (Ke and Collins, 2003) εκφράστηκε η άποψη ότι τα γονίδια που αδρανοποιούνται έχουν περισσότερες CpG νησίδες σε σχέση με εκείνα που διαφεύγουν της αδρανοποίησης. Αργότερα, οι Carrell και Willard (Carrell and Willard, 2005) αναθεωρούν την παραπάνω παρατήρηση και προσθέτουν ότι η διαφορετική αναλογία σε CpG νησίδες μεταξύ των φυλοσύνδετων γονιδίων μπορεί να συμβάλλει στη διαφορετική έκφραση των γονιδίων αυτών μεταξύ των διαφορετικών χρωμοσωμάτων X, όχι όμως να καθορίσει από



μόνη της την έκφραση ή αποσιώπησή τους. Επιπλέον, προσθέτουν ότι τα γονίδια που διαφεύγουν της αδρανοποίησης σχηματίζουν συσσωματώματα (clusters) κατά μήκος του χρωμοσώματος X, τα οποία είναι κυρίως εντοπισμένα στο μικρό βραχίονα και λίγα μόνο στο μεγάλο. Από την ίδια ομάδα δόθηκε μια εξελικτική ερμηνεία για το τελευταίο γεγονός, σύμφωνα με την οποία μεγάλο τμήμα του μικρού βραχίονα ήταν αρχικά αυτοσωματικό χρωμόσωμα, επομένως όσα γονίδια εντοπίζονται εκεί δεν διαθέτουν τους κατάλληλους μηχανισμούς αδρανοποίησης (Carrell and Willard, 2005).

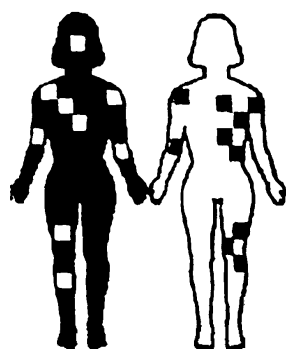
3.4 Μη τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X

Η επιλογή του χρωμοσώματος X που θα παραμείνει ενεργό είναι ένα τυχαίο γεγονός που πραγματοποιείται νωρίς κατά την εμβρυογένεση (late blastocyt stage). Η σταθερή διατήρηση αυτής της αδρανοποίησης σε όλες τις επόμενες κυτταρικές διαιρέσεις έχει ως αποτέλεσμα το γεγονός ότι στις γυναίκες υπάρχει στην πραγματικότητα μωσαϊκισμός δηλ. το 50% των κυττάρων τους εκφράζει το πατρικό χρωμόσωμα X και το υπόλοιπο 50% το μητρικό X (σχήμα8).



Σχήμα 8

Αποκλίσεις από το γεγονός της τυχαίας αδρανοποίησης (δηλ. της θεωρητικά αναμενόμενης αναλογίας αδρανοποίησης 1:1 του πατρικού ή μητρικού αλληλομόρφου)(σχήμα 9), μπορούν να οδηγήσουν ακόμη και στην εκδήλωση υπολειπόμενων χαρακτήρων σε γυναίκες-ετεροζυγώτες. Σε περιπτώσεις γυναικών-φορέων κάποιου φυλοσύνδετου μονογονιδιακού νοσήματος, η διαδικασία επιλογής θα διατηρήσει μόνο το φυσιολογικό χρωμόσωμα X ενεργό, ενώ εκείνο που φέρει τη μετάλλαξη θα αδρανοποιηθεί με αποτέλεσμα την αποτροπή εκδήλωσης της νόσου. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί μη –τυχαία αδρανοποίηση σε γυναίκες-φορείς του συνδρόμου της μυϊκής δυστροφίας τύπου Duchenne.

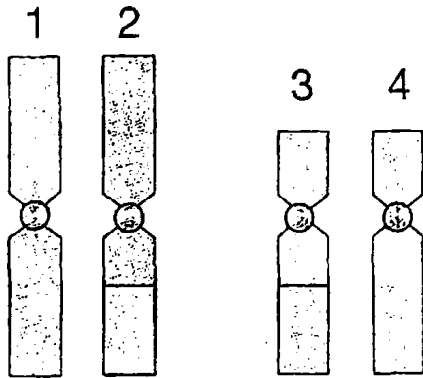


Σχήμα 9

Μια σειρά από λόγους μπορεί να οδηγήσουν στην επιλεκτική αδρανοποίηση: (1) τυχαίο γεγονός, (2) μετάλλαξη του XIST γονιδίου σημαντική για τη διαδικασία τη αδρανοποίησης (3) δομική ανωμαλία (π.χ. έλλειμμα, διπλασιασμός) του χρωμοσώματος X, το παθολογικό X είναι εκείνο που αδρανοποιείται (4) μετάθεση μεταξύ χρωμοσώματος X/ αυτοσώματος, συνήθως το φυσιολογικό X



αδρανοποιείται (σχήμα 10) (5) μείωση του εμβρυϊκού κυτταρικού πόλου, (6) εξωτερικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες (πχ.χημειοθεραπείες) κá.



(Σχήμα 10) Μετάθεση μεταξύ του ζεύγους των φυλετικών χρωμοσωμάτων X (1,2 χρωμοσώματα) και των αυτοσωμάτων (3,4). Το φυσιολογικό X (1) είναι αυτό που συνήθως αδρανοποιείται.

Σε ορισμένες περιπτώσεις η μη τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης για την ύπαρξη χρωμοσώματος X με μικρή ατυπία (έλλειμμα, διπλασιασμός κ.λ.π.) που πιθανόν ευθύνεται για αναπτυξιακή διαταραχή. Η μη τυχαία αδρανοποίηση διακρίνεται σε πρωτογενή (υπάρχει κάποιο πρόβλημα κατά τη διαδικασία της αδρανοποίησης) και δευτερογενή, όπου είναι εμφανής η επιλογή υπέρ ή κατά κυττάρων με κάποια χρωμοσωμική ανακατάταξη ή γονίδιο υπεύθυνο για κάποια νόσο (Lanasa et al,1999; Migeon et al., 1981). Η συχνότητα εμφάνισης της μη-τυχαίας αδρανοποίησης του X υπολογίζεται σε 3.2-3.5% στο γυναικείο πληθυσμό (Gale et al.,1997; Plenge et al.,1997).

Η μη-τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές αιτίες. Κλινικά όμως είναι σημαντικό να γνωρίζουμε τις αιτίες της μη-τυχαίας αδρανοποίησης και πόσο συχνές αυτές μπορεί να είναι.

Αποτελέσματα γονιδιακής αποτύπωσης: Στα μαρσιποφόρα αναφέρεται εκλεκτική αδρανοποίηση του πατρικής προέλευσης χρωμοσώματος X σε όλους τους ιστούς για πρώτη φορά το 1971 από τον Cooper (Cooper et al.,1971). Για τα τρωκτικά ισχύει το ίδιο στους εξω-εμβρυϊκούς όμως μόνο ιστούς (Takagi and Sasaki, 1975; West et al.,1977). Η επιλεκτική αυτή έκφραση του πατρικού μόνο αλληλομόρφου φαίνεται να υποδηλώνει τη δράση του φαινομένου της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Όσον αφορά μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπινους εξω-εμβρυϊκούς ιστούς, τα τελευταία αποτελέσματα φαίνεται να υποδεικνύουν επιλεκτική αδρανοποίηση του πατρικού χρωμοσώματος X στους εξω-εμβρυϊκούς ιστούς (Zeng and Yankowitz, 2003; Huynh and Lee, 2004; Mak et al., 2004; Okamoto et al,2004).



Μεταλλάξεις σε XIST /Xist: Όπως ήδη αναφέρθηκε, σημειακή μετάλλαξη (συνήθως μετατροπή του C νουκλεοτιδίου σε G) (Plenge et al,1997) στον υποκινητή του γονιδίου XIST σχετίζεται με εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.

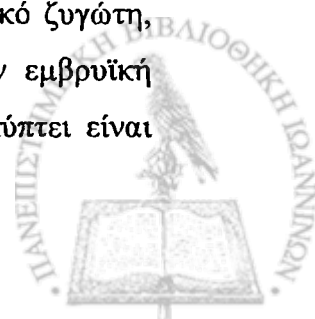
Διαδικασία Φυσικής Επιλογής: Είναι γνωστό ότι μεγάλες χρωμοσωμικές δομικές ανακατατάξεις οδηγούν σε μια διαδικασία επιλογής των κυτταρικών εκείνων πληθυσμών που θα έχουν τις μικρότερες επιπτώσεις στον φαινότυπο (Belmont et al., 1996; Migeon, 1998). Για το λόγο αυτό χρωμοσώματα X που φέρουν κάποιο έλλειμμα αδρανοποιούνται, ενώ σε περιπτώσεις ισορροπημένης μετάθεσης μεταξύ χρωμοσώματος X και αυτοσωματικού χρωμοσώματος το φυσιολογικό χρωμόσωμα X είναι αυτό που γενικά αδρανοποιείται.

Επίσης, σε περιπτώσεις γονιδιακών μεταλλάξεων, η διαδικασία της επιλογής μπορεί να περιοριστεί σε ιστούς όπου εκφράζεται το συγκεκριμένο γονίδιο, προκειμένου να μην ενεργοποιήσει το X με τη μετάλλαξη (Puck et al.,1997). Γενικότερα, η έκταση της διαδικασίας επιλογής εξαρτάται από την σπουδαιότητα και τον εντοπισμό εντός του κυττάρου του γονιδιακού προϊόντος, τον τύπο της μετάλλαξης και από το εάν τα συγκεκριμένα γονίδια διαφεύγουν της αδρανοποίησης.

Μειωμένος αριθμός πρόδρομων κυττάρων: Στις μέρες μας εξακολουθεί να μην είναι γνωστός ο ακριβής αριθμός κυττάρων που χρειάζεται να είναι παρόντα στην έσω κυτταρική μάζα (inner cell mass) κατά την χρονική στιγμή που ξεκινά η τυχαία αδρανοποίηση, οπότε και επιλέγεται ποιο χρωμόσωμα X από τα δύο θα αδρανοποιηθεί. Παρόλα αυτά είναι αποδεκτό ότι κάθε μείωση στον αριθμό των πρόδρομων κυττάρων θα αυξήσει τις πιθανότητες για μη-τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (Brown and Robinson, 2004-Review).

Επομένως, η παρατήρηση φαινομένων ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X αντανακλά και προβλήματα στους πρόδρομους εμβρυϊκούς πόλους, ενώ ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση σε έναν μόνο ιστό μπορεί να οφείλεται σε προβλήματα στους πρόδρομους πόλους των κυττάρων του συγκεκριμένου ιστού.

Τρισωμίες και μωσαϊκές τρισωμίες . Έχει αναφερθεί εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με έμβρυα που φέρουν κάποια τρισωμία ή μωσαϊκή τρισωμία με την τρισωμική σειρά εντοπισμένη μόνο στον πλακούντια (Beever et al.,1996). Οι τρισωμίες αυτές φαίνεται ότι προκύπτουν από αρχικά τρισωμικό ζυγώτη, στην περίπτωση όμως του πλακουντιακού μωσαϊκισμού νωρίς κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη χάνεται το υπεράριθμο χρωμόσωμα, οπότε το έμβρυο που προκύπτει είναι



διπλοειδές αν και υπάρχει κίνδυνος μονογονεϊκής ισοδισωμίας (Lau et al.,1996). Ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X βρέθηκε επίσης και σε ποσοστό 24% ασθενών με το σύνδρομο Prader-Willi λόγω μονογονεϊκής ισοδισωμίας του μητρικού αλληλομόρφου που πιθανόν προέκυψε με τον παραπάνω μηχανισμό (Robinson et al.,2000). Μια άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι το διπλοειδές έμβρυο προέκυψε από ένα μοναδικό διπλοειδές κύτταρο της ΕΚΜ τη στιγμή της αδρανοποίησης, ενώ τα υπόλοιπα τριπλοειδικά κύτταρα εξαιρέθηκαν λόγω φυσικής επιλογής. (Brown and Robinson, 2000-Review). Αν και γενικά ο αριθμός των περιπτώσεων μωσαϊκής τρισωμίας που έχουν μελετηθεί είναι μικρός, φαίνεται ότι σχετίζονται με αποβολές, ενδομήτριο θάνατο ή διαταραχές της ανάπτυξης. Αυτού του είδους οι τρισωμίες μπορούν να γίνουν αντιληπτές μόνο με βιοψία του πλακούντα, αφού τα έμβρυα φέρουν φυσιολογικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά.

Αύξηση του ποσοστού επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X με την ηλικία: Γενικά, υπάρχει μια τάση αύξησης του ποσοστού επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στο αίμα με την αύξηση της ηλικίας. Το παρατηρούμενο ποσοστό από <3% που είναι στα νεογνά, ~4% σε νέες γυναίκες (ηλικία γύρω στα 30 έτη) φτάνει το 30% σε γυναίκες ηλικίας ≥ 75 ετών (Busque et al.,1996; Fey et al.,1994; Gale et al.,1997). Από τον Busque (Busque et al.,1996) διατυπώθηκε ότι το ποσοστό του 22.7% με ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του ενός χρωμοσώματος X ($\geq 90\%$) που βρέθηκε σε άτομα ηλικίας ≥ 60 ετών, είναι αποτέλεσμα επιλογής πρόδρομων εμβρυονικών αιμοποιητικών κυττάρων που δείχνουν κάποια προτίμηση στην αδρανοποίηση ενός εκ των δύο χρωμοσωμάτων X.

Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι το πρότυπο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X διαφέρει από ιστό σε ιστό στο ίδιο άτομο και ότι τα κύτταρα του περιφερικού αίματος είναι εκείνα που συχνότερα εμφανίζουν το φαινόμενο της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης (Busque et al.,1996). Ίσως, μια ερμηνεία του γεγονότος αυτού είναι ότι τα κύτταρα αυτά είναι πιο δεκτικά σε ήπιες πιέσεις της διαδικασίας επιλογής ή και σε άλλα φαινόμενα όπως μείωση του μεγέθους των πόλων των εμβρυονικών κυττάρων ή μικρές αλλαγές στο χρωμόσωμα X.



4. Συνεχείς αυτόματες αποβολές

Οι συνεχείς αυτόματες αποβολές (ορίζονται ως 2 και περισσότερες ή 3 και περισσότερες διαδοχικές αποβολές πριν την 15^η εβδομάδα κύησης), αφορούν στο 2-3% των ζευγαριών που προσπαθούν να τεκνοποιήσουν (ACOG; Regan). Οι συνεχείς αποβολές διαφέρουν από τις σποραδικές αυτόματες αποβολές, οι οποίες είναι μη διαδοχικές και συμβαίνουν τυχαία κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγικής ηλικίας μιας γυναίκας.

Οι σποραδικές αυτόματες αποβολές αφορούν στο 10-15% όλων των κλινικά αναγνωρισμένων κυήσεων, το πρώτο ή νωρίς κατά το δεύτερο τρίμηνο της κύησης. Αυτή η κατηγορία των αποβολών είναι εμφανής από τη 12^η εβδομάδα κύησης και ο θάνατος του εμβρύου προηγείται των κλινικών χαρακτηριστικών της αποβολής κατά μία ή και δύο εβδομάδες.

Υπάρχουν όμως και αποβολές σε πιο πρώιμο στάδιο, πριν ακόμη γίνει η εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο. Φαίνεται λοιπόν ότι κάποιες από τις γενετικές ατυπίες που μπορεί να φέρει το έμβρυο, μπορεί να είναι τόσο καταστροφικές, ώστε να εμποδίζουν την ανάπτυξη του από τα πρώτα κιόλας στάδια της κυτταρικής διαίρεσης, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατή η εμφύτευσή του, άλλες να επιτρέπουν την ανάπτυξη μέχρι το στάδιο της βλαστοκύστης, με εφήμερη εμφύτευση, αλλά το εγκύημα να αποβάλλεται μέσα στις 2 πρώτες εβδομάδες (Munné et al., 1994). Η πολυπλοειδία καθώς κι οι ανευπλοειδίες είναι πολύ συνηθισμένες στις πρώιμες αποβολές. Στις περισσότερες γυναίκες με συνεχείς αυτόματες αποβολές οι αποβολές είναι κυρίως προ-εμβρυϊκές (πριν την 6^η εβδομάδα κύησης) ή εμβρυϊκές (μεταξύ 6^{ης} και 8^{ης} εβδομάδας).

Οι συνεχείς αυτόματες αποβολές μπορεί να οφείλονται σε μια σειρά παραγόντων, όπως: (1) Γενετικές ανωμαλίες (2) Ορμονικές και Μεταβολικές διαταραχές (3) Ανατομικά προβλήματα της μήτρας (4) Θρομβοφιλικό παράγοντες (5) Παράγοντες μόλυνσης, περιβαλλοντικοί, σύνδρομο αντι-φωσφολιπιδίων κλπ.

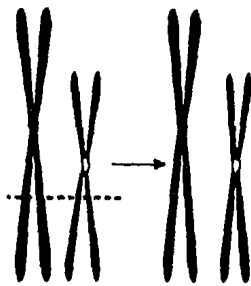


4.1 Λόγοι που μπορεί να προκαλέσουν συνεχείς αυτόματες αποβολές

4.1.1 Γενετικές ανωμαλίες

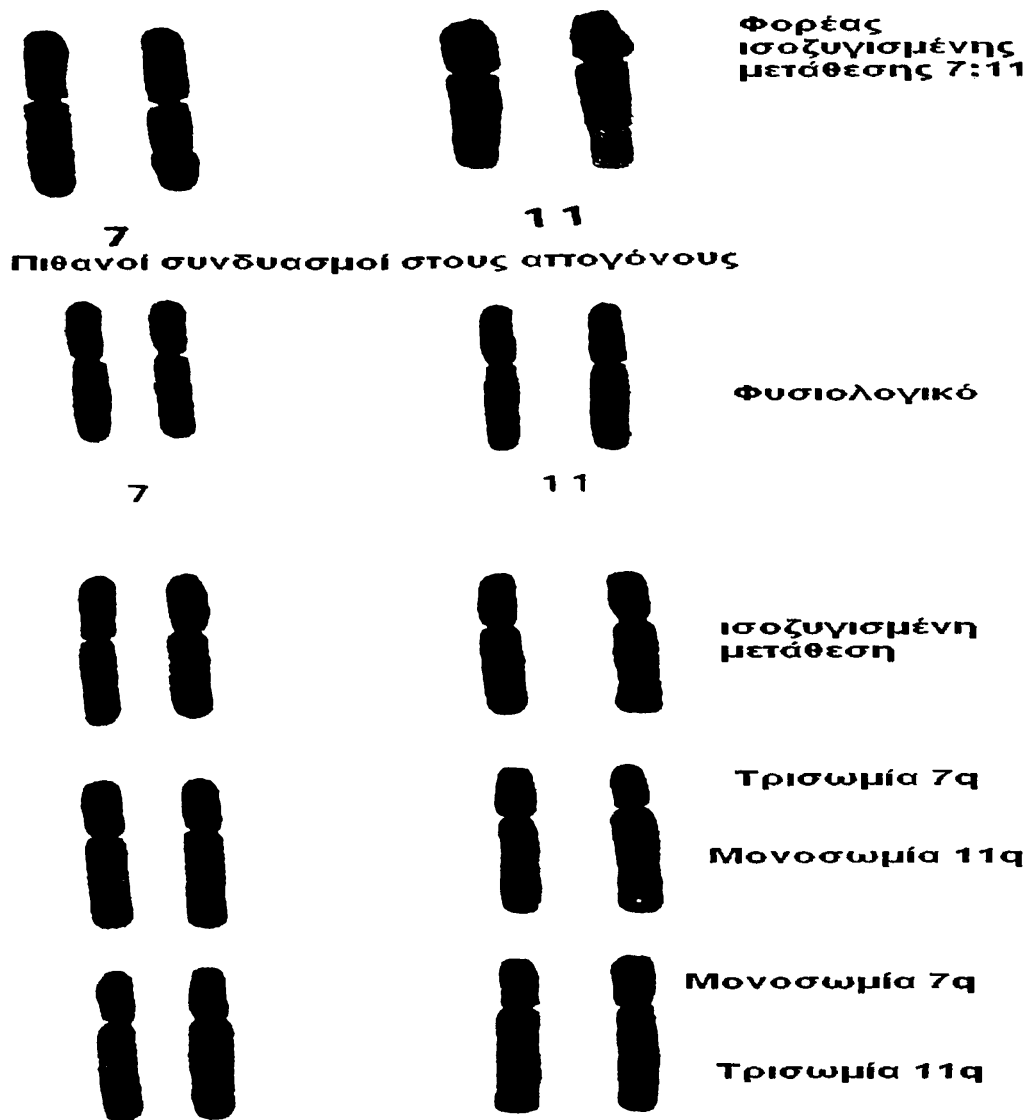
Μια πολύ συνηθισμένη γενετική αιτία είναι οι δομικές ή αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες γονέων ή εμβρύου (ισορροπημένες μεταθέσεις, αναστροφές, τρισωμίες κ.λ.π.). Η αξιολόγηση των γενετικών παραγόντων περιλαμβάνει βασικά τον έλεγχο του καρυότυπου των γονιών και του αποβαλλόμενου εμβρύου.

Σε ένα ποσοστό περίπου 2-4% των ζευγαριών φαίνεται ότι ο ένας από τους δύο συζύγους είναι φορέας κάποιας ισορροπημένης χρωμοσωμικής μετάθεσης (σχήμα 11).



(Σχήμα 11). Άτομο-φορέας ισοζυγισμένης μετάθεσης μεταξύ δύο χρωμοσωμάτων

Οι ισορροπημένες χρωμοσωμικές μεταθέσεις καλύπτουν το μεγαλύτερο ποσοστό των χρωμοσωμικών ανωμαλιών και σχετίζονται άμεσα με τις συνεχείς αυτόματες αποβολές αφού μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό γαμετών με έλλειψη ή και διπλασιασμό χρωμοσωμικού υλικού (σχήμα 12).



(Σχήμα 12) Άτομο-φορέας ισοζυγισμένης μετάθεσης μεταξύ των χρωμοσωμάτων 7 και 11. Μεταξύ των αναμενόμενων πιθανών συνδυασμών των χρωμοσωμάτων στους απογόνους, βρίσκονται τρισωμίες και μονοσωμίες. Η παρουσία τέτοιων ατυπιών στο έμβρυο, μπορεί να οδηγήσει στην αποβολή του ή την γέννηση παθολογικού παιδιού.

Σε ποσοστό $\geq 50\%$ οι αυτόματες αποβολές 1^{ου} τριμήνου οφείλονται σε χρωμοσωμική ατυπία του εμβρύου (Hassold et al., 1986). Η ανάλυση του καρυότυπου και η εύρεση της χρωμοσωμικής αιτίας αποβολής του εμβρύου είναι σημαντική για κλινικούς και προγνωστικούς λόγους (Eiben et al., 1990).



Τα περισσότερα παθολογικά έμβρυα αποβάλλονται μέχρι την 16^η εβδομάδα κύησης. Η συχνότητα των εμβρύων με χρωμοσωμικές ανωμαλίες μειώνεται καθώς προχωρά η κύηση, φθάνοντας σε ποσοστό 5% κατά το 3^ο τρίμηνο κύησης, ενώ στα νεογέννητα φθάνει μόλις το 0.6%. Οι συχνότερα απαντώμενες χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι: αυτοσωμικές τρισωμίες, μονοσωμίες, πολυπλοειδίες και δομικές ανωμαλίες. Οι τελευταίες αποτελούν το 1.5% του συνόλου των αποβολών και μπορεί είτε να έχουν κληρονομηθεί από τους γονείς που είναι φορείς είτε να έχουν προκύψει *de novo*.

Επιβαρυντικός παράγοντας για την εκδήλωση συνεχών αποβολών είναι και η ηλικία της μητέρας, όπως επιβεβαιώνει και η ομάδα των Warburton και συνεργατών, οι οποίοι αναφέρουν ότι οι αποβολές λόγω ανευπλοειδίας του εμβρύου ίσως να οφείλονται και στην προχωρημένη ηλικία της μητέρας (Warburton et al., 1987).

Σε ένα μεγάλο ποσοστό αποβολών δεν διευκρινίζεται η αιτιολογία τους, γι' αυτό γίνονται ερευνητικές προσπάθειες ανεύρεσης και άλλων αιτιών αποβολών ώστε να δοθεί μια ικανοποιητική εξήγηση. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες πέρα από την κλασική κυτταρογενετική εξέταση του καρυότυπου, προστέθηκαν νέες εξετάσεις χάρις στην ανάπτυξη των μοριακών τεχνικών ανάλυσης DNA που έχουν βοηθήσει στην ανακάλυψη ποικίλων μοριακών γενετικών ανωμαλιών ως αιτίων συνεχών αυτόματων αποβολών. Πρόσφατα συσχετίστηκε η ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X με τις συνεχείς αυτόματες αποβολές αδιευκρίνιστης αιτιολογίας (Sangha et al., 1997; Lanasa et al., 1999).

4.1.2 Ορμονικές και μεταβολικές δυσλειτουργίες

Διάφορα προβλήματα κατά την ωχρινική φάση ίσως να σχετίζονται με το φαινόμενο των συνεχών αυτόματων αποβολών. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι η προγεστερόνη που παράγεται σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ανεπαρκής για να προετοιμάσει το εσωτερικό του ενδομητρίου αργότερα κατά τη διαμόρφωση του πλακούντα. Κάποιοι επιστήμονες πιστεύουν ότι στο 25-40% των περιπτώσεων με συνεχείς αυτόματες αποβολές η αιτία είναι αυτή που μόλις αναφέρθηκε (Davis et al., 1989). Πάντως γεγονός είναι ότι οι ανωμαλίες κατά την ωχρινική φάση δεν έχουν ακόμη πείσει την πλειονότητα του επιστημονικού κόσμου για την εμπλοκή τους στις αποβολές.

Ένα ποσοστό γύρω στο 35-56 % των γυναικών με προβλήματα συνεχών αυτόματων αποβολών πάσχουν από το σύνδρομο των πολυκυστικών ωοθηκών μετά από υπερηχογραφική διάγνωση (Tulppala et al., 1993; Liddell et al., 1997). Διάφοροι άλλοι μεταβολικοί



παράγοντες των υποψήφιων μητέρων, όπως ο σακχαρώδης διαβήτης μπορούν επίσης, να σχετίζονται με συνεχείς αυτόματες αποβολές (Dorman et al., 1999).

4.1.3 Ανατομικά προβλήματα της μήτρας

Αυτά αφορούν στο 10-15% των γυναικών με συνεχείς αυτόματες αποβολές κυρίως του δεύτερου τριμήνου της κύησης. Οι συνηθέστερες ανωμαλίες είναι η παρουσία διπλής μήτρας όπως η διαφραγματώδης μήτρα, η δίκερως ή και διδελφυίδα. Επίσης, στις ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας συμπεριλαμβάνονται και προβλήματα όπως τραύματα του ενδομητρίου και λειομύοματα.

4.1.4 Θρομβοφιλικοί παράγοντες

Οι συνηθέστερα κληρονομήσιμοι διαταραγμένοι θρομβοφιλικοί παράγοντες είναι ο παράγοντας V Leiden και η μετάλλαξη G20210A της προθρομβίνης. Αυτές οι μεταλλάξεις εντοπίζονται στο 25% των μεμονωμένων περιστατικών θρόμβωσης και περίπου στο 50% των οικογενειακών περιπτώσεων θρομβοφιλίας. Κάποιες ερευνητικές ομάδες συσχετίζουν (Rai et al., 1996; Brenner et al., 1997; Ridker et al., 1998; Foka et al., 2000) και κάποιες άλλες όχι (Balash et al., 1997; Dizon-Twison et al., 1997; Kutteh et al., 1998; Pauer et al., 1998) τις παραπάνω μεταλλάξεις με συνεχείς αυτόματες αποβολές.

4.1.5 Παράγοντες μόλυνσης, περιβαλλοντικοί παράγοντες, σύνδρομο αντι-φωσφολιπιδίων κ.ά.

Διάφοροι μικρο-οργανισμοί μπορεί να προκαλέσουν συνεχείς αυτόματες αποβολές χωρίς όμως κάποιος από αυτούς να σχετίζεται με το φαινόμενο. Επίσης, διάφοροι άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η έκθεση σε συγκεκριμένα οργανικά υλικά, η κατανάλωση καφεΐνης, αλκοόλ έχουν γίνει πολύ συχνά αντικείμενο ερευνών για τη σχέση που μπορεί να έχουν με τις αποβολές. Το πιθανότερο πάντως είναι να σχετίζονται με σποραδικές αποβολές.

Το σύνδρομο των αντι-φωσφολιπιδίων (antiphospholipid antibodies syndrome-APS) είναι ένα αυτοάνοσο νόσημα που χαρακτηρίζεται από τη παρουσία υψηλών επιπέδων αντιφωσφολιπιδικών αντισωμάτων στην κυκλοφορία και στα κλινικά του χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται οι συνεχείς αποβολές, ο εμβρυϊκός θάνατος καθώς και περιστατικά θρομβώσεων (Wilson et al., 1999).

Κάποιοι ερευνητές προτείνουν βιοψία του ενδομητρίου για τυχόν εντοπισμό «εχθρικού» πληθυσμού λευκοκυττάρων, τα οποία είναι συνήθη σε γυναίκες με συνεχείς αποβολές. Προς το παρόν αυτό αντιμετωπίζεται μόνο ως υπόθεση. Τέλος, η ανοσολογική ασυμβατότητα



μεταξύ των δύο συζύγων έχει προταθεί ότι μπορεί να οδηγήσει σε μη επιτυχείς τελειώμνες κυήσεις.

4.1.6 Συνεχείς αυτόματες αποβολές αδιευκρίνιστης αιτιολογίας

Σε ένα ποσοστό $\geq 50\%$ των ζευγαριών με προβλήματα συνεχών αυτόματων αποβολών ο έλεγχος των παραγόντων που ήδη περιγράφησαν αποβαίνει αρνητικός. Δηλαδή, το 50-75% αυτών των ζευγαριών παραμένουν δίχως απάντηση στο πρόβλημά τους. Οι αποβολές αυτές καλούνται ιδιοπαθείς. Μελέτες που έχουν γίνει αποδεικνύουν ότι το 60-70% των γυναικών με αποβολές αδιευκρίνιστης αιτιολογίας έχει μια επόμενη επιτυχή κύηση (Jeng et al., 1995).

Η πολυπαραγοντική φύση των πιθανών αιτιών των ιδιοπαθών αποβολών απαιτεί τη συνεργασία μιας ομάδας ειδικών όπως: γυναικολόγων, ενδοκρινολόγων της αναπαραγωγής, γενετιστών και άλλων εξειδικευμένων σε θέματα υπογονιμότητας επιστημόνων.

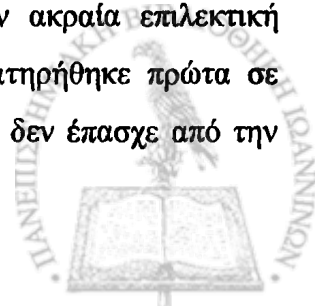
Γενικά, η γνώση του παράγοντα που προκαλεί τις αποβολές είναι σημαντική γιατί διευκολύνει τον ειδικό που παρακολουθεί τις συγκεκριμένες γυναίκες να δώσει την κατάλληλη καθοδήγηση και θεραπεία.

4.2 Ιδιοπαθείς αποβολές και εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X

Αυξημένα ποσοστά εκλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X έχουν αναφερθεί σε ποικίλες ομάδες γυναικών με καρκίνο μαστού και ωοθηκών, συνεχείς αυτόματες αποβολές και πρόωμη εμμηνόπαυση (Buller et al., 1999; Kristiansen et al., 2002; Sato et al., 2004).

Όσον αφορά στη σχέση εκλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και συνεχών αυτόματων αποβολών, αυτή επιβεβαιώθηκε από πολλές ερευνητικές ομάδες (Pegoraro et al., 1997; Lanasa et al., 1999 and 2001; Sangha et al., 1999; Uehara et al., 2001; Beever et al., 2003; Bagislar et al., 2006) αν και αμφισβητείται από άλλες (Kristiansen et al., 1999; Sullivan et al., 2001; Jin-Woo Kim et al., 2004). Η απόκλιση αυτή των συμπερασμάτων μπορεί να οφείλεται: στην επιλογή του δείγματος, στον αριθμό των ατόμων που περιλαμβάνει η κάθε μελέτη (στατιστική απόκλιση), καθώς και στις διαφορετικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται από την εκάστοτε ερευνητική ομάδα. Αναλυτικά οι χρησιμοποιούμενες μέθοδοι, καθώς και τα πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα κάθε μιας θα περιγραφούν σε επόμενη ενότητα.

Από την ομάδα των Pegoraro και συνεργατών το 1997 για πρώτη φορά αναφέρθηκε 53-μελές γενεαλογικό δένδρο με τέσσερις γενεές γυναικών που παρουσίαζαν ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Η ακραία αδρανοποίηση παρατηρήθηκε πρώτα σε κορίτσι που έπασχε από μυϊκή δυστροφία. Αν και κανένα άλλο μέλος δεν έπασχε από την



νευρομυϊκή νόσο, εντούτοις 16 από τις 50 γυναίκες της οικογένειας παρουσίαζαν εκλεκτική αδρανοποίηση του μητρικού χρωμοσώματος X στο 95% των περιφερικών λευκοκυττάρων. Οι αντίστοιχες γυναίκες-μάρτυρες που μελετήθηκαν παρουσίασαν -συγκριτικά- πολύ χαμηλά ποσοστά ακραίας αδρανοποίησης.

Σημειώνεται ότι οι γυναίκες με το πρότυπο της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X είχαν και υψηλά ποσοστά αποβολών σε σχέση με τις γυναίκες της ίδιας οικογένειας που όμως είχαν τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Όπως, αποδείχθηκε η κληρονόμηση ενός φυλοσύνδετου θνησιγόνου χαρακτήρα σε αυτή την οικογένεια οφείλεται σε μια έλλειψη μεγέθους ~500kb εντοπισμένη στο Xq28. Γενικά, η έλλειψη προκαλούσε μια πίεση επιλογής κατά των κυττάρων με ενεργό το χρωμόσωμα X με το έλλειμμα με τελικό αποτέλεσμα: γυναίκες-φορείς αυτής της έλλειψης παρουσίαζαν ακραία αδρανοποίηση, ενώ αρσενικά άτομα με την έλλειψη αυτή αποβάλλονταν. Στο συγκεκριμένο γενεαλογικό δέντρο ο αριθμός των αρσενικών αποβληθέντων εμβρύων ήταν ιδιαίτερα υψηλός. Η έρευνα αυτή απέδειξε πως αυξημένα ποσοστά ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες μπορεί να οφείλονται στην παρουσία φυλοσύνδετων ή/και θνησιγόνων χαρακτήρων.

Εδώ θα πρέπει να αναφέρουμε ότι εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X έχει παρατηρηθεί και σε γυναίκες-φορείς φυλοσύνδετων γονιδίων, όπως εκείνο της αιμορροφιλίας και της μυϊκής δυστροφίας τύπου Duchenne (Tanner et al., 1999; Tenenhouse et al., 1999; Van de Veyer et al., 2001; Villard et al., 2001). Στις περιπτώσεις αυτές το χρωμόσωμα X με τη μετάλλαξη είναι αυτό που αδρανοποιείται σε αντίθεση με το φυσιολογικό που μένει τελικά ενεργό. Βέβαια η ανακάλυψη τέτοιων υπολειπόμενων ή/και θνησιγόνων γονιδίων είναι δύσκολη και απαιτεί λεπτομερή γενετική ανάλυση ολόκληρου του γενεαλογικού δένδρου. Οι φορείς τέτοιων μεταλλάξεων ανιχνεύονται δύσκολα αφού είναι φυσιολογικά άτομα.

Η συσχέτιση μεταξύ εκλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και ιδιοπαθών αποβολών είναι πολυπαραγοντική και όχι απαραίτητα συνδεδεμένη μόνο με την ύπαρξη θνησιγόνων φυλοσύνδετων γονιδίων (Robinson et al., 2001). Η ύπαρξη ισοζυγισμένων μεταθέσεων μεταξύ χρωμοσώματος X και αυτοσωματικών χρωμοσωμάτων μπορεί επίσης να οδηγήσει σε συνεχείς αποβολές, αφού κάποιιοι από τους γαμέτες που θα προκύψουν ενδέχεται να έχουν σε διπλάσια ποσότητα ή να τους υπολείπεται τμήμα των χρωμοσωμάτων που εμπλέκονται στη μετάθεση (Byrne and Ward, 1994). Στην τελευταία αυτή περίπτωση το φυσιολογικό χρωμόσωμα X είναι αυτό που θα αδρανοποιηθεί για να εξασφαλισθεί η σωστή ποσότητα χρωμοσωμικού υλικού (Gaal and Laszlo, 1977).



4.3 Μέθοδοι μελέτης του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X

Γενικά δύο μέθοδοι διάκρισης του ενεργού από το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X υπάρχουν, η μια αφορά στη μέτρηση του επιπέδου m-RNA ή πρωτεϊνικής έκφρασης, αφού το ενεργό μόνο X μπορεί και μεταγράφεται ή μεταφράζεται. Η άλλη μέθοδος προσέγγισης προτάθηκε πρώτη φορά από τον Vogelstein (Vogelstein et al., 1985) και αφορά αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης που συνοδεύουν την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στη δράση των ευαίσθητων στη μεθυλίωση ενζύμων όπως, HpaII και HhaI. Τα ευαίσθητα στη μεθυλίωση ένζυμα διαθέτουν από δύο (το καθένα) σημεία δράσης κατά μήκος του X που όταν αυτό είναι αδρανοποιημένο αυτά βρίσκονται μεθυλιωμένα.

Το 1985 οι ομάδες των Volgestein, Wolf, καθώς και Yen και συνεργατών μελέτησαν την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X με την τεχνική Southern και ανιχνευτές που πλαισιώνουν την 5' περιοχή των γονιδίων της τρανσφεράσης της φωσφορυλιωμένης υποξανθίνης (HPRT) και της φωσφορογλυκερικής κινάσης (PGK). Και στα δύο γονίδια παρατηρείται μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων τους στο αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X. Επιπλέον πολύ πολυμορφικές περιοχές κοντά στα σημεία δράσης των HpaII και HhaI ενζύμων βοηθούν στη διάκριση μεταξύ του μητρικού και πατρικού χρωμοσώματος X.

Το 1992 από την ομάδα των Allen και συνεργατών αναφέρεται για πρώτη φορά (Allen et al., 1992) ότι στο αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X τα σημεία δράσης των HpaII και HhaI ενζύμων που βρίσκονται στο εξώνιο 1 του γονιδίου του υποδοχέα των ανδρογόνων (Human Androgen Receptor gene-HUMARA) είναι μεθυλιωμένα και επομένως η μεθυλίωσή τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης αδρανοποίησης. Το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων εκτείνεται σε έκταση >90kb στην Xq11.2-q13 περιοχή του χρωμοσώματος X και περιέχει 8 εξώνια (Kuiper et al., 1989). Κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που περιέχει τρία λειτουργικά τμήματα: το άμινο τελικό τμήμα, την περιοχή πρόσδεσης στο DNA και την περιοχή πρόσδεσης των ανδρογόνων. Η πρωτεΐνη λειτουργεί ως υποδοχέας στεροειδών ορμονών και ενεργοποιεί τη μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με την φυλετική διαφοροποίηση, τη σπερματογένεση και την ανάπτυξη του προστάτη αδένου (Yong et al., 1998).

Όπως φαίνεται και στο σχήμα που ακολουθεί κατά μήκος του HUMARA γονιδίου υπάρχουν δύο διαφορετικά σημεία δράσης του ενζύμου HpaII.

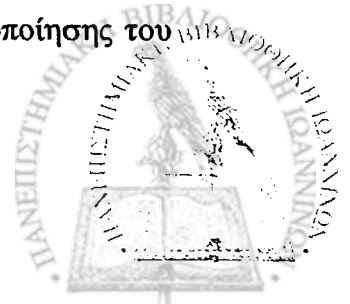




Τα δύο αυτά σημεία βρίσκονται κοντά σε μια πολύ πολυμορφική CAG νουκλεοτιδική αλληλουχία (short tandem repeat-STR) με 20 αλληλόμορφα και 90% ποσοστό ετεροζυγωτίας (οι επαναλήψεις κυμαίνονται από 11-31). Αναφέρεται ότι ποικιλομορφία στον αριθμό των επαναλήψεων αυτών συνδέεται με διάφορα συμπτώματα όπως πχ.προμηκονωτιαία μυϊκή ατροφία (νόσος Kennedy), ανδρική υπογονιμότητα, κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του προστάτη (Yong et al.,1998) κá. Η πολυμορφική αυτή θέση επιτρέπει τη διάκριση των δύο χρωμοσωμάτων X (μητρικής και πατρικής προέλευσης) όταν τα αλληλόμορφα είναι διαφορετικά.

Τα σημεία δράσης του HpaII απέχουν 20bp και 60 bp από την τρινουκλεοτιδική αλληλουχία, ενώ για το HhaI, 37 bp και 78 bp αντίστοιχα (δεν φαίνονται στο σχήμα). Στο αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X και τα τέσσερα σημεία είναι μεθυλιωμένα, ενώ στο ενεργό X και τα δύο σημεία δράσης του HpaII (ή το ένα από τα δύο) ή και τα δύο σημεία του HhaI (ή το ένα από τα δύο) δεν είναι μεθυλιωμένα. Σήμερα η μελέτη της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X γίνεται με πέψη με ένα ευαίσθητο στη μεθυλίωση ένζυμο και ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης με εκκινητές ειδικά σχεδιασμένους για την περιοχή (στο σχήμα φαίνονται σχεδιασμένοι ως AR-1 και AR-2) (Allen *et al.*, 1992). Μετά την πέψη του DNA με ένα από τα δύο ένζυμα (HpaII ή HhaI) και την ενίσχυση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, μόνο εφόσον το τμήμα που μελετάμε είναι μεθυλιωμένο παραμένει ακέραιο και δεν «κόβεται» – επομένως θα ενισχυθεί κατά την αντίδραση.

Η μεγάλη χρησιμότητα του HUMARA γονιδίου έγκειται στο πολύ μεγάλο ποσοστό ετεροζυγωτίας της CAG πολυμορφικής αλληλουχίας, καθώς και στην εύκολη ενίσχυση της περιοχής κατά την αντίδραση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Τα γονίδια HPRT και PGK (που χρησιμοποιούσαμε σαν δείκτες αδρανοποίησης μέχρι το 1992) έχουν ποσοστά ετεροζυγωτίας 18% και 30%, αντίστοιχα και σαφώς υστερούν του HUMARA γονιδίου. Στον πίνακα που ακολουθεί περιλαμβάνονται τα γονίδια που έχουν χρησιμοποιηθεί έως σήμερα, καθώς και οι μέθοδοι μελέτης (μεθυλίωση ή έκφραση) του φαινομένου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X.

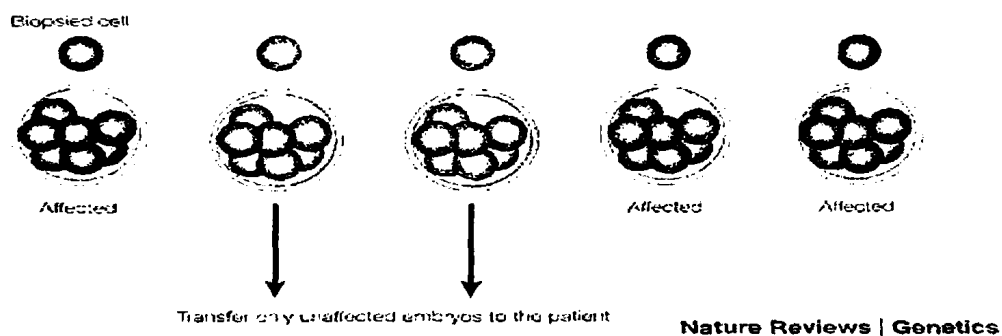


Πίνακας 1. Μέθοδοι μελέτης της αδρανοποίησης του χρωμ.Χ στηρίζόμενες στην PCR.

Γονίδιο	Θέση	Πολυμορφισμός	Ετεροζυγωτία	Μέθοδος
AR	Xq11	(CAG) _n	>80	Μεθυλίωση + έκφραση
MAOA	Xp11	(CA) _n +VNTR	~75	Μεθυλίωση
FMR1	Xq27	(CCG) _n	~65	Μεθυλίωση + έκφραση
PGK1	Xq13	BstX1-intron1	~33	Μεθυλίωση
ZNF261	Xq13	(GA) _n	>90	έκφραση
KIAAO128	Xq24-26	(GA) _n	~70	έκφραση
ZXDA	Xp11	(CA) _n	~50	έκφραση
IDSX	Xq28	C:T nt 438	~50	έκφραση
XIST	Xq13	G:A nt 15944	~40	έκφραση
TM4SF2	Xp	A:G nt 1432	~40	έκφραση
VBP1	Xq28	C:T nt 943	~40	έκφραση
MPP1 (p55)	Xp11	MspI site	~35	έκφραση

5. Προεμφυτευτική γενετική διάγνωση

Η προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (ΠΕΔ)-(preimplantation genetic diagnosis-PGD) αποτελεί μια νέα προσέγγιση για την διάγνωση χρωμοσωμικών ατυπιών και μεταλλάξεων κληρονομικών γενετικών νόσων. Η ΠΕΔ προσφέρει μια εναλλακτική μορφή προγεννητικής διάγνωσης σε ζευγάρια με αυξημένο κίνδυνο γέννησης παιδιού με γενετικό νόσημα. Η διάγνωση γίνεται στο στάδιο των 8 κυττάρων, έτσι εμφυτεύονται μόνο υγιή έμβρυα και δεν χρειάζεται διακοπή προβληματικών κύησεων (Braude et al.,2002, Review).



(Σχήμα 13). Κατά την ΠΕΔ γίνεται επιλογή ενός ή δύο κυττάρων από κάθε έμβρυο που αναπτύσσεται *in vitro*. Τελικά, μόνο μέχρι 3 φυσιολογικά έμβρυα (με πράσινο χρώμα συμβολίζονται τα φυσιολογικά κύτταρα, ενώ με κόκκινο συμβολίζονται τα πάσχοντα.) επιλέγονται για την εμβρυομεταφορά. (Braude et al.,2002;Nature Reviews).



Συγκεκριμένα, ένα ή δύο μόνο κύτταρα αφαιρούνται κατά το στάδιο των 8-12 κυττάρων, 3 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Η πραγματοποίηση της βιοψίας σε αυτό το στάδιο φαίνεται να είναι και η συχνότερα προτιμώμενη παγκοσμίως από τα διάφορα κέντρα που πραγματοποιούν ΠΕΔ. Η ανάλυση δύο κυττάρων ενισχύει την ακρίβεια της διάγνωσης που θα ακολουθήσει. Μετά από την ταυτόσημη διάγνωση σε κάθε ένα κύτταρο και αφού βρισκόμαστε στην τέταρτη ή πέμπτη μέρα της εμβρυϊκής ανάπτυξης (στάδιο μοριδίου), μόνο τα φυσιολογικά έμβρυα (έως 3 σε αριθμό) επιλέγονται για την εμβρυομεταφορά στη μήτρα (Zhuang and Zhang, 2003).

Η πρώτη πειραματική κλινική εφαρμογή της ΠΕΔ αφορούσε προσδιορισμό του φύλου του εμβρύου σε οικογένεια με φυλοσύνδετη κληρονομούμενη νοητική υστέρηση και έγινε το 1990. Η πρώτη αυτή προσπάθεια δεν πέτυχε, αλλά δύο χρόνια αργότερα η ίδια επιστημονική ομάδα πραγματοποίησε επιτυχή προεμφυτευτική διάγνωση για το γονίδιο της κυστικής ίνωσης και γεννήθηκε το πρώτο υγιές παιδί (Handyside et al., 1990; Handyside et al., 1992; Zhuang and Zhang, 2003).

5.1 Κλινικές εφαρμογές της ΠΕΔ

Σήμερα η ΠΕΔ μπορεί πλέον να εφαρμοστεί σε μια σειρά γενετικών ασθενειών.

1. Μονογονιδιακά γενετικά νοσήματα, όπου το υπεύθυνο γονίδιο μπορεί να είναι αυτοσωματικό ή φυλοσύνδετο και η μετάλλαξη που σχετίζεται με τη νόσο είναι γνωστή και ανιχνεύεται με την απλή τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).
2. Φυλοσύνδετα νοσήματα των οποίων το υπεύθυνο γονίδιο είναι άγνωστο, όμως μπορεί να γίνει επιλογή του φύλου του εμβρύου.
3. Χρωμοσωμικές ατυπίες και ανακατατάξεις (μεταθέσεις, αναστροφές κ.ά.).

Η προσφορά της ΠΕΔ στον ευρύτερο χώρο της προγεννητικής διάγνωσης είναι σημαντική, αφού επιτρέπει -σε αντίθεση με τη συλλογή χοριακών λαχνών και την αμνιοπαρακέντηση- που πραγματοποιούνται κατά το πρώτο ή δεύτερο τρίμηνο της κύησης- την αποφυγή μιας εγκυμοσύνης με παθολογικό έμβρυο. Η ΠΕΔ προτιμάται από άτομα που έχουν θρησκευτικές ή ηθικές αναστολές όσον αφορά στη διακοπή της κύησης. Τελευταία δε, προτείνεται σε ζευγάρια με συνεχείς αποτυχίες κατά την εξωσωματική γονιμοποίηση (*in vitro fertilization-IVF*) και με φυσιολογικό καρύοτυπο, ιδιαίτερα όταν οι γυναίκες είναι άνω των 37-40 ετών,



5.2 ΠΕΔ και διαταραχή του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X

Όπως ήδη περιγράψαμε σε προηγούμενη ενότητα στον άνθρωπο κατά τη γονιμοποίηση το πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα X βρίσκεται αδρανοποιημένο, ενώ στο ζυγώτη θήλεος ατόμου και τα δύο χρωμοσώματα X (πατρικής και μητρικής προέλευσης) είναι ενεργά με χαμηλά ποσοστά έκφρασης του XIST και από τα δύο. Η διαδικασία της τυχαίας αδρανοποίησης ξεκινά λίγο μετά την εμφύτευση της βλαστοκύστης στο ενδομήτριο και πριν την έναρξη της διαφοροποίησης των ιστών.

Με δεδομένο ότι η ΠΕΔ πραγματοποιείται στο στάδιο των 8 κυττάρων, πριν δηλαδή από τη στιγμή της έναρξης τυχαίας αδρανοποίησης του X, υπήρξε η σκέψη μήπως όλη η διαδικασία λήψης των δύο προς εξέταση κυττάρων προκαλεί κάποια διαταραχή στο μηχανισμό αδρανοποίησης και ειδικότερα στα ποσοστά συμμετοχής των δύο χρωμοσωμάτων X (μητρικού, πατρικού) στην τυχαία αδρανοποίηση. Αν και δεν αναφέρεται κάτι συγκεκριμένο στη διεθνή βιβλιογραφία, το ερώτημα που προέκυψε είναι εάν η απομάκρυνση των 2 βλαστομεριδίων επηρεάζει το μικροπεριβάλλον των 6 εναπομείναντων κυττάρων (πχ. εάν διαταράσσονται οι δεσμοί συνοχής μεταξύ των κυττάρων), άρα και μακροπρόθεσμα όλο το μηχανισμό της τυχαίας αδρανοποίησης.

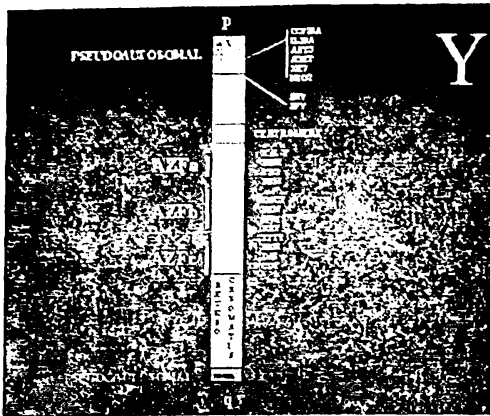
Η μελέτη βέβαια αυτή έχει νόημα μόνο σε περιπτώσεις κοριτσιών που γεννήθηκαν μετά από ΠΕΔ. Ιδιαίτερα σε οικογένειες με φυλοσύνδετα (στο X) υπολειπόμενα νοσήματα, θα είχε ενδιαφέρον να μελετήσουμε εάν εξακολουθεί να ισχύει ο μηχανισμός εκλεκτικής αδρανοποίησης του X με τη «μετάλλαξη». Τα αγόρια αποκλείστηκαν εξ αρχής, αφού διαθέτουν ένα μοναδικό χρωμόσωμα X που είναι ενεργό.

6. Ανδρική υπογονιμότητα

Στις μέρες μας ένα στα οκτώ ζευγάρια αντιμετωπίζει πρόβλημα υπογονιμότητας. Στο 40% περίπου των ζευγαριών η αιτία της υπο-γονιμότητας οφείλεται στη γυναίκα, σε ποσοστό 40% οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα, ενώ το υπόλοιπο 20% είναι συνδυασμός και των δύο παραγόντων.

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας μπορεί να είναι ποικίλα και περιλαμβάνουν: ενδοκρινολογικές, αναπτυξιακές και ανατομικές ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος, μείωση στον αριθμό και την κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Carrell et al., 2006).





(Σχήμα 14)

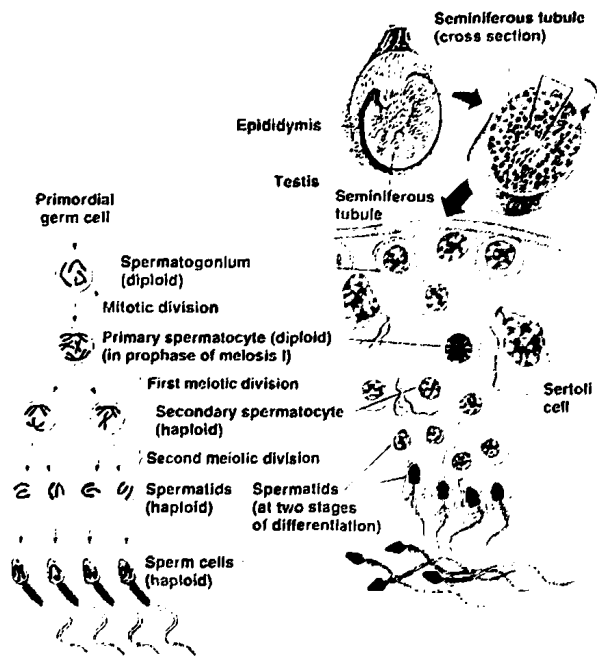
Όσον αφορά στις γενετικές ανωμαλίες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα, μπορεί να προκύψουν από χρωμοσωμικές ατυπίες, μικρο-ελλείμματα του χρωμοσώματος Y, από σφάλματα στις μειωτικές διαιρέσεις κατά τη σπερματογένεση ή να οφείλονται σε επιγενετικές αλλαγές του γονιδιώματος κατά τη γονιμοποίηση ή και αμέσως μετά από αυτή. Στις χρωμοσωμικές ατυπίες συμπεριλαμβάνονται

αριθμητικές όπως π.χ. το σύνδρομο Klinefelter (46,XXY) αλλά και δομικές ατυπίες (π.χ. μεταθέσεις), μικρο-ελλείμματα κατά μήκος του χρωμοσώματος Y (συνηθέστερες είναι εκείνες της περιοχής AZF a, b και c) (σχήμα 14). Οι γονιδιακές μεταλλάξεις μπορεί να επιδράσουν στις περίπου 2000 πρωτεΐνες που λαμβάνουν μέρος στη διαδικασία της σπερματογένεσης επηρεάζοντάς τη (Carrell et al., 2006).

Επίσης, διαταραχές του εκφορητικού συστήματος μπορεί να προκαλέσουν προβλήματα υπογονιμότητας. Εδώ ανήκει η αποφρακτική αζωοσπερμία, όπου υπάρχει παραγωγή σπερματοζωαρίων από τους όρχεις, αλλά αυτά δεν εμφανίζονται στο σπέρμα λόγω πλήρους απόφραξης. Η απόφραξη μπορεί να οφείλεται σε απόφραξη των εκφορητικών σπερματικών οδών λόγω φλεγμονής ή τραυματισμού, σε συγγενή έλλειψη σπερματικών πόρων κ.ά. Στην αποφρακτική αζωοσπερμία ανευρίσκονται εύκολα σπερματοζωάρια μετά από αναρρόφηση ή βιοψία όρχεων.

Στη μη-αποφρακτική αζωοσπερμία δεν υπάρχει καθόλου παραγωγή σπερματοζωαρίων από τους όρχεις και αυτό μπορεί να οφείλεται σε κρυψορχία, τραυματισμό, φλεγμονές, λοιμώδη νοσήματα, ακτινοβολία ή να είναι ιδιοπαθούς αιτιολογίας. Επιπλέον, οι διαταραχές του συστήματος υποθαλάμου-υπόφυσης, οι μολύνσεις του ουρογεννητικού συστήματος, ανοσοβιολογικοί παράγοντες, καθώς και η χρήση ουσιών όπως τα ναρκωτικά, αναβολικά στεροειδή, το κάπνισμα και η υπερβολική έκθεση σε χημικές ουσίες αποτελούν αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας. Τέλος, αύξηση της θερμοκρασίας ($>35^{\circ}\text{C}$) οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων Sertoli και των κυττάρων της γεννητικής σειράς, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της γονιμότητας. Η κρυψορχία και η κισσοκήλη αποτελούν κλασσικές περιπτώσεις υπογονιμότητας από υπερθερμία. Ένα ποσοστό υπογονιμότητας παραμένει αδιευκρίνιστης αιτιολογίας (περόπου 15%).





Σχήμα 15. Τομή ορχικού ιστού όπου διαφαίνονται κύτταρα σε διάφορα στάδια της σπερματογένεσης.

6.1 Σπερματογένεση και διαταραχές αυτής

Η σπερματογένεση είναι μια ορμονικά ρυθμιζόμενη λειτουργία κατά την οποία τα γαμετικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα σπερματοζώαρια περνώντας από διάφορα στάδια της μείωσης. Τα ενδιάμεσα στάδια περιλαμβάνουν τα σπερματογόνια τύπου A και B (spermatogonium), τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (primary spermatocytes) που μέσω μείωσης καταλήγουν στα δευτερογενή σπερματοκύτταρα (secondary spermatocytes) και αυτά μέσω μιας δεύτερης μειωτικής διαίρεσης καταλήγουν στις σπερματίδες (spermatids) και τελικά στα ώριμα σπερματοζώαρια (sperm cells) (σχήμα 15).

Σε ένα φυσιολογικό –ως προς τη λειτουργία της σπερματογένεσης άτομο- υπάρχουν όλες οι παραπάνω ενδιάμεσες μορφές γαμετικών κυττάρων, αλλά και ένας πληθυσμός (σωματικών) κυττάρων Sertoli που αποτελούν το 1/3 του συνόλου των κυττάρων. Τα κύτταρα Sertoli είναι σημαντικά διότι στηρίζουν δομικά τα γαμετικά κύτταρα, δημιουργούν το κατάλληλο περιβάλλον για την ανάπτυξη και ωρίμανση των γαμετών και στέλνουν ορμονικά σήματα σημαντικά κατά τη σπερματογένεση.

Σε περιπτώσεις υπο-σπερματογένεσης η αναλογία των κυττάρων Sertoli έναντι των γαμετικών είναι μεγαλύτερη, ενώ στην περίπτωση ατόμου που πάσχει από το σύνδρομο Sertoli (Sertoli cell only syndrome-SCO) κατά τη βιοψία του ορχικού ιστού ανιχνεύονται αποκλειστικά κύτταρα Sertoli. Σε ασθενή με το σύνδρομο της πρώιμης διακοπής της

ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (maturation arrest syndrome) η διαδικασία της σπερματογένεσης σταματά στα σπερματογόνια ή στο στάδιο των σπερματίδων, και δεν υπάρχουν σπερματοζωάρια.

6.2 Αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X κατά τη σπερματογένεση

Σε αντίθεση με τα αυτοσωματικά χρωμοσώματα, τα φυλετικά των άρρενων θηλαστικών συμπεριφέρονται διαφορετικά στα γαμετικά κύτταρα σε σχέση με τα σωματικά (Wang, Review, 2004). Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία της μείωσης στη σπερματογένεση, κάποια στιγμή και τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα (X και Y) αποκτούν δομή ετεροχρωματίνης-συμπυκνώνονται, διαχωρίζονται από τα αυτοσωματικά χρωμοσώματα και σχηματίζουν μία συμπαγή δομή που ονομάζεται σωματίο XY (Solarì, 1974). Πρόκειται για μια μικροσκοπική δομή ορατή κατά την φάση της παχυνταίας (φάση της μείωσης όπου τα ομόλογα χρωμοσώματα συνάπτονται και ανασυνδυάζονται).

Κατά την χρονική στιγμή δημιουργίας του XY σωματίου όλα τα φυλοσύνδετα γονίδια είναι μεταγραφικά ανενεργά, ενώ εκείνα που βρίσκονται σε αυτοσωματικά χρωμοσώματα εξακολουθούν να εκφράζονται κανονικά (Handel et al., 1994). Η αδρανοποίηση που συμβαίνει κατά τη σπερματογένεση δεν έχει καμία σχέση με την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X που λαμβάνει χώρα στα σωματικά κύτταρα των θήλεων θηλαστικών ατόμων και όπου από το αδρανοποιημένο X παράγεται απαραίτητα το XIST μετάγραφο (Plath et al., 2002). Αν και ο μηχανισμός αδρανοποίησης του X κατά τη σπερματογένεση δεν είναι ακόμη απόλυτα διασαφηνισμένος το βέβαιο είναι ότι δεν είναι αναγκαία η παρουσία του XIST και ότι η διάρκεια της αδρανοποίησης είναι περίπου 15 ημέρες για τον άνθρωπο (Goetz et al., 1984; Sharpe, 1993; Mc Carrey et al., 2002).

Αυτή η σύντομη χρονική περίοδος της αδρανοποίησης εντοπίζεται μόνο κατά την φάση της παχυνταίας κατά τη μείωση της σπερματογένεσης, όταν τα ομόλογα χρωμοσώματα συνάπτονται και ανασυνδυάζονται (με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται αποφυγή της σύζευξης και του ανασυνδυασμού μεταξύ των μη ομολόγων χρωμοσωμικών περιοχών), γιατί πριν και μετά την φάση αυτή, καθώς και στα μιτωτικά γαμετικά κύτταρα και τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα είναι ενεργά (Hendriksen et al., 1995).



6.3 Γονιδιωματική αποτύπωση

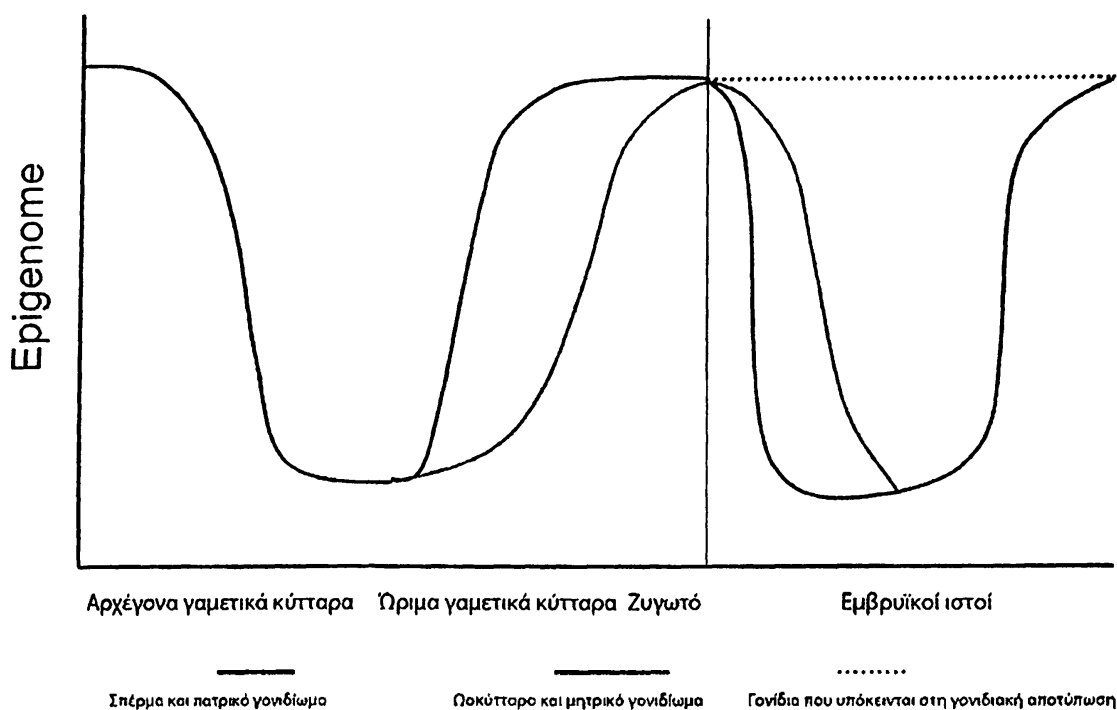
Όπως ήδη έχουμε αναφέρει, το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης εξαφανίζεται στα εμβρυονικά γαμετικά κύτταρα και επανέρχεται αργότερα ανάλογα με το φύλο του εμβρύου κατά τη γαμετογένεση ή μετά από τη γονιμοποίηση. Λάθη κατά τη γονιδιωματική αποτύπωση μπορεί να προκαλέσουν διαταραγμένη ανάπτυξη του εμβρύου ή και σοβαρές διαταραχές (Reik et al.,2001; Gosden et al.,2003; Kerjean et al., 2000).

6.3.1 Γονιδιωματική αποτύπωση κατά τη γαμετογένεση και εμβρυϊκή ανάπτυξη

Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα αρχικά απομεθυλιώνονται στις αδιαφοροποίητες γονάδες (μέχρι την φάση της γεννητικής πτυχής) (Hazakova et al.,2002). Κατά τη γαμετογένεση γίνεται επανεγκατάσταση της μεθυλίωσης των CpG νησίδων σε γονίδια που υπόκεινται στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης (βλ.σχήμα 16). Αυτό συμβαίνει τόσο στα σπερματοζώαρια όσο και στα ωκύτταρα (Obata and Kono 2002; Davis et al., 2000).

Μετά τη γονιμοποίηση του ωαρίου από το σπερματοζώαριο πραγματοποιείται απομεθυλίωση, ξεκινώντας από τον αρσενικό προπυρήνα. Είναι γνωστό ότι η χρωματίνη του πατρικού προπυρήνα είναι λιγότερο μεθυλιωμένη από την χρωματίνη του μητρικού προπυρήνα (Fulka et al.,2004). Τα γονίδια που υπόκεινται στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης προστατεύονται από την απομεθυλίωση. Μετά την εμφύτευση του εγκυήματος στο ενδομήτριο δημιουργούνται διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης για κάθε ιστό ξεχωριστά.





Σχήμα 16. Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα απομεθυλιώνονται. Κατά τη γαμετογένεση η μεθυλίωση εγκαθίσταται διαφορετικά στα σπερματοζώαρια (μπλε χρώμα) και στα ωάρια (κόκκινο χρώμα). Μετά τη γονιμοποίηση ο αρσενικός προπυρήνας απομεθυλιώνεται αμέσως ενεργητικά, ακολουθεί δεύτερο βήμα παθητικής απομεθυλίωσης του γονιδιώματος του ζυγώτη και εγκατάστασης *de novo* της μεθυλίωσης μετά την εμφύτευση στο ενδομήτριο. Τα γονίδια που ακολουθούν το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης (με διακεκομμένη γραμμή) προστατεύονται από την απομεθυλίωση. (Niemitz and Feinberg, 2004)

6.4 Γονιδιωματική αποτύπωση και διαταραχές κατά τη σπερματογένεση

Πρόσφατα συνδέθηκε το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης με διαταραχές στη σπερματογένεση (Marques et al., 2004). Μελετήθηκαν δύο γονίδια με γονιδιωματική αποτύπωση, το MEST (7q32) που εκφράζεται μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο και το H19 (11p15.5) που εκφράζεται μόνο από το μητρικό, σε δύο ομάδες ανδρών α) ολιγοζωοσπερμικούς και β) φυσιολογικούς (όσον αφορά στην ποσότητα και ποιότητα σπέρματος).

Ενώ για το MEST γονίδιο όλα τα δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν το φυσιολογικό πρότυπο γονιδιωματικής αποτύπωσης, δεν συνέβη το ίδιο και για το H19. Κάποιοι από τους άνδρες με μέτρια και σοβαρή ολιγοζωοσπερμία παρουσίασαν μεταβολές στο πρότυπο μεθυλίωσης (ελαττωμένη ποσοστά μεθυλίωσης) του πατρικού αλληλομόρφου. Η ομάδα των Marques και συνεργατών προτείνει ότι οι διαταραχές κατά την εγκατάσταση του προτύπου



της γονιδιωματικής αποτύπωσης ίσως υποδηλώνουν μεταβολές στην ενεργότητα των μεθυλοτρανσφερασών και άρα αποτελούν αιτία μη φυσιολογικής σπερματογένεσης.

6.5 Γονιδιωματική αποτύπωση και SNRPN γονίδιο

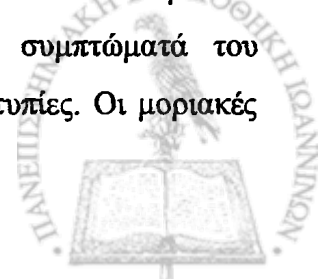
Το SNRPN γονίδιο (small ribonucleoprotein polypeptide N-SNRPN) κωδικοποιεί για ένα πολυπεπτίδιο μικρού πυρηνικού ριβονουκλεοπροτεϊνικού συμπλέγματος, ανήκει στην οικογένεια snRNP SMB/SMN και είναι γονίδιο με γονιδιωματική αποτύπωση που εκφράζεται μόνο από το πατρικό χρωμόσωμα. Το SNRPN βρίσκεται στο χρωμόσωμα 15 στην περιοχή 15q11-13 που σχετίζεται με δύο γνωστά σύνδρομα: τα σύνδρομα Prader Willi (PWS) και Angelman (AS).

Μικρο-ελλείμματα γύρω από την περιοχή του πρώτου εξωνίου του πατρικά εκφραζόμενου αλληλομόρφου του γονιδίου SNRPN σχετίζονται με την εμφάνιση του συνδρόμου PW, ενώ αντίθετα μικρο-ελλείμματα μεγέθους περίπου 30kb ανοδικά (upstream) του SNRPN και πλησιέστερα προς το κεντρομερίδιο συνδέονται με το σύνδρομο AS (Paulsen and Ferguson-Smith, 2001, Review). Τα παραπάνω οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι αυτές οι δύο περιοχές περιλαμβάνουν το αποκαλούμενο κέντρο γονιδιωματικής αποτύπωσης (imprinting control region-ICR) που ελέγχει τοπικά την εγκατάσταση, καθώς και τη διατήρηση του γονιδιωματικού «σήματος». Το ICR κέντρο βρίσκεται ~35kb ανοδικά (upstream) του SNRPN γονιδίου και έχει έκταση 880 bp, επιπλέον περιλαμβάνει 23 CpG νησίδες οι οποίες είναι μεθυλιωμένες στο μητρικό χρωμόσωμα 15 και μη μεθυλιωμένες στο πατρικό (Paulsen and Ferguson-Smith, 2001).

Το σύνδρομο PW απαντά σε συχνότητα 1 στις 20000 γεννήσεις και χαρακτηρίζεται από αδυναμία ανάπτυξης κατά την παιδική ηλικία, υπερφαγία και παχυσαρκία από την πρώιμη παιδική ηλικία, νοητική υστέρηση και προβλήματα συμπεριφοράς.

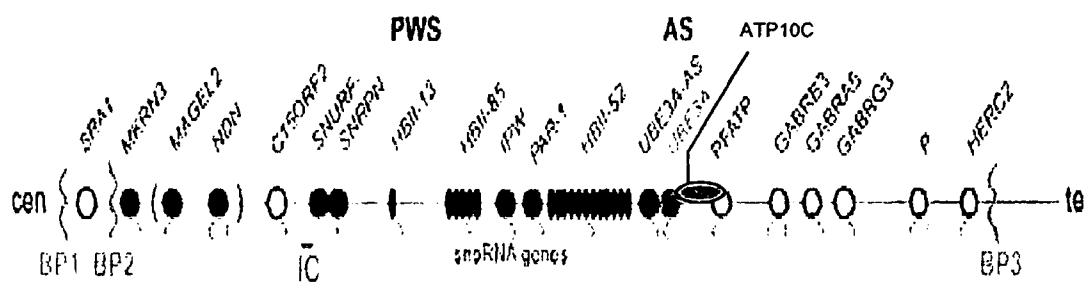
Οι μοριακές βλάβες που έχουν αναφερθεί είναι πολύπλοκες και εντοπίζονται σε μια περιοχή με γονιδιακή αποτύπωση μεγέθους περίπου 2 Mb που περιλαμβάνει μητρικής και πατρικής προέλευσης εκφραζόμενα αλληλόμορφα. Το PWS προκύπτει από απώλεια των εκφραζόμενων από το πατρικό αλληλόμορφο γονιδίων. Ασθενείς με σύνδρομο PW μπορεί να έχουν μικρο-ελλείμματα σε περιοχή μεγέθους περίπου 4kb που βρίσκεται στο πρώτο εξώνιο του υποκινητή του γονιδίου SNRPN (65-70% των περιπτώσεων), μητρική μονογονεϊκή δισωμία (20-30% των περιπτώσεων) ή αλλαγές στο πρότυπο μεθυλίωσης του ICR κέντρου.

Το AS απαντά με συχνότητα 1 στις 15000 γεννήσεις και στα συμπτώματά του περιλαμβάνονται: νοητική υστέρηση, προβλήματα στο λόγο και στερεοτυπίες. Οι μοριακές



βλάβες αφορούν στην περιοχή 15q11-13 και οφείλονται στην απώλεια έκφρασης του μητρικής προέλευσης αλληλομόρφου.

Το σύνδρομο AS μπορεί να είναι αποτέλεσμα μητρικής προέλευσης μικροελλειμμάτων της περιοχής 15q11-13 (65-70% των περιπτώσεων), πατρικής μονογονεϊκής δισωμίας (95% των περιπτώσεων) ή διαταραχών του προτύπου μεθυλίωσης (περίπου 10%), ενώ για το 10-25% των πασχόντων δεν είναι μέχρι σήμερα γνωστή η μοριακή βλάβη. Στην περίπτωση διαταραχών στο πρότυπο της γονιδιωματικής αποτύπωσης, αυτές οφείλονται σε απώλεια του μεθυλιωμένου μητρικού αλληλομόρφου ή σε μητρικής προέλευσης απώλειες της περιοχής ICR.



Σχήμα 17 .Η 15q11-q13 περιοχή μεγέθους ~ 2Mb υφίσταται γονιδιωματική αποτύπωση και ελέγχεται από ένα IC κέντρο στο 5'-άκρο του *SNRPN*. (Με μωβ χρώμα συμβολίζονται τα γονίδια που εκφράζονται από το πατρικό αλληλόμορφο, ενώ τα *UBE3A*, *ATP10C* εκφράζονται από το μητρικό αλληλόμορφο).

6.5.1 Σύνδρομο με γονιδιωματική αποτύπωση και υποβοηθούμενη αναπαραγωγή

Υπολογίζεται ότι σήμερα το 1-3% των παιδιών που γεννιούνται στις δυτικές χώρες, έχουν γεννηθεί μετά από εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, δηλαδή *in vitro* γονιμοποίηση ή ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίου (*intracytoplasmic sperm injection-ICSI*) και ο αριθμός αυτός συνεχώς αυξάνεται. Τελευταία συζητούνται τα ζητήματα ασφάλειας των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και προεμφυτευτικής διάγνωσης, διότι σε πρόσφατες μελέτες συσχετίστηκαν οι τεχνικές αυτές με νοσήματα με γονιδιωματική αποτύπωση. Συγκεκριμένα αναφέρθηκε αύξηση 3-6 φορές στη συχνότητα των συνδρόμων BW και AS σε παιδιά που γεννήθηκαν μετά από υποβοηθούμενη αναπαραγωγή σε σύγκριση με παιδιά που γεννήθηκαν φυσιολογικά. Στην περίπτωση των παιδιών αυτών είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι δεν έχουμε μικροελλείμματα της υπεύθυνης περιοχής, αλλά διαταραχές του προτύπου μεθυλίωσης (Young *et al.*, 2001; Cox *et al.*, 2003; DeBaun *et al.*, 2003; Robertson; 2005, Review).

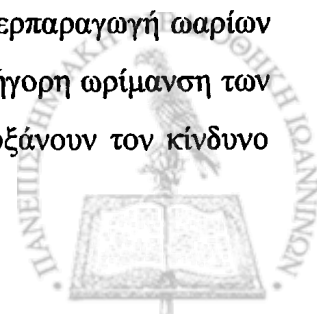


Αν και ο αριθμός των μελετών, όπως και το δείγμα των παιδιών που έχει ήδη μελετηθεί μέχρι σήμερα είναι σχετικά μικρός, και οπωσδήποτε απαιτούνται και άλλες μεγαλύτερες σε δείγμα πληθυσμού διεθνείς μελέτες, φαίνεται ότι υπάρχει κάποια αύξηση του κινδύνου και πιθανόν να προταθούν στο μέλλον κάποιες επιπλέον προγεννητικές εξετάσεις.

Ως γνωστόν ο μηχανισμός της γονιδιωματικής αποτύπωσης περιλαμβάνει την άρση αποτυπώματος κατά την πρώιμη γαμετογένεση, την επανεγκατάστασή του στα ώριμα γαμετικά κύτταρα και τη διατήρησή του και μεταβίβαση κατά τις μιτωτικές διαιρέσεις των σωματικών κυττάρων. Επειδή αντικείμενο των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής αποτελούν κυρίως τα γαμετικά κύτταρα και το πολύ πρώιμο έμβryo και όχι τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα, όπου απαλείφεται παροδικά το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η επανεγκατάσταση και διατήρηση του αποτυπώματος και κατά πόσον οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής μπορούν να τα επηρεάσουν.

Κατά καιρούς έχουν ενοχοποιηθεί πολλοί παράγοντες. Έχει προταθεί ότι ίσως η *in vitro* ωρίμανση των γαμετών και οι συνθήκες καλλιέργειας (πχ. καλλιεργητικά υλικά) σχετίζονται με διαταραχές της εγκατάστασης ή/και διατήρησης του γονιδιωματικού αποτυπώματος κατά τη διάρκεια των διαφορετικών σταδίων της ανάπτυξης. Συγκεκριμένα, από τους Kerjean και συνεργάτες (Kerjean et al, 2003) αναφέρεται ότι η καλλιέργεια *in vitro* επηρεάζει την εγκατάσταση των αποτυπώματων και μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχές της μεθυλίωσης σε ορισμένους γονιδιακούς τόπους. Επίσης, αναφέρθηκε απώλεια μεθυλίωσης μετά από καλλιέργεια σε συγκεκριμένο καλλιεργητικό υλικό (Doherty et al, 2000; Shi and Haaf, 2002). Άλλοι παράγοντες όπως π.χ. η διαδικασία πρόκλησης ωοθυλακιορρηξίας που γίνεται με παροχή γοναδοτροφινών κατά την υποβοηθούμενη αναπαραγωγή ίσως είναι υπεύθυνοι για τη διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης (Horsthemke and Ludwig, 2005-Review). Οι υψηλές δόσεις γοναδοτροφινών επηρεάζουν το πρότυπο γονιδιωματικής αποτύπωσης, διότι πιθανόν προκαλούν την απελευθέρωση ανώριμων ωοκυττάρων, ενώ η *in vitro* ωρίμανση δεν επιτρέπει την ολοκλήρωση της φυσιολογικής διαδικασίας ωρίμανσης. Πειράματα σε ποντίκια έχουν επιβεβαιώσει την παραπάνω υπόθεση, αφού βρέθηκαν μη φυσιολογικά πρότυπα μεθυλίωσης σε έμβρυα από θηλυκά με ωοθηκική υπερδιέγερση σε ποσοστό 20% έναντι του 10% σε έμβρυα προερχόμενα από ποντίκια χωρίς ωοθηκική υπερδιέγερση (Shi & Haaf, 2002).

Φαίνεται ότι μάλλον η (ορμονική) πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας και υπερπαραγωγή ωαρίων που συνεπάγεται την ωρίμανση κακής ποιότητας ωαρίων ή την πολύ γρήγορη ωρίμανση των ωαρίων που δεν επιτρέπει την σωστή διαδικασία μεθυλίωσης DNA, αυξάνουν τον κίνδυνο



λάθους στην γονιδιωματική αποτύπωση και όχι η τεχνική ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίου αυτή καθαυτή (ICSI) (Ludwig 2005).

Ειδικά για το SNRPN γονίδιο (σύνδρομο Angelman), είναι γνωστό ότι το αποτύπωμά του είναι από τα τελευταία που εγκαθίστανται κατά τη γαμετογένεση γεγονός που δίνει περισσότερο χρόνο στους περιβαλλοντικούς παράγοντες (καλλιεργητικά υλικά, χειρισμός ωαρίων-σπερματοζωαρίων κ.λ.π.) να δράσουν (Manning et al.,2001).

6.5.2 Επίδραση των περιβαλλοντικών παραγόντων στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης

Διάφορες απόψεις έχουν εκφραστεί για την αλληλεπίδραση παραγόντων του περιβάλλοντος με τη γονιδιωματική αποτύπωση. Όπως, ήδη έχει αναφερθεί οι μεθυλ-τρανσφεράσες του DNA και των ιστονών χρησιμοποιούν το S-adenosyl-methionine (SAM) σαν δότη $-CH_3$ κατά τη διαδικασία της μεθύλισης. Πιθανές βλάβες αναφέρονται κατά την εξωσωματική λόγω μεγάλης συγκέντρωσης μεθειονίνης (Zaitseva et al., 2007). Τα επίπεδα SAM εξαρτώνται από το φολικό οξύ, ενώ τα ένζυμα που συμμετέχουν στο μεταβολισμό του άνθρακα χρησιμοποιούν συνένζυμα της βιταμίνης B (Horsthemke and Ludwig, 2005-Review). Τόσο το φολικό οξύ όσο και η βιταμίνη B, παρέχονται στον οργανισμό μέσω της διατροφής, επομένως πιθανόν οι επιγενετικές καταστάσεις επηρεάζονται από τη διαίτα (Horsthemke and Ludwig, 2005-Review).

Είναι γνωστό ότι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη λειτουργικότητα του πλακούντα κατέχουν τα γονίδια με γονιδιωματική αποτύπωση και ότι διαταραχές στο πρότυπο εγκατάστασής τους πιθανόν να σχετίζονται με αποβολές. Για παράδειγμα αναφέρεται ότι σφάλματα κατά την εγκατάσταση του προτύπου μεθύλισης μπορούν να προκαλέσουν δυσλειτουργία του πλακούντα ή και αποβολές. Βέβαια αυτό δεν συνεπάγεται ότι οι αποβολές προκαλούνται μόνο από επιγενετικά σφάλματα, αλλά κάποιο ποσοστό αυτών που δεν οφείλονται σε χρωμοσωμικές ανωμαλίες του πλακούντα ή του εμβρύου, μπορούν να ερμηνευθούν με τον τρόπο αυτό (Horsthemke and Ludwig, 2005-Review).



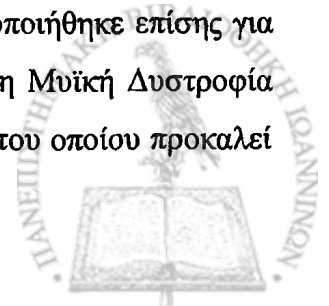
7. Σχεδιασμός ανιχνευτών κατά μήκος του χρωμοσώματος X για χρήση τους στη μεθοδολογία του πολλαπλού υβριδισμού με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές που είναι τοποθετημένοι επάνω σε πρωτότυπη μικροσυστοιχία (Συνεργασία με το Ινστιτούτο Νευρογενετικής και Νευρομυϊκών παθήσεων Λευκωσίας)

Στην κατεύθυνση της μελέτης της περιοχής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X προχωρήσαμε σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Νευρογενετικής και Νευρομυϊκών παθήσεων Λευκωσίας (Κύπρου), το οποίο διαθέτει την απαραίτητη τεχνογνωσία και εξοπλισμό (μεθοδολογία του πολλαπλού υβριδισμού με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές που είναι τοποθετημένοι επάνω σε πρωτότυπη μικροσυστοιχία, MAPH-multiplex amplifiable probe hybridization).

Η μέθοδος MAPH περιγράφηκε για πρώτη φορά το 2000 (Armour et al.,2000). Σκοπός της ήταν η ανίχνευση με ακρίβεια του αριθμού αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA στο ανθρώπινο γονιδίωμα και η δυνατότητα καταγραφής οποιασδήποτε αλλαγής του αριθμού αυτού που μπορεί να υποδηλώνει έλλειψη ή διπλασιασμό.

Η μέθοδος αυτή συνδυάζει τον υβριδισμό, που αποτελεί το πρωταρχικό στάδιο για την ανίχνευση του αριθμού αντιγράφων, με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση των ανιχνευτών που υβριδοποιήθηκαν. Μίγμα ανιχνευτών, καθένας από τους οποίους αντιστοιχεί σε κάποια μοναδική αλληλουχία του γονιδιώματος, πλαισιωμένοι από θέσεις πρόσδεσης κοινών εκκινητών, υβριδίζονται με το υπο εξέταση γενωμικό DNA που βρίσκεται ακινητοποιημένο σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μετά το ξέπλυμα κάθε ανιχνευτής που προσδέθηκε στο DNA θα βρίσκεται σε ποσότητα ανάλογη του αριθμού αντιγράφων του στο υπό εξέταση DNA. Στη συνέχεια όλοι οι ανιχνευτές που υβριδίστηκαν ενισχύονται ταυτόχρονα χρησιμοποιώντας ένα κοινό ζευγάρι εκκινητών και μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό υπολογίζεται η ποσότητα του κάθε ανιχνευτή η οποία θα αντιπροσωπεύει τον αριθμό αντιγράφων της αντίστοιχης περιοχής του DNA που εξετάζεται.

Με τη μέθοδο MAPH έχουν αναγνωριστεί γενικά ελλείμματα της τάξεως περίπου των 150bp. Για παράδειγμα ελλείμματα που προκαλούν τη Μυϊκή Δυστροφία τύπου Duchenne και τα σύνδρομα Prader-Willi/Angelman (Armour et al.,2000). Σε πιο πρόσφατες μελέτες με τη μέθοδο αυτή ανιχνεύθηκε έλλειμμα σε ολόκληρο σχεδόν το γονίδιο TBX5 το οποίο εμπλέκεται στο σύνδρομο Holt-Oram (Akrami et al.,2001) ενώ χρησιμοποιήθηκε επίσης για τη σάρωση των γονιδίων: **DMD** μεταλλάξεις του οποίου προκαλούν τη Μυϊκή Δυστροφία τύπου Duchenne (White et al.,2002), **PMP22** διπλασιασμός ή έλλειμμα του οποίου προκαλεί



αντίστοιχα τις ασθένειες του νευρικού συστήματος CMT1A (Charcot-Mary-Tooth disease type-1) και HNPP (Hereditary Neuropathy with liability to pressure palsies) (Akrami et al.,2003), και των τελομερών όλων των χρωμοσωμάτων (Sismani et al.,2001) για την ανίχνευση των αλλαγών στον αριθμό των αντιγράφων.

Η ΜΑΡΗ είναι μια ευέλικτη μέθοδος η οποία είναι πιθανό να εφαρμοστεί στην ανίχνευση μεταλλάξεων. Ο αριθμός των περιοχών που μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα καθορίζεται από τον αριθμό των ανιχνευτών που υπάρχουν σε ένα μίγμα. Αλλά υπάρχουν οι εξής περιοριστικοί παράγοντες (Hollox et al.,2002): 1) Δυνατότητα διαχωρισμού. Επειδή οι ανιχνευτές αναγνωρίζονται μόνο με βάση το μέγεθός τους απαιτείται μια διαφορά μεγέθους τουλάχιστον 3-5 bp μεταξύ τους για να διαχωρισθούν κατά την ηλεκτροφόρηση. 2) Διακριτική ικανότητα. Η χρήση του υβριδισμού επιβάλλει ανιχνευτές μεγέθους άνω των 100bp, διότι η αποτελεσματικότητά του μειώνεται για μεγέθη μικρότερα του ανωτέρου 3) Μέθοδος ανάλυσης. Η αποδοτικότητα της μεθόδου αλυσιδωτής πολυμεράσης μειώνεται σημαντικά για ανιχνευτές μεγάλου μεγέθους (>650 bp).

Το μεγαλύτερο μίγμα που έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία μέχρι σήμερα για τη ΜΑΡΗ αποτελείται από 60 ανιχνευτές και οι πιο πάνω περιορισμοί αποτελούν σοβαρό εμπόδιο στην περαιτέρω αύξηση του αριθμού αυτού.

Αυτοί οι περιορισμοί μπορούν να ξεπεραστούν με την χρήση της τεχνολογίας των μικροσυστοιχιών. Πιο συγκεκριμένα, προσδοκώμενος στόχος θα είναι να ακολουθείται η καθιερωμένη διαδικασία της μεθόδου ΜΑΡΗ, όμως αντί να γίνεται ηλεκτροφορητική ανάλυση για την ταυτοποίηση των ανιχνευτών, οι ανιχνευτές που έχουν υβριδιστεί και πολλαπλασιαστεί θα υβριδίζονται ξανά με DNA-ανιχνευτές οι οποίοι θα βρίσκονται ακινητοποιημένοι σε μικροσυστοιχίες επάνω σε πλάκα σιλικόνης. Η ποσοτική ανάλυση θα αντανακλά τον αριθμό αντιγράφων του κάθε ανιχνευτή στο υπό εξέταση γενετικό υλικό. Εφόσον στην περίπτωση αυτή, ο κάθε ανιχνευτής θα αναγνωρίζεται όχι από το μέγεθός του, αλλά από το σημείο της μικροσυστοιχίας όπου βρίσκεται, ο μόνος περιοριστικός παράγοντας στον αριθμό των ανιχνευτών που θα περιλαμβάνονται σε ένα μίγμα θα είναι ο αριθμός των ανιχνευτών που θα βρίσκονται ακινητοποιημένοι σε μικροσυστοιχίες. Με τον τρόπο αυτό θα επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή επιλογή των ανιχνευτών, αφού δεν θα είναι απαραίτητο να υπάρχει μεταξύ τους διαφορά στο μέγεθος, καθώς και η χρήση μεγαλύτερου αριθμού ανιχνευτών ανά εξέταση, ο οποίος μπορεί να φτάσει τις 100.000 (Patsalis et al.,2005).



ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι να μελετήσουμε διαταραχές του προτύπου μεθυλίωσης του DNA σε γυναίκες με αποβολές και άνδρες με υπογονιμότητα. Η μελέτη περιλαμβάνει δύο κύριες ομάδες ατόμων :

1. Γυναίκες με ιστορικό συνεχών αυτόματων αποβολών και φυσιολογικό καρύοτυπο, και
2. Άνδρες με προβλήματα υπογονιμότητας που κατέφυγαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Ακόμα, μελετήσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια (αίμα ομφαλίου και πλακούντες) που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτικό γενετικό έλεγχο με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων για το εάν η αφαίρεση 1-2 βλαστομεριδίων επηρεάζει το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης.

Αρχικά έγινε ανάλυση καρύοτυπου όλων των ζευγαριών με κλασικές κυτταρογενετικές τεχνικές, ούτως ώστε να αποκλειστεί η περίπτωση κληρονομικής χρωμοσωμικής ατυπίας (μετάθεσης ή άλλου ανασυνδυασμού των χρωμοσωμάτων) που θα μπορούσε να είναι αιτία των αποβολών. Ακόμα (όπου αυτό ήταν εφικτό) μελετήσαμε τον καρύοτυπο από ιστό αποβληθέντων εμβρύων, εφόσον είναι γνωστό ότι ποσοστό >50% των αποβολών 1^{ου} τριμήνου παρουσιάζει κάποια χρωμοσωμική ανωμαλία. Υπενθυμίζεται ότι δεν συμπεριελάβαμε στη μελέτη μας ζευγάρια με οποιαδήποτε κληρονομική χρωμοσωμική ανωμαλία.

Στη συνέχεια, σε 74 ζευγάρια με φυσιολογικό καρύοτυπο προχωρήσαμε στη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X των γυναικών με τις καθέξιν αποβολές. Η μελέτη αυτή είναι η πρώτη που αφορά στον ελληνικό πληθυσμό.

Μελετήσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA σε άνδρες με προβλήματα υπογονιμότητας που κατέφυγαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (δεύτερη εξεταζόμενη ομάδα). Προσπαθήσαμε να μελετήσουμε τη διαδικασία της σπερματογένεσης και να εκτιμήσουμε την «παρουσία» γαμετικών κυττάρων εξετάζοντας στο DNA ορχικού ιστού τα πρότυπα μεθυλίωσης συγκεκριμένων γονιδίων που επιλέξαμε ως μοριακούς δείκτες. Τα δύο γονίδια που επιλέξαμε είναι τα HUMARA και SNRPN που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, ένα στο χρωμόσωμα του φύλου X και ένα στο αυτοσωματικό χρωμόσωμα 15 και έχουν διαφορετικό πρότυπο μεθυλίωσης.



Τέλος, στην κατεύθυνση της μελέτης της μεθυλίωσης του DNA του χρωμοσώματος X και της αδρανοποίησής του προσπαθήσαμε να συμβάλουμε στην ανάπτυξη πρωτότυπης μικροσυστοιχίας (DNA microarrays) που να ανιχνεύει με ακρίβεια τον αριθμό αντιγράφων συγκεκριμένων αλληλουχιών στο ανθρώπινο γονιδίωμα, καταγράφοντας οποιαδήποτε αλλαγή στον αριθμό, που μπορεί να υποδηλώνει έλλειψη ή διπλασιασμό σε συγκεκριμένη περιοχή. Μακροπρόθεσμος στόχος είναι ο έλεγχος για διπλασιασμούς ή ελλείψεις με την χρήση των συγκεκριμένων ανιχνευτών στο DNA γυναικών με καθέξιν αποβολές που βρέθηκαν να έχουν διαταραγμένο πρότυπο αδρανοποίησης του X.

2. Υλικό της μελέτης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, μελετήσαμε δύο κύριες ομάδες πληθυσμού.

1. Γυναίκες με ιστορικό συνεχών αυτόματων αποβολών

Η πρώτη ομάδα αφορά σε ζευγάρια με αποβολές που προσήλθαν στη Γυναικολογική και Μαιευτική Κλινική του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Ο αριθμός των ζευγαριών που περιλαμβάνει η μελέτη είναι 74.

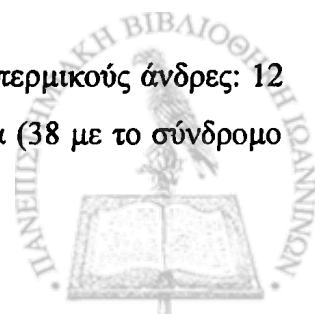
Κατόπιν ελέγχου του καρυότυπου των συζύγων, αλλά και επιπλέον αποκλεισμού οποιασδήποτε κληρονομικής χρωμοσωμικής ατυπίας μετά την κυτταρογενετική εξέταση 18 αποβληθέντων εμβρύων (*de novo* όλες οι ανωμαλίες των εμβρύων), προχωρήσαμε στη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των γυναικών.

Οι 74 γυναίκες που εξετάστηκαν είναι ηλικίας <41 ετών με ≥ 2 συνεχείς αποβολές πρώτου τριμήνου αδιευκρίνιστης αιτιολογίας. Εξαιρέθηκαν από τη μελέτη γυναίκες με διευκρινισμένη αιτία αποβολής: έμβρυο με χρωμοσωμική ανωμαλία, έκτοπη κύηση, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, ορμονικές διαταραχές, σύνδρομο αντι-φωσφολιπιδίων, θρομβοφιλικών προβλημάτων (παράγοντας V Leiden και μετάλλαξη προ-θρομβίνης G20210A) ή μολύνσεις.

Σαν μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν 80 υγιείς γυναίκες, ίδιας ηλικίας με ≥ 2 παιδιά και χωρίς αποβολές στο ιστορικό τους. Όλες οι γυναίκες της μελέτης προέρχονται από την ίδια γεωγραφική περιοχή (ΒΔ Ελλάδα). Όλα τα άτομα που συμμετείχαν σε αυτή τη μελέτη, έδωσαν τη συγκατάθεσή τους σύμφωνα με τη διακήρυξη του Ελσίνκι και τους κανόνες βιοηθικής.

2. Άνδρες με υπογονιμότητα

Η δεύτερη ομάδα πληθυσμού που μελετήσαμε περιλαμβάνει 86 αζωοσπερμικούς άνδρες: 12 με αποφρακτική αζωοσπερμία και 74 με μη-αποφρακτική αζωοσπερμία (38 με το σύνδρομο



Sertoli και 13 με το σύνδρομο της πρώιμης διακοπής της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων περιλαμβάνονται μεταξύ των μη-αποφρακτικών), που προσήλθαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με προβλήματα υπογονιμότητας.

Για τη λήψη της απαιτούμενης ποσότητας ορχικού ιστού εφαρμόστηκαν οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια στη συγκεκριμένη Κλινική και οι οποίες είναι: η συμβατική μέθοδος ανοιχτής βιοψίας και η μικρο-χειρουργική μέθοδος ανοιχτής βιοψίας. Και οι δύο μέθοδοι αποσπών ορχικό ιστό όχι περισσότερο από 0.2 gr και είναι επιτυχείς στην «αναζήτηση» σπερματοζωαρίων στο 40% των περιπτώσεων. Τα δείγματα προωθήθηκαν για μικροσκοπική εκτίμηση της παρουσίας σπερματοζωαρίων χωρίς την απομάκρυνση των σωματικών κυττάρων (Sertoli και Leyding cells).

Όλοι οι αζωοσπερμικοί άνδρες έχουν φυσιολογικό καρυότυπο 46,XY και η μέση ηλικία τους είναι τα 34 έτη (κυμαινόμενα όρια 25-43). Το περιφερικό αίμα των ιδίων ασθενών χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα –μάρτυρας διότι η λήψη ορχικού ιστού από φυσιολογικό-γόνιμο άνδρα δεν είναι επιτρεπτή, αλλά και διότι πρόκειται για φυσιολογικά άτομα άρα το πρότυπο μεθυλίωσης στο αίμα δεν αναμένεται να είναι παθολογικό.

Ο αριθμός των κοριτσιών που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση και μελετήθηκαν είναι 22. Τα δείγματα των κοριτσιών προέρχονται από το Τμήμα Ιατρικής Γενετικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Νοσοκομείο Παιδών Αγία Σοφία που είναι από τα λίγα κέντρα στη Ελλάδα που ασχολούνται με την προεμφυτευτική διάγνωση.

Τα προσωπικά στοιχεία έμειναν εμπιστευτικά. Η ανωνυμία όλων των συμμετεχόντων στην παρούσα εργασία διασφαλίστηκε με την χρήση κωδικών ονομάτων και απόλυτη διαφύλαξη όλων των προσωπικών τους στοιχείων.

3. Κυτταρογενετικές εξετάσεις

Εδώ συμπεριλαμβάνονται οι κυτταρογενετικές εξετάσεις που πραγματοποιήθηκαν σε δείγμα περιφερικού αίματος όλων των ζευγαριών, καθώς και ο έλεγχος καρυότυπου σε ιστούς προϊόντων αποβολών, όποτε αυτοί ήταν διαθέσιμοι.



3.1 Καρυότυπος από κύτταρα περιφερικού αίματος

Όλα τα ζευγάρια που προσήλθαν στη Μαιευτική και Γυναικολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με ιστορικό καθέξιν αποβολών, υπεβλήθησαν στην κλασική κυτταρογενετική εξέταση του καρυότυπου προκειμένου να αποκλεισθεί οποιαδήποτε χρωμοσωμική ατυπία. Για τον έλεγχο του καρυότυπου προτιμάται το περιφερικό αίμα από οποιοδήποτε άλλο ιστό (ινοβλάστες δέρματος, μυελός των ιστών), αφού είναι ο πιο εύκολα και με ανώδυνο τρόπο αποσπώμενος ιστός.

Η διέγερση των λεμφοκυττάρων του αίματος (σε φυσιολογικά άτομα το αίμα περιέχει λίγα διαιρούμενα κύτταρα) για συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις γίνεται με την προσθήκη διαφόρων λεκτινών, συνήθως της φυτοαιμαγλουτινίνης (μιτογόνος ουσία).

Σε σύριγγες που περιέχουν ήδη 100μl ηπαρίνης προστίθενται 2ml περιφερικού αίματος από κάθε ασθενή και το δείγμα ανακινείται ήπια με το χέρι προκειμένου να ομογενοποιηθεί. Αφού αναγραφούν προσεκτικά τα στοιχεία του κάθε ασθενούς, η διαδικασία που ακολουθείται για την καλλιέργεια των κυττάρων είναι η εξής:

Σε σωλήνες φυγοκέντρου που περιέχουν 5ml πλήρους καλλιεργητικού υλικού προστίθενται 8 σταγόνες αίματος από κάθε δείγμα και το διάλυμα ανακινείται ήπια. Τα δείγματα τοποθετούνται σε κλίβανο των 37°C (συνήθως αυτή η διαδικασία γίνεται κατά τις 14:00 το μεσημέρι), όπου και παραμένουν για περίπου 72h προκειμένου να πολλαπλασιασθούν τα κύτταρα.

Μετά από 72h προστίθενται 50μl από διάλυμα κολσεμιδίου 10μgr/μl (KaryoMax, Gibco) και ακολουθεί ήπια ανακίνηση (το κολσεμίδιο έχει δράση παρόμοια με την κολχικίνη, δηλ. παρεμποδίζει το σχηματισμό της κυτταρικής ατράκτου και έτσι «συλλαμβάνονται» όσο το δυνατό περισσότερα κύτταρα στην προμετάφαση ή μετάφαση). Τα δείγματα παραμένουν στους 37°C για περίπου 1 ώρα και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναιωρείται σε 7ml διαλύματος KCL (διασκορπίζει τα χρωμοσώματα ώστε να μην υπάρχουν επικαλύψεις μεταξύ τους) με συνεχή ανάδευση.

Ακολουθεί επώαση στους 37°C για περίπου 40-45 λεπτά και στη συνέχεια προσθήκη 1.5 ml μονιμοποιητικού διαλύματος (αναλογία όγκων 3 μεθανόλη: 1 οξικό οξύ) και ήπια ανάδευση 1-2 φορές.

Μετά από 24h τα δείγματα φυγοκεντρώνονται στις 1200 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο, επαναιωρείται το ίζημα στο εναπομείναν υγρό και προστίθενται σιγά-σιγά 7 ml μονιμοποιητικού διαλύματος.



Ακολουθεί φυγοκέντρηση, αφαίρεση του υπερκείμενου και προσθήκη 5ml μονιμοποιητικού διαλύματος. Η διαδικασία αυτή συνεχίζεται 2-3 φορές μέχρι το ίζημα να «καθαρίσει», δηλ. να απομακρυνθούν όλα τα ερυθρά αιμοσφαίρια που έχουν λυθεί και δίνουν αυτό το κοκκινωπό χρώμα και να γίνει σχεδόν λευκό.

Τέλος, το κυτταρικό εναιώρημα αποθηκεύεται σε 5 ml μονιμοποιητικού διαλύματος και ακολουθεί η δημιουργία των παρασκευασμάτων, η χρώση με Giemsa και η καρυότυπηση.

3.1.1 Δημιουργία παρασκευασμάτων

Η διαδικασία στρωσίματος των κυττάρων σε αντικειμενοφόρες πλάκες αποτελεί μια ευαίσθητη διαδικασία, η επιτυχία της οποίας εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (συνθήκες υγρασίας στο 50-55%, θερμοκρασία γύρω στους 20-25⁰C). Αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 1200 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται.

Στη συνέχεια σε ήδη προθερμασμένη αντικειμενοφόρο πλάκα προστίθενται, σε μικρή απόσταση, 2-3 σταγόνες (στυ) από το διάλυμα με τη βοήθεια πιπέτας και 1 στυ από το μονιμοποιητικό διάλυμα στο κέντρο. Καθ'όλη τη διάρκεια του στρωσίματος το παρασκεύασμα παρατηρείται στο μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεως και ανάλογα με την εικόνα των μεταφάσεων προσαρμόζεται η διαδικασία.

Αφού στρωθούν τα παρασκευάσματα παραμένουν σε κλίβανο των 80 °C για 1 ώρα, προκειμένου να σταθεροποιηθούν τα χρωμοσώματα.

3.1.2 Χρώση με Giemsa

Η χρώση με Giemsa και η εμφάνιση των G ζωνών, ανακαλύφθηκε το 1971 (Yunis JJ, 1976) και είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος που χρησιμοποιείται σήμερα στα εργαστήρια κυτταρογενετικής για την κλασική ανάλυση καρυότυπου. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση στο μικροσκόπιο εναλλασόμενων σκοτεινών και φωτεινών ζωνών, με ευκρίνεια της μεθόδου στο επίπεδο των 5-10Mb. Οι σκούρες ζώνες αντιστοιχούν σε ετεροχρωματικό DNA, είναι πλούσιες σε αδενίνη και θυμίνη και δεσμεύουν περισσότερη χρωστική, αντίθετα οι φωτεινές ζώνες είναι ευχρωματικές και πλούσιες σε γουανίνη και κυτοσίνη.

Για την εμφάνιση των G ζωνών προηγείται ενζυματική επεξεργασία με θρυψίνη και απομάκρυνση των πρωτεϊνών από την χρωματίνη. Ακολουθεί χρώση των χρωμοσωμάτων με Giemsa, σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία:



Αρχικά, η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε δοχείο που περιέχει διάλυμα θρυψίνης [10ml δ/τος 0.05% θρυψίνη –EDTA (Trypsin EDTA- Gibco), 40ml φυσιολογικού ορού και 1στγ δ/τος 1/100 HCL] για 4-5 λεπτά.

Ακολουθεί ξέπλυμα σε δοχείο που περιέχει φυσιολογικό ορό (2 φορές) και στη συνέχεια τοποθέτηση σε δοχείο που περιέχει διάλυμα Giemsa (5ml Giemsa σε περίπου 50 ml νερού) για 5-7 λεπτά.

Ξεπλένεται η αντικειμενοφόρος πλάκα με απεσταγμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Τέλος, τοποθετείται η καλυπτρίδα.

3.1.3 Ανάλυση καρυότυπου

Τα παρασκευάσματα παρατηρούνται στο μικροσκόπιο χρησιμοποιώντας καταδυτικό φακό 100x και αναλύονται 5-10 μεταφάσεις με διακριτική ικανότητα ≥ 550 ζωνών και καρυοτυπούνται [Nikon, Microphot XA, σύστημα ανάλυσης Metasystems (Ikaros)].

3.2 Κυτταρογενετική εξέταση αποβληθέντων εμβρύων

Τα δείγματα από προϊόντα αποβολών μεταφέρονταν το συντομότερο δυνατό από το χειρουργείο (μέσα σε φυσιολογικό ορό), στο εργαστήριο για κυτταρογενετική ανάλυση. Σε περίπτωση που ένα δείγμα παραμείνει για πολλές ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, τότε πλέον δεν είναι κατάλληλο για καλλιέργεια και σε αρκετές περιπτώσεις κάποια δείγματα αποκλείστηκαν από τη μελέτη γι' αυτό το λόγο. Όσον αφορά τα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία, μπορεί να περιείχαν κομμάτια πλακούντα, ξέσματα ή και δέρμα εμβρύου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιώντας τους μοριακούς δείκτες D1S180, APOB, TPOX και THO1 αποκλείστηκε η πιθανότητα μητρικής επιμόλυνσης (Διπλωματική εργασία με τίτλο «Μελέτη ανάπτυξης μητρικών κυττάρων σε καλλιέργειες κυττάρων χοριακών λαχνών και σε ιστούς από προϊόντα αποβολών με κυτταρογενετικές και μοριακές μεθόδους»).

3.2.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Όλη η διαδικασία που ακολουθείται κατά τον καθαρισμό του ιστού και τον τεμαχισμό του για τη λήψη μικρού τμήματος, γίνεται σε στείρες συνθήκες.

Μεταφέρεται το δείγμα σε τριβλίο Petri που περιέχει στείρο διάλυμα Dulbecco's MEM-DMEM (Biochrom AG) χωρίς ορό και ξεπλένεται. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται όσες φορές χρειάζεται, εάν ο ιστός είναι ιδιαίτερα αιματηρός.



Μικρό τμήμα από τον ιστό μεταφέρεται στη συνέχεια σε νέο καθαρό τριβλίο Petri, ξεπλένεται και τεμαχίζεται σε όσο το δυνατόν μικρότερα κομμάτια με αποστειρωμένες λεπίδες.

Προστίθενται 2 ml κολλαγενάσης (πρωτεολυτικό ένζυμο που διευκολύνει τη διάσπαση του ιστού) (Sigma-Aldrich, Germany) και ακολουθεί επώαση στους 37⁰ C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια αφαιρείται η κολλαγενάση με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα και προστίθενται 2 ml θρυψίνης- EDTA (Trypsin EDTA- Gibco). Αναμονή για 2-3 λεπτά, αφαίρεση με τη βοήθεια γυάλινης αποστειρωμένης πιπέτας και τελικό ξέπλυμα με DMEM, το οποίο και αφαιρείται με γυάλινη αποστειρωμένη πιπέτα.

Έπειτα μεταφέρεται κάθε τμήμα του ιστού σε φλάσκα καλλιέργειας των 50ml, στην οποία αναγράφονται τα στοιχεία του δείγματος. Για 10 περίπου λεπτά η φλάσκα αφήνεται όρθια προκειμένου να προσκολληθούν τα κύτταρα στη μια της επιφάνεια.

Προστίθενται στη συνέχεια 4ml στείρου καλλιεργητικού υλικού Chang D.Medium (Irvine Scientific) στην φλάσκα και τοποθετείται οριζόντια σε κλίβανο στους 37⁰ C. Η φλάσκα παραμένει ακίνητη για περίπου 5 ημέρες, οπότε μετά το διάστημα αυτό πραγματοποιείται η πρώτη αλλαγή καλλιεργητικού υλικού μέσα στον απαγωγό.

Με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου παρακολουθείται η πορεία ανάπτυξης των κυττάρων και πραγματοποιούνται αλλαγές στο καλλιεργητικό υλικό, όταν απορρυθμισθεί το pH, δηλ. μειωθεί η διαύγειά του (περίπου κάθε 2 ημέρες).

Όταν υπάρξει η αναμενόμενη ανάπτυξη αποικιών γίνεται η ανακαλλιέργεια που δίδει ώθηση στα κύτταρα για παραπέρα ανάπτυξη, δηλ. «αποκολλώνται» τα κύτταρα από την επιφάνεια της φλάσκας και έπειτα «επαναπροσκολλώνται» για να αναπτύξουν νέες ομοιόμορφες αποικίες. Η διαδικασία της ανακαλλιέργειας γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο:

Σε στείρες συνθήκες η φλάσκα ανοίγεται και αφαιρείται το καλλιεργητικό υλικό. Ξεπλένεται με (1-1.5) ml στείρου διαλύματος θρυψίνης/EDTA, προστίθενται 1.5 ml στείρου διαλύματος θρυψίνης/EDTA και η φλάσκα τοποθετείται στον κλίβανο στους 37⁰ C για 3-4 λεπτά.

Με το ανάστροφο μικροσκόπιο εξετάζεται εάν τα κύτταρα «αποκολλήθηκαν» και αναλόγως είτε προχωρά η διαδικασία είτε επιμηκύνεται ο χρόνος επώασης της φλάσκας στον κλίβανο.

Αφού τα κύτταρα αποκολληθούν, προστίθενται 2.5ml καλλιεργητικού, το οποίο αναστέλλει τη δράση της θρυψίνης. Τοποθετείται στη συνέχεια η φλάσκα στον κλίβανο σε οριζόντια θέση, προκειμένου τα κύτταρα να «προσκολληθούν».

Έπειτα από 3-4 ώρες και αφού τα κύτταρα έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια της φλάσκας, πραγματοποιείται η αλλαγή του υλικού της καλλιέργειας σε στείρες συνθήκες.



3.2.2 Συγκομιδή των κυττάρων

Μετά από 1-2 ημέρες από την ανακαλλιέργεια και αφού τα κύτταρα της φλάσκας έχουν δημιουργήσει ένα ομοιόμορφο πυκνό στρώμα στο δάπεδό της πραγματοποιείται η διαδικασία της συγκομιδής (harvest). Η συγκομιδή γίνεται με τον ακόλουθο τρόπο:

Σε κάθε φλάσκα προστίθενται 2 στυ κολχικίνης (Sigma, Aldrich) και ακολουθεί επώση στους 37⁰ C για περίπου 1.5 ώρα. Αφαιρείται προσεκτικά το καλλιεργητικό υλικό και προστίθενται 0.5 ml διαλύματος θρυψίνης.

Παρατηρούνται τα κύτταρα στο ανάστροφο μικροσκόπιο και αναταράσσεται δυνατά η φλάσκα για να ξεκολλήσουν από την επιφάνειά της. Στη συνέχεια προστίθεται DMEM χωρίς ορό και ξεπλένεται η φλάσκα. Μεταφέρεται όλο το περιεχόμενο μαζί με τα κύτταρα που περιέχει σε σωλήνες φυγοκέντρου (μοιράζεται ισόποσα) και φυγοκεντρείται στις 1200 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και αναδιαλύεται το ίζημα.

Έπειτα, προστίθενται 5ml υποτονικού διαλύματος KCL, ακολουθεί ανάδευση και επώαση σε υδατόλουτρο στους 37⁰ C για 45 λεπτά. Φυγοκεντρώνται στις 1200 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά και απορρίπτεται το υπερκείμενο.

Ακολουθεί η προνιμοποίηση με 5ml παγωμένου μονιμοποιητικού (3 μεθανόλη: 1 οξικό οξύ), ανάδευση με τη βοήθεια vortex και οι σωλήνες τοποθετούνται στο ψυγείο, όπου και παραμένουν για τουλάχιστον μία ημέρα.

Τα δείγματα φυγοκεντρώνται στις 1200 στροφές/λεπτό για 8 λεπτά. Απορρίπτεται το υπερκείμενο. Επαναλαμβάνεται η διαδικασία προσθήκης μονιμοποιητικού και φυγοκέντρωσης και στο τέλος το δείγμα παραμένει στο ψυγείο μέχρι τη δημιουργία των παρασκευασμάτων .

Για τη δημιουργία των παρασκευασμάτων, την χρώση με Giemsa και την καρυοτύπηση ακολουθείται η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε για τα κύτταρα περιφερικού αίματος. Τα αποτελέσματα των εξετάσεων χρειάζονται λίγες μέρες για να ολοκληρωθούν.

3.3 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα

- **πλήρες καλλιεργητικό θρεπτικό υλικό:**

RPMI 1640 medium 1X: 100ml

FBS- foetal bovine serum (Gibco, Invitrogen): 20ml

Penicillin/streptomycin (PAA- the cell culture company): 2ml



L-glutamin 200mM (100X) (PAA- the cell culture company): 2ml

PHA—L phytohemagglutinine (1.2mg protein/Flask) (Biochrom, AG): 2.5ml

- **RPMI 1640 Medium (1X):**

w 2.0g/l NaHCO_3

w/o L-glutamine

LE (low endotoxin)

(Biochrom, AG)

- **HAM'SF-10 Medium:**

w 1.2g/l NaHCO_3

w stable glutamine

(Biochrom, AG)

- **Dulbecco's MEM (DMEM)** (είναι σε μορφή σκόνης και αραιώνεται σε 10l νερό με τελική συγκέντρωση 13.54 g/l).

Περιέχει:

w 4.5 g/l D-glucose

w L-glutamine

w/o NaHCO_3 , w/o Na-Pyruvate

(Biochrom, AG)

- **Chang D.Medium**

(Irvine Scientific)

4. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες

Για τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στις γυναίκες επιλέχθηκε η μέθοδος με πέψη με ένζυμα ευαίσθητα στη μεθυλίωση (Allen., 1992). Η μελέτη αυτή περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Απομόνωση DNA από λευκά αιμοσφαίρια περιφερικού αίματος
- Έλεγχο ετεροζυγωτίας των γυναικών για την επαναλαμβανόμενη τρινουκλεοτιδική πολυμορφική περιοχή (CAG)_n που βρίσκεται στο πρώτο εξώνιο του γονιδίου του Υποδοχέα των Ανδρογόνων (Human Androgen Receptor Locus-AR). Ο έλεγχος αυτός γίνεται για να διακρίνουμε τα δύο χρωμοσώματα X (μητρικό και πατρικό) μεταξύ τους. Η εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχει την



πολυμορφική περιοχή που μας ενδιαφέρει γίνεται με τη μέθοδο της ραδιενεργού αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).

- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου και έκθεση σε αυτοραδιογραφικό φιλμ.
- Επιλογή των ετερόζυγων-πληροφοριακών γυναικών και πέψη του γενωμικού τους DNA με ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση.
- Εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχει την AR περιοχή με τη μέθοδο της ραδιενεργού αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).
- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου και έκθεση σε αυτοραδιογραφικό φιλμ.

5. Τεχνικές

5.1 Απομόνωση DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα

Για την απομόνωση DNA από τα περιφερικά λευκοκύτταρα χρησιμοποιείται περιφερικό αίμα που έχει συλλεχθεί σε δοχεία που περιέχουν EDTA ως αντιπηκτικό. Η απομόνωση πραγματοποιείται με το PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems).

Από κάθε δείγμα λαμβάνονται 300μl αίματος και προστίθενται 900μl διαλύματος λύσης RBC. Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, με παράλληλη ανάδευση ανά τακτά διαστήματα του διαλύματος. Σε περίπτωση που η αιμοληψία έγινε πολύ πρόσφατα (τουλάχιστον 1 ώρα νωρίτερα) ο χρόνος επώασης επιμηκώνεται.

Μετά την επώαση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 60 sec. Αφαιρείται το υπερκείμενο που περιέχει τα ερυθρά αιμοσφαίρια, εκτός από 10-20 μl που παραμένουν τελικά μαζί με το λευκό ίζημα.

Μετά από καλή ανάδευση με τη βοήθεια Vortex, ώστε να διαλυτοποιηθεί πλήρως το ίζημα, προστίθενται 300 μl διαλύματος Cell Lysis Solution. Με την πιπέτα αναμιγνύεται το μείγμα πάνω-κάτω αρκετές φορές. Στη συνέχεια προστίθενται 1.5 μl RNAάσης προκειμένου να γίνει η λύση των λευκών αιμοσφαιρίων και ακολουθεί επώαση για 15 λεπτά στους 37⁰ C.

Με το πέρας του χρόνου επώασης τοποθετείται αμέσως το δείγμα στον πάγο για τερματισμό της δράσης του ενζύμου και προστίθενται 100 μl Protein Precipitation Solution. Αναδεύεται έντονα το μείγμα για 20 sec με τη βοήθεια Vortex.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό και απομάκρυνση των πρωτεϊνών (σκούρο καφέ ίζημα). Έπειτα με προσοχή αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα που



περιέχει το DNA και τοποθετείται σε καθαρό μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 1.5ml που ήδη περιέχει 300 μl ισοπροπανόλης 100%. Το μείγμα ανακινείται ήπια περίπου 50 φορές.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό και αμέσως μετά –εάν η διαδικασία έχει πραγματοποιηθεί σωστά- αναμένεται το DNA με τη μορφή λευκού ιζήματος. Αφαιρείται με προσοχή το υπερκείμενο προκειμένου να παραμείνει μόνο το ίζημα.

Προστίθενται 300 μl αιθανόλης 70% και αναταράσσεται έντονα το διάλυμα για να ξεπλυθεί το ίζημα. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό, αφαίρεση με προσοχή του υπερκείμενου, τοποθέτηση του μικροφυγοκεντρικού σωληναρίου σε απορροφητικό χαρτί και παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά μέχρι πλήρους εξατμίσεως της αιθανόλης.

Τέλος, προστίθενται 100 μl διαλύματος DNA Hydration Solution στο οποίο και θα διαλυτοποιηθεί το DNA. Ακολουθεί παραμονή για λίγες ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα DNA μπορεί να φυλαχθεί στους 4⁰ C ή -20⁰ C.

5.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Γενικά

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια μέθοδος η οποία δίδει τη δυνατότητα παραγωγής πολλών αντιγράφων συγκεκριμένου τμήματος DNA με μεγάλη ταχύτητα και ευαισθησία. Αναλυτικότερα η αντίδραση PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Στάδιο αποδιάταξης του DNA (denaturation)

Η αντίδραση επιτυγχάνεται σε υψηλή θερμοκρασία (92-96⁰ C για 30-60sec). Με αυτό τον τρόπο σπάνε οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις 2 αλυσίδες της διπλής έλικας του DNA και το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνο.

2. Στάδιο υβριδισμού του γενωμικού DNA με τους εκκινητές (annealing)

Το στάδιο αυτό πραγματοποιείται με μείωση της θερμοκρασίας στους 35⁰ C με 70⁰ C για 20-60 sec. Σε αυτό επιτυγχάνεται ο υβριδισμός των εκκινητών (primers) στις συμπληρωματικές περιοχές των ανοικτών αλυσίδων του DNA. Οι εκκινητές είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων τα οποία απομονώνουν την αλληλουχία του DNA που επιθυμούμε να ενισχύσουμε. Αποτελούνται από διαφορετικές μη συμπληρωματικές αλληλουχίες, με αποτέλεσμα να μην υβριδίζονται μεταξύ τους, αλλά με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου καθώς και η συγκέντρωση των εκκινητών είναι καθοριστικοί παράγοντες για την επιτυχία της αντίδρασης.

3. Στάδιο επιμήκυνσης – σύνθεσης νέου DNA (extension)

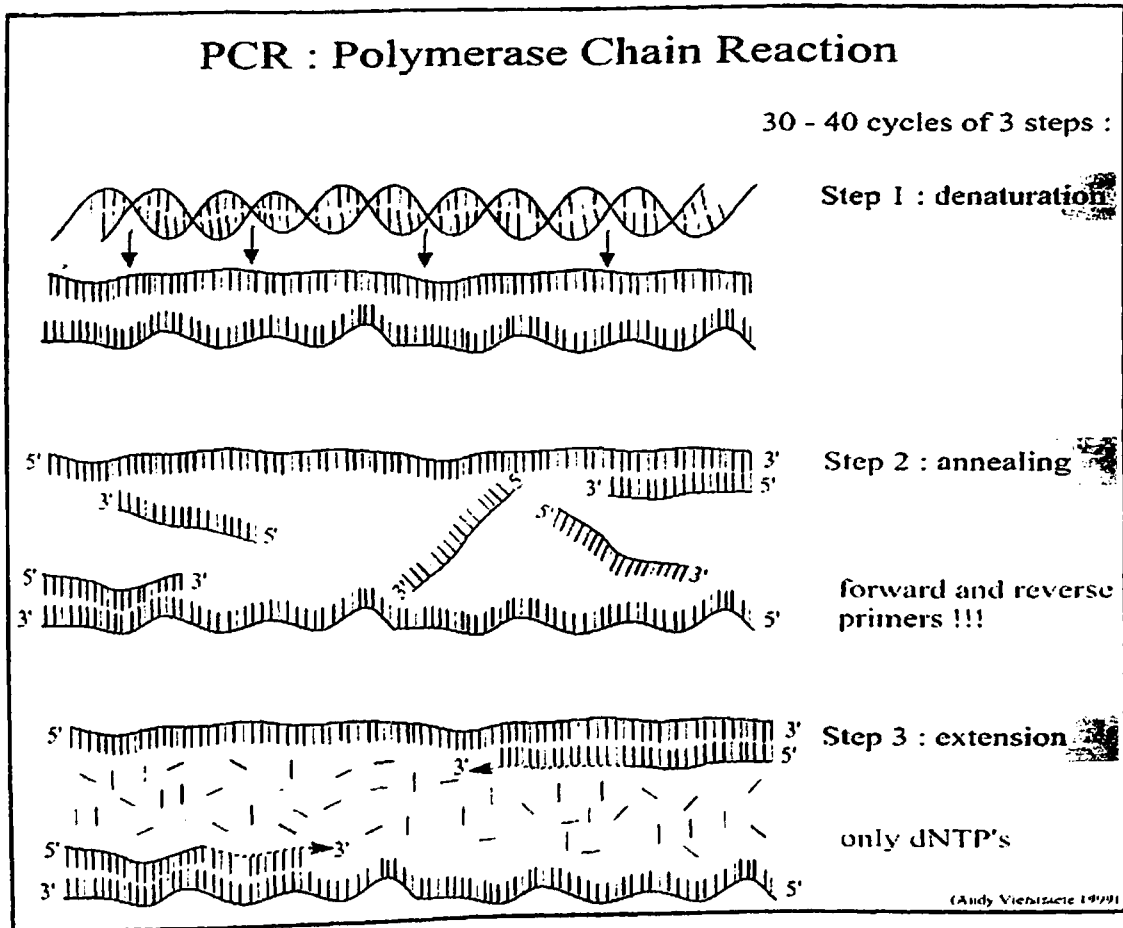
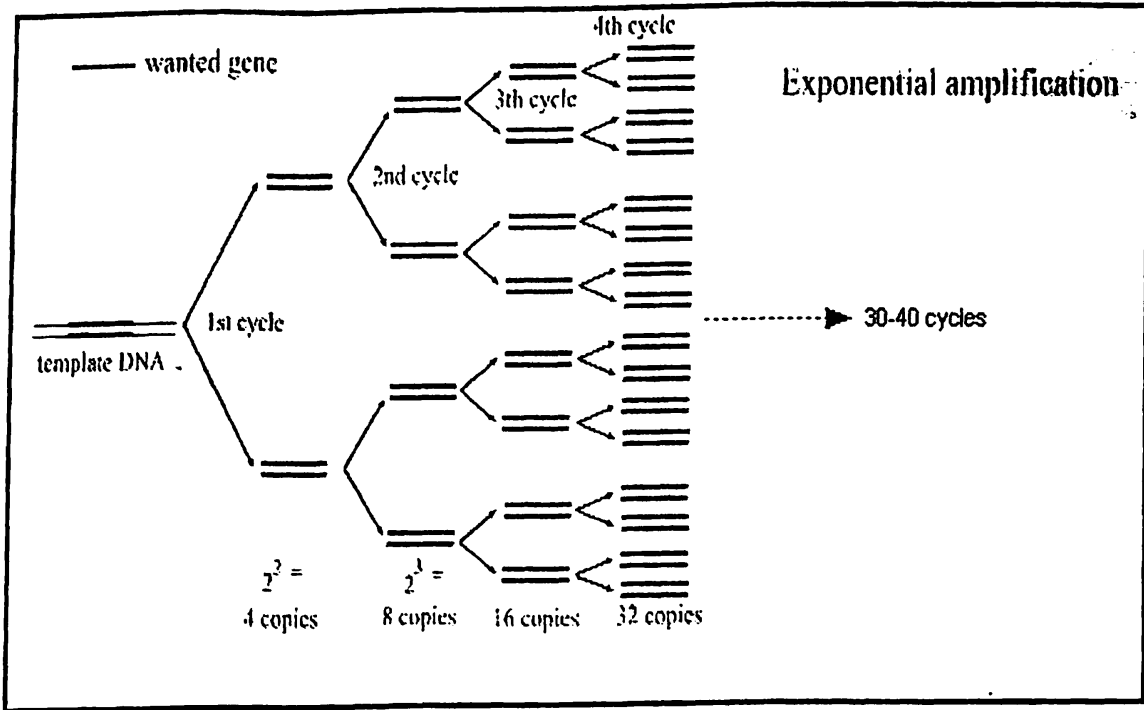


Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται η σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων του DNA με επέκταση του 3' άκρου των εκκινητών σε θερμοκρασία 70-72⁰ C για 60-180 sec. Αυτό το βήμα επιτυγχάνεται με την χρήση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση (Taq DNA polymerase). Πρόκειται για ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο που μιμείται τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του κυτταρικού πυρήνα διπλασιάζουν το DNA προκειμένου το κύτταρο να προχωρήσει σε μίτωση.

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε ένα διάλυμα που αποτελείται από το DNA, το κατάλληλο ζεύγος εκκινητών, ιόντα μαγνησίου, ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων δεοξυριβοτριφωσφωρικών νουκλεοτιδίων (dNTP's: dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen, life Technologies, USA) και Taq DNA πολυμεράση (Promega) με το συνοδό ρυθμιστικό διάλυμά της. Σε μια τυπική αντίδραση PCR ο κύκλος αποδιάταξης, υβριδισμού και σύνθεσης νέου DNA μπορεί να επαναληφθεί συνήθως 30-40 φορές. Η ενίσχυση είναι εκθετική αφού τα πολλαπλασιασμένα προϊόντα από τον προηγούμενο κύκλο χρησιμοποιούνται ως νέα καλούπια για τον επόμενο κύκλο πολλαπλασιασμού καταλήγοντας έτσι στο σχηματισμό περισσότερων από 2³⁰ ή 1 δισεκατομμυρίου ακριβών αντιγράφων του αρχικού τμήματος του DNA.

Όλη η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος της αντίδρασης γίνεται με γάντια, μέσα σε ειδικές θήκες με πάγο και τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Το μηχάνημα που χρησιμοποιείται για τις αντιδράσεις PCR είναι ο αυτόματος θερμικός κυκλοποιητής και στο εργαστήριο όπου πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Perkin-Elmer DNA Thermo Cycler. Σε όλα τα δείγματα προστέθηκε παραφινέλαιο σαν επικάλυψη για προστασία από την εξάτμιση, καθώς εκτίθενται σε υψηλές θερμοκρασίες. Η ανάλυση των προϊόντων PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση.





Σχήμα 1. Διαγραμματική απεικόνιση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης.



5.3 Ραδιενεργός αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Για τον έλεγχο της ετεροζυγωτίας των γυναικών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης με την χρήση ειδικών νουκλεοτιδίων σημασμένων με ραδιενεργό $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP (Izotopes-Institute of Isotopes-ΔΗΜΟΚΡΙΤΟΣ).

Πρωτόκολλο εκτέλεσης:

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 25 μl που περιείχε:

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
DNA	0.1 μgr	1 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1X	2.5 μl
Ιόντα μαγνησίου	1.5 mM	1.5 μl
dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.1 mM	2.5 μl
$[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP	1 μCi	0.2 μl
Εκκινητής (forward)	8 μmol	5 μl
Εκκινητής (reverse)	8 μmol	5 μl
Taq DNA Polymerase	1U/ μl	0.3 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 25 μl

Αλληλουχίες εκκινητών

Εκκινητής (forward)	5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'
Εκκινητής (reverse)	5'-GTCGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'

1. Προετοιμάζεται το Βασικό Μείγμα της αντίδρασης- όλα τα συστατικά πλην του DNA- σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο (eppendorf), προσθέτοντας τα αντιδραστήρια με τη σειρά που αναγράφονται. Οι ποσότητες των συστατικών που αναφέρονται είναι για τον τελικό όγκο αντίδρασης 25.0 μl . Κάθε φορά πολλαπλασιάζονται οι αντίστοιχοι όγκοι με το συνολικό αριθμό των εξεταζομένων δειγμάτων.
2. Η προσθήκη του ραδιενεργού $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP γίνεται στο τέλος, μέσα στον απαγωγό, παίρνοντας όλες τις απαραίτητες προφυλάξεις (χρήση διπλών γαντιών, εργαστηριακής



μπλούζας) και το μείγμα διατηρείται στον πάγο. Όλες οι εργασίες στον απαγωγό γίνονται με την χρήση ειδικού plexiglas που μειώνει την ακτινοβολία που εκπέμπεται από τα ραδιενεργά ισότοπα, ενώ ταυτόχρονα χρησιμοποιείται και μετρητής ραδιενέργειας.

3. Σε αποστειρωμένα μικροφυγοκεντρικά σωληνάρια των 0.5 ml μεταφέρεται 1.0 μl αντίστοιχου δείγματος DNA.
4. Προστίθενται 24μl από το μείγμα της αντίδρασης σε κάθε σωληνάριο και αναδεύονται καλά (μέσα στον απαγωγό).
5. Στα σωληνάρια προστίθενται τέλος 2-3 σταγόνες παραφινέλαιου, προς αποφυγή εξάτμισης και κλείνονται καλά.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στον θερμοκυκλοποιητή (Perkin Elmer), όπου τηρήθηκε το ακόλουθο πρόγραμμα.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 5 λεπτά

Αποδιάταξη (denaturing) : 95°C για 45 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 60 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 90 δευτερόλεπτα

Για 30 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

5.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα Πολυακρυλαμιδίου και Αυτοραδιογραφία

Τα σημασμένα με $\alpha^{32}\text{P}$ προϊόντα PCR αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και οπτικοποιούνται με αυτοραδιογραφία.

5.4.1 Παρασκευή αποδιατακτικού πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου 6% (w/v)

1. Για την παρασκευή του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιούνται γυάλινες πλάκες διαστάσεων (33x39)cm. Αφού καθαρισθούν σχολαστικά οι πλάκες με αιθανόλη, αποτίθεται η μεγάλη πλάκα σε καθαρή επιφάνεια, τοποθετούνται δεξιά, αριστερά και κάτω οι διαχωριστές (spacers) όμοιου πάχους 0.4mm και επάνω η μικρότερη πλάκα έτσι ώστε να είναι ισοεπίπεδη με την μεγαλύτερη.

2. Σταθεροποιούνται οι πλάκες με ειδικούς σφιγκτήρες και αυτοκόλλητη ταινία, αφού ευθυγραμμισθούν και είναι ισοεπίπεδες.

3. Τοποθετείται το ζεύγος πλακών στη συσκευή και καλύπτεται η δεξαμενή ηλεκτροφόρησης με ρυθμιστικό διάλυμα 1X TBE.

Για την ετοιμασία της πηκτής ακολουθούνται τα εξής στάδια:



4. Σε γυάλινο ποτήρι ζέσεως προστίθενται 42gr ουρία, 20 ml διαλύματος ακρυλαμιδίου /δισ, 10 ml διαλύματος TBE 10X και απεσταγμένο H₂O μέχρις όγκου 100 ml και ακολουθεί σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα ανάδευση μέχρι πλήρους διαλύσεως της ουρίας.
5. Το διάλυμα φιλτράρεται διαμέσου φίλτρου 0.45μ
6. Λίγο πριν μεταφερθεί το διάλυμα στις πλάκες ηλεκτροφόρησης προστίθενται 600μl APS (από διάλυμα 10% w/v που έχουμε προετοιμάσει ήδη) και 35 μl TEMED, για τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου.
7. Μετά από ανάδευση το διάλυμα μεταφέρεται προσεκτικά μεταξύ των πλακών ηλεκτροφόρησης. Η παροχή πρέπει να γίνει με αργό ρυθμό και ιδιαίτερη προσοχή ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων αέρα στο πήκτωμα.
8. Με προσοχή τοποθετείται το «κτένι» πάχους 0.4 mm για το σχηματισμό των θέσεων φόρτωσης. Αφήνεται το πήκτωμα να πολυμερισθεί για περίπου 60-80 λεπτά.
9. Μετά την πήξη, αφαιρείται προσεκτικά το κτένι και συνδέεται με το τροφοδοτικό παρέχοντας χαμηλή τάση και αφήνοντας το πήκτωμα να προθερμανθεί στους 48-50 °C πριν ακολουθήσει το «φόρτωμα» των δειγμάτων.

5.4.2 Προετοιμασία δειγμάτων

1. Είναι σημαντικό να έχουν βελτιστοποιηθεί τα προϊόντα της PCR, ώστε να μην υπάρξουν μη-ειδικά παραπροϊόντα που θα εμποδίσουν τη σωστή ανάλυση της ηλεκτροφόρησης.
2. Μεταφέρονται 4 μl από κάθε προϊόν PCR σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 1.5 ml και προστίθενται επίσης 4 μl διαλύματος φόρτωσης με φορμαμίδιο (Loading Buffer).
3. Ακολουθεί αποδιάταξη των προϊόντων της PCR στους 95 °C για 5 λεπτά και διατήρησή τους στον πάγο.

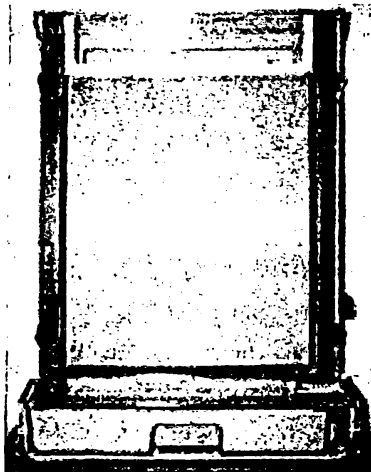
5.4.3 Ηλεκτροφόρηση- αυτοραδιογραφία

1. Αφού ξεπλυθούν οι θέσεις φόρτωσης με ρυθμιστικό διάλυμα, μεταφέρονται 4 μl από τα δείγματα στο πήκτωμα με ειδικά τριχοειδή ρύγχη.
2. Η ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων πραγματοποιείται στα 1000 περίπου Volt για ~3 ώρες σε κάθετη συσκευή ηλεκτροφόρησης (σχήμα 2- Life technologies, model S2).
3. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, αφαιρείται το σύστημα των πλακών από τη συσκευή, οι σφιγκτήρες και τα διαχωριστικά και διαχωρίζονται με πολύ προσοχή οι δύο πλάκες.
4. Τοποθετείται επάνω στο πήκτωμα ειδικό απορροφητικό χαρτόνι Whatmann στο οποίο προσκολλάται το πήκτωμα και ακολούθως καλύπτεται με μεμβράνη.



5. Στη συνέχεια μεταφέρεται και τοποθετείται σε ξηραντήρα (dryer) για 40 λεπτά (στους 80° C, υπό κενό).

6. Μέσα σε σκοτεινό θάλαμο, το πήκτωμα τοποθετείται μαζί με φιλμ (X-ray, Kodak) σε ειδική κασέτα «έκθεσης» και αφήνεται προς έκθεση σε καταψύκτη στους -70° C για 24-48 ώρες.



Σχήμα 2. Συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης (Life technologies, model S2).

Αφού συμπληρωθεί ο απαιτούμενος χρόνος έκθεσης, ακολουθεί εμφάνιση του φιλμ:

7. Αρχικά η κασέτα αφήνεται να ξεπαγώσει καλά σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 1-2 ώρες.
8. Σε σκοτεινό θάλαμο, αφαιρείται το φιλμ από την κασέτα και εμβαπτίζεται σε εμφανιστικό υγρό (X-Ray developer, Kodak-Paris, France) για 3.5 λεπτά.
9. Με το πέρας του χρόνου ξεπλένεται το φιλμ σε απεσταγμένο νερό και εμβαπτίζεται σε μονιμοποιητικό υγρό (X-Ray fixer, Kodak-Paris, France) για 7 λεπτά.
10. Τέλος, γίνεται και το τελευταίο ξέπλυμα σε νερό και εμφανίζεται το πρότυπο των χαρακτηριστικών ζωνών.

5.4.4 Χρησιμοποιούμενα διαλύματα

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ηλεκτροφόρηση στο αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου είναι τα εξής:

- Διάλυμα ακρυλαμιδίου/Δις 29:1



Acrylamide.....29 gr

N', N'-methylene-bis acrylamide.....1 gr

ddH₂O μέχρι τα100 ml

acrylamide: C₃H₅NO (MB 71.08) (Sigma, USA)

N', N'-methylene-bis acrylamide: C₇H₁₀N₂O₂ (MB 154.2) (Sigma, USA)

- **10X TBE, :**

Tris HCL.....108 gr

Boric acid.....55 gr

EDTA.....7.44 gr

ddH₂O μέχρι το.....1 lt

Trizma Base, minimum, 99.9% titration: C₄H₁₁NO₃ (MB121.14) (Sigma-Aldrich, Germany)

Boric acid : H₃BO₃ (MB 61.83) (Sigma-Aldrich, Germany)

EDTA: C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈.2H₂O (MB 372.24) (Merck, Germany)

- **TEMED** : N,N,N,N'-Tetra -methyl-ethylenediamine C₆H₁₆N₂ (MB 116.2) (Life technologies)
- **APS**: Ammonium Persulfate, (NH₄)₂SO₄) MB 228.2 (Sigma-Aldrich, Germany)
Το διάλυμα έχει περιεκτικότητας 10% (w/v), διατηρείται στους 4⁰C και είναι προτιμότερο κάθε φορά να χρησιμοποιείται φρέσκο.
- Formamide Gel Loading Buffer (4 ml dd formamide, 500 μl 10 x TBE, 100 μl xylene cyanol 5%, 250 μl bromophenol blue 2% , 150 μl H₂O)
- Ουρία: CH₄N₂O (MB 60.06) (Sigma-Aldrich, Germany)

5.5 Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X

Αφού με την αντίδραση PCR επιλέχθηκαν οι ετερόζυγες- πληροφοριακές γυναίκες για την (CAG)n πολυμορφική περιοχή, συνεχίζεται η διαδικασία με πέψη του γενωμικού DNA με το ευαίσθητο στη μεθυλίωση ένζυμο HpaII (BioLabs Inc, New England).



Κάθε φορά στα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε και DNA φυσιολογικού άρρενος ατόμου κατά την πέψη και στη συνέχεια στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Τα άρρενα άτομα φέρουν ένα μοναδικό χρωμόσωμα X το οποίο είναι ενεργό, επομένως μετά την πέψη και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δεν θα πρέπει να παρατηρηθεί ύπαρξη προϊόντος, εάν η διαδικασία της πέψης ολοκληρώθηκε σωστά. Το DNA άρρενος ατόμου (καρυότυπος 46,XY) λειτουργεί ως εσωτερικός μάρτυρας για την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων μας. Η παρουσία έστω και αχνού προϊόντος PCR για το άρρεν άτομο, υποδηλώνει ατελή ολοκλήρωση της πέψης.

5.5.1 Επώαση με το HpaII

Με δεδομένο ότι το DNA των θηλαστικών βρίσκεται μεθυλιωμένο κυρίως στις κυτοσίνες των CG δινουκλεοτιδίων, το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε σε εκείνα μόνο τα ένζυμα περιορισμού που περιέχουν CG αλληλουχίες στα σημεία δράσης τους. Δύο πολύ γνωστά τέτοια ένζυμα είναι τα HpaII και MspI, που αναγνωρίζουν την αλληλουχία CCGG (η οποία είναι παλίνδρομη, δηλ. διαβάζεται το ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις του DNA: 5'→3' και 3'→5', όπως και όλες οι αλληλουχίες που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού). Το MspI πέπτει όλες τις αλληλουχίες CCGG ανεξάρτητα από το εάν η δεύτερη κυτοσίνη είναι μεθυλιωμένη, σε αντίθεση με το HpaII που πέπτει μόνο τα μη μεθυλιωμένα τετραμερή CCGG. Αυτή η ιδιότητα το καθιστά πολύ σημαντικό εργαλείο για γρήγορη ανάλυση της μεθυλίωσης.

Συγκεκριμένα, το σημείο που αναγνωρίζει το HpaII στη νουκλεοτιδική αλληλουχία είναι το



Το πρωτόκολλο πέψης που ακολουθήθηκε είναι το ακόλουθο

DNA	1 μgr
Ρυθμιστικό διάλυμα (10mM Bis Tris Propane HCL, 10mM MgCL ₂ , 1mM DTT) pH=7.0	2 μl
HpaII (10,000U/ml)	2 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 20 μl	

Η πέψη πραγματοποιείται στους 37⁰C για ένα 24ωρο.



5.5.2 Ραδιενεργός αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά την πέψη

Με βάση το πρωτόκολλο των *Allen et al., 1992* συνεχίζεται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, όπου για κάθε δείγμα πραγματοποιούνται δύο αντιδράσεις: μία με DNA που δεν έχει υποστεί πέψη και η άλλη με DNA μετά από πέψη. Αναλυτικά, το πρωτόκολλο της PCR αναφέρεται σε τελικό όγκο αντίδρασης των 30 μ l και περιγράφεται στον ακόλουθο πίνακα.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
DNA	0.1 μ gr	2 μ l από το δ/μα πέψης/ 1 μ l από άπεπτο δ/μα DNA
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1 X	3 μ l
Ιόντα μαγνησίου	2.5 mM	3 μ l
dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	0.25 mM	3.75 μ l
[α - 32 P]-dCTP	1 μ Ci	0.2 μ l
Εκκινητής (forward)	8 pmol	4 μ l
Εκκινητής (reverse)	8 pmol	4 μ l
Taq DNA Polymerase	1U/ μ l	0.3 μ l
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 30 μ l

Αλληλουχίες εκκινητών

Εκκινητής (forward)	5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3'
Εκκινητής (reverse)	5'-GTCGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης (πραγματοποιήθηκε στον κυκλικό θερμοποιητή Perkin Elmer)

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 5 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing) : 95°C για 45 δευτερόλεπτα



Υβριδισμός (annealing) : 60 °C για 30 δευτερόλεπτα

Επιμήκυνση (extension) : 72 °C για 90 δευτερόλεπτα

Για 28 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση στους 72 °C για 10 λεπτά.

Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ακολούθησε η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης και αυτοδιογραφίας, όμοια με πριν. Η ερμηνεία και εκτίμηση των αποτελεσμάτων περιγράφονται σε επόμενο κεφάλαιο.

6. Μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X και της γονιδιοματικής αποτύπωσης του γονιδίου SNRPN στο DNA ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών

Η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X και της γονιδιοματικής αποτύπωσης του SNRPN γονιδίου σε ορχικό ιστό περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Απομόνωση DNA από δείγμα ορχικού ιστού
- Χημική επεξεργασία του DNA με NaHSO₃ (bisulfite modification)
- Εκλεκτική ενίσχυση του χημικά τροποποιημένου DNA με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και με εκκινητές κατάλληλους για τα γονίδια HUMARA και SNRPN αντίστοιχα.
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.

6.1 Δειγματοληψία ορχικού ιστού και φύλαξη αυτού

Ο πληθυσμός των ασθενών περιλαμβάνει 86 αζωοσπερμικούς άνδρες. Δώδεκα εξ'αυτών έχουν αποφρακτική αζωοσπερμία και 74 μη-αποφρακτική αζωοσπερμία (38 με το σύνδρομο Sertoli και 13 με το maturation arrest syndrome περιλαμβάνονται μεταξύ των μη-αποφρακτικών).

Τα δείγματα παραλαμβάνονταν από τα χειρουργεία και τοθετούνταν αμέσως για φύλαξη σε υγρό άζωτο μέχρι την επεξεργασία τους.



6.2 Απομόνωση DNA από ιστό

Για την απομόνωση DNA από τα δείγματα ορχικού ιστού, αρχικά γίνεται η μεταφορά μικρής ποσότητας από κάθε δείγμα σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 1.5ml όπου αναγράφεται προσεκτικά ο αντίστοιχος κωδικός του δείγματος. Η διαδικασία αυτή γίνεται σε στείρες συνθήκες. Στη συνέχεια επιστρέφεται η υπόλοιπη ποσότητα του ιστού στο υγρό άζωτο, ενώ ακολουθεί παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για να γίνει έπειτα όλη η διαδικασία της απομόνωσης DNA.

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιείται το QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), ακολουθώντας το πρωτόκολλο για ιστούς. Αρχικά αποσπώνται (μέσα στον απαγωγό και υπό αυστηρά στείρες συνθήκες) 25mg από κάθε δείγμα και εισάγονται σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 1.5ml. Προστίθενται 180 μl διαλύματος ATL buffer και 20 μl πρωτεϊνάσης (Proteinase K), αναδεύεται το μείγμα και τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 56°C μέχρι ο ιστός να διαλυτοποιηθεί πλήρως. Ανά τακτά διαστήματα ελέγχεται η πορεία της πέψης και τα δείγματα αναδεύονται. Συνήθως, η πλήρης διάλυση του ιστού εξασφαλίζεται σε 12-15 ώρες.

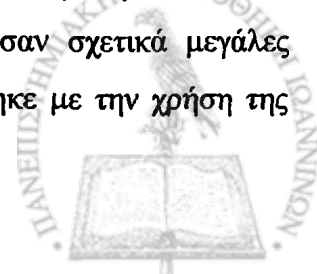
Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl AL Buffer, αναδεύονται και ακολουθεί επώαση στους 70°C για 10 λεπτά. Με το πέρας των 10 λεπτών η δράση της πρωτεϊνάσης τερματίζεται με προσθήκη 200 μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης, ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα, μεταφορά στην ειδική κολώνα καθαρισμού και φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό.

Στον ηθμό της κολώνας κατακρατείται το DNA, το οποίο όμως δεν είναι καθαρό. Γι'αυτό προστίθενται 500μl διαλύματος AW1 και φυγοκεντρούνται στις 8.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό, οπότε κατακρημνούνται οι πρωτεΐνες. Επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία για το διάλυμα AW2 στις 14.000 στροφές/λεπτό για 3 λεπτά.

Μετά και την τελευταία φυγοκέντρηση, στον ηθμό κατακρατείται το DNA. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl ddH₂O στον ηθμό και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8.000 στροφές/λεπτό για 1 λεπτό, οπότε το DNA εκλύεται. Για αύξηση της περιεκτικότητας του τελικού διαλύματος σε DNA το διάλυμα φυγοκεντρείται άλλη μία φορά.

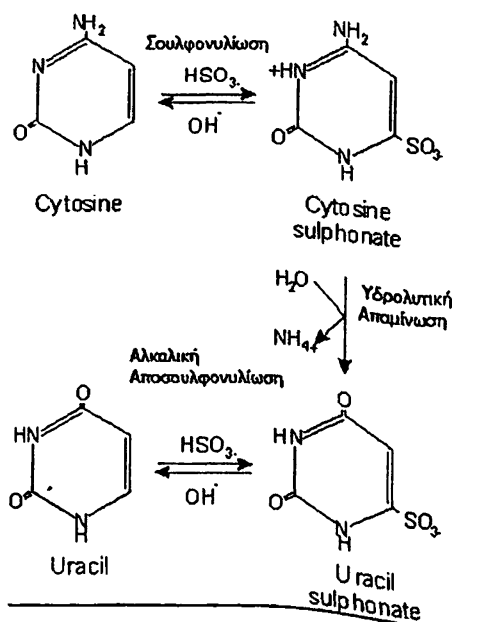
6.3 Χημική κατεργασία με NaHSO₃ (bisulfite modification)

Νωρίτερα από τη δεκαετία του '90 υπήρχαν πολύ λίγες τεχνικές για την εκτίμηση της κατάστασης μεθυλίωσης μεμονωμένων CpG νησίδων κατά μήκος του γενωμικού DNA. Επιπρόσθετα, οι περισσότερες χρησιμοποιούμενες τεχνικές απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA (της τάξης των 10μgr). Η δυσκολία αυτή ξεπεράστηκε με την χρήση της



μεθόδου της χημικής κατεργασίας με NaHSO_3 , μέθοδο την οποία συνέλαβε αρχικά ως ιδέα ο G.W.Grigg και υλοποίησε στη συνέχεια με τη βοήθεια του D.Millar (Frommer et al., 1992).

Με την τεχνική αυτή επιδρούμε με την χημική ουσία NaHSO_3 στις κυτοσίνες αποδιαταγμένου DNA. Οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες μετά από απαμινώσεις και σουλφονυλίωσεις (σχήμα 3,4), αντίθετα οι 5-μεθυλοκυτοσίνες (5-mC) παραμένουν ως έχουν. Στη συνέχεια το χημικά κατεργασμένο DNA πολλαπλασιάζεται με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), όπου χρησιμοποιούνται δύο ζεύγη ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών: ένα για την περίπτωση που η αλληλουχία που μελετάται είναι μεθυλιωμένη και ένα άλλο εάν



(Σχήμα 3)

Μη μεθυλιωμένο DNA:

ggg gcg gac cgc g

κατεργασία με
 NaHSO_3

ggg gug gau ugu g

Μεθυλιωμένο DNA:

ggg gc^mg gac c^mgc^m g

κατεργασία με
 NaHSO_3

ggg gc^mg gau c^mgc^m g

(Σχήμα 4)



η αλληλουχία δεν είναι μεθυλιωμένη.

Αναλυτικά τα βήματα της διαδικασίας είναι τα εξής, κατά τους Manning *et al.*, 2000:

- 1- Σε μικροφυγοκεντρικό σωλήνα των 1.5ml εισάγονται 2 μgr DNA και ο όγκος του διαλύματος συμπληρώνεται με ddH₂O μέχρι τα 50 μl .
- 2- Αποδιατάσσεται το DNA προσθέτοντας 5.5 μl φρέσκου NaOH 3M σε κάθε δείγμα και επωάζοντας στους 37⁰C για 15 λεπτά. Η αποδιάταξη ολοκληρώνεται στους 95⁰C για 3 λεπτά και γρήγορη μεταφορά έπειτα στον πάγο.
- 3- Προστίθενται 30 μl φρέσκου δ/τος υδροκινόνης 10mM (Hydroquinone, Sigma-Aldrich) και 520 μl δ/τος NaHSO₃ 3M με pH 5 (Natriumpyrosulfit Na₂S₂O₅/ NaHSO₃, Sigma-Aldrich) σε κάθε δείγμα. Αφού αναμιχθεί το κάθε δείγμα με την πιπέτα πάνω-κάτω, καλύπτεται με λίγες στγ παραφινέλαιο, ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύματος.
- 4- Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 55⁰C για 16 τουλάχιστον ώρες, φροντίζοντας τα δείγματα να μην είναι εκτεθειμένα σε φως.
- 5- Μετά την επώαση αφαιρείται προσεκτικά από κάθε δείγμα το παραφινέλαιο και ακολουθούνται οι οδηγίες του Wizard DNA Clean –Up System purification kit (Promega, Leiden, The Netherlands) για να γίνει ο καθαρισμός του DNA. Συγκεκριμένα, προστίθεται 1 ml από το διάλυμα Wizard DNA Clean –Up σε κάθε δείγμα και αναδεύεται προσεκτικά. Κατόπιν, ακολουθεί χρωματογραφία στήλης και το DNA τελικά κατακρατείται στον ηθμό. Γίνεται ξέπλυμα με διάλυμα ισο-προπανόλης 80% και το DNA εκλούεται τελικά σε 50 μl ddH₂O θερμοκρασίας 70⁰C.
- 6- Στο διάλυμα DNA που προκύπτει προστίθενται 5.5 μl NaOH 3M και επωάζεται στους 37⁰C για 15 λεπτά για να αποδιαταχθεί πλήρως.
- 7- Με το τέλος της επώασης προστίθενται 1 μl γλυκογόνου 10 mgr/ml (Invotrogen), 17 μl διαλύματος οξικού αμμωνίου 10M και 220 μl απόλυτης αιθυλικής αλκοόλης για τον καθαρισμό του DNA. Ακολουθεί μεταφορά στους -80⁰C και παραμονή για μερικές ώρες και στη συνέχεια πάλι ξέπλυμα με 500 μl διαλύματος 70% αιθυλικής αλκοόλης.
- 8- Μετά και την τελευταία φυγοκέντρωση αφαιρείται το υπερκείμενο διάλυμα και αφήνεται το λευκό ίζημα που είναι το DNA, να στεγνώσει εντελώς πριν προστεθούν τα 30 μl ddH₂O.
- 9- Το τελικό διάλυμα φυλάσσεται σε θερμοκρασία -80⁰C.



Φαίνεται πως η χημική κατεργασία με NaHSO_3 που περιγράφηκε πλεονεκτεί έναντι της χρήσης περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση, αφού αρχικά πληροφορεί για την κατάσταση μεθυλίωσης των CpG νησίδων ευρύτερα και όχι μόνο εκείνων που βρίσκονται εντός της περιοχής που αναγνωρίζεται από τα περιοριστικά ένζυμα.

Επιπλέον, η χρήση της μεθόδου των περιοριστικών ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση προϋποθέτει την πλήρη πέψη του μη μεθυλιωμένου γενωμικού DNA πράγμα όχι εύκολα εφικτό (Herman et al., 1996; Kubota et al., 1999).

6.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης μετά την χημική κατεργασία με NaHSO_3

6.4.1 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο του HUMARA

Πρώτη φορά αναφέρεται από την ομάδα των Allen και συνεργατών το 1992 (Allen et al., 1992) ότι το γονίδιο του υποδοχέα των ανδρογόνων (Human androgen Receptor locus) περιέχει μεθυλιωμένες τις περιοχές δράσης των HpaII και HhaI, εντός του πρώτου εξωνίου του αδρανοποιημένου χρωμοσώματος X.

Αργότερα, η ομάδα των Kubota και συνεργατών (Kubota et al., 1999) σχεδιάζει ειδικούς εκκινητές για τη μελέτη της μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X, με τη μέθοδο της χημικής κατεργασίας με NaHSO_3 αυτή την φορά και όχι με την χρήση περιοριστικών ενζύμων. Σχεδιάστηκαν δύο είδη εκκινητών, ένα για την περίπτωση των μεθυλιωμένων CpG νησίδων (εξώνιο 1) που δεν υπέστησαν χημική μετατροπή και ένα ακόμη για τις μη-μεθυλιωμένες CpG νησίδες που υπέστησαν τη μετατροπή.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το ζευγάρι των εκκινητών μόνο για την περίπτωση των μεθυλιωμένων CpG νησίδων, αφού μας ενδιαφέρει εκείνη η φάση της σπερματογένεσης κατά την οποία αδρανοποιείται το χρωμόσωμα X (στάδιο παχυταινίας).

Το πρωτόκολλο εκτέλεσης που ακολουθήθηκε είναι το παρακάτω:

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 30 μl που περιείχε:

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
DNA χημικά κατεργασμένο	~30ngr	5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1X	3 μl
Ιόντα μαγνησίου	25 mM	2.4 μl



dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTPP)	2 mM	2 μl
Εκκινητής μεθυλιωμένος(forward)	10 pmole/μl	2 μl
Εκκινητής μεθυλιωμένος(reverse)	10 pmole/μl	2 μl
Taq DNA Polymerase	1U/ μl	0.3 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 30 μl

Αλληλουχίες εκκινητών

Εκκινητής (forward)	5'- GCGAGCGTAGTATTTTTTCGGC -3'
Εκκινητής (reverse)	5'- AACCAAATAACCTATAAAACCTCTACG -3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης (πραγματοποιήθηκε στον κυκλικό θερμοποιητή Perkin Elmer)

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 58 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 30 δευτερόλεπτα

Για 35 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 λεπτά.

6.4.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο SNRPN

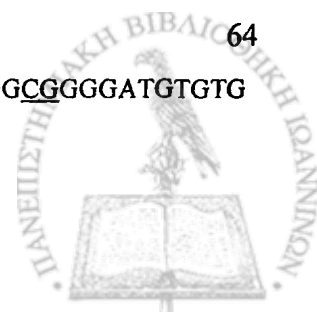
Το SNRPN γονίδιο υπόκειται στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης (genomic imprinting), με αποτέλεσμα το πατρικής και μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο να διαφέρουν στις μεθυλιωμένες CpG νησίδες. Αναλυτικότερα: στο μητρικό αλληλόμορφο οι κυτοσίνες είναι μεθυλιωμένες στις CpG νησίδες και επομένως παραμένουν ως έχουν κατά την χημική κατεργασία με NaHSO₃, ενώ στο πατρικό αλληλόμορφο δεν παρατηρείται μεθυλίωση των κυτοσινών και αυτές μετατρέπονται σε ουρακίλες. Επιπλέον, δεν παρατηρείται μεθυλίωση των κυτοσινών που βρίσκονται εκτός των CpG νησίδων και μετατρέπονται και αυτές σε ουρακίλες.

Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ειδικά έτσι ώστε να πλαισιώνουν και το μητρικό-μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, αλλά και το πατρικό-μη μεθυλιωμένο (σχήμα 5). Οι τέσσερις εκκινητές βρίσκονται στο εξώνιο 1 του γονιδίου της ριβονουκλεοπρωτεΐνης (SNRPN).

1

CAACAAGCACGCCTGCGCGGCCGCGAGAGGCAGGCTGGCGCGCATGCTCAGGCGGGGATGTGTG

----- 1-----> ----- 3----->



CGAAGCCTGCCGCTGCTGCAGCGAGTCTGGCGCAGAGTGGAGCGGCCGCGGAGATGCCTGACG

←----- 4 -----

CATCTGTCTGAGGAGCGGTCACTGACGCGATGGAGCGGGCAAGGTC

←----- 2 -----

Σχήμα 5. Οι θέσεις των εκκινήτων είναι: βέλη 1 και 2 για το μητρικό αλληλόμορφο και βέλη 3 και 4 για το πατρικό. Οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες που βρίσκονται εντός των CpG νησίδων στο πατρικό αλληλόμορφο είναι υπογεγραμμένες.

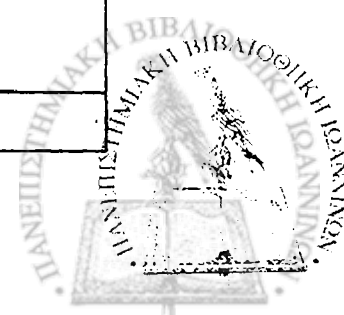
Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίζεται σε αυτό που προτάθηκε από την ομάδα της Manning και συνεργατών (Manning *et al.*, 2000).

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 30 μl που περιείχε:

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
DNA χημικά κετεργασμένο	~30ngr	5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1X	3 μl
Ιόντα μαγνησίου	25 mM	2.4 μl
dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTPP)	200 μM	3 μl
Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη περιοχή (forward)/ Εκκινητής για τη μη-μεθυλιωμένη περιοχή (forward)	10 pmole/μl	3 μl
Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη περιοχή(reverse)/ Εκκινητής για τη μη-μεθυλιωμένη περιοχή (reverse)	10 pmole/μl	3 μl
Taq DNA Polymerase	1U/ μl	0.3 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 30 μl

Αλληλουχίες εκκινήτων για τη μεθυλιωμένη περιοχή:

Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη περιοχή (forward)	5'- TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTC_-3'
Εκκινητής για τη μεθυλιωμένη	5'- AACCTTACCCGCTCCATCGCG_-3'



περιοχή(reverse)	
------------------	--

Αλληλουχίες εκκινητών για τη μη μεθυλιωμένη περιοχή:

Εκκινητής για τη μη-μεθυλιωμένη περιοχή (forward)	5' - GTAGGTTGGTGTGTATGTTTAGGT -3'
Εκκινητής για τη μη-μεθυλιωμένη περιοχή(reverse)	5' - ACATCAAACATCTCCAACAACCA -3'

Πρόγραμμα κυκλοποίησης (πραγματοποιήθηκε στον κυκλικό θερμοποιητή Perkin Elmer)

Αρχική αποδιάταξη: 95°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 30 δευτερόλεπτα

Υβριδισμός (annealing) : 62 °C για 30 δευτερόλεπτα

Σύνθεση (extension) : 72 °C για 30 δευτερόλεπτα

Για 35 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10 λεπτά.

6.5 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η μέθοδος αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό τμημάτων DNA σύμφωνα με το μέγεθός τους. Η πηκτή αγαρόζης είναι εμπλουτισμένη με 0,5 mg/ml βρωμιούχου αιθιδίου. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε διάλυμα 1X TBE (89mM Tris-HCL, 89mM Boric acid, 2.5mM EDTA pH=8). Η ταχύτητα κίνησης και επομένως η απόσταση που διανύουν μέσα στην πηκτή αγαρόζης εξαρτάται από:

- Το μοριακό βάρος του DNA (αντιστρόφως ανάλογη)
- Τη διαμόρφωση του DNA (κυκλικό, γραμμικό)
- Τη συγκέντρωση της αγαρόζης (μικρή συγκέντρωση της αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό μεγάλων τμημάτων DNA, ενώ μεγαλύτερη συγκέντρωση χρησιμοποιείται για τα μικρά τμήματα. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε πηκτή αγαρόζης 2 και 2.5%).
- Τη διαφορά τάσης του ηλεκτροφορητικού πεδίου. Σε χαμηλή τάση ρεύματος (Volt) η κινητικότητα του γραμμικού DNA είναι ανάλογη της τάσης και η δυνατότητα διαχωρισμού ελαττώνεται όταν αυξάνεται η τάση του ρεύματος.



Η συσκευή ηλεκτροφόρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι η Electrophoresis Power Supply PS 3002 (GIBCO BRL, USA). Οι ηλεκτροφορητικές ζώνες των PCR προϊόντων φωτογραφίζονται σε υπεριώδες φως στο τέλος της ηλεκτροφόρησης και ακολουθεί ανάλυση αυτών. Το βρωμιούχο αιθίδιο όταν είναι δεσμευμένο σε DNA δίνει έντονο πορτοκαλί χρώμα φθορισμού.

Στην περίπτωση των προϊόντων των αλυσιδωτών αντιδράσεων πολυμεράσης που πραγματοποιήσαμε, τα αναμενόμενα μεγέθη είναι 186bp εάν υποκινητής του γονιδίου του HUMARA είναι μεθυλιωμένος και 174bp και 100bp κατά τη μελέτη του SNRPN γονιδίου, για το μητρικό και πατρικό αλληλόμορφο αντίστοιχα. Υπενθυμίζεται ότι για όλα τα πειράματά μας χρησιμοποιήθηκε ανθρώπινο DNA ολικά μεθυλιωμένο που διατίθεται στο εμπόριο (Intergen Company, Purchase, NY) ως θετικός μάρτυρας και ότι όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

7. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε παιδιά μετά από προεμφυτευτική διάγνωση

Για τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια μετά από προεμφυτευτική γενετική διάγνωση ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με νωρίτερα, μόνο που σε αυτή την περίπτωση η απομόνωση του DNA έχει ήδη γίνει από το εργαστήριο που μας προμήθευσε τα δείγματα με το kit QIAamp DNA Mini kit της Qiagen.

Τα βήματα αναλυτικά που ακολουθήθηκαν είναι τα εξής:

- Έλεγχος της ετεροζυγωτίας για την επαναλαμβανόμενη τρινουκλεοτιδική πολυμορφική περιοχή (CAG)_n που βρίσκεται στο πρώτο εξόνιο του γονιδίου του Υποδοχέα των Ανδρογόνων (Human Androgen Receptor Locus-AR) με τη μέθοδο της ραδιενεργού αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).
- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου και έκθεση σε αυτοραδιογραφικό φιλμ.
- Επιλογή των ετερόζυγων –πληροφοριακών γυναικών και πέψη του γενωμικού τους DNA με ένζυμο ευαίσθητο στη μεθυλίωση.
- Εκλεκτική ενίσχυση του γενωμικού DNA που περιέχει την AR περιοχή που μας ενδιαφέρει με τη μέθοδο της ραδιενεργού αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR).



- Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της αντίδρασης PCR σε αποδιατακτικό πήκτωμα ακρυλαμιδίου και έκθεση σε αυτοραδιογραφικό φιλμ.

Ακολουθήθηκαν όλα τα βήματα που περιγράψαμε και κατά τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στις γυναίκες, με τον ίδιο ακριβώς τρόπο.

8. Σύνθεση ανιχνευτών κατά μήκος του χρωμοσώματος X

Το ενδιαφέρον μας εστιάστηκε στη σύνθεση ανιχνευτών που να βρίσκονται κατά μήκος του χρωμοσώματος X. Απώτερος σκοπός η εύρεση ή ο αποκλεισμός αλληλουχιών των οποίων ο διπλασιασμός ή η έλλειψη σχετίζονται με μη τυχαία αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X. Σχεδιάστηκαν DNA ανιχνευτές, οι οποίοι να είναι μοναδικοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, να μην περιλαμβάνουν δηλαδή επαναλαμβανόμενα πολυμορφικά μοτίβα και να έχουν μέγεθος από 100 έως 600 bp. Από τους ανιχνευτές αυτούς οι 34 ειδικά αφορούν στην περιοχή του XIST. Οι υπόλοιποι βρίσκονται κατά μήκος του χρωμοσώματος X.

Η διαδικασία που ακολουθήσαμε είναι η εξής:

- πολλαπλασιασμός των DNA ανιχνευτών με τη μέθοδο PCR και έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης
- κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών
- πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο PCR των κλώνων που επιλέχθησαν χρησιμοποιώντας κοινό ζεύγος εκκινητών

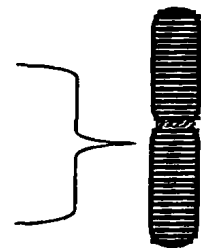
Το σχήμα που ακολουθεί αναπαριστά τα βήματα που περιλαμβάνει ευρύτερα το σχέδιο μελέτης. Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής υλοποιήθηκαν τα βήματα 2, 3 και 4:

Σχεδιάγραμμα της πειραματικής διαδικασίας

Ανάπτυξη ειδικών DNA-ανιχνευτών

1. Σχεδιασμός DNA-ανιχνευτών

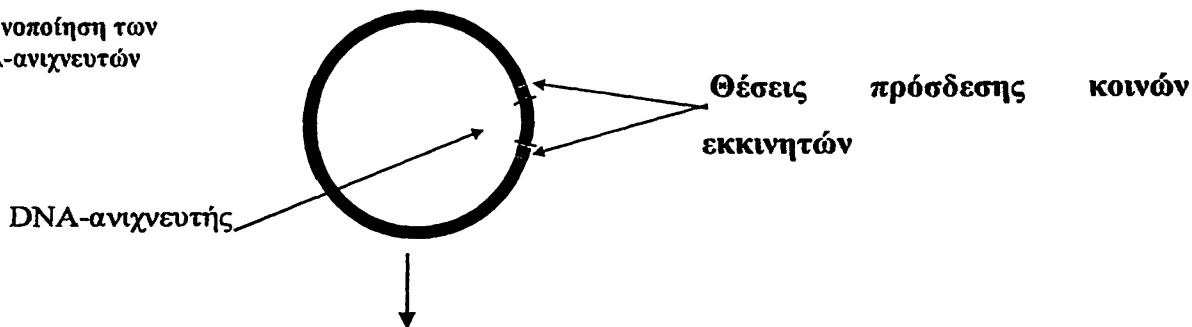
Χαρακτηριστικά κάθε ανιχνευτή: -μοναδικός στο ανθρώπινο γονιδίωμα
-μη πολυμορφικός
-με ακρίβεια χαρτογραφημένος
-μέγεθος: 100-600 βάσεις



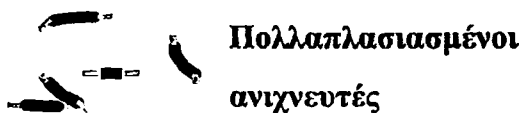
2. Πολλαπλασιασμός των DNA-ανιχνευτών με PCR και έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης



3. Κλωνοποίηση των DNA-ανιχνευτών



4. Πολλαπλασιασμός με PCR των κλώνων που επιλέχθηκαν χρησιμοποιώντας ένα κοινό ζεύγος εκκινητών



5. Ομαδοποίηση των DNA-ανιχνευτών

Μίγματα των ανιχνευτών από τα 24 χρωμοσώματα UUUUU

Υπό ανάλυση DNA

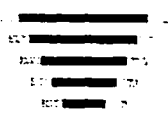
Υβριδισμός



Ανιχνευτές ενός μίγματος πλαισιωμένοι από θέσεις πρόσδεσης κοινών εκκινητών

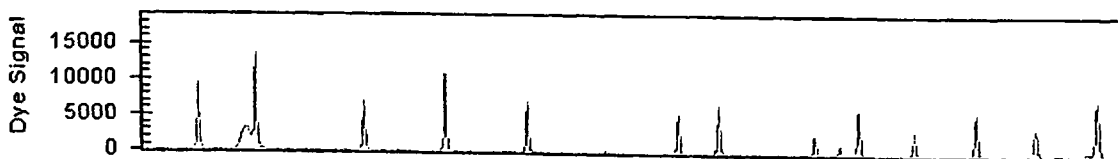
6. Χρήση των ανιχνευτών με τη μέθοδο MAPH

Πολλαπλασιασμός των υβριδισμένων ανιχνευτών χρησιμοποιώντας ένα κοινό ζεύγος εκκινητών



6. Χρήση των ανιχνευτών με τη μέθοδο MAPH

Ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός και ποσοτική ανάλυση των ανιχνευτών του μίγματος



Τα βήματα 5 και 6 προβλέπεται να πραγματοποιηθούν μελλοντικά για τους ανιχνευτές που κατασκευάσαμε, όμως ήδη έχουν εφαρμοσθεί για ανιχνευτές αυτοσωμάτων σε συνεργασία με εργαστήρια του εξωτερικού.

Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή των βημάτων.

8.1 Πολλαπλασιασμός των ανιχνευτών

Για τον πολλαπλασιασμό των ανιχνευτών σχεδιάστηκαν, με την χρήση του ίδιου λογισμικού, κατάλληλοι εκκινητές για τον καθένα ξεχωριστά και στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκαν με τη μέθοδο της PCR.

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 20 μl που περιείχε:

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
Γονιδιωματικό DNA	~20-100 ng	0.5 μl
Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1X	2 μl
dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTPP)	50 mM	0.5 μl
Εκκινητής (forward)	10 μM	2 μl
Εκκινητής (reverse)	10 μM	2 μl
Ampli Taq DNA Polymerase/Promega	5U/ μl	0.3 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 20 μl

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κυκλικό θερμοποιητή PTC-100 της MJ.Research, INC. Κάθε ζεύγος εκκινητών είναι ειδικό για την ανίχνευση συγκεκριμένης αλληλουχίας του DNA.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 92°C για 2 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing) : 67°C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension) : 72°C 1 λεπτό

Για 25 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση: 72°C για 10 λεπτά.



Τα προϊόντα ελέγχθησαν σε πηκτή αгарόζης 2% στα 170Volt για περίπου 25min. Κάθε φορά αναμιγνύαμε 5 μl από το προϊόν της PCR με 4 μl χρωστικής και 2 μl διαλύματος TBE 1X.

8.2 Κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών

Για την κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρείας Invitrogen (Invitrogen Corp.). Το σύστημα κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι το TOPO TA cloning^R, το οποίο προσφέρει μία πολύ αποδοτική και γρήγορη στρατηγική κλωνοποίησης για την άμεση ενσωμάτωση προϊόντων της PCR σε πλασμιδιακούς φορείς.

Το σύστημα αυτό έχει επιλεγεί λόγω του ότι:

- 1) Είναι ιδανικό για την κλωνοποίηση προϊόντων PCR μεγέθους 100 έως 1000 bp.
- 2) Ο φορέας κλωνοποίησης περιέχει θέσεις πρόσδεσης κοινών εκκινητών (universal primers), πλησίον του σημείου κλωνοποίησης και έτσι καθίσταται δυνατός ο ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός των κλωνοποιημένων ανιχνευτών όπως απαιτεί η μέθοδος MAPH (multiplex amplifiable probe hybridization).

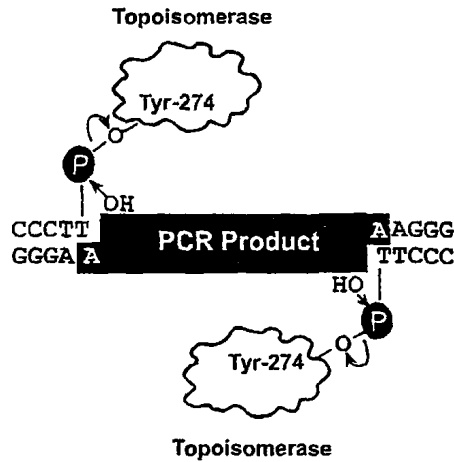
Το σύστημα κλωνοποίησης TOPO TA Cloning^R (Invitrogen Corp.) περιλαμβάνει:

- Αντιδραστήρια TOPO TA Cloning^R τα οποία φυλάσσονται στους -20 °C και περιλαμβάνουν: πλασμιδιακό φορέα pCR^R 2.1-TOPO^R, διάλυμα άλατος (1.2M NaCl, 0.06 MgCl₂) και απεσταγμένο H₂O
- One Shot^R Chemically Competent cells τα οποία φυλάσσονται στους -80 °C και περιλαμβάνουν: TOP10 στέλεχος *E. coli* και θρεπτικό υλικό (SOC Medium).

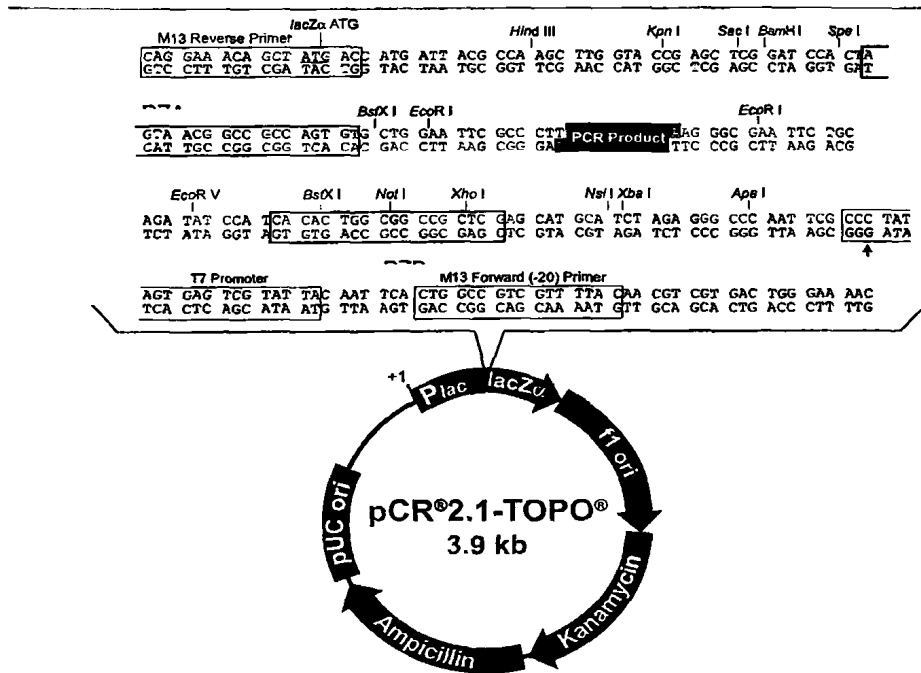
Ο πλασμιδιακός φορέας (pCR^R 2.1-TOPO^R) προμηθεύεται σε γραμμική μορφή με μονόκλωνα 3' άκρα από θυμίνες (T) και με την τοποϊσομεράση I ομοιοπολικά συνδεδεμένη με αυτόν, γι' αυτό και ο φορέας αναφέρεται ως "ενεργοποιημένος".

Η Taq πολυμεράση έχει μια ανεξάρτητη του εκμαγείου δράση τρανσφεράσης με την οποία προσθέτει αδενίνες στα 3' άκρα των προϊόντων της PCR κατά το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης. Έτσι οι ανιχνευτές μπορούν να συνδεθούν με τους φορείς εφόσον αυτοί προμηθεύονται με μονόκλωνα συμπληρωματικά 3' άκρα από θυμίνες





Σχήμα 6. Ο πλασμιδιακός φορέας με τις θυμίνες (T) στα 3' άκρα του, το προϊόν της PCR με τις αδενίνες (A) στα 3' άκρα του και η τοποϊσομεράση I, η οποία παίζει ρόλο λιγάσης.



Σχήμα 7. Χάρτης του πλασμιδιακού φορέα pCR^R 2.1-TOPO^R. Περιλαμβάνει: θέση έναρξης της αντιγραφής (ακολουθία ori), περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (Polylinker cloning site), γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και καναμυσίνη, Γονίδιο LacZα και θέσεις πρόσδεσης των εκκνητών PZA και PZB (TOPO TA Cloning^R, Version P, Instruction Manual)

Περιοχή πολλαπλής κλωνοποίησης (Polylinker cloning site): Είναι μια ακολουθία νουκλεοτιδίων που κατασκευάστηκε με τέτοιο τρόπο ώστε να περιέχει θέσεις αναγνώρισης για μια ποικιλία ενζύμων περιορισμού



Γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη: Τα κύτταρα *E.coli* που περιέχουν τον πλασμιδιακό φορέα όταν επιστρωθούν σε θρεπτικό που περιέχει αμπικιλίνη θα επιβιώσουν επειδή αυτά φέρουν και το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό. Το ίδιο ισχύει και για το γονίδιο ανθεκτικότητας στην καναμυσίνη

Γονίδιο LacZa: τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης το οποίο κωδικοποιεί για τα πρώτα 146 αμινοξέα του ενζύμου της β-γαλακτοσιδάσης (το τμήμα του ενζύμου που εκφράζεται ονομάζεται α-fragment και είναι το αμινοτελικό άκρο του ενζύμου). Το κύτταρο-ξενιστής εκφράζει το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Το τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης που εκφράζεται από τον φορέα αλλά και το τμήμα που εκφράζεται από το κύτταρο-ξενιστή δεν είναι ενεργά από μόνα τους, όταν όμως συνδεθούν μεταξύ τους σχηματίζουν την ενζυμικά ενεργή β-γαλακτοσιδάση. Η β-γαλακτοσιδάση όταν αντιδρά ενζυμικά με το υπόστρωμα X-Gal οδηγεί στο σχηματισμό ενός προϊόντος που έχει χρώμα μπλέ. Έτσι στην παρουσία του X-Gal (QIAGEN) τα κύτταρα στα οποία εκφράζεται το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (LacZ) εμφανίζουν μπλέ αποικίες, ενώ σε αυτά που δεν εκφράζεται εμφανίζουν άσπρες αποικίες. Επειδή η κλωνοποίηση του επιθυμητού τμήματος του DNA διακόπτει την ακολουθία που κωδικοποιεί για το α-fragment της β-γαλακτοσιδάσης με αποτέλεσμα αυτό να μην εκφράζεται, παρεμποδίζεται ο σχηματισμός ενεργής β-γαλακτοσιδάσης. Επομένως, στα κύτταρα με τον ανασυνδυασμένο φορέα επειδή η β-γαλακτοσιδάση δεν εκφράζεται αυτά δεν διασπών το X-Gal κι έτσι δεν χρωματίζονται. Αντίθετα τα κύτταρα που περιέχουν τον μη ανασυνδυασμένο φορέα διασπών το X-Gal και χρωματίζονται μπλέ.

Με τον τρόπο αυτό γίνεται η διάκριση ανάμεσα στις αποικίες με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και σ'αυτές με το μη ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.

Αναλυτικά τα βήματα για την κλωνοποίηση των ανιχνευτών είναι:

- 1) Σωληνάρια με κύτταρα *E.coli* αφέθηκαν να ξεπαγώσουν σε πάγο
- 2) Ετοιμάστηκαν σωλήνες, ανάλογα με τον αριθμό των ανιχνευτών για κλωνοποίηση ανά περίπτωση, κάθε ένας από τους οποίους περιείχε τα ακόλουθα αντιδραστήρια: 1.0μl ρυθμιστικό διάλυμα (100mM Tris-HCL, pH8.3, 500mM KCL, 25mM MgCL₂, 0.01% gelatin), 2.0μl ddH₂O, 1.0μl φορέα κλωνοποίησης (10ngr/μl πλασμιδίου σε:50% glycerol, 50mM Tris-HCL, pH7.4, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1% Triton X-100, 100μgr/ml BSA, phenol red) και 2.0 μl προϊόν PCR .
- 3) Μετά την προετοιμασία του μείγματος κλωνοποίησης, το δείγμα αναδεύτηκε ελαφρά και οι σωλήνες αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 5-30 λεπτά ώστε να γίνει η αντίδραση



της κλωνοποίησης (όσο μεγαλύτερο το χρονικό διάστημα που αφήνεται το μείγμα ν'αντιδράσει τόσο μεγαλύτερη η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης).

- 4) Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε πάγο για να τερματιστεί η αντίδραση
- 5) Μεταφέρθηκαν 2 μl από κάθε σωλήνα που περιείχε το μίγμα κλωνοποίησης στον αντίστοιχο σωλήνα με τα *E.coli* και αφέθηκαν για 5-30 λεπτά σε πάγο
- 6) Ακολούθησε θερμικό-σόκ των κυττάρων *E.coli* στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα και αμέσως μετά τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πάγο
- 7) Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 250 μl θρεπτικού ζωμού (SOC medium)
- 8) Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα σε θερμοκρασία 37 °C για 1 ώρα περίπου, ούτως ώστε να καλλιεργηθούν τα κύτταρα
- 9) Στο διάστημα αυτό, σε τρυβλία Petri που είχαν προθερμανθεί και τα οποία περιείχαν θρεπτικό άγαρ και αμπικιλίνη, έγινε επίστρωση σε κάθε ένα με 20 μl χρωμογόνου υποστρώματος X-Gal και καταγράφηκαν οι αριθμοί των ανιχνευτών.
- 10) Σε κάθε τρυβλίο Petri επιστρώθηκαν 30 μl από τον αντίστοιχο σωλήνα με τα μετασχηματισμένα κύτταρα *E.coli* και έγινε επώαση στους 37 °C για όλη τη νύχτα.
- 11) Επιλέχθηκαν από κάθε τρυβλίο μερικές άσπρες αποικίες οι οποίες μεταφέρθηκαν σε τρυβλίο μικροτιτλοδότησης (96-well plates) στο οποίο είχε προηγουμένως τοποθετηθεί θρεπτικό άγαρ (180 μl) και γλυκερόλη (20 μl) (HMFМ). Όλη η διαδικασία πραγματοποιείται μέσα στον απαγωγό, παρουσία αναμμένου λύχνου.
- 12) Ακολούθησε καλλιέργεια των κλώνων στους 37 °C για όλη τη νύχτα και στη συνέχεια κρυοσυντήρηση στους -80 °C (ώστε να μπορέσουμε να τους διατηρήσουμε για μεγάλα χρονικά διαστήματα)

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί ότι σε κάθε κλώνο είχε ενσωματωθεί ο επιθυμητός ανιχνευτής, όλοι οι κλώνοι που επιλέχθηκαν πολλαπλασιάστηκαν απ'ευθείας από τις καλλιέργειες με την μέθοδο της PCR και ακολούθησε ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης. Κατά την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα ζεύγος εκκινητών, PZA και PZB, αφού μετά την διαδικασία της κλωνοποίησης οι ανιχνευτές είχαν αποκτήσει κοινές θέσεις πρόσδεσης εκκινητών.

Η αντίδραση PCR έγινε σε τελικό όγκο 20 μl που περιείχε:

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις αντίδρασης	Χρησιμοποιούμενες Ποσότητες
Βακτηριακή καλλιέργεια	~20-100 ng	0.5-1.0 μl



Ρυθμιστικό διάλυμα (500mM KCL, 200mM Tris-HCL, pH=8)	1X	2 μl
dNTP's (ισομοριακό μείγμα dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	50 mM	0.5 μl
Εκκινητής (forward)	10 μM	1 μl
Εκκινητής (reverse)	10 μM	1 μl
Taq DNA Polymerase	5U/ μl	0.3 μl
Δις-απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό		Μέχρι τελικού όγκου 20 μl

Αλληλουχίες εκκινητών

Εκκινητής PZA (forward)	5'-AGTAACGGCCGCCAGTGT-3'
Εκκινητής PZB (reverse)	5'-CGAGCGGCCGCCAGTGTG-3'

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον κυκλικό θερμοποιητή PTC-100 της MJ.Research, INC.

Πρόγραμμα κυκλοποίησης

Αρχική αποδιάταξη: 94°C για 10 λεπτά

Ακολουθεί: Αποδιάταξη (denaturing) : 94°C για 1 λεπτό

Υβριδισμός (annealing) : 55 °C για 1 λεπτό

Σύνθεση (extension) : 72 °C 1 λεπτό

Για 25 κύκλους και

Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 30 λεπτά.

Τα προϊόντα ελέγχθηκαν σε πηκτική αгарόζης 2% στα 170 Volt για 25min.

Υπενθυμίζεται ότι PZA και PZB επιλέγησαν ως κοινά ενακτήρια μόρια (universal primers). Αυτά αναγνωρίζουν αλληλουχίες που υπάρχουν κοντά στην περιοχή ενσωμάτωσης του «ξένου» DNA στον φορέα κλωνοποίησης.

Χρησιμοποιούμενα διαλύματα:

• **HMFM (10X)**

36mM K₂HP

13mM KH₂P

20mM NaCitruse

10mM MgSO₄



44% glycerol

- **LB χωρίς άγαρ**

Bactor-Try (τρουπτόνη): 10gr (Internationa diagnostics Group-LAB-M)

Yeast: 5gr(Internationa diagnostics Group-LAB-M)

NaCl: 10gr (Sigma-Aldrich)

σε 1lt H₂O

- **SOC Medium**

2% Tryptone

0.5% Yeast extract

10mM NaCL

2.5mM KCL

10mM MgCL₂

10mM MgSO₄

20mM glucose



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

9. Αποτελέσματα κυτταρογενετικών εξετάσεων

9.1 Ανάλυση καρυότυπου σε ζευγάρια με καθέξιν αποβολές

Κυτταρογενετική εξέταση για τον έλεγχο του καρυότυπου με τη διαδικασία που περιγράψαμε προηγούμενα πραγματοποιήθηκε σε 74 ζευγάρια (άνδρες-γυναίκες). Τελικά σε όλα τα άτομα βρέθηκε φυσιολογικός καρυότυπος, ενώ πολύ συχνοί είναι και οι πολυμορφισμοί των χρωμοσωμάτων είτε σε δορυφορικές περιοχές των ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων είτε στην ετεροχρωματινική περιοχή του χρωμοσώματος 9.

Αναλυτικά, για τις γυναίκες-συζύγους βρέθηκε ότι όλες έχουν φυσιολογικό καρυότυπο 46,XX, εκτός από ορισμένες που είτε φέρουν μεγάλους δορυφόρους στα ακροκεντρικά χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21 και 22, είτε φέρουν αναστροφή στο χρωμόσωμα 9 είτε τέλος, έχουν μεγάλη ετεροχρωματική περιοχή στο χρωμόσωμα 9.

Ο πίνακας 1 που ακολουθεί περιέχει τα αποτελέσματα της ανάλυσης καρυότυπου που πραγματοποιήθηκε στις συζύγους.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα καρυοτυπικής ανάλυσης γυναικών με καθέξιν αποβολές

Καρυότυπος	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικός καρυότυπος 46,XX ^a	74
Μεγάλοι δορυφόροι στα χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21 και 22 ^b	10
Μεγάλη ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 (9qh+)	2
Αναστροφή στην ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 [46,XX,inv(9)(p11q13)]	2
Μεγάλη ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 και μεγάλοι δορυφόροι στο χρωμ.15 (46,XX, 15ps, 9qh+)	1
Μεγάλη ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 και μεγάλοι δορυφόροι στο χρωμ.14 (46,XX, 14ps, 9qh+)	1
Συνολικός αριθμός γυναικών	74

^a Και οι 6 γυναίκες που βρέθηκαν στη συνέχεια με τη μοριακή ανάλυση ότι έχουν ακραία εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμ.Χ, έχουν φυσιολογικό καρυότυπο 46,XX



^β Κάποιες από τις 10 γυναίκες με μεγάλους δορυφόρους στα ακροκεντρικά χρωμοσώματα παρουσιάζουν τον πολυμορφισμό αυτό σε ένα μόνο χρωμόσωμα ή και σε δύο ταυτόχρονα, πχ 46,XX, 15ps, 46,XX, 13ps, 21ps

Για τους 74 άνδρες συζύγους πραγματοποιήθηκε αντίστοιχη κυτταρογενετική ανάλυση. Όλοι παρουσιάζουν φυσιολογικό καρυότυπο 46,XY, πλην κάποιων πολυμορφισμών στις δορυφορικές περιοχές ακροκεντρικών χρωμοσωμάτων, στην ετεροχρωματινική περιοχή του 9 και αναστροφή στο χρωμόσωμα Y.

Ο πίνακας 2 που ακολουθεί περιέχει τα αποτελέσματα της ανάλυσης καρυότυπου των συζύγων.

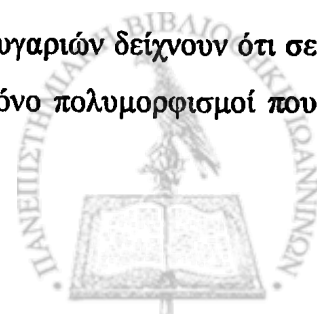
Πίνακας 2. Αποτελέσματα καρυοτυπικής ανάλυσης συζύγων.

Καρυότυπος	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικός καρυότυπος 46,XY ^α	74
Μεγάλοι δορυφόροι στο χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21 και 22 ^β	14
Μεγάλη ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 (46,XY,9qh+)	5
Αναστροφή στην ετεροχρωματινική περιοχή στο χρωμ.9 [46,XY,inv(9)(p11q13)]	2
Αναστροφή στο χρωμόσωμα Y	2
Δορυφόροι μεγάλοι στο χρωμ.21 και μεγάλη ετεροχρ. στο 9 (46,XY,21ps, 9qh+)	1
Συνολικός αριθμός ανδρών	74

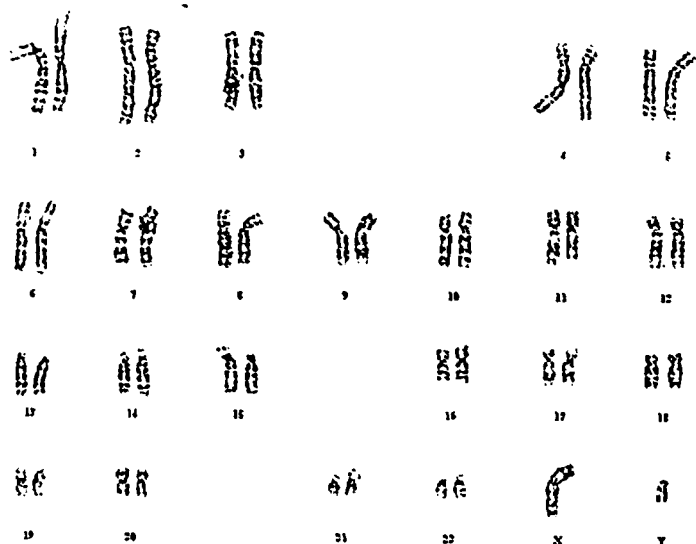
^α Φυσιολογικό καρυότυπο 46,XY έχουν όλοι οι σύζυγοι των 6 γυναικών με ακραία εκλεκτική αδρανοποίηση του χρωμ.X.

^β Κάποιοι από τους 14 άνδρες με μεγάλους δορυφόρους στα ακροκεντρικά χρωμοσώματα παρουσιάζουν τον πολυμορφισμό αυτό σε ένα μόνο χρωμόσωμα ή και σε δύο ταυτόχρονα, πχ 46,XY, 15ps, 46,XY, 13ps, 21ps

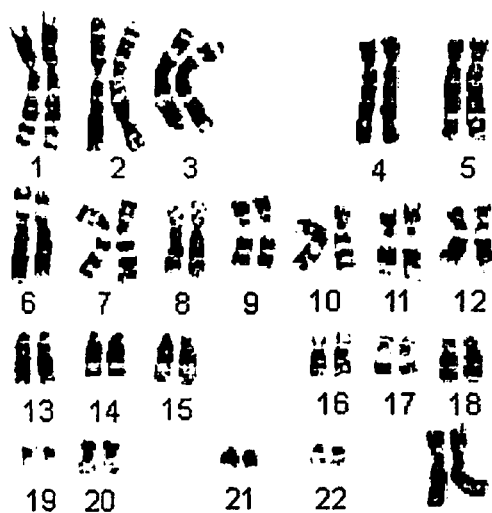
Το αποτέλεσμα επομένως, από την κυτταρογενετική εξέταση των ζευγαριών δείχνουν ότι σε κανένα από αυτά δεν βρέθηκε κάποιο παθολογικό εύρημα, παρά μόνο πολυμορφισμοί που



δεν έχουν καμία επίπτωση στον φαινότυπο. Με δεδομένο ότι και οι άλλες εξετάσεις που προβλέπονται από το πρωτόκολλο (έχουν ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα) ήταν αρνητικές, όλα τα ζευγάρια κατατάχθηκαν στην κατηγορία ζευγαριών με ιδιοπαθείς αποβολές. Όλες οι σύζυγοι παραπέμφθησαν ακολούθως για το μοριακό έλεγχο του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X.



Φυσιολογικός καρυότυπος άρρενος ατόμου, 46, XY (χρώση με Giemsa)



Φυσιολογικός καρυότυπος φυσιολογικού θήλεος ατόμου 46,XX (χρώση με Giemsa)

10. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με καθέξιν αποβολές

10.1 Αποτελέσματα συλλογής πληροφοριακών –ετερόζυγων γυναικών

Από τις 74 γυναίκες οι 56 παρουσίασαν το πρότυπο των διπλών ζωνών που υποδηλώνει την κατάσταση ετεροζυγωτίας, για την επαναλαμβανόμενη τρινουκλεοτιδική πολυμορφική περιοχή (CAG)_n που βρίσκεται στο πρώτο εξώνιο του γονιδίου του Υποδοχέα των Ανδρογόνων (Human Androgen Receptor Locus-AR). Δηλαδή το ποσοστό πληροφορικότητας για τις γυναίκες με καθέξιν αποβολές βρέθηκε στο 75.7% (95% CI 65.9-85.4), ενώ για τις 80 γυναίκες-μάρτυρες βρέθηκε ότι οι 55 είναι ετεροζυγώτες δηλ. ποσοστό πληροφορικότητας 68.8% (95% CI 58.6-78.9).

Ο μέσος όρος ηλικίας είναι τα 32.7 έτη (SD 4.7) για τις γυναίκες-ασθενείς και 31.1 (SD 3.8) για τις γυναίκες –μάρτυρες (p=0.06). Ο μέσος αριθμός αποβολών είναι 2 (διακόμανση από 2-6) για την ομάδα των ασθενών, εκ των οποίων 43 γυναίκες-ασθενείς (76.8%, 95% CI 65.7-87.8) έχουν πρωτογενείς-ιδιοπαθείς αποβολές (primary miscarriages) δηλ. δεν έχουν καμία επιτυχή τελειόμηνη κύηση και 13 δευτερογενείς ιδιοπαθείς αποβολές (secondary miscarriages) δηλ. τουλάχιστον μία επιτυχή τελειόμηνη κύηση στο ενεργητικό τους.

10.2 Ποσοτική εκτίμηση της αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X

Στις ετερόζυγες–πληροφοριακές γυναίκες συνεχίσαμε τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X, όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενη ενότητα. Μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης και την έκθεση σε αυτοραδιογραφικό φιλμ η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με την χρήση του προγράμματος Bio-Rad Quantity One V4.6.0 software. Η επεξεργασία δεν γίνεται στο ίδιο το φιλμ, αλλά στη εικόνα που έχει προκύψει μετά από σάρωσή του.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του προγράμματος το ποσοστό αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X υπολογίζεται πάντα σε σχέση με το πιο έντονο αλληλόμορφο δηλαδή εκείνο που είναι σε μεγαλύτερο ποσοστό κυττάρων αδρανές. Η ένταση του δείγματος που έχει υποστεί πέψη συγκρίνεται με εκείνου που δεν έχει υποστεί πέψη. Το ποσοστό αδρανοποίησης υπολογίζεται από τον τύπο $(Bd1/Bu1)/(Bd1/Bu1+Bd2/Bu2)$, όπου Bd1 είναι η ένταση της ζώνης του πιο έντονα αδρανοποιημένου αλληλομόρφου μετά την πέψη με το HpaII, Bd2 η ένταση της ζώνης του λιγότερο έντονου μετά την πέψη αλληλομόρφου και Bu1 και Bu2 εκπροσωπούν τις εντάσεις των ζωνών των δειγμάτων που δεν έχουν υποστεί πέψη (Lau et al., 1997).



Σε όλα τα αποτελέσματα που θα αναγράφονται από το σημείο αυτό και έπειτα, όταν η επιλεκτική αδρανοποίηση αποκαλείται «ήπια» σημαίνει ότι το ποσοστό αδρανοποίησης κυμαίνεται από 70% έως 90%, ενώ «ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση» θεωρείται εκείνη όπου το ποσοστό είναι μεγαλύτερο του 90%. Για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων η ανάλυση επαναλήφθηκε σε όσα δείγματα το ποσοστό αδρανοποίησης βρέθηκε μεγαλύτερο του 70%.

10.3 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

Η σύγκριση των συνεχών μεταβλητών μεταξύ των ομάδων γυναικών έγινε με την χρήση του t-test και του χ^2 , ενώ για $P < 0.05$ η διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων δεν θεωρείται στατιστικά σημαντική. Τα όρια ανοχής (confidence intervals-CIs) μιας παρατηρούμενης συχνότητας υπολογίσθηκαν με την χρήση της διώνυμης κατανομής. Υπήρξε μικρός αριθμός δειγμάτων με ποσοστό εκλεκτικής αδρανοποίησης μεγαλύτερο του 90%, γι' αυτό και χρησιμοποιήσαμε και τις περιπτώσεις «ήπιας» και «ακραίας» επιλεκτικής αδρανοποίησης για να ορίσουμε την εκλεκτική αδρανοποίηση. Όλες οι αναλύσεις έγιναν με το πρόγραμμα SPSS (SPSS, Inc, Chicago, IL).

10.4 Αποτελέσματα από την εκτίμηση των ποσοστών αδρανοποίησης

Η κατανομή των αποτελεσμάτων επιλεκτικής αδρανοποίησης για τις δύο ομάδες γυναικών φαίνεται στον πίνακα 3. Ποσοστό αδρανοποίησης μεγαλύτερο του 70% βρέθηκε στο 23.2% των ασθενών σε αντίθεση με το ποσοστό 10.9% που βρέθηκε στις γυναίκες μάρτυρες ($p=0.085$). Ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση ($>90\%$) βρέθηκε στο 10.7% των ασθενών, ενώ στις γυναίκες-μάρτυρες το ποσοστό είναι 3.6%. Αν και το ποσοστό ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης είναι υψηλότερο για τους ασθενείς, δεν είναι στατιστικά σημαντικό ($p=0.271$).

Σε μια δεύτερη ανάλυση μέσα στην ομάδα των ασθενών συγκρίναμε το βαθμό επιλεκτικής αδρανοποίησης μεταξύ ασθενών με πρωτογενείς και δευτεροπαθείς αποβολές. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των υπο-ομάδων. Εν τούτοις, ο αριθμός των περιπτώσεων που εξετάστηκαν παραμένει μικρός για ανάλυση.



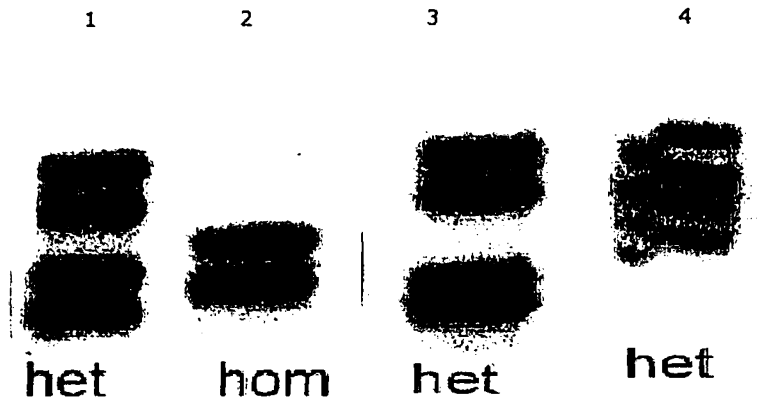
Πίνακας 3. Ποσοστά εκλεκτικής αδρανοποίησης σε γυναίκες με ιδιοπαθείς αποβολές και γυναίκες μάρτυρες

	N	Πληροφοριακές (%)	> 70% SXI n (% , 95% CI)	P	>90% SXI (% [95% CI])	P
Μάρτυρες	80	55 (68.8)	6 (10.9%, 2.7-19.1)		2 (3.6%, 0.0-8.6)	
Ασθενείς	74	56 (75.7)	13 (23.2%, 12.1-34.3)	0.085	6 (10.7%, 2.6-18.8)	0.271
2 αποβολές	44	32 (72.7)	7 (21.9%, 7.5-36.2)		4 (12.5%, 1.0-23.9)	
≥3 αποβολές	30	24 (80.0)	6 (25.0%, 7.7-42.3)	0.784	2 (8.3%, 0.0-19.4)	0.681
Πρωτογενείς	56	43 (76.8)	9 (20.9%, 8.8-33.1)		3 (6.9%, 0.6-14.6)	
Δευτεροπαθείς	18	13 (72.2)	4 (30.8%, 5.7-55.8)	0.072	2 (15.4%, 0.0-35.0)	0.580

(*Fetal Diagnosis and Therapy, Dasoula et al., 2007*)

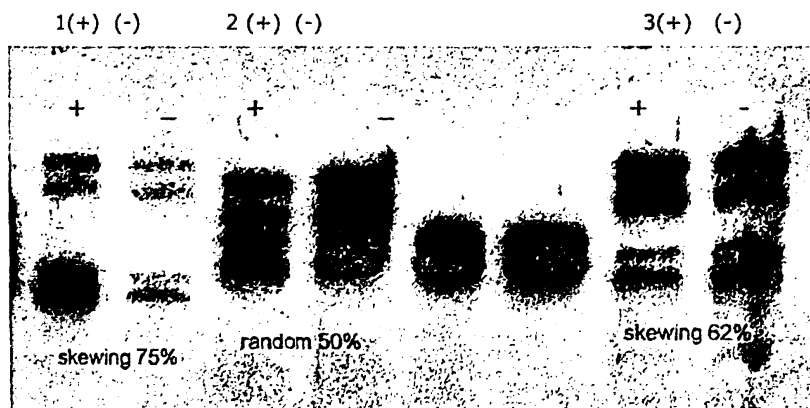
Παρακάτω (εικόνα 1) φαίνονται παραδείγματα ομόζυγων-ετερόζυγων γυναικών. Υπόψιν ότι, εφόσον το πήκτωμα ακρυλαμιδίου που χρησιμοποιείται κατά την αυτοραδιογραφία είναι αποδιατακτικό, αυτό σημαίνει ότι το DNA που μελετάται είναι αποδιαταγμένο. Οι δύο αλυσίδες της κάθε διπλής έλικας μετακινούνται με ελαφρώς διαφορετική ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση (λόγω συμπληρωματικότητας των βάσεων στη σύνθεση της διπλής έλικας). Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι ότι τελικά το κάθε αλληλόμορφο αντιπροσωπεύεται από δύο διαφορετικές ζώνες (Allen et al., 1992). Επομένως, ένα ομόζυγο άτομο για την (CAG)_n πολυμορφική περιοχή εμφανίζεται με το πρότυπο των διπλών ζωνών, ενώ ένα ετερόζυγο με τέσσερις ζώνες.





Εικόνα 1. Παράδειγμα ομοζυγωτίας και ετεροζυγωτίας. Το κάθε αλληλόμορφο αντιπροσωπεύεται από ένα ζεύγος ζωνών, επομένως τα δύο ζεύγη των ζωνών αντιπροσωπεύουν την ετερόζυγη κατάσταση, ενώ το ένα ζεύγος ζωνών την ομόζυγη. (1, 3, 4= ετερόζυγη κατάσταση, 2=ομόζυγη κατάσταση)

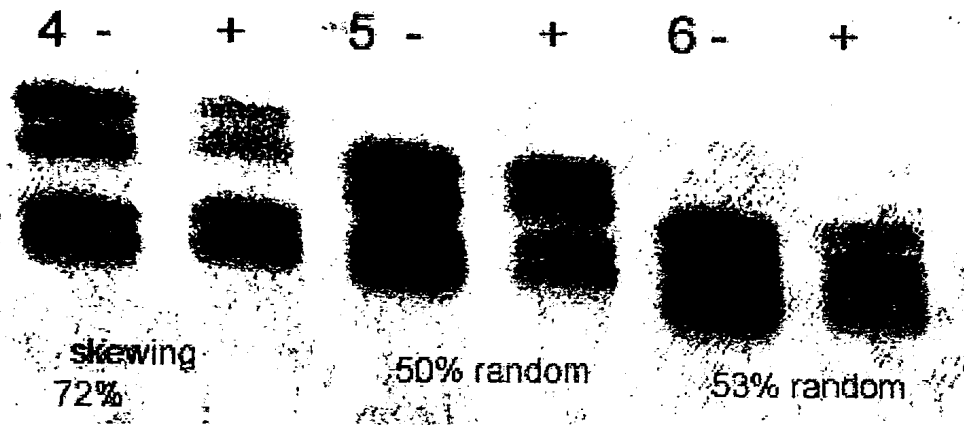
Στην εικόνα 2 φαίνονται παραδείγματα μη-τυχαίας (επιλεκτικής) αδρανοποίησης. Το κάθε δείγμα εκπροσωπείται δύο φορές, μία με αρχικό υπόστρωμα γενωμικό DNA μετά από την πέψη με το ένζυμο HpaII (+) και άλλη μια με DNA που δεν έχει υποστεί πέψη (-). Κάτω από το κάθε ζεύγος δειγμάτων αναγράφεται το ποσοστό της επιλεκτικής αδρανοποίησης, έτσι όπως υπολογίστηκε κατά την ποσοτική εκτίμηση της αδρανοποίησης.



Εικόνα 2.

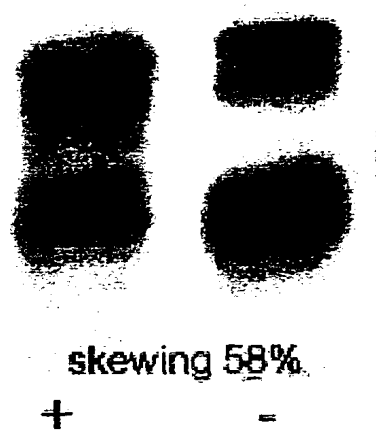
Για το δείγμα 1 (εικ.2) το ποσοστό αδρανοποίησης βρέθηκε 75%, για το 2 βρέθηκε 50% (τυχαία αδρανοποίηση) και για το 3 βρέθηκε 62%.

Στην εικόνα 3 έχουν υπολογισθεί τα ποσοστά αδρανοποίησης για τα δείγματα 4, 5 και 6 σε 72%, 50% και 53% αντίστοιχα.

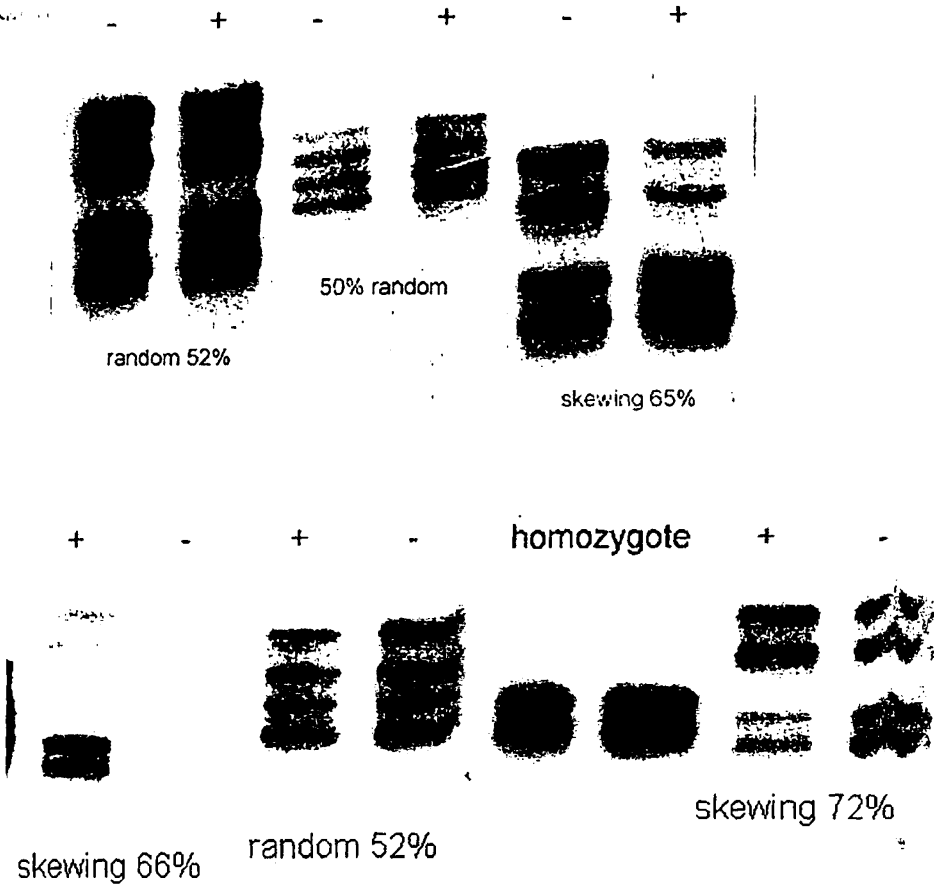


Εικόνα 3.

Στην εικόνα 4 φαίνεται δείγμα με τυχαία αδρανοποίηση 58%.



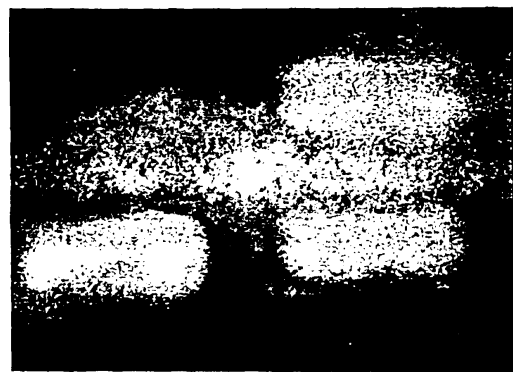
Εικόνα 4.



Εικόνα 5. Παραδείγματα επιλεκτικής αδρανοποίησης. Κάτω από το κάθε δείγμα αναγράφεται το ποσοστό αδρανοποίησης όπως υπολογίσθηκε.

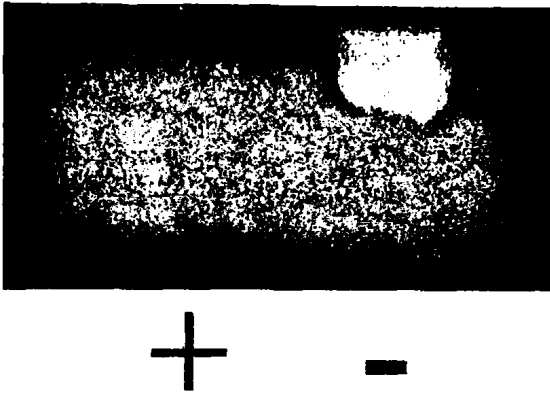


Εικόνα 6. Παράδειγμα τυχαίας αδρανοποίησης



Εικόνα 7. Παράδειγμα ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης (skewing > 90%).





Εικόνα 8. Πλήρης πέψη σε αρσενικό άτομο.
(*Fetal Diagnosis and Therapy, Dasoula et al., 2007*)

Όπως φαίνεται στην εικόνα 8, σε DNA άρρενος ατόμου μετά την πλήρη πέψη με το ένζυμο HpaII και την ενίσχυση με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης δεν θα πρέπει να ανιχνεύεται προϊόν. Η απουσία προϊόντος υποδηλώνει σωστή διεξαγωγή της πέψης.

11. Αποτελέσματα κυτταρογενετικής εξέτασης σε ιστούς από προϊόντα αποβολών.

Κυτταρογενετική εξέταση πραγματοποιήθηκε σε 18 ιστούς από αποβληθέντα έμβρυα. Συνοπτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την ανάλυση φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Συνολικά αποτελέσματα κυτταρογενετικής ανάλυσης αποβληθέντων εμβρύων.

Αποτέλεσμα καρυοτυπικής ανάλυσης	Αριθμός δειγμάτων
Φυσιολογικός καρυότυπος	3 (2 46,XX-1 46,XY)
46,XY/ 92,XXYY	1
92,XXXX	1
46,XX/ 47,XX,+9	1
45,XO	1
47,XY+21	1
92,XXYY	1
Αποτυχία ανάπτυξης καλλιεργείων	9
Σύνολο δειγμάτων	18

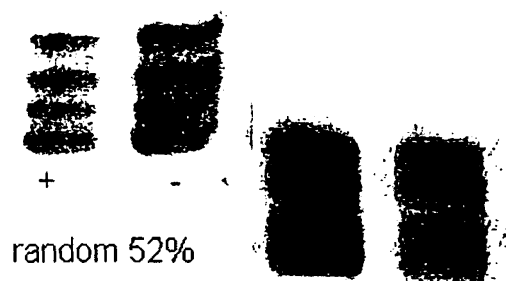
Όπως φαίνεται από τον πίνακα 4, ένας σημαντικός αριθμός καλλιεργείων δεν κατόρθωσε να αναπτυχθεί. Οι πιθανές αιτίες μιας αποτυχημένης καλλιέργειας μπορεί να είναι: προσβολή



των κυττάρων από μύκητες, σφάλματα κατά τη μεταφορά του δείγματος στο εργαστήριο και αδυναμία προσκόλλησης των κυττάρων στο υπόστρωμα.

12. Αποτελέσματα από τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση

Απομονώσαμε DNA από αίμα ομφαλίου και πλακούντες 22 κοριτσιών που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση. Τελικά τα 11 από τα 22 κορίτσια είναι πληροφοριακά για τη CAG πολυμορφική περιοχή που βρίσκεται στο γονίδιο του HUMARA δηλαδή η πληροφορικότητα διαμορφώνεται σε ποσοστό 50%. Η μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X συνεχίστηκε γι'αυτά τα κορίτσια και όλα έδειξαν το φυσιολογικό πρότυπο της τυχαίας αδρανοποίησης (Εικόνα 9).



Εικ.9. Τυχαία αδρανοποίηση σε κορίτσια μετά από ΠΕΔ.

12.1 Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε περιπτώσεις οικογενειών με αποβολές.

Δύο μόνο οικογένειες με ιστορικό αποβολών σε πολλά μέλη τους βρέθηκαν. Απομονώσαμε DNA περιφερικού αίματος από όλους τους συγγενείς-μέλη των οικογενειών αυτών και ακολουθήσαμε τη γνωστή διαδικασία, δηλαδή συλλογή ετερόζυγων-πληροφοριακών γυναικών για τη CAG πολυμορφική περιοχή αρχικά και στη συνέχεια μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης στις πληροφοριακές. Και στις δύο περιπτώσεις τα μέλη των οικογενειών παρουσίασαν το πρότυπο της τυχαίας αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X.

13. Αποτελέσματα από τη μελέτη της μεθυλίωσης σε DNA ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών.

Η μελέτη των δειγμάτων από ορχικό ιστό υπογόνιμων ανδρών, περιλαμβάνει την κλασική μικροσκοπική μελέτη (με χρώση Παπανικολάου) και τη μοριακή ανάλυση DNA η οποία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας εργασίας.

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων διακρίνεται σε εκείνη που αφορά στους άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία και σε εκείνη που αφορά στους άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

13.1 Αποτελέσματα των τριών μεθόδων μελέτης (μικροσκοπική, SNRPN και HUMARA ανάλυση) στους ιστούς ανδρών με αποφρακτική αζωοσπερμία.

Και οι 12 συνολικά άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία που περιέχονταν στο αρχικό μας δείγμα ήταν θετικοί για την ύπαρξη γαμετικών κυττάρων και με τις τρεις μεθόδους, δηλαδή τη μικροσκοπική και τις δύο μοριακές (μελέτη των γονιδίων SNRPN και HUMARA), με απόλυτη συμφωνία των αποτελεσμάτων, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 5).

Πίνακας 5. Αποτελέσματα μοριακών και μικροσκοπικών αναλύσεων στους 12 άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία.

Αριθμός δειγμάτων ιστών που εξετάστηκαν	Μέθοδος εκτίμησης της περιέκτικότητας των ορχικών ιστών σε γαμετικά κύτταρα	Αριθμός δειγμάτων θετικών για την ύπαρξη σπερματοζωαρίων
12	DNA ανάλυση <ul style="list-style-type: none"> — HUMARA — SNRPN 	12
	Μικροσκοπική ανάλυση	12

(Fertility and Sterility, Dasoula et al., 2007)



Συγκεκριμένα, η μικροσκοπική εξέταση έδειξε, όπως ήταν αναμενόμενο, ύπαρξη σπερματοζωαρίων για τα 12 δείγματα από ορχικό ιστό.



Εικ.10. Μικροσκοπική παρατήρηση σπερματοζωαρίων σε δείγμα από ορχικό ιστό

Το γονίδιο HUMARA βρέθηκε μεθυλιωμένο σε όλα τα δείγματα πράγμα που υποδηλώνει την ύπαρξη γαμετικών κυττάρων, τα οποία διέρχονται από την φάση της παχυνταίας κατά τη διάρκεια της μείωσης στη σπερματογένεση. Στα δείγματα DNA που ελήφθησαν από το περιφερικό αίμα των ίδιων υπογόνιμων ανδρών και τα οποία χρησιμοποιούνται ως εσωτερικοί μάρτυρες, δεν βρέθηκε μεθυλίωση του γονιδίου HUMARA (εικόνα 11).



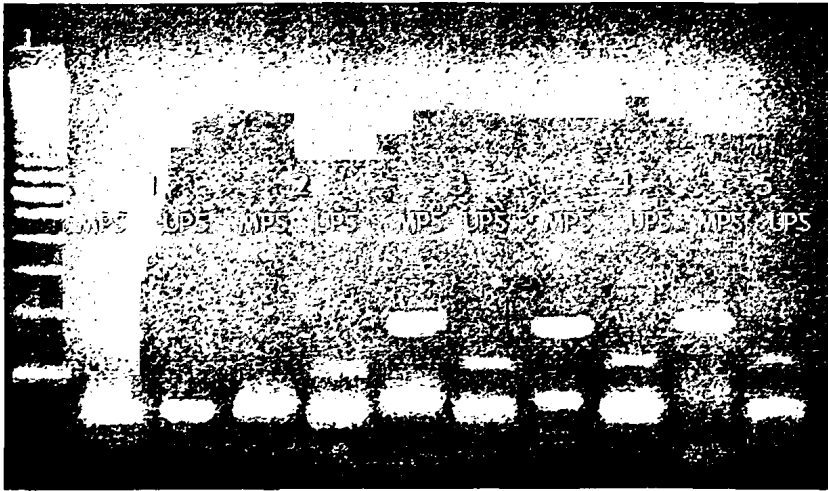
(Fertility and Sterility, Dasoula et al.,2007)

Εικόνα 11. Προϊόντα αντίδρασης PCR για τον έλεγχο της μεθυλίωσης του γονιδίου του HUMARA, όπου χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές μόνο για την περίπτωση που η υπό-μελέτη περιοχή είναι μεθυλιωμένη. Τα δείγματα 1,2 και 4 (ιστός) βρέθηκαν με μεθυλίωση της περιοχής, ενώ τα 3,5,6



(ιστός) βρέθηκαν δίχως μεθυλίωση της περιοχής (άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία). Το δείγμα 7 περιέχει DNA από περιφερικό αίμα και το 8 είναι ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης. (L: 100bp ladder).

Ομοίως, η ανάλυση για το γονίδιο SNRPN έδειξε την ύπαρξη μόνο του μη μεθυλιωμένου (πατρικού) αλληλομόρφου και για τα 12 δείγματα ιστών, επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη γαμετικών κυττάρων. Παράλληλα, τα δείγματα από περιφερικό αίμα (εσωτερικοί μάρτυρες) παρουσίαζαν και τα δύο αλληλόμορφα (μητρικό-μεθυλιωμένο και πατρικό-μη μεθυλιωμένο), όπως κάθε φυσιολογικός σωματικός ιστός. (Εικόνα 12)



(Fertility and Sterility, Dasoula et al., 2007)

Εικόνα 12. Παρατήρηση των προϊόντων αντίδρασης PCR για έλεγχο του γονιδίου SNRPN. Για κάθε δείγμα 1,2,3,4 και 5 χρησιμοποιήσαμε ζεύγη εκκινητών ειδικά σχεδιασμένων για την περίπτωση που η περιοχή είναι μεθυλιωμένη και για την περίπτωση που δεν είναι μεθυλιωμένη [MPS, UPS: εκκινητές για τη μεθυλιωμένη (methylated primer set) και μη-μεθυλιωμένη περιοχή (un-methylated primer set), αντίστοιχα]. Το δείγμα 1 δεν περιέχει DNA και χρησιμεύει για ανίχνευση τυχόν επιμολύνσεων, το δείγμα 2 (ιστός) είναι θετικό για το UPS μόνο, τα δείγματα 3 και 4 (ιστός από άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία) είναι θετικά για MPS και UPS, το δείγμα 5 (περιφερικό αίμα) είναι θετικό επίσης για MPS και UPS. (L: 100bp ladder).



13.2 Αποτελέσματα των τριών μεθόδων μελέτης (μικροσκοπική, SNRPN, HUMARA) στους ιστούς των ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία

Τα αποτελέσματα για τους 74 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία φαίνονται στον πίνακα 6. Μόνο 23 από αυτούς βρέθηκαν θετικοί για την ύπαρξη σπερματοζωαρίων κατά τη μικροσκοπική ανάλυση. Μεταξύ αυτών, 19 ήταν θετικοί και στην ανάλυση SNRPN λόγω παρουσίας του μη-μεθυλιωμένου πατρικού αλληλομόρφου. Ενώ, για το HUMARA γονίδιο, ανάλυση των 23 αυτών ανδρών έδειξε πλήρη απουσία μεθυλίωσης του γονιδίου και για τους 23, με μόνη εξαίρεση 2 άνδρες (<10%), οι οποίοι ήταν θετικοί στον έλεγχο για τη μεθυλίωση του γονιδίου. Επομένως, η μικροσκοπική εξέταση των ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία βρίσκεται σε συμφωνία με την ανάλυση του SNRPN σε ποσοστό 82% των εξεταζόμενων ορχικών ιστών, υποδηλώνοντας μεγάλη ευαισθησία της μοριακής εξέτασης της μεθυλίωσης του SNRPN γονιδίου.

Από τους εναπομείναντες 51 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία που δεν ήταν θετικοί στην ύπαρξη σπερματοζωαρίων κατά τη μικροσκοπική ανάλυση, 13 έχουν το σύνδρομο της πρώιμης διακοπής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (maturation arrest syndrome). Ανάλυση του γονιδίου HUMARA έδειξε μεθυλίωση (παρουσία γαμετικών κυττάρων) στα 11 δείγματα με ευαισθησία στο ποσοστό του 84%. Ανάλυση του SNRPN γονιδίου έδειξε παρουσία μητρικού-μεθυλιωμένου και πατρικού-μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου για τους 11 αυτούς ασθενείς, αποδεικνύοντας την ύπαρξη σωματικών κυττάρων. Τα δείγματα των εσωτερικών μαρτύρων για τους συγκεκριμένους ασθενείς παρουσίασαν, όπως αναμέναμε, μη μεθυλιωμένη την εξεταζόμενη περιοχή του γονιδίου HUMARA και μεθυλιωμένο-μητρικό και μη μεθυλιωμένο-πατρικό αλληλόμορφο για το γονίδιο SNRPN.

Συγκρίνοντας την ανάλυση του γονιδίου SNRPN με τη μικροσκοπική ανάλυση για τους 23 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία που ήταν θετικοί για σπερματοζωάρια με το μικροσκόπιο, το όριο αποδοχής της πιθανότητας βρέθηκε ίσο με 0.584 (p value= 0.584) δηλαδή δεν είναι στατιστικά σημαντικό (>0.05).



Πίνακας 6. Αποτελέσματα μοριακής και μικροσκοπικής ανάλυσης για τους 51 άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία.

Αριθμός δειγμάτων	Μέθοδος εκτίμησης της περιεκτικότητας σε γαμετικά κύτταρα	Αριθμός δειγμάτων θετικών για σπερματοζώαρια	Αριθμός δειγμάτων αρνητικών για σπερματοζώαρια	
74	DNA ανάλυση	HUMARA	2	11 (σύνδρομο πρώιμης διακοπής ωρίμανσης)
		SNRPN	19	
	Μικροσκοπική ανάλυση	23	51	

(*Fertility and Sterility, Dasoula et al., 2007*)

14. Σύνθεση ανιχνευτών για μικροσυστοιχίες

14.1 Πολλαπλασιασμός των DNA ανιχνευτών

Αφού είχε προηγηθεί ο σχεδιασμός με την χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος (από εξειδικευμένα μέλη του εργαστηρίου) ειδικών εναρκτηρίων μορίων (primers) για κάθε ανιχνευτή, προχωρήσαμε στον πολλαπλασιασμό τους με τη μέθοδο της PCR και στη συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης επιβεβαιώθηκαν για την καθαρότητα και το μέγεθός τους με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.

Πίνακας 7. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι ανιχνευτές που σχεδιάστηκαν και κλωνοποιήθηκαν για σκοπούς ερευνητικού προγράμματος στα πλαίσια του οποίου εντάσσεται η παρούσα εργασία. Για κάθε ένα ανιχνευτή αναγράφεται η θέση του στο γονιδίωμα και το μέγεθός του. Με έντονο μαύρο χρώμα σημειώνονται εκείνοι οι εκκινητές για τους οποίους δεν ήταν επιτυχής η αρχική αντίδραση πολλαπλασιασμού τους ή η κλωνοποίησή τους στη συνέχεια.



Probe	Position	Length bp	Probe	Position	Length bp
XO43	4334179	406	XO21	213447	286
XO404	40428677	420	XO433	43331392	431
XO397	39711370	438	XO437	43739698	570
XO99	9913315	580	XO441	44196220	438
XO109	10944648	449	XO479	47936175	589
XO147	14769757	540	XO483	48337130	551
XO166	16666912	511	XO488	48871094	490
XO188	18804655	574	XO498	49871797	526
XO197	19755856	498	XO509	50995185	485
XO203	20389145	418	XO515	51570600	506
XO206	20681077	513	XO532	53252526	526
XO219	21962696	404	XO539	53978000	518
XO222	22293864	548	XO543	54361077	442
XO236	23632733	492	XO556	55695482	495
XO312	31267736	465	XO616	61658558	554
XO335	33577258	419	XO626	62649479	421
XO372	37246888	456	XO645	64503768	496
XO654	65438433	449	XO664	66471978	582
XO668	66886461	448	XO686	68638762	469
XO701	70158571	529	XO712	71229319	441
XO719	71942125	511	XO725	72526508	456
XO728	72818945	553	XO740	74098141	548
XO745	74516564	451	XO752	75206021	600
XO755	75558154	594	XO760	76059507	596
XO777	77715394	424	XO791	79167099	511
XO796	79606890	325	XO818	81857574	460
XO870	87036395	588	XO882	88211674	486
XO902	90202990	574	XO928	92807765	529
XO933	93385048	539	XO987	98702054	421
XO1148	114895567	547	XO1192	119222813	552
XO1200	120009714	426	XO1217	21775299	532
XO1237	123744553	539	XO1373	137349629	558
XO1380	138082765	489	XO1415	141573153	569
XO1441	144137241	498	XO1445	144589208	422
XO1452	145246899	476	XO1483	148374078	268
XO971	97172492	527	XO1508	150841038	313
XIST7120	7120328	472	XO712	71229319	441
XIST7142	71426684	532	XIST7154	71545352	576
XIST7176	71767608	525	XIST7190	71908247	533
XIST71938	71939837	405	XIST7196	71962159	596
XIST7200	72003632	507	XIST7205	72052926	533
XIST7214	72142376	578	XIST7220	72202313	570
XIST7228	72290028	557	XIST7237	72374654	587
XIST7243	72436817	348	XIST7249	72497649	404
XO725	72526508	456	XIST7258	72589558	401

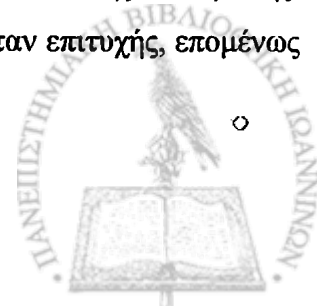


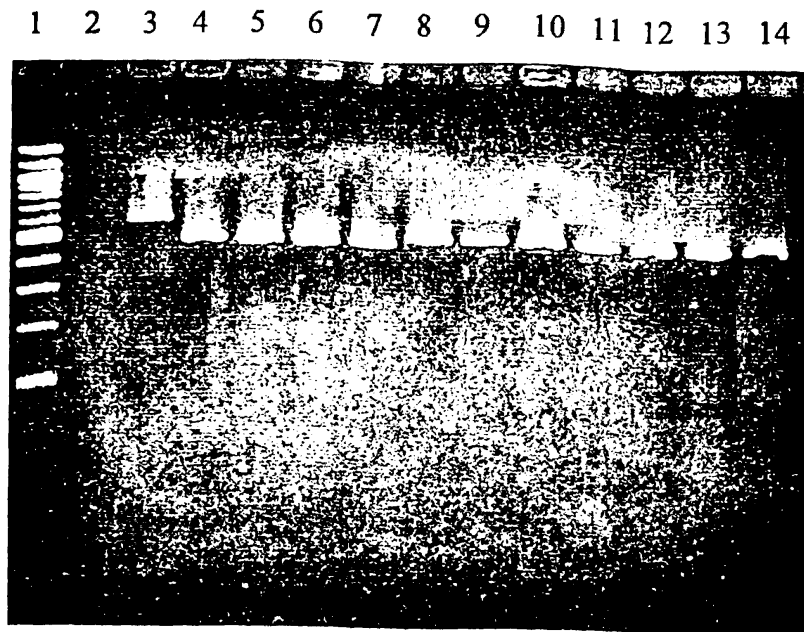
XIST7263	72633484	473	XIST7268	72680479	498
XIST7275	72751767	541	XIST71904	71904689	589
XIST7198	71910305	596	XIST71910	71912713	579
XIST71912	71914491	401	XIST71914	71917021	527
XIST71917	71919357	571	XIST7200	72003632	507
XIST71923	71925202	591	XIST71924	71927020	416
XIST71927	71929591	584	XIST71928	71931342	422
XIST7250	7250359	248	XIST71398	71398365	405
XIST 7181	71815098	505	XIST7186	71864860	441
X06	623447	400	X011	1111051	245
X015	1520093	332	X020	2046824	263
X0561	56157352	492	X0522	52210857	447
X0529	52995456	573	X01133	113398409	403
X01406	140624621	563	X01478	14788503	484
XO610	61002830	527			
X0872	87200236	461	X0877	87767947	450
X0881	88103358	401	X0894	89471946	495
X0897	89752207	440	X0940	94064319	549
XIST71920	71923052	466	X0990	99063610	434
X01022	102200548	551	X01068	106844051	418
X01102	110284251	553	XO567	56726440	586
X01136	113654192	422	X01156	115606453	581
X01179	117994617	442	XIST7129	71294742	574
X01474	147412965	549	XIST7116	71162026	456
X0783	78340473	599	XIST7171	71721011	514
X0807	80775810	585	XIST7133	71337519	597
XO867	86725020	550			

14.2 Ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Τα προϊόντα ελέγχθησαν σε πηκτή αγαρόζης 2% με τη βοήθεια μάρτυρα (100bp ladder) για να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε την ορθότητα των αποτελεσμάτων μας και επομένως να προχωρήσουμε στο επόμενο στάδιο της κλωνοποίησης.

Στην εικόνα 13 φαίνεται ο έλεγχος που έγινε σε πηκτή αγαρόζης για 12 ανιχνευτές (αναγράφονται στη λεζάντα). Επειδή τα προϊόντα της αντίδρασης και στις 12 περιπτώσεις είχαν το αναμενόμενο μέγεθος χωρίς την παρουσία άλλων παραπροϊόντων της αντίδρασης, θεωρήσαμε ότι ο πολλαπλασιασμός των συγκεκριμένων ανιχνευτών ήταν επιτυχής, επομένως προχωρήσαμε στην κλωνοποίησή τους.

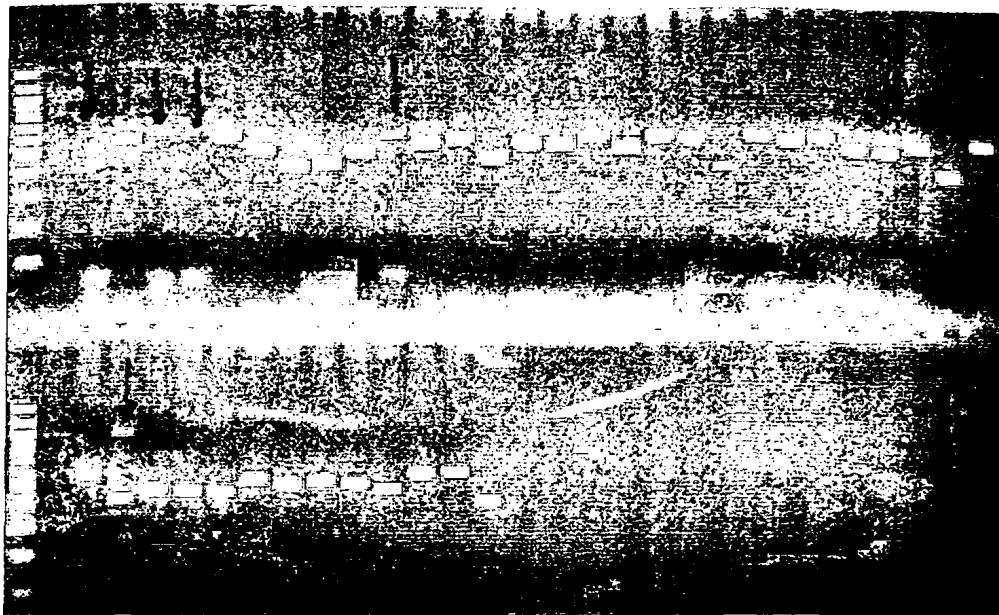




Εικ.13. Θέση 1: μάρτυρας 100bp ladder, 2: -, 3:XO-752 (600bp), 4: XO-522 (447 bp), 5: XO-543 (442 bp), 6: XO-556 (493 bp), 7: XO-561 (492 bp), 8: XO-645(496 bp), 9: XO-668 (448 bp), 10: XO-686 (469 bp), 11: XO-712 (441 bp), 12: XO-725 (456 bp), 13: XO-745 (451bp), 14: XO-372 (456bp)

Στην εικόνα που ακολουθεί (εικόνα 14) φαίνεται και πάλι ο έλεγχος των προϊόντων της PCR για 41 ανιχνευτές. Η αντίδραση ήταν ανεπιτυχής για τους ανιχνευτές: XIST-7116, XO-1022, XO-783, XIST-71920 και XO-807. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, όχι μόνο η πλήρης απουσία προϊόντος μετά την αντίδραση, αλλά και η παρουσία παραπροϊόντων της αντίδρασης, καθιστούν την αντίδραση ανεπιτυχή.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30



Εικ.14. Σειρά 1, Θέση 1: 100bp ladder, 2: -, 3: XIST 7116 (απέτυχε), 4: XIST-7190 (533bp), 5,6: XO-1022, XIST-71920 (απέτυχαν), 7: XIST- 71904 (589 bp), 8: XO -719 (511bp), 9: XIST- 7249 (404 bp), 10: XIST- 7258 (401bp), 11: XIST-7200 (507bp), 12: XO-807 (απέτυχε), 13: XIST-7181 (505bp), 14: XIST-7205 (533bp), 15: XIST -7186 (441bp), 16: XO-791 (511bp), 17: XO-1483 (516bp), 18: XO-437 (570bp), 19: XO-479 (589bp), 20: XO-752 (600bp), 21: XO-760 (596bp), 22: XO-654 (449bp), 23: XO-701 (529bp), 24: XO-728 (553bp), 25: XO-740 (548bp), 26: XO-686 (469bp), 27: XO-725 (456bp), 28: XO-882 (486bp), 29: XO- 1133 (403bp), 30: XO-1192 (552bp). Σειρά 2: 3: XIST-7196 (596bp), 4: XO-783 (απέτυχε), 5: XO-509 (485bp), 6: XO-488(490bp), 7: XO-556 (495bp), 8: XO-483 (551bp), 9: XO-498(526bp), 10: XO-740 (548bp), 11: XO-971 (527bp), 12: XO-1478 (486bp), 13: XO-1406 (563bp), 14: XO-1415 (569bp), 15: XO-1133 (403bp).

Ο πολλαπλασιασμός των ανιχνευτών που επιλέξαμε ήταν επιτυχής για την πλειοψηφία εξ'αυτών, με τους οποίους και προχωρήσαμε στην περαιτέρω διαδικασία κλωνοποίησης.

14.3 Κλωνοποίηση των DNA ανιχνευτών

Από το σύνολο των ανιχνευτών που αναγράφονται στον πίνακα 7, στα πλαίσια αυτής της εργασίας κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς οι 119 ανιχνευτές με τη χρήση του συστήματος κλωνοποίησης TOPO TA Cloning^R (Invitrogen Corp.).



Ο πίνακας που ακολουθεί είναι ενδεικτικός τρυβλίου μικροτιτλοδότησης (96 well plates) στο οποίο είχαν τοποθετηθεί ορισμένες αποικίες μετά την επιλογή τους από τα τρυβλία (άσπρες αποικίες). Από την καλλιέργεια αυτή αφαιρέθηκε ορισμένη ποσότητα στη συνέχεια για να γίνει ο πολλαπλασιασμός και έλεγχος των παρακάτω κλώνων.

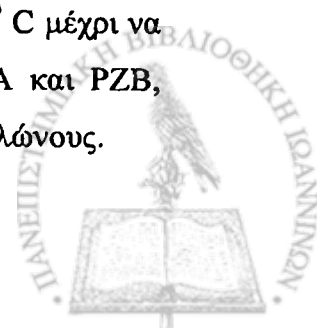
Πίνακας 8. (96 well plates)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	XO- 515	XO- 515	XO- 515	XO- 515	XO- 529	XO- 529	XO- 529	XO- 529	XO- 1200	XO- 1200	XO- 1200	XO- 1200
B	XO- 1148	XO- 1148	XO- 1148	XO- 1148	XO- 532	XO- 532	XO- 532	XO- 532	XO- 539	XO- 539	XO- 539	XO- 539
C	XO- 543	XO- 543	XO- 543	XO- 543	XO- 556	XO- 556	XO- 556	XO- 556	XO- 437	XO- 437	XO- 437	XO- 437
D	XO- 441	XO- 441	XO- 441	XO- 441								
E												
F												
G												
H												

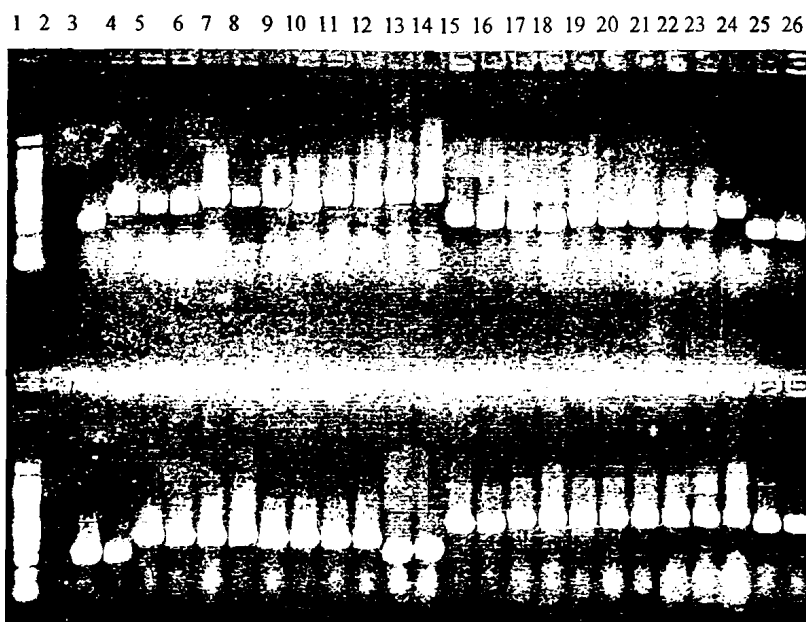
Σε τέσσερα «πηγαδάκια» στη σειρά τοποθετούνται άσπρες αποικίες του ίδιου ανιχνευτή με τη βοήθεια ρύγχους. Μετά από ένα 24ωρο επώασης στους 37⁰ C, από το τρυβλίο μικροτιτλοδότησης του πίνακα 8, επιλέξαμε τα θολά πηγαδάκια (η θολερότητα υποδηλώνει πολλαπλασιασμό των κυττάρων, άρα και επιτυχή έκβαση της μεθόδου). Για τους ανιχνευτές που φαίνονται στον πίνακα επιτυχής ήταν η έκβαση στα πηγαδάκια με συντεταγμένες: (A.1 .2 .3. 6.7.8.9.10, B. 1. 2. 3. 4 .5 .8 .9 .12 , C.1 .2 .3 .4 .5 .6 .7 .8 .9 .10 .11 .12 , D. 1. 4). Τα διεγραμμένα τετράγωνα υποδηλώνουν ανεπιτυχή ανάπτυξη των καλλιεργειών δηλ.αποτυχημένο βακτηριακό μετασχηματισμό.

14.4 Πολλαπλασιασμός των κλώνων που επιλέχθηκαν με τη μέθοδο της PCR και ποιοτικός προσδιορισμός των προϊόντων με ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αгарόζης

Μετά την καλλιέργεια των κλώνων ακολούθησε κρυοσυντήρησή τους στους -80⁰ C μέχρι να προχωρήσουμε στην PCR με την χρήση των κοινών ζευγών εκκινητών PZA και PZB, προκειμένου να βεβαιωθούμε για τη σωστή ενσωμάτωση των ανιχνευτών στους κλώνους.



Τα προϊόντα της PCR ελέγχθησαν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικ.15) φαίνεται ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης 2%.



Εικ.15: Σειρά 1: Θέση 1: Μάρτυρας 100bp ladder, 2: -, 3: XIST-7250 (325bp), 4,5,6:XIST-7258

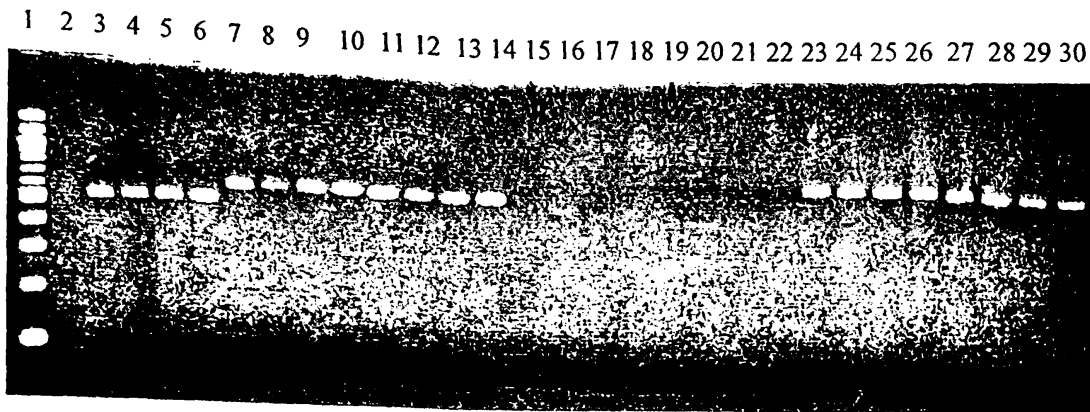
(478bp), 7,8,9: XO-777 (501bp), 10: XO-1445 (490bp), 11,12: XO-818 (537bp), 13,14: XO-882 (563bp), 15,16,17,18: XO-1483 (345bp), 19:XO-1508 (390bp), 20,21,22,23: XO-15 (409bp), 24: XO-6 (477bp), 25,26:

XO-11 (322bp). **Σειρά 2:** Θέση 1: Μάρτυρας 100bp ladder, 2: -, 3,4: XO-796 (402bp), 5,6,7,8:XIST-71938 (482bp), 9,10,11,12: XIST-71912 (478bp), 13: XO-20 (340bp), 14: XO-21 (363bp), 15,16: XO-701 (607bp), 17,18,19,20: XO-664 (659bp), 21,22,23,24: XO-755 (671bp), 25,26: XO-928 (606bp)

**Σημ. Τα μεγέθη των κλωνοποιημένων ανιχνευτών που αναγράφονται στις παρενθέσεις είναι αυτά που προκύπτουν μετά την κλωνοποίηση. Προστίθενται δηλ. στο αρχικό τους μέγεθος 77 bp για τις θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών που πλαισιώνουν τις περιοχές των ανιχνευτών*

Στο σχήμα που ακολουθεί (εικόνα 16) φαίνεται ο έλεγχος στους κλωνοποιημένους ανιχνευτές: XIST-7243, XIST-7275, XIST-71914, XIST-7129, XIST-7171, XIST-7198, XIST-7220. Δεν δούλεψαν καθόλου οι XIST-7129 και XIST-7171.





Εικόνα 16. Θέση 1:100bp ladder, 2:-, 3,4,5,6 : XIST -7243 (452bp), 7,8,9,10: XIST-7275 (618bp), 11,12,13,14: XIST-71914 (604bp), 15,16,17,18: XIST-7129, 19,10,21,22: XIST-7171 , 23,24,25,26: XIST-7198 (673bp) και 27,28,29,30 XIST-7220 (647bp).

Για όσους κλωνοποιημένους ανιχνευτές το αποτέλεσμα δεν ήταν επιτυχές, αποκλείσθηκαν από τη μελέτη.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

15. Μεθυλίωση του DNA και ανθρώπινη αναπαραγωγή- Γενικά

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το φαινόμενο της μεθυλίωσης του DNA σε σχέση με την ανθρώπινη αναπαραγωγή. Συγκεκριμένα, ασχοληθήκαμε με τον τρόπο με τον οποίο το μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης ορισμένων θέσεων του γονιδιώματος εμπλέκεται στις αποβολές και την ανδρική υπογονιμότητα.

Μελετώντας τις εξής ομάδες πληθυσμού: 1) γυναίκες με καθέξιν αποβολές και το προϊόν των αποβολών τους 2) άνδρες με υπογονιμότητα και 3) κορίτσια που γεννιούνται μετά από προεμφυτευτική διάγνωση (ΠΕΔ), είχαμε τη δυνατότητα να διερευνήσουμε αφ' ενός μεν τη συμπεριφορά των επιγενετικών τροποποιήσεων στα αναπαραγωγικά κύτταρα, αφ' ετέρου δε τους κινδύνους των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στα κορίτσια που θα γεννηθούν και τα οποία με τη σειρά τους θα κυοφορήσουν νέα έμβρυα.

Αναλυτικότερα, η μελέτη μας ξεκίνησε με την ομάδα των γυναικών με καθέξιν αποβολές (ΟΜΑΔΑ Α). Συγκεκριμένα, επιλέξαμε ζευγάρια με καθέξιν αποβολές, όπου αφού αποκλείστηκαν όλοι οι κλινικοί και συνηθέστεροι γενετικοί λόγοι (μεταθέσεις και ανασυνδυασμοί των χρωμοσωμάτων), αναζητήσαμε διαταραχές στο πρότυπο μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X στο περιφερικό αίμα των γυναικών. Είναι γνωστό ότι η μεθυλίωση στο DNA του χρωμοσώματος X σχετίζεται με την αδρανοποίησή του.

Για κάποιες από τις γυναίκες (όπου ήταν εφικτό) υπήρξε διαθέσιμο δείγμα ιστού από προϊόντα αποβολών, εκεί έγινε και ανάλυση του καρυότυπου του ιστού προκειμένου να εξετάσουμε την περίπτωση κάποιας κληρονομούμενης χρωμοσωμικής ανωμαλίας.

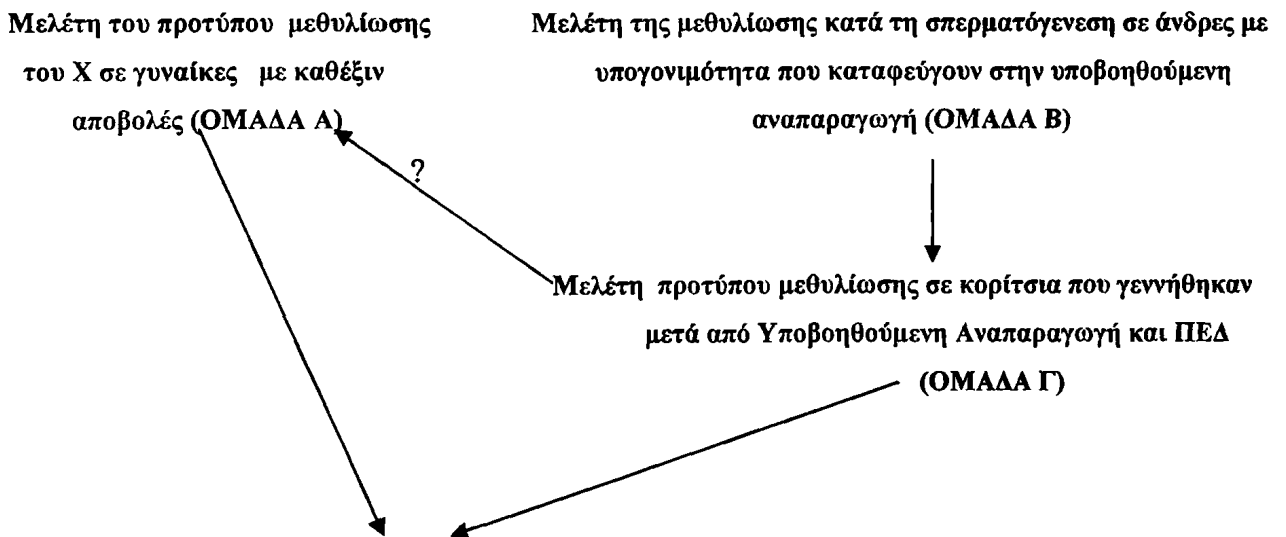
Στη συνέχεια η δεύτερη μεγάλη ομάδα της μελέτης μας (ΟΜΑΔΑ Β) περιλαμβάνει υπογόνιμους άνδρες που κατέφυγαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στόχος μας η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA στα γεννητικά κύτταρα αυτών των ανδρών. Συγκεκριμένα μελετήσαμε το πρότυπο μεθυλίωσης δύο γονιδίων που εντοπίζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα, το φυλετικό X και το αυτοσωματικό 15. Η μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδιακών αυτών περιοχών αποτέλεσε το μέσο για να εκτιμήσουμε την περιεκτικότητα σε γαμετικά κύτταρα των ορχικών ιστών των συγκεκριμένων ανδρών. Τα αποτελέσματα της μοριακής μελέτης συγκρίθηκαν με εκείνα της κλασικής μεθόδου μικροσκοπίας για όλα τα δείγματα. Η μελέτη μας υποδεικνύει ότι ένας υπογόνιμος άνδρας μπορεί ενδεχομένως να παρουσιάζει διαταραγμένη σπερματογένεση λόγω σφάλματος κατά την εγκατάσταση του σωστού προτύπου μεθυλίωσης στο DNA του ορχικού του ιστού.



Στη συνέχεια στα πλαίσια της μελέτης της σχέσης μεθυλίωσης και υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στραφήκαμε σε κορίτσια που έχουν γεννηθεί με τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και στα οποία έχει γίνει ΠΕΔ (ΟΜΑΔΑ Γ). Η αρχική ιδέα ήτανε κατά πόσο όλοι οι χειρισμοί στη διάρκεια της ΠΕΔ για την απομάκρυνση των βλαστομεριδίων μπορούν να διαταράξουν το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X και εάν όντως μπορούν, τότε κατά πόσο τα κορίτσια αυτά μπορεί να εκδηλώσουν αργότερα προβλήματα με καθέξιν αποβολές.

Τέλος, κατασκευάσαμε 119 ανιχνευτές κατά μήκος του χρωμοσώματος X με σκοπό να ανιχνεύσουμε πιθανές ελλείψεις ή διπλασιασμούς που μπορεί να σχετίζονται με τις αποβολές στις γυναίκες. Μακροπρόθεσμος στόχος η εφαρμογή τους με την μέθοδο των μικρο-συστοιχιών (DNA micro-arrays) σε γυναίκες με καθέξιν αποβολές για ανίχνευση ελλείψεων ή διπλασιασμών κατά μήκος του X.

Ακολουθεί εκτενής συζήτηση των αποτελεσμάτων μας για κάθε ομάδα πληθυσμού ξεκινώντας από τις γυναίκες με καθέξιν αποβολές, περνώντας στους υπογόνιμους άνδρες που καταφεύγουν στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή και καταλήγοντας σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από ΠΕΔ. Η πορεία της μελέτης μας, καθώς και οι διαδοχικές ομάδες και η σχέση που τις συνδέει περιγράφονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα.



Συμπεράσματα για το ρόλο της μεθυλίωσης στην αναπαραγωγή

(διαταραχές του προτύπου μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X→καθέξιν αποβολές) και (διαταραχές μεθυλίωσης DNA→διαταραγμένη σπερματογένεση→τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής→γέννηση κοριτσιών με διαταραγμένο πρότυπο μεθυλίωσης?→εμφάνιση καθέξιν αποβολών στην αναπαραγωγική ηλικία?)



ΓΥΝΑΙΚΕΣ ΜΕ ΚΑΘΕΞΙΝ ΑΠΟΒΟΛΕΣ (ΟΜΑΔΑ Α)

16. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε ελληνικό πληθυσμό γυναικών με ιδιοπαθείς αποβολές.

Στο δείγμα του πληθυσμού που μελετήθηκε στην εργασία μας καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το ποσοστό ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με ≥ 2 συνεχείς αποβολές πρώτου τριμήνου και αδιευκρίνιστης αιτιολογίας, διαμορφώνεται στο 10.7%. Επομένως, υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και συνεχών αποβολών, αν και η διαφορά σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό για γυναίκες-μάρτυρες με αποδεδειγμένη γονιμότητα (3.6%, $P=0.271$) δεν είναι ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική.

Όπως προαναφέρθηκε, από τις 74 γυναίκες-ασθενείς με ιστορικό ιδιοπαθών αποβολών και τις 80 γυναίκες-μάρτυρες που μελετήθηκαν, πληροφοριακές για την (CAG)_n πολυμορφική περιοχή του γονιδίου του υποδοχέα των ανδρογόνων (HUMARA) ήταν οι 56 (75.7%) και 55 (68.8%) γυναίκες, αντίστοιχα.

Στα αποτελέσματά μας η συχνότητα ετεροζυγωτίας διαμορφώνεται κατά μέσο όρο στο 72.25% και είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη κάποιων μελετών (Lanasa et al., 1999 and 2001; Uehara et al., 2001; Sullivan et al., 2003), όπου αγγίζει σχεδόν το ποσοστό του 90%. Είναι πιθανό το όχι ιδιαίτερα υψηλό ποσοστό πληροφορικότητας της εργασίας μας να οφείλεται στην ομοιογένεια του πληθυσμού, σε αντίθεση με τις άλλες μελέτες που περιλαμβάνουν πολυφυλετικό δείγμα πληθυσμού. Πάντως και από άλλες μελέτες έχουν αναφερθεί μικρά ποσοστά ετεροζυγωτίας για τη συγκεκριμένη πολυμορφική θέση (Sangha et al., 1999; Bagislar et al., 2006).

Η ομάδα των ασθενών αλλά και των μαρτύρων που μελετάμε προέρχεται από τη Βόρειο-δυτική Ελλάδα, μια περιοχή με 500.000 περίπου πληθυσμό. Αναφέρεται ότι το περιορισμένο ποσοστό ετεροζυγωτίας μπορεί να οφείλεται και στο μικρό μέγεθος του πληθυσμού, το οποίο τελικά μειώνει την ποικιλομορφία των αλληλομόρφων (Pääbo et al., 1995).

Ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση βρέθηκε στη μελέτη μας σε έξι γυναίκες, δηλαδή σε αναλογία 1 στα 8 ζευγάρια, όπως και σε προηγούμενες μελέτες (πίνακας 9).



Αναφορές	Γυναίκες με ιδιοπαθείς αποβολές		Γυναίκες-μάρτυρες	
	Αριθμ. ετεροζυγωτών/Αριθμός (%) γυναικών με Α.Ε.Α		Αριθμ. ετεροζυγωτών/Αριθμός (%) γυναικών με Α.Ε.Α	
Lanasa et al., 1999	48	7/48 (14.6%)	68	1/68 (1.5%)
Sangha et al.,1999	76	14/76 (18%)	111	6/111 (5%)
Lanasa et al.,2001	105	15/105 (14.3%)	100	1/100 (1%)
Uehara et al., 2001	42	7/42 (16.7%)	36	2/36 (5.6%)
Beever et al.,2003	207	25/207 (12%)	99	7/99 (7%)
Sullivan et al.,2003	106	7/106 (6.6%)	102	4/102 (3.9%)
Kim et al.,2004	45	1/45 (2.2%)	54	5/54 (9.3%)
Dasoula et al.,2007	56	6/56 (10.7%)	55	2/55 (3.6%)
Bagislar et al.,2006	62	11/62 (17.7%)	124	2/124 (1.6%)

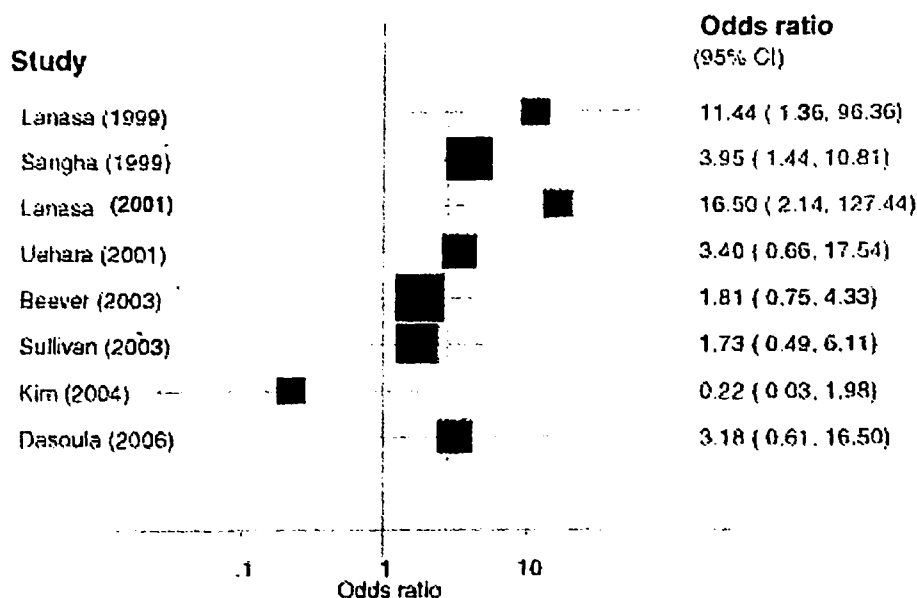
(*Fetal Diagnosis and Therapy, Dasoula et al.,2007*)

Σύντμηση: Α.Ε.Α: ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση

Πίνακας 9. Προηγούμενες μελέτες του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με ιδιοπαθείς αποβολές και γυναίκες-μάρτυρες. Όταν τα ποσοστά της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X μεταξύ των ασθενών και γυναικών-μαρτύρων δεν έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά, υποθέτουμε ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο φαινομένων.

Υπολογίσαμε τους λόγους αναλογιών (odds ratio) και τον σχετικό κίνδυνο (relative risk) για κάθε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα των επεξεργασιών είναι παρόμοια. Το γράφημα που ακολουθεί αναπαριστά τους λόγους αναλογιών (odds ratio) σε κάθε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί.





(*Fetal Diagnosis and Therapy, Dasoula et al., 2007*)

Γράφημα 1. Όλες οι δημοσιευμένες εργασίες αναπαριστώνται στο γράφημα, όπου τα μαύρα κουτιά δεξιά της αφετηρίας των αξόνων (1 odds ratio) δείχνουν μια αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης ιδιοπαθών αποβολών σε γυναίκες με ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X, ενώ τα μαύρα κουτιά αριστερά της αρχής των αξόνων, υποδηλώνουν μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης των αποβολών.

Το συμπέρασμα λοιπόν που προκύπτει από τη δική μας μελέτη για τη συγκεκριμένη ομάδα του ελληνικού πληθυσμού, είναι ότι υπάρχει τριπλάσια πιθανότητα εμφάνισης συνεχών αποβολών σε γυναίκες με πρότυπο ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Οι ερευνητικές εργασίες των Lanasa (1999 και 2001), Uehara (2001), Sangha (1999) επίσης υποστηρίζουν τη σχέση καθέξιν αποβολών και ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης αποβολών –μέχρι σήμερα– έχουν παρουσιάσει οι μελέτες των Lanasa (1999 και 2001) με ενδεκαπλάσια και δεκαεξαπλάσια πιθανότητα εμφάνισης αποβολών, του Uehara (2001) με τριπλάσια πιθανότητα εμφάνισης και του Sangha (1999) με τετραπλάσια πιθανότητα εμφάνισης.

Γενικά, το ποσοστό της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X για την ομάδα του ελληνικού πληθυσμού που επιλέξαμε, διαμορφώνεται στο 10.7% και είναι συγκρίσιμο με το 12.59% (όπως προκύπτει από τις διεθνείς μελέτες) που ισχύει για τις γυναίκες με καθέξιν αποβολές. Επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι ο πληθυσμός που



μελετήσαμε είναι ομοιογενής, χωρίς να παρουσιάζει τον πολυφυλετικό χαρακτήρα άλλων εργασιών που πραγματοποιήθηκαν σε πολιτείες όπως πχ. της Αμερικής και του Καναδά.

Σε σχέση με τις εργασίες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία φαίνεται ότι υπάρχουν κάποιες διαφοροποιήσεις που αφορούν κυρίως στον αριθμό των γυναικών που συμπεριλαμβάνονται, αλλά και στα κριτήρια ένταξής τους. Από τον πίνακα 9 είναι εμφανές ότι και άλλες μελέτες (Uehara et al., 2001; Kim et al., 2004) έχουν παρόμοιο μέγεθος του υπό μελέτη πληθυσμού. Αξίζει όμως να υπενθυμίσουμε ότι οι γυναίκες-ασθενείς της εργασίας μας εντάχθηκαν στην ομάδα μελέτης μας μετά από πολύ αυστηρό έλεγχο και με πολύ αυστηρά και περιοριστικά κριτήρια, κατά συνέπεια το αρχικό δείγμα που συλλέχθηκε περιορίστηκε σε σημαντικό βαθμό (πραγματοποιήθηκε μια σειρά εξετάσεων πχ. ενδοκρινολογικές, έλεγχος θρομβοφιλίας κ.α. που ήταν τελικά αρνητικές).

16.1 Αιτίες συνεχών αποβολών γενετικής φύσεως

Δεν είναι ακόμη ξεκάθαρο εάν υπάρχει κάποια αιτιολογική σχέση μεταξύ ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και ιδιοπαθών αποβολών. Όπως επίσης, δεν είναι ακόμη γνωστός ο μηχανισμός που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αυτό το αποτέλεσμα, εάν όντως ισχύει η συσχέτιση.

Ο Lanasa (2001) υπέθεσε ότι υπολειπόμενα φυλοσύνδετα θνησιγόνα γονίδια μπορεί να προκαλέσουν την ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X σε γυναίκες-φορείς και τον θάνατο, αντίστοιχα σε αρρενα-άτομα φορείς. Στη δική μας ομάδα των ασθενών, αν και υπάρχουν τέσσερις γυναίκες-ασθενείς με ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του X και επιτυχείς κύσεις, εντούτοις δεν υπάρχει κάποια εμφανής κυριαρχία των θήλεων απογόνων σε βάρος των αρρενων. Εάν όντως οι γυναίκες αυτές είχαν αποκτήσει μόνο θήλεα άτομα, τότε θα ευσταθούσε η υποψία ύπαρξης κάποιου θνησιγόνου γονιδίου. Άρα, και στα τέσσερα αυτά περιστατικά αποκλείεται η πιθανότητα τέτοιας μετάλλαξης.

Είναι πολύ πιθανό ο μηχανισμός της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X, να έχει γενετικό υπόβαθρο: για παράδειγμα γονιδιακή μετάλλαξη στο XIST γονίδιο, «κρυφές» χρωμοσωμικές ανωμαλίες κατά μήκος του X ή και άγνωστες ακόμη μεταλλάξεις κατά μήκος του X. Αν και όλοι οι ασθενείς της μελέτης μας έχουν φυσιολογικό καρυότυπο (μετά από χρώση με Giemsa), τίποτα δεν μπορεί να αποκλείσει το ενδεχόμενο ύπαρξης μιας κρυφής χρωμοσωμικής ανωμαλίας. Ο Plenge (Plenge et al., 1997) πρώτος ανέφερε σημειακή



μετάλλαξη στον υποκινητή του γονιδίου του XIST (μετατροπή του C σε G), υπεύθυνη για την ακραία αδρανοποίηση του X σε δύο οικογένειες.

Έχει επίσης ειπωθεί ότι η ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X μπορεί να είναι κληρονομικό γνώρισμα που εντοπίζεται σε πολλά μέλη της ίδιας οικογένειας. Ο Pegoraro (Pegoraro et al.,1997) ανέφερε έλλειψη στο Xq28 και ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του X σε πολυμελή οικογένεια με ιδιοπαθείς αποβολές.

Από την άλλη πλευρά, η ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του X μπορεί να συμβεί εντελώς τυχαία, πιθανόν λόγω περιορισμένου μεγέθους του εμβρυϊκού κυτταρικού πόλου κατά την εμβρυογένεση και όταν γίνεται η «επιλογή» του χρωμοσώματος X που θα αδρανοποιηθεί (Sangha et al.,1999; Sullivan et al.,2003).

Στη μελέτη μας περιλαμβάνονται δύο πολυμελείς οικογένειες με ιστορικό αποβολών στα μέλη τους. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και για τις δύο οικογένειες, έδειξε τυχαία αδρανοποίηση.

16.2 Λόγοι για τους οποίους το ποσοστό ακραίας αδρανοποίησης στη μελέτη μας δεν είναι στατιστικά σημαντικό σε σχέση με εκείνο των μαρτύρων

Στην παρούσα εργασία, αν και το αποτέλεσμά μας συγκλίνει με εκείνο της πλειοψηφίας των αντίστοιχων εργασιών του παρελθόντος, εντούτοις δεν είναι στατιστικά σημαντικό. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε μια σειρά από λόγους.

Αρχικά, μια σημαντική δικαιολογία αποτελεί η επιλογή των κριτηρίων που εφαρμόσαμε. Η παρούσα μελέτη περιλαμβάνει ασθενείς με ≥ 2 συνεχείς αποβολές πρώτου τριμήνου, για τις οποίες δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες, ανατομικές ανωμαλίες της μήτρας, το σύνδρομο των αντι-φωσφολιπιδίων, μεταβολικές και ορμονικές διαταραχές έχουν αποκλεισθεί. Γι'αυτόν ακριβώς το λόγο κατατάσσουμε τις περιπτώσεις των αποβολών που μελετάμε στις ιδιοπαθείς.

Αντιθέτως, ο Lanasa (Lanasa et al.,2001) δεν αποκλείει από τη μελέτη του γυναίκες με διαταραχές στον θυρεοειδή ή άλλα ορμονικά προβλήματα. Επιπλέον, αναφέρει συχνότητα ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X για τις γυναίκες-μάρτυρες της δικής τους εργασίας σε ποσοστό 1.5% που είναι μικρότερο από το αντίστοιχο της δικής μας ομάδας (3.6%), αλλά και αυτού που έχει αναφερθεί για τον γενικό πληθυσμό (3.2-3.5%)(Gale et al.,1997; Plenge et al.1997).

Ο Sangha (Sangha et al.,1999) απέκλεισε από τη μελέτη του μόνο τους ασθενείς που είχαν κάποια χρωμοσωματική ανωμαλία, ενώ ο Uehara (Uehara et al.,2001) απέκλεισε εκείνους με



δομικές χρωμοσωματικές ανωμαλίες, διαταραχές στον θυρεοειδή και το σύνδρομο των αντι-φωσφολιπιδίων.

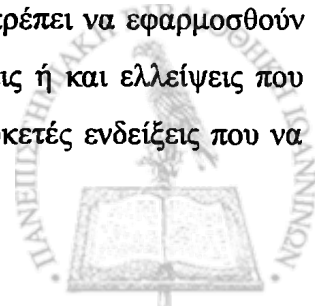
Η μελέτη μας βασίστηκε στην χρήση ενζύμων ευαίσθητων στη μεθυλίωση για το HUMARA γονίδιο, με σκοπό να διακρίνουμε το ενεργό από το αδρανοποιημένο χρωμόσωμα X. Η μέθοδος αυτή προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Allen (1992) και προϋποθέτει την πλήρη πέψη του μη-μεθυλιωμένου DNA. Επομένως, ίσως η χρήση τέτοιων ενζύμων οδηγήσει σε μια υποτίμηση του πραγματικού βαθμού επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε ορισμένα άτομα και συμβάλλει με αυτό τον τρόπο σε ελαφρά τροποποίηση των παρατηρούμενων ποσοστών μεταξύ των διαφόρων ομάδων. Στη μελέτη μας η πλήρης πέψη του γενωμικού DNA πιστοποιείται από την πλήρη απουσία προϊόντος μετά την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης στα άρρενα άτομα.

Είναι γνωστό ότι το ποσοστό της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X αυξάνεται με την ηλικία (Busque et al., 1996; Sharp et al., 2000). Στα αποτελέσματά μας η διανομή των ποσοστών επιλεκτικής αδρανοποίησης δεν διαφέρει μεταξύ ασθενών και μαρτύρων. Μια πολύ πιθανή αιτία είναι η εναρμόνιση ηλικιακά των ασθενών και των γυναικών-μαρτύρων. Ο Lanasa (1999) περιέλαβε ασθενείς σημαντικά μεγαλύτερους από τους μάρτυρες και ίσως αυτό να επηρέασε το τελικό του αποτέλεσμα.

Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι η παρούσα εργασία είναι η δεύτερη μετά από εκείνη των Sullivan και συνεργατών που κάνει τη διάκριση ανάμεσα σε πρωτογενείς και δευτεροπαθείς αποβολές. Αν και το δείγμα δεν είναι ικανοποιητικό σε μέγεθος για ένα αδιαμφισβήτητο στατιστικά αποτέλεσμα (όπως και στην μελέτη των Sullivan και συνεργατών), εντούτοις μας επιτρέπεται να εικάσουμε ότι το ποσοστό ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X μεταξύ γυναικών με πρωτογενείς και δευτεροπαθείς αποβολές δεν φαίνεται να διαφέρει.

Επιπλέον, το δείγμα του πληθυσμού που μελετήσαμε προέρχεται από μια γεωγραφικά και εθνικά ομοιογενή περιοχή. Αν και δεν έχουν μέχρι στιγμής αναφερθεί διαφορετικά ποσοστά ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με διαφορετική εθνικότητα, τίποτα δεν μπορεί να αποκλείσει και αυτό το ενδεχόμενο.

Το θέμα της ακραίας επιλεκτικής αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και της συσχέτισης που μπορεί να έχει με τις συνεχείς αποβολές είναι ακόμη υπό αμφισβήτηση. Νέες μοριακές μέθοδοι, όπως η τεχνολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays) θα πρέπει να εφαρμοσθούν προκειμένου να εντοπιστούν τυχόν υπο-τελομεριδιακές ανακατατάξεις ή και ελλείψεις που μπορεί να οδηγήσουν σε αποβολές. Προς το παρόν δεν υπάρχουν αρκετές ενδείξεις που να



υποστηρίζουν την ενσωμάτωση του ελέγχου του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στα γενικότερα πλαίσια των εξετάσεων στις οποίες υποβάλλονται οι γυναίκες με αποβολές.

ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΙ ΑΝΔΡΕΣ (ΟΜΑΔΑ Β)

17. Μελέτη της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων SNRPN και HUMARA, σε βιοψίες ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών.

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την κατάσταση μεθυλίωσης δύο διαφορετικά κληρονομούμενων και μεθυλιωμένων περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος: του γονιδίου του υποδοχέα των ανδρογόνων (HUMARA) που βρίσκεται στο φυλετικό χρωμόσωμα X και του γονιδίου SNRPN που βρίσκεται στο αυτόσωμα 15. Το υλικό της μελέτης μας περιλαμβάνει 86 δείγματα από βιοψίες ορχικού ιστού. Παράλληλα, τα ίδια δείγματα παραπέμφθησαν και για μικροσκοπική εξέταση, με σκοπό να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων των χρησιμοποιούμενων μεθόδων και αξιολόγησή τους.

Τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να έχουν κλινική εφαρμογή, αφού η μεθυλίωση του γονιδίου HUMARA κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, αλλά και το φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης στο οποίο υπόκειται το γονίδιο SNRPN θα μπορούσαν να αποτελέσουν δείκτες της περιεκτικότητας των ορχικών ιστών σε γαμετικά κύτταρα. Επισημαίνουμε ακόμη, ότι η απουσία σπερματοζωαρίων εκφράζεται από ένα μη-φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, γι' αυτό και η μεθυλίωση είναι ενδεχομένως συνυφασμένη με τη διαθεσιμότητα σε γαμετικά κύτταρα των όρχεων, αλλά και το στάδιο στο οποίο σταματά η σπερματογένεση στους υπογόνιμους άνδρες.

Στα αποτελέσματά μας για τους άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία (πίνακας 5, Αποτελέσματα) υπάρχει πλήρης ομοφωνία μικροσκοπίας και των δύο μοριακών μεθόδων. Δηλαδή φαίνεται ότι και στους 12 επιβεβαιώνεται και με τις τρεις μεθόδους (μικροσκοπία, μελέτη του γονιδίου HUMARA και του SNRPN) η ύπαρξη γαμετικών κυττάρων.

Αντιθέτως, για τους άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία υπάρχει διαφοροποίηση στα αποτελέσματα των χρησιμοποιούμενων μεθόδων (πίνακας 6, Αποτελέσματα). Η κλασική μέθοδος της μικροσκοπίας δείχνει να βρίσκεται σε συμφωνία περισσότερο με τη μοριακή μέθοδο μελέτης του γονιδίου SNRPN, η οποία τελικά αποδεικνύει την παρουσία σπερματοζωαρίων στην πλειοψηφία των δειγμάτων ιστών που ήταν θετικά για σπερματοζωάρια με το μικροσκόπιο. Η ανάλυση του γονιδίου HUMARA έδειξε μεθυλίωση στο στάδιο της παχυνταίας κατά τη σπερματογένεση και άρα ύπαρξη γαμετικών κυττάρων



(ανώριμων) για τους 11 ασθενείς μόνο που πάσχουν από το σύνδρομο της πρόϊμης διακοπής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων (maturation arrest syndrome).

Γενικά, για τα διάφορα γονίδια που υφίστανται τη γονιδιωματική αποτύπωση εκείνο που γνωρίζουμε είναι ότι η εγκατάσταση επιγενετικού σήματος του πατρικού αλληλομόρφου πραγματοποιείται σε διαφορετικές-κατά περίπτωση-χρονικές στιγμές κατά τη σπερματογένεση. Σύμφωνα με τα τελευταία βιβλιογραφικά δεδομένα, η σωστή εδραίωση του μη-μεθυλιωμένου πατρικού SNRPN αλληλομόρφου (paternal imprint) γίνεται στα στάδια των στρογγυλών και επιμηκυσμένων σπερματίδων, καθώς και των ώριμων σπερματοζωαρίων, δηλαδή κατά την απλοειδική φάση (Manning et al., 2001). Τα γαμετικά κύτταρα των προηγούμενων σταδίων δεν έχουν ακόμη εγκαταστήσει το πατρικής προέλευσης γονιδιωματικό αποτύπωμα.

Το γονίδιο SNRPN είναι επομένως από εκείνα που τελευταία χρονικά εγκαθιστούν το πατρικό γονιδιακό αποτύπωμα και γι' αυτόν ακριβώς το λόγο τα αποτελέσματα από τη μελέτη του βρίσκονται σε μεγάλη συνάφεια με τα αποτελέσματα της μικροσκοπίας, όπου επίσης αναγνωρίζονται κυρίως τα τελικά στάδια της σπερματογένεσης.

Όσον αφορά το γονίδιο HUMARA, η μεθυλίωση είναι ορατή μόνο στο στάδιο της παχυταινίας κατά τη μείωση και πιθανόν σε κανένα άλλο κατά την ωρίμανση του σπερματοζωαρίου (Wang et al., 2004). Ίσως τελικά, αυτό να αποτελεί έναν τρόπο ερμηνείας των αποτελεσμάτων του πίνακα 6 (Αποτελέσματα), όπου φαίνεται και το χαμηλό ποσοστό δειγμάτων θετικών για σπερματοζωάρια με τη μέθοδο του HUMARA στους άνδρες αυτούς.

Συμπερασματικά, η μελέτη του γονιδίου SNRPN καλύπτει ένα ευρύτερο χρονικό φάσμα της σπερματογένεσης, ενώ η μελέτη του γονιδίου HUMARA εστιάζεται και είναι πληροφοριακή μόνο για το στάδιο της παχυταινίας, τότε δηλαδή που συμβαίνει και η προσωρινή αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X.

Όλες οι προηγούμενες παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση της μεθυλίωσης για το γονίδιο SNRPN παρέχει διαφορετικές πληροφορίες σε σχέση με το HUMARA για την σπερματογένεση και βρίσκεται σε μεγαλύτερη συμφωνία με τη μέθοδο της μικροσκοπίας. Όσον αφορά τη διακύμανση των σταδίων της σπερματογένεσης που συμβαδίζει με την παρουσία της μεθυλίωσης, η μελέτη του HUMARA έχει κάποιους περιορισμούς, αφού όπως προαναφέραμε περιορίζεται σε μια πολύ συγκεκριμένη φάση της σπερματογένεσης. Από την άλλη, η μελέτη του SNRPN είναι πληροφοριακή –κυρίως– για άνδρες τους οποίους η μέθοδος μικροσκοπίας έδειξε θετικούς σε σπερματοζωάρια.



Τα αποτελέσματά μας επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι οι περισσότεροι άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία παρουσιάζουν έναν εμπλουτισμένο σε σωματικά κύτταρα πληθυσμό (βάση της μελέτης της μεθυλίωσης). Παρ' όλα αυτά και γαμετικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από έναν υπο-πληθυσμό ανδρών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, όπως έχει αναφερθεί και σε άλλες μελέτες (Devroey, 1998).

Μια επιπλέον ερμηνεία για τα διαφορετικά αποτελέσματα μεταξύ μικροσκοπίας και μοριακών αναλύσεων στην εργασία μας είναι ότι κάποιοι ιστοί δεν παρουσιάζουν ομοιόμορφη κατανομή των σπερματοζωαρίων, αλλά αντίθετα έναν εστιακό εντοπισμό της σπερματογένεσης. Σύμφωνα με τον Silber (Silber et al., 2000) όταν υπάρχει σπερματογένεση στους άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία, αυτή εμφανίζεται διάχυτη στον ορχικό ιστό και όχι κάπου τοπικά εντοπισμένη. Η μέθοδος της ανοιχτής βιοψίας που πραγματοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, αφαιρεί μεγαλύτερο κομμάτι ιστού απ' ότι θα αφαιρούσε η μέθοδος αναρρόφησης με βελόνα (Silber et al., 2000), και πιθανώς να επιτυγχάνεται με τον τρόπο αυτό απόκλιση των αποτελεσμάτων μικροσκοπίας και μοριακής μελέτης της μεθυλίωσης.

Έχει μεγάλη κλινική σημασία η ανακάλυψη δεικτών για τον εντοπισμό εστιών σπερματογένεσης σε δείγματα ορχικού ιστού, με δεδομένο ότι οι ιστολογικές εξετάσεις που γίνονται σε δείγματα βιοψιών για διαγνωστικούς λόγους, η μέτρηση των επιπέδων της περιφέρεικής FSH ορμόνης του ορού, των επιπέδων της ορμόνης inhibin-B και το μέγεθος των όρχεων, δεν αποτελούν σημαντικά αξιόπιστους μάρτυρες (Devroey, 1998).

Έχοντας όλα τα προηγούμενα υπ' όψιν, προτείνουμε μια νέα εναλλακτική μέθοδο ελέγχου της παρουσίας ή απουσίας σπερματοζωαρίων στους ορχικούς ιστούς αζωοσπερμικών ανδρών. Η μελέτη μας δείχνει ότι ένας υπογόνιμος άνδρας μπορεί ενδεχομένως να παρουσιάζει διαταραγμένη σπερματογένεση λόγω σφάλματος κατά την εγκατάσταση του σωστού προτύπου μεθυλίωσης στο DNA του ορχικού του ιστού. Η κλινική αξία των αποτελεσμάτων μας είναι ακόμη υπό θεώρηση και μένει να δοκιμασθεί η μέθοδός μας σε περιπτώσεις ανδρών με διακοπή της σπερματογένεσης κατά την φάση των σπερματοκυττάρων και αρνητικά αποτελέσματα κατά την ανίχνευση σπερματοζωαρίων με τη μικροσκοπική εξέταση.

Ίσως το συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης που ανιχνεύεται στο DNA ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών που διαθέτουν ανώριμα γαμετικά κύτταρα (πχ σύνδρομο πρώιμης διακοπής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων) να εγκυμονεί και κάποια προβληματική συμπεριφορά των κυττάρων αυτών αργότερα κατά τη διαδικασία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, λόγω ενδεχόμενων λαθών κατά την εγκατάσταση και διατήρηση του γονιδιωματικού αποτυπώματος (Horsthemke and Ludwig, 2005-Review).



Πρόσφατα και άλλες μέθοδοι προτάθηκαν για την εκτίμηση της περιεκτικότητας των ορχικών ιστών σε γαμετικά κύτταρα. Οι Yamamoto (Yamamoto et al., 2002) και Giannakis (Giannakis et al., 2004) προτείνουν την ποσοτικοποίηση της δραστηριότητας του ενζύμου της τελομεράσης προκειμένου να εκτιμήσουν την παρουσία γαμετικών κυττάρων σε υπογόνιμους άνδρες. Αναφέρουν συγκεκριμένα ότι η δράση του ενζύμου είναι αυξημένη μέχρι το στάδιο των στρογγυλών σπερματίδων και ότι κατά τη μετάβαση στα σπερματοζωάρια παρεμποδίζεται. Η ομάδα των Brugo-Olmedo (Brugo –Olmedo et al., 2001) χρησιμοποιεί τα επίπεδα της πρωτεΐνης inhibin-B για να προβλέψει την παρουσία ή μη σπερματοζωαρίων σε άνδρες με μη αποφρακτική αζωοσπερμία. Η τρέχουσα μελέτη είναι ίσως, η πρώτη που χρησιμοποιεί μια μοριακή γενετική προσέγγιση για την εκτίμηση της περιεκτικότητας των ορχικών ιστών υπογόνιμων ανδρών. Ενδεχομένως, η προτεινόμενη προσέγγιση να είναι χρήσιμη για τις περιπτώσεις της μη αποφρακτικής αζωοσπερμίας.

ΚΟΡΙΤΣΙΑ ΠΟΥ ΓΕΝΝΗΘΗΚΑΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΕΔ (ΟΜΑΔΑ Γ)

18. Μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από προεμφυτευτική διάγνωση (ΠΕΔ)

Κανένα στοιχείο δεν υπάρχει στη διεθνή βιβλιογραφία που να συσχετίζει τη διαδικασία της ΠΕΔ με διαταραχές του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε το πρότυπο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε DNA που απομονώθηκε από αίμα ομφαλίου και πλακούντες 22 κοριτσιών που γεννήθηκαν μετά από ΠΕΔ. Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε μια προσπάθεια να διαπιστώσουμε κατά πόσο η όλη διαδικασία της βιοψίας για τη λήψη των προς εξέταση κυττάρων μετά την γονιμοποίηση και της ανθρώπινης παρέμβασης γενικότερα, μπορούν να επηρεάσουν φυσιολογικές διαδικασίες εντός των κυττάρων (πχ. εγκατάσταση του σωστού προτύπου μεθυλίωσης του DNA).

Η βιοψία ως γνωστό γίνεται στο στάδιο των 8-12 κυττάρων όπου και τα δύο X χρωμοσώματα (μητρικής και πατρικής προέλευσης) είναι ενεργά. Λίγο αργότερα, στην τροφοβλάστη εμφανίζεται επιλεκτική αδρανοποίηση του πατρικού X χρωμοσώματος (Huynh and Lee, 2004; Mak et al., 2004; Okamoto et al., 2004), ενώ η διαδικασία της τυχαίας αδρανοποίησης ξεκινά μετά την πλήρη εμφύτευση του εμβρύου στο ενδομήτριο και εντοπίζεται στο κυρίως έμβρυο.



Σκεφτήκαμε ότι η αφαίρεση των δύο προς εξέταση βλαστομεριδίων ίσως διαταράσσει το μικρο-περιβάλλον των εναπομείναντων κυττάρων και επηρεάζει κατ'επέκταση την έναρξη της διαδικασίας τυχαίας αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στο κυρίως έμβρυο. Τα αποτελέσματά μας έδειξαν φυσιολογικό πρότυπο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X για όλα τα δείγματα. Επομένως, φαίνεται ότι η απόσπαση των δύο προς εξέταση κυττάρων δεν ανατρέπει κάποια ισορροπία όπως αρχικά υποθέσαμε. Το δείγμα μας βέβαια δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλο για γενίκευση των συμπερασμάτων μας, όμως η απουσία έστω και ενός παθολογικού ευρήματος μας επιτρέπει να υποθέτουμε ότι μάλλον δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ διαταραχής προτύπου του χρωμοσώματος X και ΠΕΔ.

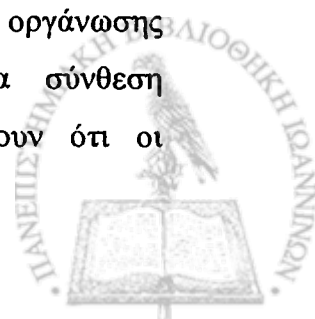
Για το ποντίκι τα πράγματα είναι πολύ πιο διασαφηνισμένα, εκεί το πατρικής προέλευσης χρωμόσωμα X είναι αδρανοποιημένο για μεγάλο διάστημα πριν από την εμφύτευση στο ενδομήτριο (Okamoto, 2004; Mak, 2004; Huynh and Lee, 2003). Επομένως αφαιρώντας δύο βλαστομερίδια ενδέχεται να απομακρύνουμε κάποιο αδρανοποιημένο πατρικό X επηρεάζοντας στη συνέχεια τη διαδικασία επανεργοποίησής του και την έναρξη αργότερα της διαδικασίας τυχαίας αδρανοποίησης.

19. Κυτταρογενετικές εξετάσεις σε ζευγάρια με καθέξιν αποβολές

Πραγματοποιήσαμε τις κλασικές κυτταρογενετικές εξετάσεις στα ζευγάρια με καθέξιν αποβολές προκειμένου να αποκλείσουμε την πιθανότητα ύπαρξης κάποιας χρωμοσωμικής ατυπίας (μεταθέσεις, ανασυνδυασμοί).

19.1 Καρυότυπος γονέων- Πολυμορφισμοί των χρωμοσωμάτων

Σε ένα ποσοστό περίπου 4% των ζευγαριών με καθέξιν αποβολές, ο ένας από τους δύο συζύγους είναι φορέας κάποιας αμοιβαίας ισορροπημένης μετατόπισης. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει η πιθανότητα το 50-70% των γαμετών και κατά συνέπεια το ίδιο το έμβρυο να φέρουν κάποια χρωμοσωματική ανωμαλία (Rai and Regan, 2006-Review). Όπως φαίνεται και στους πίνακες 1 και 2 (Αποτελέσματα) στα ζευγάρια που εξετάσαμε δεν υπήρξε κανένα τέτοιο παθολογικό εύρημα των γονιών. Εκείνοι όμως που σίγουρα είναι εμφανείς είναι οι διάφοροι πολυμορφισμοί που εντοπίσαμε (μεγάλες ετεροχρωματινικές περιοχές στα χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21, 22, 9 και Y, καθώς και αναστροφή στα χρωμοσώματα 9 και Y). Οι διάφοροι πολυμορφισμοί στα χρωμοσώματα θεωρούνται «φυσιολογικό εύρημα», αφού οι ετεροχρωματινικές περιοχές δεν περιέχουν κωδικές αλληλουχίες και τα κέντρα οργάνωσης πυρηνίσκων (nucleolar organizing regions-NOR), περιέχουν γονίδια για σύνθεση ριβοσωμικού RNA (r-RNA). Τελευταία όμως, τα νέα δεδομένα αναφέρουν ότι οι



πολυμορφισμοί συσχετίζονται με υπογονιμότητα και καθέξιν αποβολές (Prochi et al.,2005). Σύγχρονες μοριακές τεχνικές προτείνουν την ύπαρξη γονιδίων σχετιζόμενων με γονιμότητα και βιωσιμότητα στις ετεροχρωματικές περιοχές.

Για το χρωμόσωμα 9 ειδικότερα, έχει βρεθεί μια πληθώρα πολυμορφισμών (αναστροφές, ενδιάμεσοι και ενδοκυτταρικοί διπλασιασμοί της ετεροχρωματικής περιοχής) και θεωρείται ότι περιέχει τη μεγαλύτερη ποσότητα ετεροχρωματίνης σε σχέση με τα υπόλοιπα χρωμοσώματα. Πρόσφατα θεωρήθηκε ότι η μεταγραφική ενεργοποίηση των δομικών ετεροχρωματικών περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος, αποτελεί απόκριση σε συνθήκες στρες (Prochi et al.,2005). Αναφέρεται ειδικότερα ότι θερμικό στρες προκαλεί την περικεντρομεριδιακή συσσώρευση ετεροχρωματίνης (περιλαμβανομένου και του χρωμοσώματος 9).

Στην ίδια μελέτη (Prochi et al.,2005), ελέγχθηκε ο καρυότυπος 842 ατόμων με συνεχείς αποβολές που κατέφυγαν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Τελικά, 28.82% των ανδρών συζύγων και 17.19% των γυναικών συζύγων βρέθηκαν να είναι φορείς κάποιου πολυμορφισμού. Τα ποσοστά αυτά δεν θεωρούνται αμελητέα και επιπλέον, προτείνεται η καθιέρωση της εξέτασής τους για τυχόν ύπαρξή τους στους γαμέτες ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν.

Γενικά, το θέμα της συσχέτισης των πολυμορφισμών με την υπογονιμότητα είναι αμφιλεγόμενο. Μελέτες που ασχολήθηκαν με πολυμορφισμούς της ετεροχρωματίνης σε ακροκεντρικά χρωμοσώματα, στο Y, καθώς και στο 9, και με αναστροφές αυτής δεν βρήκαν συσχέτιση (Blumberg et al., 1982; Del Porto et al.,1993; Fryns et al.,1984). Υπήρξαν και μελέτες που βρήκαν συνάφεια (Sasiadek et al., 1997; Fortuny et al., 1988; Tsvetkova et al.,1979) μεταξύ των δύο φαινομένων.

Στη μελέτη μας από τα 74 ζευγάρια (δηλ.148 άτομα) βρέθηκε ότι φορείς πολυμορφισμών (μεγάλοι δορυφόροι στα χρωμοσώματα 13, 14, 15, 21, 22, 9 και Y, μεγάλη ετεροχρωματίνη ή αναστροφή αυτής στα χρωμοσώματα 9 και Y) είναι 40 άτομα δηλ. το 27% του συνόλου των εξεταζομένων ατόμων (πίνακες 1 και 2 στα Αποτελέσματα). Παρόμοια ποσοστά γύρω στο 20% έχουν αναφερθεί και από άλλες μελέτες (Sasiadek et al., 1997; Prochi et al.,2005).

Το ποσοστό ατόμων-φορέων πολυμορφισμών της μελέτης μας δεν μπορεί εύκολα να αγνοηθεί και ίσως να αποτελεί και ένα κίνητρο για μια πιο επιφυλακτική αντιμετώπιση τέτοιων ευρημάτων από εδώ και στο εξής, καθώς και για πιθανό συσχετισμό τους με τις καθέξιν αποβολές.



19.2 Κυτταρογενετική εξέταση σε προϊόντα αποβολών

Η κυτταρογενετική εξέταση σε ιστούς από προϊόντα αποβολών πραγματοποιήθηκε (όπου ήταν εφικτό) προκειμένου να αποκλείσουμε την ύπαρξη κληρονομούμενης χρωμοσωμικής ατυπίας στα ζευγάρια με καθέξιν αποβολές που μελετήσαμε. Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματά μας πρόκειται για *de novo* χρωμοσωμικές ανωμαλίες που εντοπίζονται μόνο στα έμβρυα.

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενη ενότητα, το 15% όλων των κλινικά αναγνωρισμένων κήσεων καταλήγει σε αποβολή, ενώ το 50% των δειγμάτων από τα προϊόντα αποβολών παρουσιάζει κάποια σοβαρή χρωμοσωματική ανωμαλία (Lockwood et al., 1992). Ένα ποσοστό των δειγμάτων των προϊόντων αποβολών που φτάνουν στα εργαστήρια κυτταρογενετικής για έλεγχο του καρυότυπου αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν και επομένως να γίνει η διάγνωση του καρυότυπου του εμβρύου. Παλαιότερα το ποσό αυτό ανέρχονταν στο 50% (Wolf et al., 1995), σήμερα όμως και με την εξέλιξη των εφαρμοζόμενων τεχνικών τείνει να μειωθεί. Υπάρχει μάλιστα και η υποψία ότι τα δείγματα που αποτυγχάνουν, μάλλον θα αποτελούνται από τμήματα ιστού με σοβαρή χρωμοσωματική ανωμαλία. Στην παρούσα μελέτη (πίνακας 4, Αποτελέσματα) τα μισά από τα δείγματά μας απέτυχαν να αναπτυχθούν, συνήθως λόγω μόλυνσης κατά τη λήψη και μεταφορά τους.

Ένα πολύ συχνό πρόβλημα που αντιμετωπίζουν τα εργαστήρια κατά την κυτταρογενετική μελέτη των προϊόντων αποβολής, είναι το φαινόμενο της μητρικής επιμόλυνσης, που οδηγεί στην εσφαλμένη παρατήρηση ότι τα περισσότερα δείγματα έχουν φυσιολογικό καρυότυπο θήλεος ατόμου 46,XX. Στα αποτελέσματά μας 3 μόνο δείγματα με φυσιολογικό καρυότυπο βρέθηκαν, με αναλογία φύλου 2 θηλυκά: 1 αρσενικό και στα οποία όπως ήδη αναφέραμε αποκλείστηκε η πιθανότητα της μητρικής επιμόλυνσης με μοριακούς δείκτες.

Είναι επίσης γεγονός ότι τα περισσότερα δείγματα από προϊόντα αποβολών δεν αποστέλλονται καν για κυτταρογενετική εξέταση, λόγω άγνοιας των ειδικών για την χρησιμότητα μιας τέτοιας εξέτασης. Ακόμα και στην περίπτωση όμως που ο κλινικός ιατρός γνωρίζει και θέλει να προβεί σε αυτή τη διαδικασία, είναι απαραίτητο να έχει και τις απαιτούμενες γνώσεις και την εμπειρία, ώστε να το πράξει σωστά. Θα πρέπει δηλαδή το κομμάτι του ιστού που θα παραδώσει στο εργαστήριο γενετικής να είναι καθαρό, όχι μολυσμένο και να περιλαμβάνει βιώσιμο τμήμα του υπό εξέταση ιστού. Επιπλέον, σημαντική παράμετρος της όλης διαδικασίας είναι η άμεση αποστολή στο εργαστήριο του δείγματος. Θα πρέπει να είναι ταχεία και χρησιμοποιώντας το κατάλληλο καλλιεργητικό μέσο.



Από τα αποτελέσματά μας προκύπτει ότι 2 έμβρυα παρουσίασαν τρισωμία (σε διαφορετικά χρωμοσώματα), 1 μονοσωμία X και 3 πολυπλοειδία. Από τη βιβλιογραφία (Rai and Regan, 2006-Review) γνωρίζουμε ότι οι συχνότερα απαντώμενες χρωμοσωματικές ανωμαλίες είναι: αυτοσωμικές τρισωμίες, μονοσωμία του X, πολυπλοειδίες και δομικές ανωμαλίες. Δηλαδή πράγματι τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα ισχύοντα βιβλιογραφικά δεδομένα.

20. Σύνθεση ανιχνευτών

20.1 Μέθοδος πολλαπλού υβριδισμού με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές (MAPH-multiplex amplifiable probe hybridization)-Γενικά

Μία τεχνική που θα έδινε γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα και θα μπορούσε να ανιχνεύσει μικρές κυτταρογενετικές ανακατατάξεις θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη διότι έτσι θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε πάνω στο χρωμόσωμα X τη θέση γονιδίων που σχετίζονται με αποβολές ή με την διαταραχή της αδρανοποίησης. Στα πλαίσια αυτά συμμετείχαμε σε ένα πολυκεντρικό ερευνητικό πρόγραμμα που σκοπό έχει την ανάπτυξη ειδικά σχεδιασμένων DNA-ανιχνευτών κατά μήκος του χρωμοσώματος X για την αποκάλυψη τυχόν μικροσκοπικών ελλείψεων ή διπλασιασμών, που θα μπορούσαν να διαταράξουν το φυσιολογικό πρότυπο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με ιδιοπαθείς αποβολές.

Ως γνωστόν, οι κλασικές κυτταρογενετικές τεχνικές μπορούν μόνο να εντοπίσουν χρωμοσωμικές αναδιατάξεις μεγέθους $\geq 5\text{MB}$. Κατά καιρούς έγιναν διάφορες προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων μεθόδων μεγαλύτερης διακριτικής ικανότητας. Σταθμό στην προσπάθεια αυτή αποτελεί (μετά την ανάπτυξη της μεθόδου του *in situ* υβριδισμού με φθορίζοντα μόρια: Fluorescence *In Situ* Hybridization- FISH), η ανάπτυξη της CGH (comparative genomic hybridization) μεθόδου δηλ. του συγκριτικού γονιδιωματικού υβριδισμού με δυνατότητα ευκρίνειας στα 3MB. Αργότερα, η εισαγωγή των μικροσυστοιχιών (CGH microarrays) αναβαθμίζει ακόμη περισσότερο τη συγκεκριμένη μέθοδο προσδίδοντας ευκρίνεια της τάξεως του 1 MB.

Εναλλακτική μέθοδο της CGH αποτελεί η MAPH (Multiplex Amplifiable Probe Hybridisation-πολλαπλός υβριδισμός με ταυτόχρονα ενισχυμένους ανιχνευτές), που επιτρέπει τον ακριβή και αξιόπιστο προσδιορισμό του αριθμού αντιγράφων του γονιδιώματος. Η αρχική MAPH όπως πρωτο-περιγράφηκε, περιελάμβανε την ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα ακρυλαμιδίου παρέχοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης ελλείψεων ή διπλασιασμών στο



γονιδίωμα μεγέθους έως 150bp. Το επόμενο βήμα ήταν η ανάπτυξη της μεθόδου MAPH με την χρήση μικροσυστοιχιών (Patsalis et al.,2005).

Κινούμενοι προς αυτή την κατεύθυνση και μέσα στα γενικότερα πλαίσια αναβάθμισης της μεθόδου, προσπαθήσαμε να αυξήσουμε τον αριθμό των DNA-ανιχνευτών που λαμβάνουν μέρος στη «σάρωση» και επομένως να αυξήσουμε και τον αριθμό των περιοχών του ανθρώπινου γονιδιώματος που μπορούν ν'αναλυθούν ταυτόχρονα και αξιόπιστα με τη μέθοδο MAPH. Οι ανιχνευτές που συντέθηκαν και κλωνοποιήθηκαν επιτυχώς κατά τη συνεργασία μας είναι 119 σε αριθμό, εντοπίζονται μόνο στο χρωμόσωμα X, κάποιιοι από αυτούς ειδικότερα στο γονίδιο XIST (34 ανιχνευτές εντός του γονιδίου). Το ενδιαφέρον μας ειδικά για το χρωμόσωμα X συνδυάζεται με τη μελέτη που αναφέραμε νωρίτερα του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X σε γυναίκες με καθέξιν αποβολές. Η αρχική ιδέα ήταν να εξετασθούν εκ των υστέρων οι γυναίκες που παρουσίασαν ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X (κατά τη μελέτη μας) με την array- MAPH τεχνική για να διαπιστωθούν τυχόν ελλείψεις ή διπλασιασμοί.

Ο μακροπρόθεσμος στόχος αυτού του ερευνητικού προγράμματος, είναι η ανάπτυξη μιας πρωτότυπης μικροσυστοιχίας (αντί του πηκτώματος ακρυλαμιδίου), όπου θα μπορεί να τοποθετηθεί μεγάλος αριθμός τέτοιων ανιχνευτών ούτως ώστε να χρησιμοποιηθεί με τη μεθόδου MAPH και ν'αποτελέσει διαγνωστικό εργαλείο για την ταυτόχρονη σάρωση χρωμοσωμικών ανωμαλιών σε όλα τα ανθρώπινα χρωμοσώματα, να λειτουργήσει δηλ. ως Μοριακός Καρυότυπος. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η αναβάθμιση της μεθόδου MAPH ως προς την χρήση, την ευαισθησία και την αξιοπιστία (array-MAPH).

Οι DNA-ανιχνευτές με τους οποίους ασχοληθήκαμε, σχεδιάστηκαν με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι μοναδικοί στο ανθρώπινο γονιδίωμα, να μην περιλαμβάνουν επαναλαμβανόμενα πολυμορφικά μοτίβα, να είναι καλά χαρτογραφημένοι με μεγέθη που να κυμαίνονται από 100-600 bp.

20.2 Συζήτηση της πειραματικής διαδικασίας και των αποτελεσμάτων

20.2.1 (α) Πολλαπλασιασμός των DNA-ανιχνευτών με την Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Από το σύνολο των ανιχνευτών που είχαν αρχικά σχεδιαστεί, ορισμένοι δεν έγινε κατορθωτό να πολλαπλασιαστούν με τη μέθοδο της PCR. Το βασικότερο πρόβλημα ήταν ότι λαμβάναμε προϊόντα λανθασμένου μεγέθους, πιθανόν λόγω μη ειδικού υβριδισμού των εκκινητών. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών, ένα μικρό ποσοστό



αυτών παρουσίασε κάποια παρέκκλιση από τα ζητούμενα κριτήρια με αποτέλεσμα να παρουσιάσει κάποιο ποσοστό ομολογίας με άλλες μη επιθυμητές αλληλουχίες του γονιδιώματος. Για ν'αντιμετωπιστεί το πρόβλημα δοκιμάστηκε ν'αυξηθεί η θερμοκρασία υβριδισμού καθώς και να μειωθεί ο χρόνος υβριδισμού ώστε ν'αυξηθεί η ειδικότητα των εκκινητών, πράγμα που σε αρκετές περιπτώσεις ήταν αποτελεσματικό. Οι ανιχνευτές που δεν κατέστη δυνατό να πολλαπλασιαστούν εξαιρέθηκαν από την μελέτη.

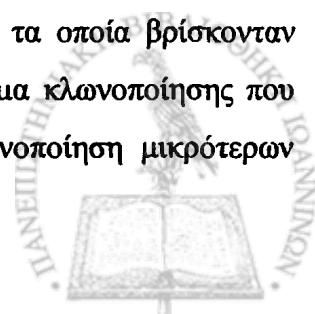
Σημαντικό είναι ν'αναφερθεί ότι για τις αντιδράσεις της PCR χρησιμοποιήθηκε ειδικά η Taq DNA πολυμεράση επειδή αυτή διαθέτει μια ανεξάρτητη του εκμαγείου δράση τρανσφεράσης με την οποία προσθέτει αδενίνες στα 3'άκρα των προϊόντων της PCR κατά το στάδιο της τελικής επιμήκυνσης. Αυτό διευκολύνει την κλωνοποίηση των προϊόντων της PCR σε φορείς οι οποίοι προμηθεύονται με μονόκλωνα προεξέχοντα 3'άκρα από θυμίνες

20.2.2 (β) Κλωνοποίηση των DNA-ανιχνευτών

Το αναμενόμενο ποσοστό της αποδοτικότητας της κλωνοποίησης με τη χρήση του συγκεκριμένου συστήματος (TOPO TA Cloning^R) είναι γύρω στο 95%. Παρ'όλα αυτά σε μερικές περιπτώσεις η αποδοτικότητα της κλωνοποίησης ήταν χαμηλότερη.

Ένα από τα προβλήματα ήταν η μη ενσωμάτωση των επιθυμητών ακολουθιών στους φορείς κλωνοποίησης με αποτέλεσμα να λαμβάνεται μεγάλος αριθμός μπλέ αποικιών. Αυτό ίσως οφειλόταν στο ότι κατά την αντίδραση της PCR, στο στάδιο της τελικής επιμήκυνσης, παρόλο που είχε χρησιμοποιηθεί η Taq DNA πολυμεράση δεν είχαν προστεθεί αδενίνες σε όλα τα 3'άκρα με αποτέλεσμα τα προϊόντα της PCR να μην παρουσιάζουν συμπληρωματικότητα με τα άκρα του φορέα κι έτσι δεν σχηματίζονταν ανασυνδυασμένα μόρια. Για ν'αντιμετωπιστεί αυτό δοκιμάστηκε ν'αυξηθεί ο χρόνος του σταδίου της τελικής επιμήκυνσης ώστε να μπορέσουν να προστεθούν οι αδενίνες σε όλα τα 3'άκρα, πράγμα που αύξησε σε κάποιο βαθμό την αποτελεσματικότητα της κλωνοποίησης. Επιπλέον, η παρουσία μεγάλου αριθμού μη ανασυνδυασμένων φορέων μπορεί να οφειλόταν στη χρήση μικρής ποσότητας προϊόντος της PCR με αποτέλεσμα να μην είναι σωστή η αναλογία φορέα-προϊόντος της PCR. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές ποσότητες αντιδραστηρίων και εμπειρικά καταλήξαμε στις ποσότητες που αναγράφονται στο πειραματικό μέρος.

Ένας άλλος παράγοντας που επηρέασε την αποδοτικότητα της κλωνοποίησης ήταν η κλωνοποίηση ανεπιθύμητων τμημάτων μικρού μεγέθους (< 100 bp) τα οποία βρίσκονταν στην αντίδραση της PCR μαζί με τα επιθυμητά τμήματα. Το σύστημα κλωνοποίησης που χρησιμοποιήθηκε είναι σχεδιασμένο έτσι ώστε να ευνοεί την κλωνοποίηση μικρότερων



τμημάτων DNA, γι' αυτό τα μικρότερα τμήματα ενσωματώνονται στον φορέα με μεγαλύτερη ευκολία.

Μια άλλη περίπτωση που παρουσιάστηκε ήταν η ενσωμάτωση στον ίδιο φορέα κάποιου προϊόντος περισσότερες από μία φορά. Αυτό φαινόταν, μετά από ηλεκτροφόρηση, σαν ένα προϊόν διπλάσιου ή μεγαλύτερου μεγέθους από το αναμενόμενο. Αυτό μάλλον οφειλόταν σε χρήση μεγαλύτερης ποσότητας προϊόντος της PCR με αποτέλεσμα να μην υπάρχει η σωστή αναλογία φορέα-προϊόντος της PCR.

Οι ανιχνευτές οι οποίοι δεν κατέστη δυνατόν να κλωνοποιηθούν, εξαιρέθηκαν από την μελέτη.

Η μέθοδος ΜΑΡΗ, παρά τους ορισμένους περιορισμούς που παρουσιάζει, φαίνεται να υπόσχεται πολλά. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα πρώτα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με επιβεβαιωμένες με άλλες μεθόδους (κυρίως CGH microarrays) ελλείψεις ή διπλασιασμούς κρίθηκαν ενθαρρυντικά (Patsalis et al., 2005), όμως επειδή μέχρι στιγμής το κόστος της μεθόδου δεν είναι διόλου ευκαταφρόνητο, η ερευνητική προσπάθεια για ένταξη της μεθόδου στα ευρύτερα πλαίσια των εξετάσεων που προβλέπονται για τα ζευγάρια με καθέξιν αποβολές, μάλλον εγκαταλείπεται προσωρινά.

Η μέθοδος αυτή βρίσκεται ακόμη σε πολύ αρχικά στάδια, όμως σκοπός μακροπρόθεσμος είναι η μείωση του κόστους και οι τροποποιήσεις που θα αναβαθμίσουν τη μέθοδο όσον αφορά στην ανίχνευση ανωμαλιών, στις οποίες φαίνεται να οφείλονται πολλές γενετικές παθήσεις αγνώστου μέχρι σήμερα αιτιολογίας. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα, η μέθοδος ΜΑΡΗ, να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον ως διαγνωστικό εργαλείο με τη βοήθεια του οποίου τα ανθρώπινα χρωμοσώματα να μπορούν να αναλύονται γρήγορα, με μικρό κόστος και μεγαλύτερη ευκρίνεια σε σχέση με τις άλλες υπάρχουσες μεθόδους. Έτσι, με τη μείωση του φόρτου εργασίας και του κόστους, η μέθοδος είναι δυνατόν να παρέχει αρκετά πλεονεκτήματα τόσο στους ασθενείς όσο και στο σύστημα υγείας γενικότερα.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ:

- ✓ Στις γυναίκες με καθέξιν αποβολές υπάρχει σχέση ανάμεσα στο μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA του χρωμοσώματος X (ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση) και την εμφάνιση αποβολών.
- ✓ Διαταραχές στη διαδικασία σπερματογένεσης συνδυάζονται με διαταραχές του προτύπου μεθυλίωσης.
- ✓ Η μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης των γονιδίων HUMARA και SNRPN στο DNA του ορχικού ιστού υπογόνιμων ανδρών μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μέθοδος εκτίμησης της περιεκτικότητας σε γεννητικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα είναι συγκρίσιμα με εκείνα της κλασικής μικροσκοπίας.
- ✓ Δεν ανιχνεύθηκε διαταραγμένο πρότυπο μεθυλίωσης του χρωμοσώματος X σε κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από Υποβοηθούμενη Αναπαραγωγή και ΠΕΔ.
- ✓ Δεν κρίνουμε απαραίτητο να συμπεριλαμβάνεται ο έλεγχος του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στα γενικότερα πλαίσια των εξετάσεων στις οποίες υποβάλλονται γυναίκες με καθέξιν αποβολές.
- ✓ Μελλοντικά ίσως η προοπτική εισαγωγής της μεθόδου των μικροσυστοιχιών (DNA microarrays) με ανιχνευτές κατά μήκος του χρωμοσώματος X να μας οδηγήσει στην ανακάλυψη μικροσκοπικών ελλείψεων ή διπλασιασμών ή γονιδίων που σχετίζονται με αποβολές.



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στόχος της παρούσης εργασίας ήταν να μελετήσαμε το φαινόμενο της μεθυλίωσης του DNA στην ανθρώπινη αναπαραγωγή. Η μελέτη μας περιελάμβανε τις εξής ομάδες πληθυσμών: γυναίκες με καθέξιν αποβολές αδιευκρίνιστης αιτιολογίας (ΟΜΑΔΑ Α), άνδρες με προβλήματα υπογονιμότητας που καταφεύγουν σε τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ΟΜΑΔΑ Β) και κορίτσια που γεννήθηκαν μετά από τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και στα οποία είχε γίνει προεμφυτευτική διάγνωση (ΟΜΑΔΑ Γ). Απώτερος στόχος της μελέτης μας η διερεύνηση του τρόπου με τον οποίο επιγενετικές τροποποιήσεις του γονιδιώματος και ειδικότερα το μη φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης του DNA, εμπλέκονται στα φαινόμενα των αποβολών και της υπογονιμότητας.

Αρχικά και όσον αφορά στη μελέτη της ΟΜΑΔΑΣ Α, η μεθοδολογία που χρησιμοποιήσαμε βασίζεται στη δράση ευαίσθητων στη μεθυλίωση ενζύμων. Συγκεκριμένα για τη μελέτη του προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στο περιφερικό αίμα των γυναικών επιλέξαμε το γονίδιο HUMARA το οποίο είναι μεθυλιωμένο στο αδρανοποιημένο X, ενώ παράλληλα στο εξώνιο 1 διαθέτει μια (CAG)_n πολύ πολυμορφική αλληλουχία που επιτρέπει τη διάκριση του μητρικού και πατρικού αλληλομόρφου.

Οι 56 από τις 74 γυναίκες-ασθενείς της μελέτης μας βρέθηκαν πληροφοριακές για τη συγκεκριμένη θέση και από αυτές οι 6 μόνο εμφάνισαν διαταραγμένο πρότυπο αδρανοποίησης του X (ακραία επιλεκτική αδρανοποίηση, $\geq 90\%$), δηλαδή ποσοστό 10.7%. Το αντίστοιχο ποσοστό για τις 55 πληροφοριακές από τις 80 γυναίκες- μάρτυρες διαμόρφώθηκε στο 3.6% (3/55). Τα παραπάνω ποσοστά (αν και δεν είναι στατιστικά σημαντικά, $P=0.271$) υποδηλώνουν συσχέτιση του φαινομένου των καθέξιν αποβολών με το μη φυσιολογικό πρότυπο αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X και συμφωνούν με τη συντριπτική πλειοψηφία των αντίστοιχων εργασιών που έχουν πραγματοποιηθεί διεθνώς.



Στα πλαίσια της μελέτης του προτύπου μεθυσίωσης του DNA από ορχικό ιστό 86 υπογόνιμων ανδρών (ΟΜΑΔΑ Β), χρησιμοποιήσαμε δύο διαφορετικούς μοριακούς δείκτες (το γονίδιο HUMARA και το γονίδιο SNRPN) για την ένδειξη περιεκτικότητας σε γαμετικά κύτταρα. Τα αποτελέσματα της μοριακής ανάλυσης συγκρίθηκαν με εκείνα της κλασικής μεθόδου μικροσκοπίας.

Τελικά, τα ευρήματα έδειξαν ότι για τους 12 αποφρακτικούς άνδρες υπάρχει πλήρης ομοφωνία και των 3 μεθόδων, ενώ για του υπόλοιπους 74 με μη αποφρακτική αζωοσπερμία υπάρχει διαφοροποίηση, αφού φαίνεται η μέθοδος μικροσκοπίας να συγκλίνει με τα αποτελέσματα της SNRPN ανάλυσης σε ποσοστό 82% προσδίδοντας με αυτό τον τρόπο μεγάλη ευαισθησία στη μέθοδο SNRPN ανάλυσης. Η ανάλυση του γονιδίου HUMARA διαφαίνεται ιδιαίτερα χρήσιμη στις περιπτώσεις ανδρών που πάσχουν από το σύνδρομο της πρώιμης διακοπής ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της ΟΜΑΔΑΣ Γ μας επιτρέπουν να συμπεράνουμε ότι μάλλον δεν προκαλείται διαταραχή του φυσιολογικού προτύπου αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X κατά τη διαδικασία της προεμφυτευτικής διάγνωσης. Τέλος, κατασκευάσαμε 119 ανιχνευτές κατά μήκος του χρωμοσώματος X προκειμένου να ανιχνεύσουμε μικροσκοπικές ελλείψεις ή διπλασιασμούς που ίσως ευθύνονται για τις καθέξιν αποβολές. Μακροπρόθεσμος στόχος η ανάπτυξη μικροσυστοιχιών που θα περιέχουν ανιχνευτές κατά μήκος του X και που θα επρέπουν την ανακάλυψη μικροσκοπικών δομικών ανακατατάξεων ή και γονιδίων που σχετίζονται με τις αποβολές.



Study of X chromosome DNA methylation status in human reproduction

Aggeliki Dasoula

SUMMARY

The purpose of this study was to examine the effect of DNA methylation on human reproduction. Our study included three groups of patients: Greek women with unexplained recurrent miscarriage (Group A), infertile men who will undergo *in vitro* fertilization procedure (Group B) and girls born after *in vitro* fertilization procedure and preimplantation genetic diagnosis (Group C). The endmost purpose of the present study was to analyze how epigenetic modifications and abnormal DNA methylation pattern can interfere with recurrent miscarriage and infertility.

Group A was consisted of 74 women-patients with unexplained recurrent miscarriage. A methylation sensitive assay was used to investigate the X-inactivation pattern of them. Fifty-six of them were found to be informative for exon 1 of HUMARA gene. It is known that exon 1 contains a highly polymorphic (CAG)_n repeat so as to distinguish the maternal and paternal X chromosome. We used HUMARA gene for methylation analysis as it is known that when X chromosome is inactive this region is methylated. Among the informative cases, 6 of the 56 informative women-patients showed abnormal methylation pattern of X chromosome (extreme skewed X-chromosome inactivation). For the control group our results showed that 55 of 80 women were informative. From these 55 women only 3 (3.6%) showed extreme skewed X chromosome inactivation pattern. In the present study, women with unexplained recurrent miscarriage showed a statistically non-significant increase in skewed XCI prevalence (10.7%) compared with control women (3.6%; $P=0.271$).



Group B included 86 azoospermic men (12 obstructive and 74 non-obstructive azoospermic men). We analyzed the methylation status of two differentially inherited and methylated loci: the Human Androgen Receptor and the SNRPN gene in testicular biopsy samples and compared the results with microscopic evaluation. Our results showed that obstructive azoospermia patients were positive for spermatozoa and germ cells by all approaches (microscopy, HUMARA and SNRPN analysis) with absolute consistency. In contrast, for the non-obstructive men microscopy was consistent with SNRPN analysis as regards the presence of germ cells in 82% of the testicular tissues tested. Non-obstructive patients with maturation arrest were positive for the presence of germ cells only by HUMARA analysis with 84% sensitivity. In conclusion, methylation analysis of the testicular tissue is consistent with microscopic analysis, as regards the prevalence of germ cells and stage of spermatogenic arrest in the biopsy samples.

To further investigate the interaction between methylation and reproduction, we analyzed the pattern of methylation of X chromosome in girls born after preimplantation genetic diagnosis (Group C). Our results revealed that there is no association between abnormal pattern of chromosome inactivation and the procedure of preimplantation diagnosis.

Finally, we designed 119 X chromosome specific probes which would be spotted onto microarray so as to detect subtle rearrangements and/or deletions that could result in pregnancy loss.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abkowitz JL, Taboada M, Shelton GH, Catlin SN, Gutterop P, Kiklevich JV.** An X chromosome gene regulates hematopoietic stem cell kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3862-66
- Akrami SM, Winter RM, Brook JD, Armour JA.** Detection of a large TBX5 deletion in a family with Holt-Oram syndrome. *J Med Genet.* 2001; 38(12):E44.
- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW.** Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992; 51(6): 1229-39.
- Anderson C, Brown CJ.** Polymorphic X-chromosome inactivation of the human TIMPI gene. *Am J Hum Genet* 1999;65: 699-708.
- Ariel M, Robinson E, McCarrey JR, Cedar H.** Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine Xist gene. *Nat Genet.* 1995; 9(3): 312-5.
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G.** Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(2): 605-9.
- Bagislar S, Ustuner I, Cengiz B, Soylemez F, Akyerli CB, Ceylaner S, Ceylaner G, Acar A, Ozcelik T.** Extremely skewed X-chromosome inactivation patterns in women with recurrent spontaneous abortion. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006; 46(5):384-7.
- Balasch J, Reverter JC, Fabregues F, Tassies D, Rafel M, Creus M, Vanrell JA.** First-trimester repeated abortion is not associated with activated protein C resistance. *Hum Reprod.* 1997; 12(5):1094-7.
- Baniushin BF.** Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes.[Article in Russian] : *Mol Biol (Mosk).* 2005; 39(4): 557-66.
- Belmont JW.** Genetic control of X inactivation and processes leading to X inactivation skewing. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1101-08



- Bestor TH.** The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(16): 2395-402. Review.
- Blumberg BD, Shulkin JD, Rotter JI, Mohandas T, Kaback MM.** Minor chromosomal variants and major chromosomal anomalies in couples with recurrent abortion. *Am J Hum Genet.* 1982; 34(6): 948-60.
- Braude P, Pickering S, Flinter F, Ogilvie CM.** Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet.* 2002; 3(12): 941-53. Review. Erratum in: *Nat Rev Genet.* 2003; 4(2): 157.
- Brenner B, Mandel H, Lanir L, Younis J, Rothbart H, Ohel G et al.** Activated protein c resistance can be associated with recurrent fetal loss. *Br J Haematol* 1997; 97: 551-54.
- Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S, Rastan S.** The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* 1992; 71(3):515-26.
- Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF.** The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell.* 1992; 71(3): 527-42.
- Brown CJ, Lafreniere RG, Powers VE, Sebastio G, Ballabio A, Pettigrew AL, Ledbetter DH, Levy E, Craig IW, Willard HF.** Localization of the X inactivation centre on the human X chromosome in Xq13. *Nature* 1991; 349(6304):82-4.
- Brown CJ, Robinson WP.** XIST expression and X-chromosome inactivation in human preimplantation embryos. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(1): 5-8. Review
- Brugo-Olmedo S, De Vincentiis S, Calamera JC, Urrutia F, Nodar F, Acosta AA.** Serum inhibin B may be a reliable marker of the presence of testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril.* 2001; 76(6): 1124-9.



- Busque L, Mio R, Mattioli J, Brais E, Blais N, Lalonde Y, Maragh M, Gilliland DG.** Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. *Blood*. 1996; 88(1): 59-65.
- Byrne JL, Ward K.** Genetic factors in recurrent abortion. *Clin Obstet Gynecol*. 1994; 37(3):693-704. Review.
- Carrell DT, De Jonge C, Lamb DJ.** The genetics of male infertility: a field of study whose time is now. *Arch Androl*. 2006; 52(4): 269-74. Review.
- Carrel L, Cottle AA, Goglin KC, Willard HF.** A first-generation X-inactivation profile of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(25):14440-4.
- Carrel L, Willard HF.** Heterogeneous gene expression from the inactive X chromosome: an X-linked gene that escapes X inactivation in some human cell lines but is inactivated in others. *Procl. Natl Acad Scien USA* 1999; 96: 7364-69
- Carrel L, Willard HF.** X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature*. 2005; 434: 400-4.
- Cheng MK, Disteché CM** Silence of the fathers: early X inactivation. *Bioessays*. 2004;26(8):821-4.
- Cooper DW, Vandenberg JL, Sharman GB, Poole WE.** Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation *Nat N Biol* 1971; 230:155-57.
- Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B.** Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2003;71: 162-64.
- Dasoula A., Georgiou I., Kontogianni E., Sofikitis N., Syrrou M.** Methylation status of the SNRPN and HUMARA genes in testicular biopsy samples. *Fert Ster* 2007; 87(4): 805-9.



- Dasoula A, Kalantaridou S, Sotiriadis A, Pavlou M, Georgiou I, Paraskevaïdis E, Makrigiannakis A, Syrrou M.** Skewed X chromosome inactivation in Greek women with idiopathic recurrent miscarriage. *Fet Diagnosis and Therapy* 2007; x:x-x
- Davis OK, Berkeley AS, Naus GJ, Cholst IN, Freedman KS.** The incidence of luteal phase defect in normal, fertile women determined by serial endometrial biopsies. *Fertil Steril* 1989; 51: 582-86.
- Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS.** The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet.* 2000; 9(19): 2885-94.
- DeBaun MR, Niemitz EL and Feinberf AP.** Assosiation of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 156-60.
- Del Porto G, D'Alessandro E, Grammatico P, Coghi IM, DeSanctis S, Giambenedetti M, Vaccarella C, Fabi R, Marcano MF, Nicotra M.** Chromosome heteromorphisms and early recurrent abortions. *Hum Reprod.* 1993; 8(5): 755-8.
- Devriert K. et al.** Skewed X chromosome inactivation in female carriers of dyskeratosis congenital. *Am J Hum Genet;* 1997 60:581-87
- Devroey P.** Clinical application of new micromanipulative technologies to treat the male. *Hum Reprod.* 1998; 13 Suppl 3:112-22; discussion 123-6. Review.
- Dizon-Townson DS, Meline L, Nelson LM, Varner M, Ward K.** Fetal carriers of the factor V Leiden mutation are prone to miscarriage and placental infarction. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177(2):402-5.
- Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM.** Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod.* 2000; 62(6):1526-35.



Dorman JS, Burke JP, McCarthy BJ, Norris JM, Steenkiste AR, Aarons JH et al. Temporal trends diabetes. *Diabetes Res Clinic Pract* 1999;43: 41-7

Eiben B, Bartels I, Bahr-Porsch S, Borgmann S, Gatz G, Gellert G, Goebel R, Hammans W, Hentemann M, Osmers R, et al. Cytogenetic analysis of 750 spontaneous abortions with the direct-preparation method of chorionic villi and its implications for studying genetic causes of pregnancy wastage. *Am J Hum Genet.* 1990; 47(4):656-63.

Epstein CJ, Smith S, Travis b, Tucker G. Both X chromosomes function before visible X-chromosome inactivation in female mouse embryos. *Nature* 1978; 274: 500-3

Feinberg AP. Methylation meets genomics. *Nat Genet.* 2001; 27(1): 9-10.

Fey MF et al. Clonality and X inactivation patterns in hematopoietic cell population detected by the highly informative M27B DNA probe. *Blood* 1994; 83: 931-38

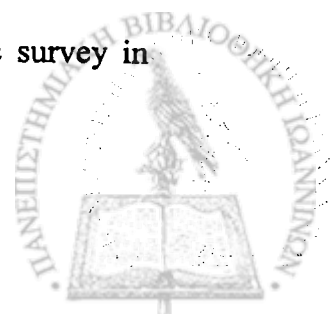
Fleissner E., Borek E. Studies on the enzymatic methylation of soluble RNA. I. Methylation of the s-RNA polymer. *Biochemistry.* 1963 ; 2:1093-100.

Foka ZJ, Lambropoulos AF, Saravelos H, Karas GB, Karavida A, Agorastos T, Zournatzi V, Makris PE, Bontis J, Kotsis A. Factor V leiden and prothrombin G20210A mutations, but not methylenetetrahydrofolate reductase C677T, are associated with recurrent miscarriages. *Hum Reprod.* 2000; 15(2):458-62.

Fortuny A, Carrio A, Soler A, Cararach J, Fuster J, Salami C. Detection of balanced chromosome rearrangements in 445 couples with repeated abortion and cytogenetic prenatal testing in carriers. *Fertil Steril.* 1988; 49(5): 774-9.

Frommer M., Mcdonald C., Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg G.W., Molloy P.L. and Paul C.L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(5)1827-31.

Fryns JP, Kleczkowska A, Kubien E, Petit P, Van den Berghe H. Cytogenetic survey in couples with recurrent fetal wastage. *Hum Genet.* 1984; 65(4): 336-54.



- Fulka H, Mrazek M, Tepla O, Fulka J Jr.** DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction*. 2004;128(6):703-8.
- Gaal M, Laszlo J.** X inactivation pattern in an unbalanced X-autosome translocation with gonadal dysgenesis. *Hum Hered*. 1977; 27(6): 396-402.
- Gale RE et al.** Acquired skewing of X-chromosome inactivation patterns in myeloid cells of the elderly suggests stochastic clonal loss with age. *Br J Haemat* 1998; 98:512-19
- Gardner RL and Lyon MF.** X chromosome inactivation studied by injection of a single cell into the mouse blastocyst. *Nature* 1971;231:385-86.
- Gartler SM, Andina RJ.** Mammalian X-chromosome inactivation. *Adv Hum Genet*. 1976; 7: 99-140. Review.
- Giannakis D, Baltogiannis D, Tsoukanelis K, Loutradis D, Miyagawa I, Makrydimas G, Kanakas N, Sofikitis N.** Role of testicular tissue telomerase assay for the prediction of the presence of testicular spermatozoa in azoospermic men with varicoceles, pre- and post-varicocelectomy. *Andrologia*. 2004; 36(3): 111-22.
- Goetz P, Chandley AC, Speed RM.** Morphological and temporal sequence of meiotic prophase development at puberty in the male mouse. *J Cell Sci*. 1984; 65: 249-63.
- Gosden R, Trasler J, Lucifero D, Faddy M.** Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet*. 2003; 361(9373): 1975-7. Review
- Gromova ES and Khoroshaev AV.** Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA. [Article in Russian] *Mol Biol (Mosk)*. 2003; 37(2): 300-14.
- 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*. 2002;117(1-2): 15-23.
- Handel MA, Park C, Kot M.** Genetic control of sex-chromosome inactivation during male meiosis. *Cytogenet Cell Genet*. 1994 ;66(2):83-8.



Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature (Lond.)* 1990; 344: 768–770.

Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, Winston RM, Hughes MR. Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med.* 1992; 327(13): 905-9.

Harrison KB, Warburton D. Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 163-68

Harrison KB. X-chromosome inactivation in the human cytotrophoblast *Cytogenet Cell Genet* 1989; 52: 37-41

Hassold T. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage. *Trends Genet* 1986; 2: 105-10.

Hendriksen PJ, Hoogerbrugge JW, Themmen AP, Koken MH, Hoeijmakers JH, Oostra BA, van der Lende T, Grootegoed JA. Postmeiotic transcription of X and Y chromosomal genes during spermatogenesis in the mouse. *Dev Biol.* 1995; 170(2): 730-3.

Herman J, Graff J, Myöhänen S, Nelkin B, Baylin S. Methylation specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1996; 93: 9821-26

Hollox EJ, Akrami SM, Armour JA DNA copy number analysis by MAPH: molecular diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn.* 2002; 2(4): 370-8.

Hollox EJ, Atia T, Cross G, Parkin T, Armour JA High throughput screening of human subtelomeric DNA for copy number changes using multiplex amplifiable probe hybridisation (MAPH). *J Med Genet.* 2002; 39(11): 790-5.

Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update.* 2005;11(5): 473-82. Epub 2005 Jul 1. Review.



Huynh KD, Lee JT. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* 2003; 426: 857-62.

Jeng GT, Scott JR, Burmeister LF. A comparison of meta-analytic results using literature vs individual patient data. Paternal cell immunization for recurrent miscarriage. *JAMA*. 1995; 274(10):830-6.

Ke X, Collins A. CpG islands in human X-inactivation. *Ann Hum Genet*. 2003; 67: 242-9.

Kerjean A, Couvert P, Heams T, Chalas C, Poirier K, Chelly J, Jouannet P, Paldi A, Poirot C. In vitro follicular growth affects oocyte imprinting establishment in mice. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(7):493-6.

Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, Le Tessier D, Cuisset L, Paldi A, Jouannet P, Jeanpierre M. Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet*. 2000; 9(14): 2183-7.

Kim J.W, Park SY, Kim YM, Kim JM, Han JY, Ryu HM: X-chromosome inactivation patterns in Korean Women with idiopathic recurrent spontaneous abortion. *JKorean Med Sci* 2004; 19: 258-62.

Kratzer PG, Gartler SM. HGPRT activity changes in preimplantation mouse embryos. *Nature*. 1978; 274(5670): 503-4.

Kuiper GG, Faber PW, van Rooij HC, van der Korput JA, Ris-Stalpers C, Klaassen P, Trapman J, Brinkmann AO. Structural organization of the human androgen receptor gene. *J Mol Endocrinol*. 1989; 2(3): R1-4.

Kutteh WH Report from the Society for Gynecologic Investigation, Atlanta, Georgia, March 11-14, 1998. *J Reprod Immunol*. 1998; 40(2):175-82

Lanasa MC, Hogge WA, Hoffman EP: The X chromosome and recurrent spontaneous abortion: the significance of transmanifesting carriers. *Am.J.Hum.Genet*. 1999; 64: 934-938.



Lanasa MC, Hogge WA, Kubic CJ, Ness RB, Harger J, Nagel T, Prosen T, Markovik N, Hoffman EP: A novel X-linked genetic cause of recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 563-568

Lau AW Skewed X- chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. *Am J Hum Genet* 1997; 61: 1353-1361.

Liddell HS, Sowden K, Farquhar CM, Recurrent miscarriage: screening for polycystic ovaries and subsequent pregnancy outcome. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 1997; 37:402-6.

Lyon MF Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature*. 1961; 190: 372-3.

Lyon M. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. *Am J Hum Genet*. 1962:135-48.

Lyon MF Gene action in the X chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*) *Nature* 1962; 190: 372-73

Lyon MF. X-chromosome inactivation. Pinpointing the centre. *Nature*. 1996; 379(6561): 116-7

Mak W, Nesterova TB, de Napoles M, Appanah R, Yamanaka S, Otte AP, Brockdorff N. Reactivation of the paternal X chromosome in early mouse embryos. *Science*. 2004 Jan 30;303(5658):666-9

Manning M, Lissens W, Bonduelle M, Camus M, De Rijcke M, Liebaers I, Van Steirteghem A. Study of DNA-methylation patterns at chromosome 15q11-q13 in children born after ICSI reveals no imprinting defects. *Mol Hum Reprod*. 2000; 6(11): 1049-53.

Manning M, Lissens W, Weidner W, Liebaers I. DNA methylation analysis in immature testicular sperm cells at different developmental stages. *Urol Int*. 2001; 67(2): 151-5.

Mann JR. Imprinting in the germ line. *Stem Cells*. 2001; 19(4): 287-94. Review.



- McCarrey JR, Dilworth DD.** Expression of Xist in mouse germ cells correlates with X-chromosome inactivation. *Nat Genet.* 1992; 2(3): 200-3.
- McDonald LE, Paterson CA, Kay GF.** Bisulfite genomic sequencing- derived methylation profile of the Xist gene throughout early mouse development. *Genomics* 1998; 54: 379-86.
- McKee BD and Handel MA.** Sex chromosomes, recombination and chromatin conformation. *Chromosoma* 1993; 102:71-80
- Migeon BR, Do TT.** In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Hum Genet* 1979; 31: 581-85
- Migeon BR, Wolf SF, Axelman J, Kaslow DC, Schimdt M.** Incomplete X chromosome dosage compensation in chorionic villi of human placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82: 3390-94
- Migeon BR** Non-random X chromosome inactivation in mammalian cells *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80:142-148
- Mukherjee AB.** Cell cycle analysis and X-chromosome inactivation in the developing mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 1608-11.
- Obata Y, Kono.** Maternal primary imprinting is established at a specific time for each gene throughout oocyte growth. *J Biol Chem.* 2002; 277(7): 5285-9. Epub 2001 Nov 16. T.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E.** DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999; 99(3): 247-57.
- Okamoto I, Otte AP, Allis CD, Reinberg D, Heard E.** Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science.* 2004 ; 303(5658): 644-9.
- Pääbo S:** The Y chromosome and the origin of all of us (men). *Science* 1995; 268: 1141-42.
- Patsalis Ph, Kousoulidou L, Sismani C, Männik K, Kurg A.** MAPH: from gels to microarrays. *Eur J Med Genet* 2005; 48: 241-9.



Pauer HU, Neesen J, Hinney B. Factor V Leiden and its relevance in patients with recurrent abortions. *Am J Obstet Gynecol.* 1998; 178(3):629.

Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol.* 2001; 195(1):97-110. Review.

Pegoraro E, Whitaker J, Mowery-Rushton P, Surti U, Lanasa M, Hoffman EP. Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(1): 160-70.

Penny GD, Kay GF, Sheardown SA, Rastan S, Brockdorff N. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature.* 1996; 379(6561):131-7.

Plath K, Mlynarczyk-Evans S, Nusinow DA, Panning B. Xist RNA and the mechanism of X chromosome inactivation. *Annu Rev Genet.* 2002; 36: 233-78. Epub 2002 Jun 11. Review.

Plenge RM, Hendrich BD, Schwartz C, Arena JF, Naumova A, Sapienza C, Winter RM, Willard HF. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. *Nat Genet.* 1997; 17(3):353-6.

Prochi F, Arundhati S, Firuza R. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 2005;11(6):726-732.

Puck JM, Nussbaum RL, Conley ME. Carrier detection in X-linked severe combined immunodeficiency based on patterns of X chromosome inactivation. *J Clin Invest* 1987; 79: 1395-1400.

Rai R, Regan L, Hadley E, Dave M, Cohen H. Second trimester pregnancy loss is associated with activated C resistance. *Br J Haematol* 1996; 92: 489-90.

Rai R, Regan L. Recurrent miscarriage. *Lancet.* 2006; 368(9535): 601-11. Review.

Rastan S, Cattanch BM. Interaction between the Xce locus and imprinting of the paternal X chromosome in mouse yolk-sac endoderm. *Nature.* 1983; 303(5918): 635-7.



- Rastan S.** Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos-location of the inactivation centre. *J Embryol Exp Morphol.* 1983; 78:1-22
- Rauch A,** Hoyer J, Guth S, Zweier C, Kraus C, Becker C, Zencker M, Hüffmeier U, Thiel C, Rühendorf F, Nürnberg P, Reis A, Trautman U. Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation. *Am J Med Genet* 2006; 140A: 2063-74.
- Reik W,** Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet.* 2001; 2(1): 21-32. Review.
- Ridker PM,** Miletich JP, Buring JE, Ariyo AA, Price DT, Manson JE, Hill JA. Factor V Leiden mutation as a risk factor for recurrent pregnancy loss. *Ann Intern Med.* 1998; 128(12 Pt 1):1000-3.
- Robertson KD.** DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(8): 597-610. Review.
- Robinson WP,** Beever C, Brown CJ, Stephenson MD. (15 see Sullivan 2003). Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin Reprod Med.* 2001 ; 19(2):175-81. Review.
- Robinson Christian SL,** Kuchinka BD, Penaherrera MS, Das S, Schuffenhauer S, Malcolm S, Schinzel AA, Hassold TJ, Ledbetter DH. Somatic segregation errors predominantly contribute to the gain or loss of a paternal chromosome leading to uniparental disomy for chromosome 15. *Clinic Genet* 2000; 57: 349-58.
- Sangha KK,** Stephenson MD, Brown CJ, Robinson WP: Extremely skewed X-Chromosome Inactivation is increased in women with recurrent spontaneous abortion. *Am.J.Hum.Genet.* Letter to the editor. 1999; 65: 913-917.



Sasiadek M, Haus O, Lukasik-Majchrowska M, Slezak R, Paprocka-Borowicz M, Busza H, Plewa R, Bullo A, Jagielski J. Cytogenetic analysis in couples with spontaneous abortions. *Ginekol Pol.* 1997; 68(5A): 248-52.

Scarano E. DNA methylation. *Nature* 1973; 246:539. Letter.

Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M. DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol.* 2005; 204(1): 21-35. Review.

Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In *the Physiology of Reproduction (Vol.1)*. (Knobil E and Neill JD, eds). 1993: 1363-1434, Raven Press

Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum Genet.* 2000; 107(4): 343-9.

Shi W and Haaf T. Aberrant methylation patterns at the two cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev.* 2002; 63: 329-34.

Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol.* 2006; 53(2):245-56.

Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000; 15(11): 2278-84.

Simon C, Rubio C, Vidal F, Gimenez C, Moreno C, Parrilla JJ et al. Increased chromosome abnormalities in human preimplantation embryos after in-vitro fertilization in patients with recurrent miscarriage. *Reprod Fertil Dev* 1998; 10:87-92.

Sullivan AE, Lewi T, Stephenson M, Odem R, Schreiber J, Ober C, Branch DW: Pregnancy outcome in recurrent miscarriage patients with skewed X- chromosome inactivation. *Obstetrics and Gynecology* 2003; 101(6): 1236-1241.

Takagi N, Sasaki M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature.* 1975 ; 256: 640-2.



- Tan S-S, Williams EA, Tam PPL.** X chromosome inactivation occurs at different times in different tissues of the post-implantation mouse embryo. *Nat Genet* 1993; 3:17-74.
- Tanner SM, Orstavik KH, Kristiansen M, Lev D, Lerman-Sagie T, Sadeh M, Liechti-Gallati S.** Skewed X-inactivation in a manifesting carrier of X-linked myotubular myopathy and in her non-manifesting carrier mother. *Hum Genet.* 1999; 104(3): 249-53.
- Tenenhouse HS.** X-linked hypophosphataemia: a homologous disorder in humans and mice. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; 14(2):333-41. Review.
- Therman E, Sarto GE, Disteché C, Denniston C.** A possible active segment on the inactive human X chromosome. *Chromosoma.* 1976; 59: 137-45.
- Tsvetkova TG, Iankova MF.** Human chromosome polymorphism and disordered reproductive function. I. Routine chromosome variants. *Genetika.* 1979; 15(10):1858-69.
- Tulppala M, Stenman UH, Cacciatore B, Ylikorkala O.** Polycystic ovaries and levels of gonadotrophins and androgen in recurrent miscarriage: prospective study in 50 women. *Br J Obstet Gynaecol* 1993; 100: 348-52.
- Turek-Plewa J, Jagodzinski PP.** The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett.* 2005; 10:631-47. Review.
- Uehara S, Hashiyada M, Sato K, Sato Y, Fujimori K, Okamura K:** Preferential X-chromosome inactivation in women with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Fertility and Sterility.* 2001; 76(5): 908-914.
- Uehara S, Tamura M, Nata M, Ji G, Yaegashi N, Okamura K, Yajima A.** X chromosome inactivation in the human trophoblast of early pregnancy. *J Hum Genet* 2000; 45: 119-26
- Van den Veyver IB.** Skewed X inactivation in X-linked disorders. *Semin Reprod Med.* 2001; 19(2):183-91. Review.



Vidal F, Gimenez C, Rubrio C, Simon C, Pellicer a, Santalo J et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15:310-31.

Villard L, Levy N, Xiang F, Kpebe A, Labelle V, Chevillard C, Zhang Z, Schwartz CE, Tardieu M, Chelly J, Anvret M, Fontes M. Segregation of a totally skewed pattern of X chromosome inactivation in four familial cases of Rett syndrome without MECP2 mutation: implications for the disease. *J Med Genet.* 2001; 38(7):435-42.

Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Feinberg AP. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. *Science.* 1985; 227(4687): 642-5.

Walter J. and Paulsen M. Imprinting and disease. *Seminars in Cell and Developmental Biology.* 2003; 14:101-10.

Warburton D, Kline J, Stein Z et al. Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of a subsequent abortion? Evidence from 273 women with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 1987; 41:465-83.

West JD, Frels WI, Chapman VM, Papaioannou VE. Preferential expression of the maternally derived X chromosome in the mouse yolk sac. *Cell.* 1977;12:873-82.

Willard HF. X chromosome inactivation, XIST, and pursuit of the X-inactivation center. *Cell.* 1996; 86(1): 5-7. Review.

Wilson R, Ling H, MacLean MA, Mooney J, Kinnane D, McKillop JH, Walker JJ. Thyroid antibody titer and avidity in patients with recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 1999; 71(3): 558-61.

Wolf G and Horger E. Indications for examination of spontaneous abortion specimens: A reassessment. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173(5): 1364-68.



Yamamoto Y, Sofikitis N, Kaponis A, Georgiou J, Giannakis D, Mamoulakis Ch, Loutradis D, Yiannakopoulos X, Mio Y, Miyagawa I, Chatzikyziakidou A. Use of a highly sensitive quantitative telomerase assay in intracytoplasmic sperm injection programmes for the treatment of 47,XXY non-mosaic Klinefelter men. *Andrologia*. 2002; 34(4): 218-26.

Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut and Sineclair KD. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat. Genet.* 2001; 27: 153-154

Yong EL, Ghadessy F, Wang Q, Mifsud A, Ng SC. Androgen receptor transactivation domain and control of spermatogenesis. *Rev Reprod.* 1998; 3(3):141-4. Review.

Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science.* 1976; 191(4233): 1268-70.

Zaitseva I, Zaitsev S, Alenina N, Bader M, Krivokharchenko A. Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2007 Feb 8; [Epub ahead of print].

Zeng SM, Yankowitz J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta.* 2003;24(2-3):270-5.

Zuccoti M, Monk M. Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted xist expression and paternal X-inactivation. *Nat Genet* 1995; 9:312-20



... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..
... ..

