



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ, ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ
ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ**

**ΕΥΤΥΧΙΑ Σ. ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΟΥ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2011

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 Δημητριάδου Ευτυχίας: 28-9-2006

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 595^α/21-11-2006

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπουσα

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

Μέλη

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Τζαβάρας Θεόδωρος Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20-12-2006

«Χρωμοσωμικές ανωμαλίες επιγενετικοί παράγοντες και μηχανισμοί ρετρομετάθεσης»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 695^α/2-11-2010

Γεωργάτος Σπυρίδων	Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σοφικίτης Νικόλαος	Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Αγγελίδης Χαράλαμπος	Αναπληρωτής Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Καλανταρίδου Σοφία	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής – Γυναικολογίας με έμφαση στη Γυναικολογική Ενδοκρινολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Σύρρου Μαρίκα	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Κωλέττας Ευάγγελος	Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας με έμφαση στη Μοριακή Φυσιολογία Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
Τζαβάρας Θεόδωρος	Επίκουρος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 21-12-2011

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ

Μαργαρίτα Τζαφλίδου

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ

Τμήμα της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Έργο 80015.

... στον αδερφό μου

***«Ο χρόνος που πέρασες με το τριαντάφυλλό
σου είναι αυτό που το κάνει ξεχωριστό για σένα»
Αντουάν ντε Σαιντ-Εξυπερύ
(Ο Μικρός Πρίγκιπας)***

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες η ενασχόληση με το ανθρώπινο Γονιδίωμα προσελκύει όλο και περισσότερο τα μέλη της Επιστημονικής Κοινότητας και συγχρόνως οι Επιστημονικές ανακαλύψεις εξάπτουν την περιέργεια και το ενδιαφέρον της κοινής γνώμης για τη Βιολογία και τη Γενετική. Σε γενικές γραμμές, το γονιδίωμα είναι ιδιαίτερα σταθερό και οι μεταλλάξεις είναι πολύ σπάνια γεγονότα, που συμβαίνουν με ρυθμό περίπου 10^{-9} νουκλεοτίδια το χρόνο. Παρόλα αυτά, υπάρχουν άλλοι μηχανισμοί οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν αστάθεια του γονιδιώματος, όπως, μεταξύ άλλων, οι ανακατατάξεις των χρωμοσωμάτων και η ενεργοποίηση μεταθετών στοιχείων, οδηγώντας τελικά στην εμφάνιση συνδρόμων και ασθενειών στον άνθρωπο. Ακόμη, τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσανατολιστεί στη μελέτη ασθενειών οι οποίες οφείλονται σε μηχανισμούς που έχουν τη βάση τους όχι στην αλληλουχία του DNA αυτή καθ' εαυτή, αλλά και στις τροποποιήσεις του DNA, δηλαδή σε μεταβολές σε επίπεδο επιγονιδιώματος.

Στη διάρκεια της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής ασχοληθήκαμε με τη μελέτη μηχανισμών που σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με την εκδήλωση ασθενειών στον άνθρωπο. Οι κύριοι άξονες στους οποίους κινηθήκαμε περιγράφονται από τον τίτλο της διατριβής «Χρωμοσωμικές ανωμαλίες, επιγενετικοί παράγοντες και μηχανισμοί ρετρομετάθεσης». Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες αποτελούν ένα ανεξάντλητο πεδίο έρευνας και πολύ συχνή αιτία συνδρόμων, ασθενειών, διαταραχών και δυσμορφιών στον άνθρωπο. Οι πιθανές διαταραχές σε επίπεδο χρωμοσωμάτων αλλά και κυτταρικών λειτουργιών σε σχέση με τα ρετρομεταθετά στοιχεία και το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης αποτέλεσε για μας ένα μεγάλο και πολύ ενδιαφέρον ερώτημα. Τα ρετροτρανσποζόνια θεωρούνταν για πολλά χρόνια ανενεργές αλληλουχίες και κατά το παρελθόν έχουν χαρακτηριστεί ακόμη και «άχρηστο» DNA. Η ερευνητική πρόοδος ήρθε να αποδείξει ότι πρόκειται για αλληλουχίες με πολλαπλούς ρόλους και ιδιαίτερη συμβολή στη δομή, την οργάνωση και τη λειτουργία του γονιδιώματος. Μάλιστα, η επιγενετική αποσιώπηση των στοιχείων αυτών αλλά και η επιγενετική ρύθμιση άλλων περιοχών του γονιδιώματος και γονιδίων έχει ιδιαίτερη σημασία για τη σωστή λειτουργία και την ακεραιότητα του γονιδιώματος στο σύνολό του. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί έναν πολύ σημαντικό και δυναμικό μηχανισμό επιγενετικής ρύθμισης που είναι δυνατόν να επηρεαστεί από ερεθίσματα του περιβάλλοντος και σε πολλές περιπτώσεις η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης γονιδίων με αποτύπωση μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση γνωστών συνδρόμων και ασθενειών.

Κατά τη διάρκεια της Διατριβής μου είχα την ευκαιρία να ασχοληθώ με ιδιαίτερα ενδιαφέροντα και σύγχρονα θέματα της επιστήμης της Βιολογίας δίνοντας έμφαση στη Γενετική του ανθρώπου, που αποτελεί ένα πεδίο έρευνας που αγαπώ ιδιαίτερα. Με την ολοκλήρωση αυτού του κύκλου μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους που, ο καθένας από διαφορετική θέση, με διαφορετικό τρόπο κι έχοντας διαφορετικό ρόλο με βοήθησαν στην πορεία μου μέχρι εδώ.

Δε θα μπορούσα να ξεκινήσω διαφορετικά παρά ευχαριστώντας την κ. Μαρίκα Σύρρου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας – Ιατρικής Γενετικής και υπεύθυνη καθηγήτριά μου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, αλλά και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό της και να ασχοληθώ με θέματα του ενδιαφέροντός μου. Την ευχαριστώ από τα βάθη της καρδιάς μου που μου έδωσε το χώρο να κινηθώ όσο ήταν δυνατόν αυτόνομα και ανεξάρτητα, να δοκιμάσω τις δυνάμεις μου και να σταθώ στα πόδια μου. Μέσα από αυτή τη συμπόρευση είχα την ευκαιρία να συλλέξω πολλές και πολύτιμες εμπειρίες και γνώσεις. Στο πρόσωπό της βρήκα τη δική μου ευκαιρία στο όνειρο που λέγεται Βιολογία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή Βιολογίας κ. Θεόδωρο Τζαβάρα, και τον Καθηγητή Ουρολογίας κ. Νικόλαο Σοφικίτη για την καθοδήγηση, τις συμβουλές τους

και την υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια. Οι γνώσεις του κ. Τζαβάρα, σε θεωρητικό και πειραματικό επίπεδο, στο πρωτόγνωρο για μένα πεδίο της ρετρομετάθεσης και η προθυμία του να τις μοιραστεί μαζί μου ήταν ουσιαστικής σημασίας για την πρόδοό μου. Οι συζητήσεις μου με τον κ. Σοφικίτη για θέματα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με βοήθησαν στο να βρω απαντήσεις σε σχετικά ερωτήματα που με προβληματίζαν αλλά και το δρόμο μου στο ευρύ πεδίο της Γενετικής του ανθρώπου.

Ένα ευχαριστώ για τις χρήσιμες και εύστοχες παρατηρήσεις τους στα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής, τον Καθηγητή Βιολογίας κ. Σπύρο Γεωργάτο, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Βιολογίας κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Μαιευτικής - Γυναικολογίας κ. Σοφία Καλανταρίδου και τον Επίκουρο Καθηγητή Φυσιολογίας κ. Ευάγγελο Κωλέττα.

Ακόμη, θα ήθελα να αναφερθώ στον Δρ. Γεώργιο Βαρθολομάτο, Υπεύθυνο του Εργαστηρίου Αιματολογίας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ιωαννίνων αλλά και τον Αχιλλέα Καραμούτσιο, Υποψήφιο Διδάκτορα και μέλος του Εργαστηρίου Αιματολογίας, και να τους ευχαριστήσω για τη βοήθεια στην πραγματοποίηση της πλειοψηφίας των πειραμάτων κυτταρομετρίας.

Επίσης, να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Ουρολογίας κ. Δημήτριο Μπαλτογιάννη για τη συνεργασία μας στο κομμάτι της μελέτης επιγενετικών παραγόντων στην υπογονιμότητα στα πλαίσια του έργου «Μελέτη της μεθυλίωσης γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση σε υπογόνιμους άνδρες» που χρηματοδοτήθηκε από τον Ειδικό Λογαριασμό Έρευνας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η Δρ. Ευγενία Στεφάνου, Κλινική Κυτταρογενετίστρια και Υπεύθυνη του Εργαστηρίου Κυτταρογενετικής του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Πάτρας με υποδέχτηκε με ιδιαίτερη καλοσύνη στο Εργαστήριό της όποτε κι αν το επέβαλαν οι συνθήκες, ήταν πάντα πρόθυμη να προσφέρει ένα χέρι βοήθειας σε όλους τους τομείς και την ευχαριστώ θερμά.

Ένα πολύ μεγάλο και ιδιαίτερο ευχαριστώ στο Δημήτρη Νουτσόπουλο, τώρα πια Επίκουρο Καθηγητή Ανοσολογίας ΠΔ/407 στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, καθώς όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε για μένα κάτι παραπάνω από στενός και πολύτιμος συνεργάτης, ένας πραγματικός και ανεκτίμητος φίλος. Κι ευτυχώς αυτό είναι κάτι που δεν τελειώνει με την ολοκλήρωση μιας Διατριβής.

Δε θα μπορούσα σε καμία περίπτωση να παραλείψω να εκφράσω τη μεγάλη ευγνωμοσύνη μου προς την κ. Ανδρομάχη Τσουμάνη, πρώην ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Βιολογίας, η οποία με καθοδήγησε στα πρώτα μου βήματα στο νέο τότε εργαστηριακό περιβάλλον, με «αγκάλιασε» από την πρώτη στιγμή κάνοντάς με να νιώσω ευπρόσδεκτη και με βοήθησε να εξοικειωθώ με τις τεχνικές κυτταρογενετικής.

Αν η αρχή είναι το ήμισυ του παντός, τότε η δική μου αρχή στην περιπέτεια του εργαστηριακού πάγκου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την Ιωάννα Μπούμπα, ΕΤΕΠ της Ιατρικής Σχολής, η οποία έθεσε τα εργαστηριακά μου θεμέλια, καθοδηγώντας με κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της Διπλωματικής μου Εργασίας σε προπτυχιακό επίπεδο και την ευχαριστώ.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω όλους τους προπτυχιακούς, μεταπτυχιακούς φοιτητές και Υποψήφιους Διδάκτορες του Εργαστηρίου Βιολογίας, αλλά και των γειτονικών Εργαστηρίων Βιολογικής Χημείας και Φυσιολογίας που όλα αυτά τα χρόνια μοιραστήκαμε την καθημερινότητά μας και σε πολλές περιπτώσεις και τα αναλώσιμά μας. Φυσικά, όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πραγματοποίησαν τις Διπλωματικές τους εργασίες στη Μονάδα Κυταρογενετικής του Εργαστηρίου Βιολογίας για τη ζωντανία και τη φρεσκάδα που προσέφεραν στο εργαστήριό. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τις τότε φοιτήτριες του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών Μαριάντζελα Βλάικου και Λένα Χατζηλιάδη, οι οποίες με περισσή προθυμία και ενθουσιασμό βοήθησαν όποτε χρειάστηκε.

Τελειώνοντας, θα ήθελα να αφιερώσω λίγες γραμμές σε δικούς μου ανθρώπους και φίλους που, παρότι δεν έχουν άμεση σχέση με τη δουλειά μου στο εργαστήριο, αποτελούν για μένα ορόσημα και με στήριξαν σε κρίσιμα σημεία της ζωής και της διαδρομής μου.

Πολλά ευχαριστώ Γιώτα, Μαρία, Δημήτρη, Έμυ, Αντώνη, Γιάννη, Κατερίνα, Αλέξανδρε, Σοφία και Έλενα. Φυλάω όλες τις στιγμές.

Αλέξανδρε απλά σ' ευχαριστώ για την υπομονή, την επιμονή, την κατανόηση, τη στήριξη και για τόσα ακόμη που ίσως τελικά δεν έχει νόημα να γραφτούν εδώ.

Η οικογένεια μου είναι η βάση μου. Ο αδερφός μου Γιώργος και οι γονείς μου Στέφανος και Σούλα αποτέλεσαν αυτά τα χρόνια, όπως άλλωστε και σε όλη μου τη ζωή, την αφετηρία μου, το στήριγμά μου και τη δύναμή μου σε όλα ανεξαιρέτως τα επίπεδα. Χωρίς αυτούς δε θα μπορούσα να έχω καν αποτολμήσει αυτό το εγχείρημα, πόσο μάλλον να έχω φτάσει στο σημείο να το ολοκληρώνω σήμερα. Σε αυτούς οφείλω ό,τι είμαι και ό,τι μικρό ή μεγάλο έχω καταφέρει. Δικαιωματικά, λοιπόν, αυτή η Διατριβή είναι και δική τους. Μαμά, μπαμπά, αδερφάκι, σας ευχαριστώ. _

Ευτυχία,
Γιάννενα 2011

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	5
2. Η ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ	5
2.1. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ	5
3. Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	6
4. Η ΜΕΤΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	7
4.1. ΤΑ DNA ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ	7
4.2. ΤΑ ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ	9
4.2.1. Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια	10
4.2.1.1. Τα στοιχεία LINE	10
4.2.1.2. Τα στοιχεία SINE	12
4.2.1.3. Τα στοιχεία SVA	12
4.2.2. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια	13
4.3. ΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΡΕΤΡΟΪΟΙ	14
4.3.1. Τα δομικά χαρακτηριστικά των Ενδογενών Ρετροϊών	15
4.3.2. Η ονοματολογία και η ταξινόμηση των Ενδογενών Ρετροϊών	16
4.3.3. Οι οικογένειες HERV	16
4.3.4. Η οικογένεια HERV-K	17
4.3.4.1. Η οικογένεια HERV-K10	18
5. Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	18
6. ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ	20
7. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	22
8. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	22
8.1. ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ	23
8.2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ	24
8.3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ	24
8.4. ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	25
9. Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ	25
9.1. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ	26

10. Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA	27
10.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ	27
10.2. ΟΙ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ	28
11. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	29
12. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ DNA	31
12.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	32
12.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ HERV	32
13. Η ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΗΜΑΔΙΟΥ	33
13.1. ΤΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΑΡΡΕΝΩΝ ΓΑΜΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	34
13.2. Ο ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	35
13.3. Ο ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΖΥΓΩΤΟ	35
14. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	37
14.1. HERV ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ	37
15. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ	38
15.1. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 11	40
15.2. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 14	42
16. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	43
16.1. ΟΙ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ	43
16.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	43
16.3. Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ	44
17. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ	44
18. Η ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ	45
18.1. PGD ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ	46
B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	47
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ	55
1.1. ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΡΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ	55
1.2. ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΥΓΡΟ (ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ)	55

1.3. ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ	55
1.4. DNA ΑΠΟ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ	56
2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA	56
2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	56
2.1.1. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα	56
2.1.2. Απομόνωση DNA από βιοψίες όρχεων	56
2.1.3. Απομόνωση DNA από σπερματοζώαρια	57
2.2. ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ NaHSO ₃	57
2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	59
2.3.1. Ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (MS-PCR)	60
2.3.1.1. <i>IGF2/H19</i>	62
2.3.1.2. <i>CDKN1C (p57^{KIP2})</i>	62
2.3.1.3. <i>DLK1/MEG3</i>	63
2.3.1.4. <i>HERV-K10</i>	64
2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	65
2.5. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	66
3. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	66
3.1 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ <i>in situ</i> ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ (FISH) ΣΕ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ	66
3.1.1. Παρασκευή μεταφασικών χρωμοσωμάτων από κύτταρα σε καλλιέργεια	67
3.1.2. Δημιουργία παρασκευασμάτων μεταφασικών χρωμοσωμάτων	67
3.1.3. Παρασκευή σημασμένου DNA	68
3.1.4. DNA FISH	68
3.2. RNA FISH ΣΕ ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ	69
3.2.1. Μονιμοποίηση ωαρίων	70
3.2.2. RNA FISH	71
3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΔΑΣ	72
3.3.1. Καλλιέργεια και παρασκευή μεταφασικών χρωμοσωμάτων	73
3.3.2 Προετοιμασία και χρώση παρασκευασμάτων για οπτικοποίηση των SCE	73

4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	74
4.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	74
4.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA	75
4.3. ΥΛΙΚΑ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ	76
4.3.1. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες	76
4.3.2. Δημιουργία ισοτελικών άκρων	77
4.3.3. Αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα	77
4.3.4. Αντίδραση σύνδεσης	78
4.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	78
4.4.1. Ηλεκτροφόρηση DNA	78
4.4.2. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης	78
4.4.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA	79
5. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	79
5.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ	79
5.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	80
5.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ	80
5.4. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	81
5.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	81
5.6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA	82
6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	83
6.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	83
6.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	84
6.3. ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	85
6.3.1. Θρεπτικά υλικά	85
6.3.2. Διάλυμα έκπλυσης	85
6.3.3. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA	85
6.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	86
6.5. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ	86

6.6. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ	86
6.6.1. Μεταφορά εξωγενούς DNA με κατιοντικά λιπίδια	87
6.6.2. Μεταφορά εξωγενούς DNA με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου	88
6.6.3. Μεταφορά εξωγενούς DNA με μικροένεση	89
7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	89
7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ	89
7.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	89
7.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ (RT-PCR)	90
7.3.1. Παρασκευή συμπληρωματικού DNA	90
7.3.2. Ποσοτικοποίηση του cDNA	91
7.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	91
8. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	92
8.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	92
8.1.1. Καλλιεργούμενα κύτταρα	93
8.1.2. Ανώριμα ωάρια	93
8.2. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ	93
8.2.1. Φθορισμο-ενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (FACS)	93
8.2.2. Ανάλυση της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου	95
8.2.3. Επιλογή και διαχωρισμός κυττάρων	95
8.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	96
8.3.1. Εκχύλιση ολικού DNA από κύτταρα θηλαστικών	96
8.3.2. Εκχύλιση ολικού DNA από ανώριμα ωάρια	96
8.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	96
B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
1. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10	101
1.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ HERV-K	101
1.1.1. Κατασκευή ενός λειτουργικού για τη ρετρομετάθεση ανασυνδυασμένου στοιχείου HERV-K10	101
1.1.2. Κατασκευή ενός μη λειτουργικού για τη ρετρομετάθεση στοιχείου HERV-K10	103
1.1.3. Λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης	104

1.2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ HERV-K10	105
1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ	106
1.4. Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10	109
1.5. Η ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10	112
1.6. Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΕΤΡΑΒΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΩΝ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	114
1.7. Η ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΤΩΝ HERV-K10 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΑ HERV-K10	115
1.8. Η ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10 ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	116
1.9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΕ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ	118
1.10. Η Ν-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΚΥΣΤΕΪΝΗ ΑΝΑΣΤΡΕΦΕΙ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	119
1.11. ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΣΕ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	119
1.12. ΥΨΗΛΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ HERV-K10 ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ	121
1.13. ΕΚΦΡΑΣΗ RNA HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ	122
1.14. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΣΕ ΩΑΡΙΑ	124
2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ HERV-K10 ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ	125
2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ PGD	126
2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΡΧΕΩΝ ΥΠΟΓΟΝΙΜΩΝ ΑΝΔΡΩΝ	128
2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΩΝ ΑΝΔΡΩΝ	130
3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	132
Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	135
1. ΜΕΛΕΤΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ	137

1.1. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΣΕ ΥΨΗΛΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ	137
1.2 ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΕΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΕΣ	138
1.3. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ	139
1.4. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ	139
1.5. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa	140
1.6. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ A549	140
1.7. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ	141
1.8. ΕΚΦΡΑΣΗ RNA HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ	142
1.9. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ	143
2. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ	144
2.1. ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ PGD	144
2.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	146
2.2.1. Διαταραχή της μεθυλίωσης σε ανώριμα σπερματοζώαρια	147
2.2.2. Διαταραχή της μεθυλίωσης σε ώριμα σπερματοζώαρια	147
2.3. ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ART	149
3. ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ	150
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	153
III. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ	157
A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	159
B. ABSTRACT	163
IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	167

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ - ΙΣΤΟΡΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο Ελβετός βοτανολόγος Nageli τη δεκαετία του 1840 περιέγραψε για πρώτη φορά την ύπαρξη δομών που μοιάζουν με νήματα στο εσωτερικό των πυρήνων φυτικών κυττάρων. Ονόμασε τις δομές αυτές «μεταβατικές κυτταροβλάστες», οι οποίες πιθανότατα δεν ήταν τίποτα άλλο παρά αυτό που σήμερα ονομάζουμε χρωμοσώματα. Τις δεκαετίες που ακολούθησαν, διάφοροι ερευνητές ασχολήθηκαν με το ρόλο των δομών αυτών στην κυτταρική διαίρεση και σύντηξη [1-3]. Ο όρος «χρωμόσωμα» επινοήθηκε το 1888 από τον Waldeyer μετά από την ανάπτυξη των τεχνικών χρώσης που κατέστησαν τις δομές αυτές πιο ευδιάκριτες (χρωμόσωμα = χρώμα + σώμα) [4].

Στις αρχές του 1900, η θεωρία του Mendel άρχισε να επανέρχεται στο προσκήνιο, μετά από 40 χρόνια χρόνια που είχε μείνει στην αφάνεια. Οι μελέτες μιας σειράς ερευνητών κατέληξαν στο ότι τα κληρονομικά χαρακτηριστικά και κατ' επέκταση τα γονίδια, όρος που εισήχθη στα τέλη της δεκαετίας του 1910 από τον Johannsen, βρίσκονται πάνω στα χρωμοσώματα. Αυτή η σειρά γεγονότων σηματοδότησε την απαρχή της σύγχρονης Κυτταρογενετικής, όρος που χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Sutton, η οποία άρχισε να αναπτύσσεται με αργούς ρυθμούς [5-7].

Ο φυσιολογικός αριθμός χρωμοσωμάτων του ανθρώπου που αναφερόταν κατά καιρούς κυμαίνονταν από 16 μέχρι 48, μέχρι τη δεκαετία του 1950, οπότε και επιτεύχθηκαν αρκετές τεχνικές βελτιώσεις, οι οποίες επέτρεψαν την καλύτερη παρατήρηση των χρωμοσωμάτων. Έτσι, το 1956 οι Tjio και Levan, στο κλασικό τους πλέον άρθρο, ανέφεραν για πρώτη φορά ότι ο πραγματικός αριθμός των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου είναι 46, κάτι που γρήγορα επιβεβαιώθηκε και σε άλλο ιστό [8, 9]. Τρία μόλις χρόνια αργότερα ήρθε η πρώτη απόδειξη της κλινικής χρησιμότητας του καρυοτύπου, με την αποκάλυψη ότι τα άτομα με σύνδρομο Down έχουν ένα επιπλέον χρωμόσωμα, ενώ ακολούθησε η αποκάλυψη και άλλων συνδρόμων με ανευπλοειδίες [10].

Τη δεκαετία του 1970 αναπτύχθηκαν νέες τεχνικές χρώσης και ζώνωσης των χρωμοσωμάτων (ζώνωση G, Q, R, σήμανση με BrdU), που αύξησαν τη διακριτική ικανότητα και συν'εβαλαν στην ευκολότερη και αποτελεσματικότερη παρατήρησή τους [11-13]. Τα χρόνια που ακολούθησαν η κυτταρογενετική σημείωνε συνεχώς πρόοδο και σταδιακά αυξανόταν όλο και περισσότερο η διακριτική της ικανότητα, καθώς χρησιμοποιούνταν τεχνικές για την παραγωγή όλο και λιγότερο συμπυκνωμένων χρωμοσωμάτων [14, 15].

2. Η ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΟΥ

Η χρωμοσωμική σύσταση ενός διπλοειδούς κυττάρου στον άνθρωπο αποτελείται από 46 χρωμοσώματα ή 23 ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων, 22 αυτοσωματικών και 1 ζεύγους φυλετικών χρωμοσωμάτων. Το ένα χρωμόσωμα του κάθε ζεύγους προέρχεται από τον πατέρα και το άλλο από τη μητέρα. Οι γυναίκες έχουν 2 φυλετικά χρωμοσώματα X, ένα από τον κάθε γονέα, ενώ οι άνδρες 1 χρωμόσωμα X από τη μητέρα και 1 χρωμόσωμα Y από τον πατέρα. Τα γαμετικά κύτταρα είναι απλοειδή, δηλαδή περιλαμβάνουν 23 χρωμοσώματα, 22 αυτοσωμικά και 1 φυλετικό. Το σύνολο του γενετικού υλικού ενός ατόμου αποτελεί το γονιδίωμα του.

2.1. Η ΔΟΜΗ ΚΑΙ Η ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Τα δύο βασικά χημικά συστατικά της χρωματίνης είναι το DNA και οι πρωτεΐνες. Το ικρίωμα του χρωμοσώματος σχηματίζεται από πρωτεΐνες, ιστόνες και μη ιστόνες,

από τις οποίες οι πρώτες είναι ιδιαίτερα συντηρημένες μεταξύ των διαφορετικών οργανισμών και ο ρόλος τους στη διατήρηση της ακεραιότητας του χρωμοσώματος είναι καίριος. Τα άκρα του χρωμοσώματος αποτελούνται από τα τελομερή, εξειδικευμένες αλληλουχίες συνεχών επαναλήψεων του εξανουκλεοτιδίου TTAGGG, οι οποίες αφενός αποτρέπουν τη σύντηξη των χρωμοσωμάτων και αφετέρου διασφαλίζουν την αντιγραφή ολόκληρης της αλληλουχίας DNA των χρωμοσωμάτων κατά το διπλασιασμό. Το κεντρομερίδιο είναι εξειδικευμένη περιοχή στην οποία συνδέεται η μιτωτική άτρακτος ώστε να μετακινηθούν οι δύο αδελφές χρωματίδες προς αντίθετους πόλους του διαιρούμενου κυττάρου.

3. Η ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η συνολική ποσότητα του DNA του απλοειδούς γονιδιώματος είναι χαρακτηριστική κάθε είδους οργανισμού. Το γονιδίωμα αποτελείται από δύο γενικούς τύπους αλληλουχιών: **α)** το μη επαναλαμβανόμενο DNA, που αποτελείται από μοναδικές αλληλουχίες και **β)** το επαναλαμβανόμενο DNA, που περιλαμβάνει αλληλουχίες που απαντώνται στο γονιδίωμα σε περισσότερα από ένα αντίγραφα.

Το επαναλαμβανόμενο DNA αποτελεί σημαντικό τμήμα των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτικών οργανισμών. Μάλιστα, υπάρχει έντονος παραλληλισμός μεταξύ της εξελικτικής πολυπλοκότητας του οργανισμού και της αύξησης του αριθμού των επαναλαμβανόμενων στοιχείων που περιλαμβάνονται στο γονιδίωμά του, με εξαίρεση ίσως τα φυτά, τα γονιδιώματα των οποίων βρίθουν επαναλαμβανόμενο DNA [16, 17]. Ανάλογα με τον αριθμό των επαναλήψεων της αλληλουχίας, το επαναλαμβανόμενο DNA μπορεί να διακριθεί περαιτέρω σε ενδιάμεσα επαναλαμβανόμενο, το οποίο αποτελείται από βραχείες αλληλουχίες που υπάρχουν σε 10-1,000 αντίγραφα στο γονιδίωμα και υπερεπαναλαμβανόμενο, που αποτελείται από βραχείες αλληλουχίες, συνήθως <100 bp με χιλιάδες αντίγραφα στο γονιδίωμα [18].

Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

i) Μεταθετά στοιχεία. Σημαντικό ποσοστό του ενδιάμεσα επαναλαμβανόμενου DNA αποτελείται από μεταθετά στοιχεία (transposable elements, TE) ή τρανσποζόνια, τα οποία είναι μικρές αλληλουχίες DNA μεγέθους περίπου 1 Kb που έχουν την ικανότητα να μετατίθενται σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα ή/και να δημιουργούν αντίγρατά τους. Αποτελούν περίπου το 46.36% του ανθρώπινου γονιδιώματος, απαντώντας σε περίπου 3.2×10^6 αντίγραφα.

ii) Κατεργασμένα ψευδογονίδια. Πρόκειται για αλληλουχίες που προέρχονται από την ενσωμάτωση ενός αντιγράφου mRNA στο γονιδίωμα, μετά από αντίστροφη μεταγραφή του και περιλαμβάνουν γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και μικρά δομικά RNA. Αποτελούν περίπου το 0.4% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

iii) Απλές και Διαδοχικές επαναλήψεις. Πρόκειται για υπερεπαναλαμβανόμενο DNA της ιδιοστατικής ετεροχρωματίνης που περιλαμβάνει επαναλήψεις απλών αλληλουχιών, όπως για παράδειγμα (CA)_n. Μπορεί να περιλαμβάνουν διαδοχικές μονάδες 123 bp σε περίπου 2,000 αντίγραφα ή επαναλαμβανόμενες μονάδες 234 bp σε περισσότερα από 10,000 αντίγραφα. Αντιστοιχούν στο 3% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

iv) Μερικοί διπλασιασμοί. Πρόκειται για επαναλήψεις τμημάτων DNA μεγέθους 10-300 Kb που έχουν αναδιπλασιαστεί σε μια νέα θέση, ακόμη και στο ίδιο χρωμόσωμα και αποτελούν το 5% του ανθρώπινου γονιδιώματος.

4. Η ΜΕΤΑΘΕΣΗ ΚΑΙ ΤΑ ΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Δύο είναι οι κύριες κατηγορίες αλληλουχιών που συνυπάρχουν στο γονιδίωμα, τα «κλασικά» γονίδια και τα μεταθετά στοιχεία. Ενώ η σημασία και η χρησιμότητα των κλασικών γονιδίων αναγνωρίστηκε από πολύ νωρίς, η συζήτηση σχετικά με τη συμβολή των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα συνεχίζεται. Αν και κάποτε θεωρούνταν εγωιστικό και παρασιτικό DNA [19], ο πραγματικός τους ρόλος αποκαταστάθηκε από νέες επιστημονικές ανακαλύψεις που ήρθαν στο προσκήνιο και αποκάλυψαν το σημαντικό τους ρόλο στη δομή, τη λειτουργία και την εξέλιξη των γονιδίων και των γονιδιωμάτων [20, 21].

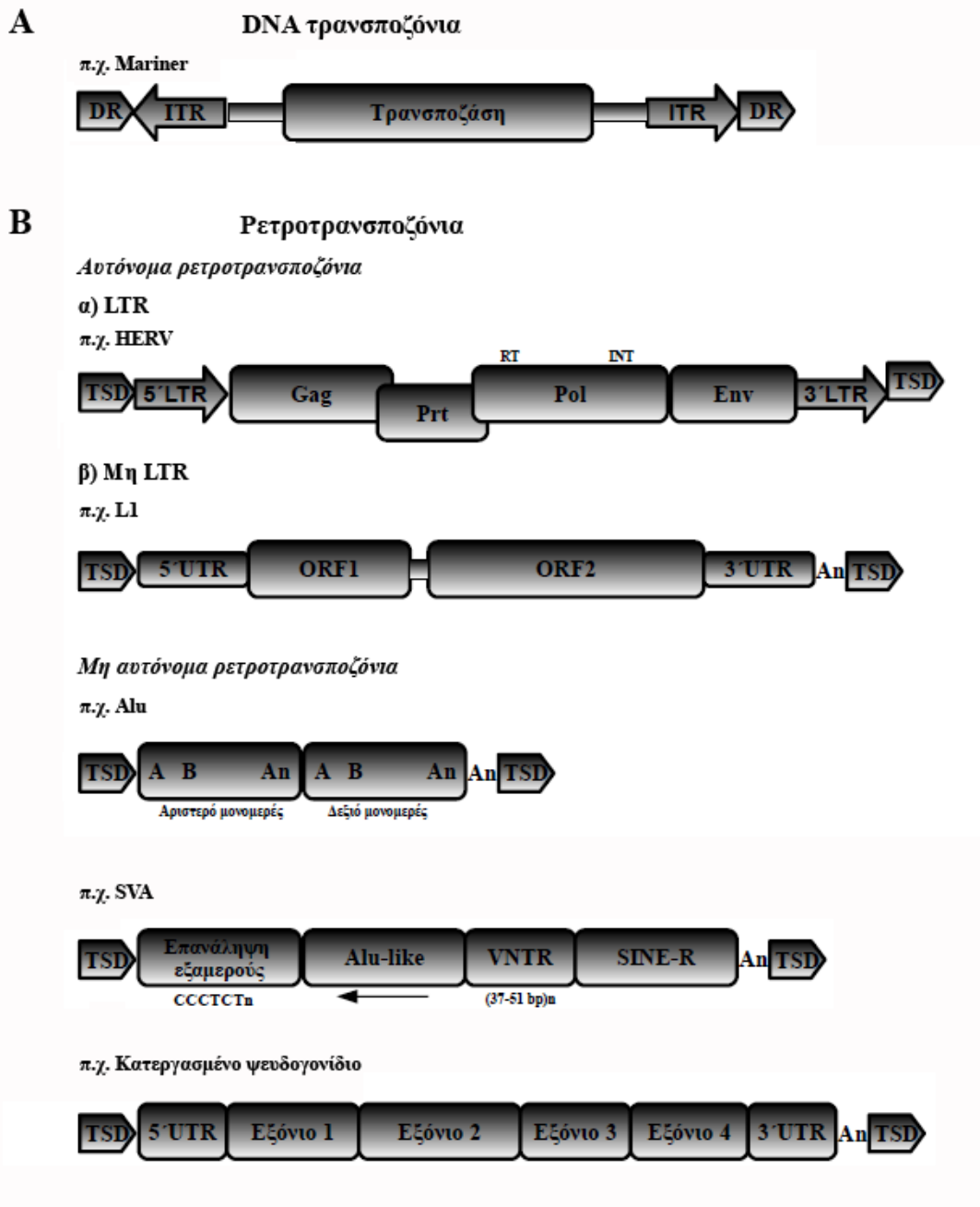
Με τον όρο μεταθετά στοιχεία περιγράφονται μη κωδικές μετρίως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA που βρίσκονται διασκορπισμένες στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών και των προκαρυωτικών οργανισμών. Πρόκειται για κινητές αλληλουχίες, δηλαδή αλληλουχίες που είναι ικανές να μεταφέρονται από μια περιοχή του γονιδιώματος σε μια άλλη. Η ιδιότητα των μεταθετών στοιχείων να μετακινούνται σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα του κυττάρου από το οποίο προέρχονται αναφέρεται ως μετάθεση [22].

Η πρώτη αναφορά στα μεταθετά στοιχεία έγινε τη δεκαετία του 1940 από τη Barbara McClintock, η οποία ανακάλυψε τα μεταθετά στοιχεία μελετώντας τη μοριακή βάση της χρωμοσωμικής απόκλισης στον αραβόσιτο (*Zea mays*). Αρχικά αναφέρθηκε σε αυτά ως «στοιχεία ελέγχου» που καθορίζουν το φαινότυπο κι αποτελούν γενετικές οντότητες που έχουν την χαρακτηριστική ιδιότητα της μετακίνησης από και προς γονίδια [23, 24]. Η σπουδαιότητα της ανακάλυψης εκτιμήθηκε πλήρως πολλά χρόνια αργότερα, ενώ χρειάστηκε μισός επιπλέον αιώνας για την κατανόηση του τρόπου δράσης των μεταθετών στοιχείων και των επιπτώσεων της δράσης τους στη δομή και τη λειτουργία του γονιδιώματος [25].

Τα κινητά στοιχεία του DNA μπορούν να διακριθούν σε δύο ομάδες, τα DNA τρανσποζόνια και τα ρετροτρανσποζόνια (Εικ. 1). Η ταξινόμηση γίνεται βάσει του μηχανισμού μετάθεσής τους, που μπορεί να περιλαμβάνει ένα ενδιάμεσο μόριο DNA ή RNA, αντίστοιχα [22]. Τα DNA τρανσποζόνια μετατίθενται άμεσα ως μόρια DNA με ένα μηχανισμό «αποκοπής και ενσωμάτωσης» [26, 27]. Από την άλλη, τα ρετροτρανσποζόνια μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» που περιλαμβάνει την αντίστροφη μεταγραφή ενός ενδιάμεσου μορίου RNA το οποίο στη συνέχεια ενσωματώνεται ως συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) σε νέα θέση στο γονιδίωμα, ενώ το αρχικό αντίγραφο παραμένει *in situ* στη θέση από όπου αντιγράφηκε (Εικ. 2) [28, 29].

4.1. ΤΑ DNA ΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

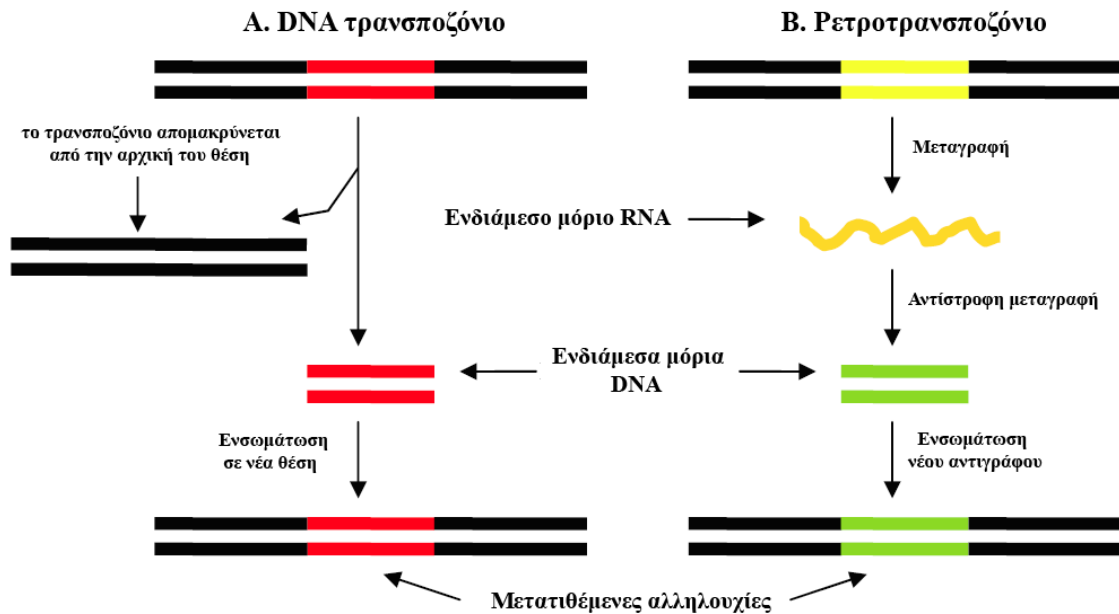
Τα DNA τρανσποζόνια δε διπλασιάζονται κατά τη διάρκεια ενός γεγονότος μετάθεσης και είναι σχετικά σπάνια στο γονιδίωμα [30]. Τα πρώτα τρανσποζόνια που ανακαλύφθηκαν ήταν τα Activator (Ac) και Dissociation (Ds) του αραβόσιτου [23], τα οποία όμως χαρακτηρίστηκαν σε μοριακό επίπεδο πολλά χρόνια αργότερα [31]. Τα DNA τρανσποζόνια των ευκαρυωτικών οργανισμών, ανάλογα με την ικανότητά τους να κωδικοποιούν για ενεργότητα τρανσποζάσης, διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα. Τα περισσότερα αντίγραφα των DNA του γονιδιώματος είναι ανενεργά, όμως, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι ένα ενεργό τρανσποζόνιο είναι ικανό να κινητοποιήσει ένα ανενεργό, προσφέροντας τις απαιτούμενες για τη μετάθεση ενεργότητες *in trans* [32, 33].



Εικ. 1. Τύποι μεταθετών στοιχείων στα θηλαστικά.

(A) DNA τρανσποζόνια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα DNA τρανσποζονίου είναι το Mariner. (B) Ρετροτρανσποζόνια. Διακρίνονται σε (α) LTR και (β) μη LTR ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μακρών τελικών επαναλήψεων στα άκρα τους. Όλα τα ρετροτρανσποζόνια περιβάλλονται από βραχείες ευθείες επαναλήψεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα LTR ρετροτρανσποζονίων είναι οι ενδογενείς ρετροϊοί. Ανάλογα με την ικανότητά τους να κωδικοποιούν για τις απαραίτητες για τη ρετρομετάθεση ενεργότητες διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα. Παράδειγμα αυτόνομων ρετροτρανσποζονίων αποτελεί η οικογένεια των LINE με χαρακτηριστικό εκπρόσωπο τα L1. Στα μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια περιλαμβάνονται τα SINE (π.χ. Alu), τα σύνθετα στοιχεία SVA και τα κατεργασμένα ψευδογονίδια.

DR: διπλασιασμοί (duplication repeats), ITR: ανεστραμμένες τελικές επαναλήψεις (inverted terminal repeats), TSD: βραχείες ευθείες επαναλήψεις, LTR: μακρές τελικές επαναλήψεις, UTR: μη μεταφραζόμενη περιοχή, ORF: ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης, VNTR: ποικίλου αριθμού συνεχείς επαναλήψεις.

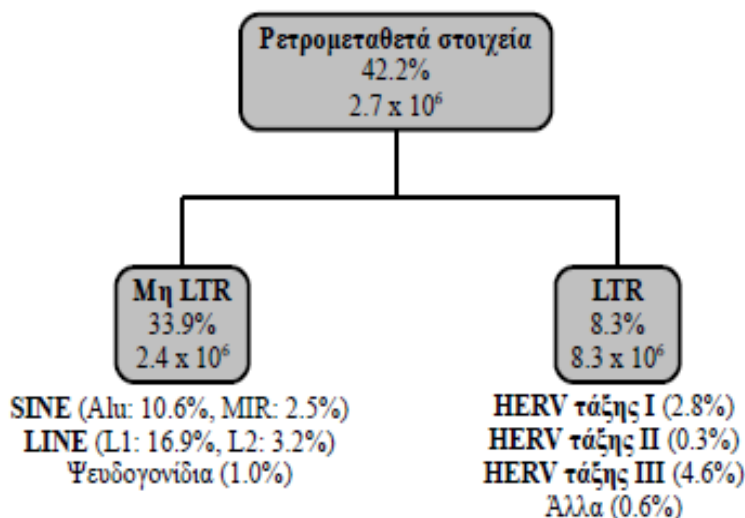


Εικ. 2. Ταξινόμηση μεταθετών στοιχείων ανάλογα με το μηχανισμό μετάθεσής τους. (Α) Τα DNA τρανσποζόνια μετατίθενται μέσω ενός μηχανισμού «αποκοπής και ενσωμάτωσης». (Β) Τα ρετροτρανσποζόνια μετατίθενται με ένα μηχανισμό «αντιγραφής και ενσωμάτωσης» μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου RNA.

Γενικά, τα ευκαρυωτικά DNA τρανσποζόνια είναι γενετικά αυτόνομες μονάδες μεγέθους 1-3 Kb. Στον άνθρωπο υπάρχουν 294,000 αντίγραφα DNA τρανσποζονίων που αντιστοιχούν στο 2.84% του γονιδιώματος [18]. Ως προς τη δομή τους, τα ευκαρυωτικά DNA τρανσποζόνια έχουν ομοιότητες με τα βακτηριακά στοιχεία IS (Αλληλουχίες Ένθεσης – Insertion Sequences, IS) [34] και αποτελούνται από την κεντρική περιοχή που κωδικοποιεί για την τρανσποζάση, δύο αντίστροφες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 5-500 bp και τις ευθείες τελικές επαναλήψεις μεγέθους 2-8 bp που βρίσκονται στα άκρα τους (Εικ. 1Α). Τα μη αυτόνομα DNA τρανσποζόνια δεν κωδικοποιούν για ενεργότητα τρανσποζάσης είτε εξαιτίας ελλειμμάτων που διακόπτουν το ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου της τρανσποζάσης ή σημειακών μεταλλάξεων στην αλληλουχία του γονιδίου που οδηγούν στην παραγωγή ανενεργής πρωτεΐνης [35].

4.2. ΤΑ ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑ

Τα ρετροτρανσποζόνια αποτελούν το 90% των μεταθετών στοιχείων του ανθρώπινου γονιδιώματος [36]. Όλοι οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί φέρουν ρετροτρανσποζόνια στα γονιδιώματά τους και στον άνθρωπο συγκεκριμένα υπάρχουν 2.7×10^6 αντίγραφα που αντιστοιχούν στο 42.2% του γονιδιώματος [37]. Ορισμένα ρετροτρανσποζόνια εμφανίζουν σημαντικές δομικές και λειτουργικές ομοιότητες με τους προιούς των ρετροϊών και βάσει αυτής τους της ιδιότητας κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες, τα ρετροτρανσποζόνια που δε φέρουν μακρές τελικές επαναλήψεις (Long Terminal Repeats, LTR) και γι' αυτό ονομάζονται μη LTR ρετροτρανσποζόνια (non-LTR retrotransposons) ή ρετροτρανσποζόνια μη ιϊκού τύπου κι εκείνα που φέρουν LTR και αποκαλούνται LTR ρετροτρανσποζόνια (LTR retrotransposons) ή ρετροτρανσποζόνια ιϊκού τύπου (Εικ. 3).



Εικ. 3. Ταξινόμηση των κυριότερων ρετρομεταθετών στοιχείων [37].

Δίνονται οι κυριότερες κατηγορίες ρετρομεταθετών στοιχείων του ανθρώπου, το ποσοστό του γονιδιώματος στο οποίο αντιστοιχούν και η εκτίμηση του αριθμού των αντιγράφων τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

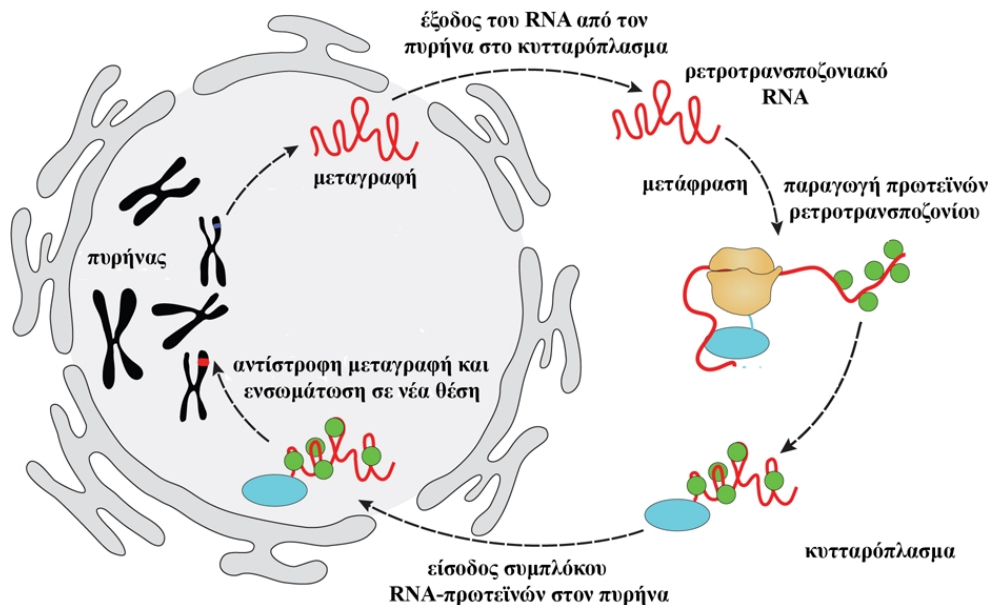
4.2.1. Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια

Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια αποτελούν την πιο διαδεδομένη κατηγορία ρετροτρανσποζονίων των ευκαρυωτικών οργανισμών και αντιστοιχούν στο 33.9% του γονιδιώματος του ανθρώπου [37], με κυριότερους εκπροσώπους τα μακρά διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Long Interspersed Nuclear Elements, LINE), τα βραχεία διάσπαρτα πυρηνικά στοιχεία (Short Interspersed Nuclear Elements, SINE) και τα σύνθετα στοιχεί SVA (SINE-R, VNTR, Alu) [38-40].

Τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια διαθέτουν ευθείες επαναλήψεις εκατέρωθεν και αλληλουχίες πλούσιες σε κατάλοιπα A στο ένα άκρο τους και, παρότι δε διαθέτουν LTR, περιλαμβάνουν εσωτερικούς υποκινητές για μεταγραφή από την RNA πολυμεράση III του κυττάρου. Στην Εικόνα 4 που ακολουθεί φαίνεται η αλληλουχία γεγονότων που λαμβάνει χώρα κατά τη διάρκεια της μετάθεσης ενός μη LTR ρετροτρανσποζονίου.

4.2.1.1. Τα στοιχεία LINE

Τα LINE είναι τα καλύτερα χαρακτηρισμένα αυτόνομα μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία [39]. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 868,000 αντίγραφα LINE τα οποία διακρίνονται σε τρεις οικογένειες (LINE-1, LINE-2 και LINE-3) που αντιστοιχούν συνολικά στο 21% του γονιδιώματος του ανθρώπου. Η οικογένεια των LINE-1 ή L1 είναι η πολυπληθέστερη (520,000 αντίγραφα) και η μόνη που περιλαμβάνει όχι μόνο ανενεργά, ελλειμματικά στοιχεία, εξαιτίας κολόβωσης της αλληλουχίας τους (έλλειμμα στο 5' άκρο τους) ή συσσώρευσης σημειακών μεταλλάξεων [39], αλλά και ενεργά μέλη [18]. Συγκεκριμένα, στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 3,000-5,000 πλήρους μήκους στοιχεία L1, από τα οποία, όμως, μόλις 80-100 είναι ικανά προς ρετρομετάθεση [41].



Εικ. 4. Αλληλουχία γεγονότων κατά τη διάρκεια της μετάθεσης ενός αυτόνομου μη LTR ρετρομεταθετού στοιχείου.

Η ρετρομετάθεση των μη LTR ρετροτρανσποζονίων (π.χ. LINE) είναι μια ενδοκυτταρική διαδικασία μέρος της οποίας πραγματοποιείται στον πυρήνα, ενώ κάποια από τα στάδια της λαμβάνουν χώρα στο κυτταρόπλασμα. Περιλαμβάνει τη μεταγραφή του στοιχείου, τη μετάφραση του ρετροτρανσποζονιακού RNA, την αντίστροφη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του νέου αντιγράφου στο γονιδίωμα.

Ένα πλήρους μήκους στοιχείο L1 του ανθρώπου έχει τυπικό μέγεθος περίπου 6 Kb και αποτελείται από μία 5' αμετάφραστη περιοχή (5' Untranslated Region, 5'UTR), δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (Open Reading Frame 1, ORF1 και Open Reading Frame 2, ORF2) και μία 3' αμετάφραστη περιοχή (3' Untranslated Region, 3'UTR) (Εικ. 1Bβ) [42]. Η 5'UTR μεγέθους 910 bp είναι πλούσια σε CpG και λειτουργεί ως εσωτερικός υποκινητής [43] για μεταγραφή από την RNA πολυμεράση II. Τα ORF1 και ORF2 διαχωρίζονται από μία μη κωδική περιοχή με ρόλο συνδέτη, μεγέθους 63 bp. Μεταγράφονται προς ένα δικιστρονικό mRNA και κωδικοποιούν για πρωτεΐνες απαραίτητες για ρετρομετάθεση [44]. Το ORF1 κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ORF1p μεγέθους περίπου 40 kDa. Η ORF1p σχηματίζει ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σωματίδια (Ribonucleic Particles, RNP) [45], έχει δυνατότητα πρόσδεσης στο RNA [46] και διαθέτει ενεργότητα συνοδού νουκλεϊκών οξέων, η οποία είναι ανεξάρτητη από τη δυνατότητα πρόσδεσης στο RNA και απαραίτητη για ρετρομετάθεση [47]. Το ORF2 κωδικοποιεί για την πρωτεΐνη ORF2p, μεγέθους περίπου 150 kDa η οποία διαθέτει τρεις συντηρημένες δομικές περιοχές: μια αμινοτελική περιοχή με ενεργότητα ενδονουκλεάσης (Endonuclease, EN) [48], μια κεντρική περιοχή με ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, RT) [49] και μια καρβοξυτελική περιοχή με πολλά κατάλοιπα κυστεΐνης [50]. Η ενεργότητα EN δημιουργεί θραύση στη μία έλικα του δίκλωνου μορίου DNA και, αν και δείχνει προτίμηση σε θέσεις του γονιδιώματος με αλληλουχία 5'-TTTTA-3', η ενσωμάτωση των L1 γίνεται κατά βάση με τυχαίο τρόπο [51]. Η περιοχή RT χαρακτηρίζεται από την παρουσία 11 συντηρημένων ομο-ολιγομερών αλληλουχιών και διαθέτει ενζυμικές ενεργότητες RNA- και DNA-εξαρτώμενης DNA πολυμεράσης οι οποίες εκφράζονται μέσω του

καταλυτικού δομικού μοτίβου FXDD, ενώ ακόμη εξαρτώνται από την παρουσία ιόντων Mg^{2+} [49, 52, 53]. Η αντίστροφη μεταγραφή των στοιχείων L1 χρησιμοποιεί ως εκκινήτη το γενωμικό DNA και πραγματοποιεί την αντίστροφη μεταγραφή μέσω μηχανισμού που είναι γνωστός ως αντίστροφη μεταγραφή πριμοδοτημένου στόχου (Target Primed Reverse Transcription, TPRT). Από τη θραύση της αλυσίδας που προκαλεί η EN προκύπτει μια μονόκλωνη προεξοχή με υψηλή περιεκτικότητα σε T, η οποία μπορεί να υβριδοποιηθεί με την ουρά πολυ-A του mRNA του L1 και αποτελεί τον εκκινήτη για την αντίστροφη μεταγραφή [54]. Η καρβοξυτελική περιοχή περιέχει μία περιοχή CCHC με δομή που μοιάζει με κλείδωση δακτύλου ψευδαργύρου (zinc knuckle-like) [50], η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίστροφη μεταγραφή και θεωρείται ότι είτε μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις ORF2-DNA κατά τη διάρκεια ενσωμάτωσης του στοιχείου L1 [39, 44] ή διευκολύνει τον πολυμερισμό του στοιχείου L1 από την αντίστροφη μεταγραφή [53]. Η 3'UTR μέγεθος 205 bp περιέχει λειτουργικό σήμα πολυαδενυλίωσης AATAAA που ακολουθείται από ουρά πολυ-A μεταβλητού μεγέθους. Τέλος, στα δύο άκρα των στοιχείων L1 υπάρχουν βραχείες ευθείες επαναλήψεις 2-20 bp (Target Site Duplications, TSD), οι οποίες δημιουργούνται από τον διπλασιασμό της θέσης στόχου μετά από ρετρομετάθεση [39].

4.2.1.2. Τα στοιχεία SINE

Τα στοιχεία SINE είναι μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια και αποτελούν μια από τις σημαντικότερες και πολυπληθέστερες οικογένειες μη LTR ρετροτρανσποζονίων. Είναι από τα πλέον επιτυχημένα ρετροτρανσποζόνια και ο αριθμός τους φτάνει τα 1.6×10^6 αντίγραφα, που αντιστοιχεί στο 13.64% του ανθρώπινου γονιδιώματος [18]. Έχουν μέγεθος 100-300 bp, δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και χρησιμοποιούν για τη ρετρομετάθεσή τους *in trans* ενζυμικές ενεργότητες που κωδικοποιούνται από τα αυτόνομα ρετρομεταθετά στοιχεία L1 [21].

Τα SINE αποτελούνται από μία περιοχή που προέρχεται από αλληλουχίες κυτταρικών γονιδίων που κωδικοποιούν για tRNA η οποία καταλήγει σε μία ουρά πολυ-A στο 3' άκρο, ενώ όλη η δομή περικλείεται από βραχείες TSD και φέρουν εσωτερικό υποκινητή για την RNA πολυμεράση III (Εικ. 1Bβ) [55, 56].

Έχουν χαρακτηριστεί αρκετές οικογένειες SINE (π.χ. Alu, B1, B2, MIR και ID), ωστόσο η συντριπτική πλειοψηφία των SINE του ανθρώπου ανήκουν στην οικογένεια των στοιχείων Alu. Βασικό χαρακτηριστικό των Alu είναι το μικρό μήκος και ο μεγάλος αριθμός των αντιγράφων που βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, υπάρχουν περίπου 1.4×10^6 αντίγραφα Alu μεγέθους 300 bp [18], τα οποία δεν κατανέμονται τυχαία αλλά τείνουν να συσσωρεύονται σε περιοχές που περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό γονιδίων [57].

4.2.1.3. Τα στοιχεία SVA

Τα SVA είναι σύνθετα μη κωδικά ρετροτρανσποζόνια, η ανακάλυψη των οποίων προέκυψε από τη μελέτη των στοιχείων SINE-R, τα οποία προέρχονται από τον ανθρώπινο ενδογενή ρετροϊό HERV-K10 και υπάρχουν στο ανθρώπινο γονιδίωμα σε 4,000-5,000 αντίγραφα ανά απλοειδές γονιδίωμα [58].

Το σύνθετο αυτό στοιχείο ονομάστηκε βάσει του γεγονότος ότι περιλαμβάνει SINE-R, ποικίλου αριθμού συνεχείς επαναλήψεις (Variable Number Tandem Repeats, VNTR), αλληλουχίες ομοιάζουσες με τα στοιχεία Alu, επαναλήψεις εξανουκλεοτιδίων και TSD (SINE-R, VNTR, Alu, δηλαδή SVA) [59]. Επομένως,

κάθε ένα από τα συστατικά τμήματα του SVA αποτελεί είτε ρετρομεταθετό στοιχείο ή επαναλαμβανόμενη αλληλουχία. Έχουν αναγνωρισθεί έξι υποοικογένειες SVA (SVA_A-SVA_F), τέσσερις από τις οποίες (SVA_A-SVA_D) εμφανίστηκαν πριν από το διαχωρισμό ανθρώπου, χιμπατζή και γορίλα, ενώ οι υποοικογένειες SVA_E και SVA_F εμφανίζονται μόνο στον άνθρωπο [60]. Υπάρχουν περίπου 2,700 αντίγραφα SVA στο ανθρώπινο γονιδίωμα, από τα οποία περισσότερα από 2,000 είναι πλήρους μήκους [40]. Τα πλήρους μήκους SVA έχουν μέσο μέγεθος περίπου 2 Kb, αλλά στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν αντίγραφα μεγέθους από 700 bp μέχρι 4 Kb [60, 61].

Δομικά, τα πλήρους μήκους SVA περιλαμβάνουν επαναλήψεις του εξανουκλεοτιδίου CCCTCT στο 5' άκρο τους, που ακολουθούνται από μια αντινοηματική αλληλουχία Alu, μια περιοχή VNTR μεγέθους 48-2,300 bp που περιλαμβάνει πολλαπλά αντίγραφα αλληλουχίας 35-50 bp, μια αλληλουχία SINE-R μεγέθους <500 bp που αποτελείται από το 3' άκρο του γονιδίου *env* και το 3' LTR του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 και τέλος, ένα συντηρημένο εξαμερές AATAAA που λειτουργεί ως σήμα πολυαδενυλίωσης και μια ουρά πολυ-A (Εικ. 1Bβ). Δεν είναι γνωστός ο ακριβής αριθμός των επαναλήψεων του εξανουκλεοτιδίου, αλλά υπολογίζεται ότι κυμαίνεται μεταξύ 10 και 13 [40, 60].

Πιθανολογείται ότι για την κινητοποίησή τους χρησιμοποιούν την αντίστροφη μεταγραφάση των L1 [40], υπόθεση που δεν έχει μέχρι σήμερα επιβεβαιωθεί πειραματικά, ενώ πιθανότατα μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II [62].

4.2.2. Τα LTR ρετροτρανσποζόνια

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα στη φύση, καθώς καταλαμβάνουν περίπου το 8.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος [18], και εμφανίζουν ομοιότητες με τους ρετροϊούς τόσο ως προς τη γονιδιακή τους σύσταση όσο και ως προς τη δομή τους. Ακριβώς όπως και οι προΐοι των ρετροϊών διαθέτουν LTR μεγέθους 300-1,500 bp, τα οποία περιέχουν σήματα έναρξης της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II και σήματα λήξης της μεταγραφής, καθώς επίσης και βραχείες ευθείες επαναλήψεις στα άκρα τους [63]. Φυλογενετικές μελέτες βάσει της αλληλουχίας των γονιδίων RT και RNάσης H προτείνουν ότι τα LTR ρετροτρανσποζόνια προέκυψαν από τα μη LTR με προσθήκη των LTR, οι αλληλουχίες των οποίων προέρχονταν από ένα προγονικό μεταθετό στοιχείο [64]. Τα περισσότερα ρετροτρανσποζόνια διακρίνονται από τους ρετροϊούς λόγω απουσίας της εξωκυτταρικής φάσης του κύκλου ζωής τους, καθώς δε διαθέτουν λειτουργικά γονίδια για το σχηματισμό φακέλου και ιικού καψιδίου, κι επομένως τα ισοσώματα που σχηματίζονται ενδοκυτταρικά δεν είναι μολυσματικά. Παρόλα αυτά, υπάρχουν ορισμένες εξαιρέσεις ρετροτρανσποζονίων που περιλαμβάνουν λειτουργικά πλαίσια ανάγνωσης του γονιδίου *env* και για τα οποία έχει ανιχνευθεί ο σχηματισμός εξωκυτταρικών μολυσματικών ισοσωμάτων [65].

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια έχουν μέγεθος 4-10 Kb, και η δομή τους περιλαμβάνει δύο LTR στα δύο άκρα τους, μεταξύ των οποίων υπάρχουν ρυθμιστικές αλληλουχίες σημαντικές για την πριμοδότηση της αντίστροφης μεταγραφής και αλληλουχίες των γονιδίων *gag*, *pol* και *env* [36]. Διακρίνονται σε αυτόνομα και μη αυτόνομα, ανάλογα με το αν κωδικοποιούν για τις απαιτούμενες για ρετρομετάθεση πρωτεΐνες ή όχι. Τα μη αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια, συνήθως διαθέτουν ακέραια τα LTR και τη θέση πρόσδεσης εκκινήτη, αλλά είναι ελλειμματικά για ένα μέρος ή ακόμη και το σύνολο της κωδικής τους περιοχής (solo-LTR). Παρόλα αυτά, ορισμένα είναι ικανά

να μετατεθούν, χρησιμοποιώντας *in trans* πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα αυτόνομα LTR ρετροτρανσποζόνια [66].

Στον άνθρωπο, τα LTR ρετροτρανσποζόνια κατατάσσονται σε 6 ομάδες. Τα μέλη των HERV (Human Endogenous Retroviruses) τάξης I εμφανίζουν ομοιότητες με τους γάμμα ρετροϊούς ή ρετροϊούς τύπου C, όπως ο MLV (murine leukemia virus), με χαρακτηριστικά μέλη τους ενδογενείς ρετροϊούς HERV-E, HERV-R και HERV-H. Οι HERV τάξης II έχουν κοινά χαρακτηριστικά με τους βήτα ρετροϊούς ή ρετροϊούς τύπου B, όπως ο MMTV (εξ' ου και συχνά αναφέρονται ως Human MMTV-Like, HML) και αντιπροσωπευτικά μέλη είναι οι HERV-K. Οι HERV τάξης III ή HERV-L εμφανίζουν κάποια ομοιότητα με τους αφρώδεις ρετροϊούς (spuma retroviruses). Τα στοιχεία MER4, είναι μη αυτόνομοι ενδογενείς ρετροϊοί οι οποίοι συνδέονται φυλογενετικά με τους HERV τάξης I. Τέλος, τα LTR ρετροτρανσποζόνια των τάξεων MST (που έχουν ονομαστεί από την παρουσία μιας περιοριστικής θέσης για το ένζυμο MstII) και MLT (mammalian LTR transposons), είναι μέλη της ευρύτερης υπερικογένειας των μη αυτόνομων στοιχείων MaLR (mammalian apparent LTR retrotransposons), τα οποία δε συνδέονται φυλογενετικά με μολυσματικούς ρετροϊούς [18, 63, 67, 68].

4.3. ΟΙ ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΡΕΤΡΟΪΟΙ

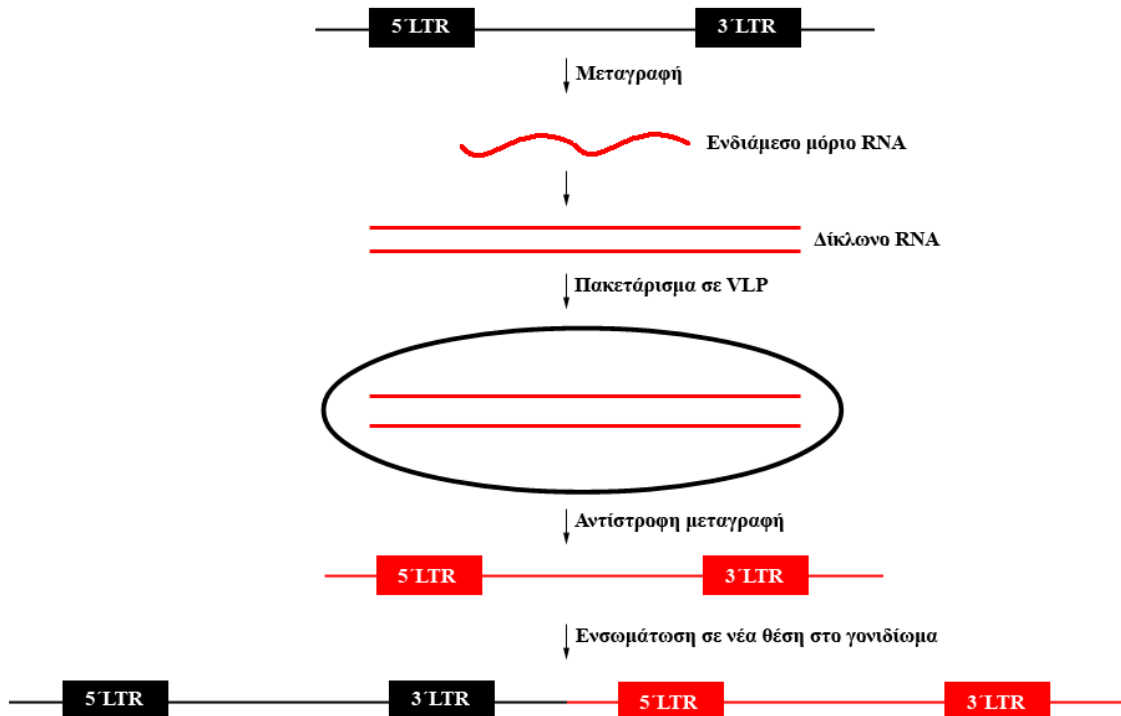
Οι ρετροϊοί μολύνουν συνήθως σωματικά κύτταρα, ορισμένοι όμως κατάφεραν να μολύνουν γαμετικά κύτταρα και να ενσωματωθούν στο γονιδίωμα τους κατά την εξέλιξη. Αυτοί οι ρετροϊοί, που αποτελούν πλέον αναπόσπαστο κομμάτι του γονιδιώματος του ξενιστή τους, ονομάζονται ενδογενείς ρετροϊοί (Endogenous Retroviruses, ERV). Ενώ τα ρετροτρανσποζόνια απαντώνται τόσο στα σπονδυλωτά όσο και σε κατώτερους οργανισμούς, όπως οι μύκητες, τα φυτά και τα έντομα [69], οι ERV περιορίζονται στα σπονδυλωτά [70]. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι εξωγενείς ρετροϊοί από τους οποίους προέκυψαν οι ενδογενείς μορφές έχουν εκλείψει.

Πολλές οικογένειες ERV απαντώνται σε πολυάριθμα αντίγραφα στο γονιδίωμα, γεγονός που μπορεί να οφείλεται είτε σε πολλά διαφορετικά γεγονότα μόλυνσης από ρετροϊούς και ενσωμάτωσης νέων αντιγράφων στο γονιδίωμα, ή σε νέα γεγονότα ρετρομετάθεσης των ενδογενών μορφών και επανενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ίδιου κυττάρου [56, 71].

Στον άνθρωπο, η ανακάλυψη του πρώτου εξωγενούς και ενδογενούς ρετροϊού συνέπεσαν χρονικά και συνέβησαν στις αρχές της δεκαετίας του 1980 [72, 73], ενώ σήμερα, είναι πλέον γνωστό ότι το 8.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος αποτελείται από τα 30,000 περίπου αντίγραφα HERV [74]. Οι ρετροϊκές αυτές αλληλουχίες αφορούν, αφενός, σε λιγότερο ή περισσότερο ακέραιους HERV, και, αφετέρου, σε αλληλουχίες που προέρχονται από HERV, όπως για παράδειγμα τα στοιχεία SINE-R [58] και SVA [40, 59], ενώ η πλειοψηφία των αντιγράφων HERV που υπάρχουν στο γονιδίωμα αποτελούνται μόνο από LTR (solo LTR) κι έχουν προκύψει από ανασυνδυασμό μεταξύ των 5' και 3' LTR (5.3%). Πολλοί HERV είναι ελλειμματικοί σε κωδικές αλληλουχίες, καθώς φέρουν μεγάλο αριθμό μεταλλάξεων και ελλειμμάτων, ενώ υπάρχουν και ορισμένοι πλήρους αλληλουχίας (3%) [18].

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι μέχρι σήμερα δεν έχουν καταγραφεί γεγονότα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV. Ωστόσο, η δυνατότητά τους προς ρετρομετάθεση δεν θα πρέπει να αποκλειστεί, δεδομένης της ύπαρξης στοιχείων τα

οποία έχουν τη δυνατότητα να κωδικοποιήσουν τις απαραίτητες προς ρετρομετάθεση ενεργότητες, γεγονός που υπογραμμίζει την αναγκαιότητα για διεξοδικότερη έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση.

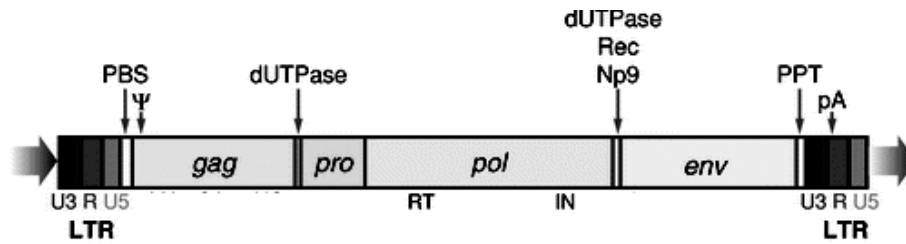


Εικ. 5. Αλληλουχία γεγονότων κατά τη διάρκεια της μετάθεσης των ενδογενών ρετροϊών. Αφού γίνει μεταγραφή και μετάφραση των γονιδίων του ενδογενούς ρετροϊκού στοιχείου, το δίκλωνο μόριο RNA που σχηματίζεται πακετάρεται σε ψευδοϊκά σωματίδια (viral-like particles, VLP). Ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή και, τέλος, το νέο αντίγραφο του στοιχείου ενσωματώνεται σε νέα θέση στο γονιδίωμα.

4.3.1. Τα δομικά χαρακτηριστικά των Ενδογενών Ρετροϊών

Οι ακέραιες αλληλουχίες των HERV περιλαμβάνουν την κανονική δομή των ρετροϊών [75]. Οι πλήρους μήκους HERV έχουν μέγεθος 9-10 Kb και αποτελούνται από μια κεντρική περιοχή που περιλαμβάνει τα γονίδια gag (δομικές εσωτερικές πρωτεΐνες του καψιδίου), prt (πρωτεάση), pol (αντίστροφη μεταγραφάση, ριβονουκλεάση και ιντεγκράση) και env (εξωτερικές δομικές πρωτεΐνες του καψιδίου) που περιβάλλεται από δύο LTR [76]. Ορισμένες οικογένειες HERV ανοδικά του γονιδίου env περιλαμβάνουν αλληλουχίες που κωδικοποιούν για τις πρωτεΐνες Rec και Nr9, οι οποίες συμμετέχουν στη ρύθμιση του ματίσματος. Στην κεντρική περιοχή περιλαμβάνονται επίσης cis-δρώσες αλληλουχίες απαραίτητες για την αντίστροφη μεταγραφή. Συγκεκριμένα, στο 5' άκρο της βρίσκεται η θέση πρόσδεσης του εκκινήτη για την έναρξη της αντίστροφης μεταγραφής (PBS), ενώ στο 3' άκρο της η πριμοδοτική για την αντίστροφη μεταγραφή πολυουρινική περιοχή (PPT). Καθοδικά του PBS βρίσκεται το σήμα πακεταρίσματος Ψ, που κωδικοποιείται από το γονίδιο gag και αλληλεπιδρά με το νουκλεοκαψίδιο. Οι ενεργές μορφές των HERV περιλαμβάνουν επίσης θέσεις δότη (Splice Donor, SD) και αποδέκτη ματίσματος (Splice Acceptor, SA) [63]. Οι αλληλουχίες LTR έχουν μέγεθος 0.3-1.5

Kb, χαρακτηρίζονται από την τυπική οργάνωση 5'-U3-R-U5-3' και περιέχουν σήματα έναρξης της μεταγραφής μέσω ενός υποκινητή RNA πολυμεράσης II καθώς και σήματα τερματισμού της μεταγραφής (Εικ. 6).



Εικ. 6. Δομικά χαρακτηριστικά ενός ενδογενούς ρετροϊού [75].

LTR: μακρές τελικές επαναλήψεις, PBS: θέση πρόσδεσης πριμοδοτικής αλληλουχίας (prime binding site), Ψ: σήμα πακεταρίσματος, RT: αντίστροφη μεταγραφή, IN: ιντεγκράση, PPT: πολυουρινική περιοχή (polyurine tract), pA: σήμα πολυαδενυλίωσης.

4.3.2. Η ονοματολογία και η ταξινόμηση των Ενδογενών Ρετροϊών

Δυστυχώς δεν υπάρχει μια κοινώς αποδεκτή ονοματολογία για τα στοιχεία HERV και δεν ακολουθείται πάντοτε κάποια συγκεκριμένη λογική, καθώς αρκετές οικογένειες ονομάστηκαν αυθαίρετα από την ομάδα που τις ανακάλυψαν. Η επικρατούσα, όμως, ονοματολογία βασίζεται στο αμινοξύ για το οποίο παρουσιάζει ειδικότητα το tRNA που χρησιμοποιείται ως εκκινήτης για την αντίστροφη μεταγραφή του στοιχείου, και το οποίο υβριδοποιείται στη θέση PBS. Έτσι, λοιπόν, η ονομασία που προκύπτει αποτελείται από τη συντομογραφία HERV που ακολουθείται από το σύμβολο του αμινοξέος με ένα γράμμα [77]. Παρόλα αυτά αποδείχτηκε σε πολλές περιπτώσεις αδόκιμη, καθώς αφενός μεν πολλές διαφορετικές οικογένειες περιλαμβάνουν την ίδια αλληλουχία PBS, αφετέρου δε η αρχική αλληλουχία του PBS μπορεί να φέρει τόσες μεταλλάξεις ώστε καθίσταται αδύνατο να ταυτοποιηθεί η προέλευση του στοιχείου.

4.3.3. Οι οικογένειες HERV

Μέχρι σήμερα, έχουν αναφερθεί περίπου 50 διαφορετικές οικογένειες HERV [63, 78], ενώ στη Repbase, διαδικτυακή βάση δεδομένων για επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, υπάρχουν καταχωρημένες περισσότερες από 200 διαφορετικές αλληλουχίες HERV και άλλες αλληλουχίες με LTR [68] και ο αριθμός αυτός φτάνει τις 350 αλληλουχίες στη βάση δεδομένων των HERV (HERVd) [79]. Αν και για τις περισσότερες οικογένειες HERV δεν είναι γνωστός ο ακριβής αριθμός των μελών τους, αποτελούνται συνήθως από πολλά αντίγραφα που πολλές φορές φτάνει και τα 200 [78]. Για τις περισσότερες οικογένειες HERV δεν είναι γνωστός ακόμη ο ακριβής χρόνος ενσωμάτωσής τους στο γονιδίωμα, αλλά μπορεί υπολογιστεί βάσει της διαφοροποίησης της αλληλουχίας του κάθε μέλους από αυτήν του αρχικού στοιχείου αναφοράς [80, 81].

Οι καλύτερα μελετημένες οικογένειες HERV είναι οι HERV-H (RTVL-H), HERV-W (MSRV), ERV-9, HERV-L και HERV-K. Η έκφραση ή η ένθεση στοιχείων που ανήκουν σε κάποιες από αυτές έχουν συσχετιστεί με επωφελείς ή επιβλαβείς επιδράσεις (Πίν. 1).

Οικογένεια HERV	Αριθμός αντιγράφων (solo LTR)	Επίδραση
Γάμμα ρετροϊοί (Τάξη I)		
HERV-E	250 (1,000)	Σύνδρομο Opitz
HERV-W	40 (1,100)	Σχηματισμός πλακούντα
HERV-FRD	50 (2,000)	Σχηματισμός πλακούντα
HERV-H	1,000 (1,000)	Γονιδιακή έκφραση
Βήτα ρετροϊοί (Τάξη II)		
HERV-K (HML-2)	60 (2,500)	Καρκινογένεση
Αφρώδεις ρετροϊοί (Τάξη III)		
HERV-L	580 (6,000)	Περιορισμός Fv-1 στους μύες

Πίν. 1. Αντιπροσωπευτικές οικογένειες HERV και επιβλαβείς ή ωφέλιμες επιδράσεις τους [37]. Δίνεται ο αριθμός αντιγράφων, ενώ ο αριθμός solo LTR αναφέρεται σε παρένθεση.

4.3.4. Η οικογένεια HERV-K

Η οικογένεια των HERV-K αποτελείται από αρκετές διακριτές οικογένειες, καθώς στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν αρκετοί HERV οι οποίοι χρησιμοποιούν το tRNA που παρουσιάζει ειδικότητα για τη λυσίνη ως εκκινήτρια για την αντίστροφη μεταγραφή, γι' αυτό ορισμένες φορές αναφέρεται ως υπεροικογένεια HERV-K. Βάσει διαφορών στην αλληλουχία της συντηρημένης περιοχής που κωδικοποιεί για την αντίστροφη μεταγραφάση, οι HERV-K ταξινομούνται σε 10 οικογένειες, οι οποίες ονομάζονται επίσης HML-1 έως και HML-10 (Human MMTV-like), χάριν της ομολογίας με τον βήτα ρετροϊό MMTV (mouse mammary tumor virus) [82, 83]. Μάλιστα, οι HERV-K (HML-5) αποτελούν στην πραγματικότητα την οικογένεια HERV-M, καθώς η περιοχή του PBS τους εμφανίζει απόλυτη ομολογία με το tRNA της μεθειονίνης [84].

Οι HERV-K ενσωματώθηκαν στο γονιδίωμα πριν από περίπου 45 εκατομμύρια χρόνια [85] και ήταν ενεργοί τόσο πριν όσο και μετά από τον εξελικτικό διαχωρισμό ανθρώπου-χιμπατζή, πριν από 5 εκατομμύρια χρόνια περίπου. Ορισμένα μέλη της οικογένειας των HERV-K απαντώνται αποκλειστικά στον άνθρωπο, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ενσωμάτωσή τους συνέβη μετά από το διαχωρισμό των δύο ειδών [86, 87]. Ο νεότερος HERV-K που έχει ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα είναι ο HERV-K113, η ηλικία του οποίου υπολογίζεται στα <200,000 χρόνια [85].

Η πρώτη περιγραφή αλληλουχιών μελών της οικογένειας των HERV-K έγινε ουσιαστικά με την απομόνωση μιας αλληλουχίας προϊού MMTV [88]. Υπάρχουν περίπου 550 αντίγραφα HERV-K από τα οποία μόλις 30-50 είναι πλήρους μήκους, ενώ υπάρχουν επιπλέον 6,400 solo LTR. Τα πλήρους μήκους στοιχεία έχουν δύο LTR εκατέρωθεν, περίπου 1 Kb η καθεμία, οι οποίες αποτελούν τον υποκινητή και το σήμα πολυαδενυλίωσης, αντίστοιχα, [76] ενώ αρκετά είναι αυτά που περιέχουν ακέραια ORF για τις ιικές δομικές και ενζυμικές πρωτεΐνες [85, 89, 90, 91]. Οι αλληλουχίες HERV-K έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε δινουκλεοτίδια CpG, παρόλα αυτά, η μεθυλίωση αυτών των αλληλουχιών πιθανώς παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ικανότητάς τους να μεταγράφονται, να ρετρομετατίθενται και να

συμμετέχουν σε ανασυνδυασμούς [92]. Η οικογένεια των HERV-K αποτελεί την πιο ενεργή οικογένεια HERV σε μεταγραφικό επίπεδο στο ανθρώπινο γονιδίωμα [93]. Μάλιστα, έχουν ανιχνευθεί διαφορετικά επίπεδα έκφρασης HERV-K σε διάφορους φυσιολογικούς [83] αλλά και καρκινικούς [94-97] ιστούς. Επιπλέον, έχει ανιχνευτεί παραγωγή ψευδοϊικών σωματιδίων (Viral-like particles, VLP) [96, 98], γεγονός που ενισχύει την άποψη ότι πιθανώς υπάρχουν ενεργές μορφές τους στο ανθρώπινο γονιδίωμα.

4.3.4.1. Η οικογένεια HERV-K10

Η οικογένεια HERV-K10 είναι πιθανότατα ο πιο καλά μελετημένος υποπληθυσμός HERV. Οι HERV-K10 αντιστοιχούν σε 1-2% του ανθρώπινου γονιδιώματος. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 60 αντίγραφα HERV-K10 στον άνθρωπο και περίπου 2,500 solo LTR. Μετά την αρχική απομόνωση του συγκεκριμένου στοιχείου [88], ακολούθησε η απομόνωση του πλήρους μήκους προιού [76].

Ο πρωτότυπος HERV-K10 (HERV-K101) έχει μέγεθος 9,469 bp και η αλληλουχία του είναι αντιπροσωπευτική ολόκληρης της τάξης. Περιλαμβάνει δύο αλληλουχίες LTR μεγέθους 970 bp, ενώ στην LTR ανοδικά του ενισχυτή βρίσκεται στοιχείο που ανταποκρίνεται στα γλυκοκορτικοειδή ανάλογο με εκείνο του MMTV. Το πλαίσιο ανάγνωσης της κωδικής αλυσίδας περιλαμβάνει έξι μεγάλα ORF (ORF1-6) τα οποία κωδικοποιούν για τις ιικές πρωτεΐνες, παρά την παρουσία ορισμένων κωδικονίων πρώιμου τερματισμού και μεταλλάξεων αλλαγής πλαισίου ανάγνωσης [76]. Έτσι, ο HERV-K10 θέτει ισχυρότατη υποψηφιότητα ως πιθανός ενδογενής ρετροϊός ικανός προς ρετρομετάθεση, κάτι που δεν έχει αποδειχτεί πειραματικά μέχρι σήμερα.

5. Η ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία κατανέμονται με διαφορετικό τρόπο στα χρωμοσώματα του ανθρώπου βάσει της περιεκτικότητας των αλληλουχιών σε δινουκλεοτίδια CpG. Συγκεκριμένα, τα αρχαιότερα στοιχεία απαντώνται κυρίως σε περιοχές με χαμηλή περιεκτικότητα σε CpG σε σχέση με τα νεότερα στοιχεία. Επιπλέον, θεωρείται ότι δεν είναι η ίδια η αλληλουχία των βάσεων αυτή που προκαλεί τη συγκεκριμένη κατανομή των αρχαιότερων στοιχείων αλλά μάλλον κάποια άλλα χαρακτηριστικά, τα οποία με τη σειρά τους συσχετίζονται με τη σύσταση της αλληλουχίας [99, 100].

Επίσης, ως προς την κατανομή των ρετρομεταθετών στοιχείων σε περιοχές που περιέχουν μεγάλο αριθμό γονιδίων, έχει βρεθεί ότι όλα τα ρετροτρανσποζόνια, πολύ περισσότερο δε αυτά που έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με τα παρακείμενα γονίδια, απαντώνται ιδιαίτερα σπάνια στο εσωτερικό γονιδίων. Σε αντίθεση με τη διαπίστωση αυτή, είναι γνωστό ότι οι περισσότεροι ρετροϊοί προτιμούν να ενσωματώνονται σε αλληλουχίες ενεργών γονιδίων ή θέσεις έναρξης της μεταγραφής [101]. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι η σχετική κατανομή των ρετρομεταθετών στοιχείων αλλάζει κατά την πορεία της εξέλιξης, επομένως, θα πρέπει να υπάρχουν μηχανισμοί για την επιλεκτική απαλοιφή τους από διάφορες περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι λοιπόν, ενώ τα νεότερα στοιχεία HERV-K τάξης II δείχνουν μια προτίμηση να ενσωματώνονται σε περιοχές πλούσιες σε CpG, κοντά σε γονίδια, οι αρχαιότερες τάξεις τρανσποζονίων σπάνια συναντώνται σε αυτές τις περιοχές [99]. Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι τα LTR ρετροτρανσποζόνια που εντίθενται στο εσωτερικό γονιδίων και συγχρόνως δείχνουν κάποια προτίμηση για περιοχές πλούσιες σε CpG δεν

γίνονται ανεκτά από το γονιδίωμα του ξενιστή στον ίδιο βαθμό. Μάλιστα, τα παλαιότερα LTR ρετροτρανσποζόνια απαντώνται πολύ σπάνια ακόμη και σε απόσταση 5 Kb από γονίδια. Επομένως, τα LTR ρετροτρανσποζόνια έχουν απαλειφθεί από περιοχές γονιδίων, πιθανώς εξαιτίας της ικανότητάς τους να επηρεάζουν τη μεταγραφή γονιδίων. Από την άλλη, τα L1 έχουν μεγάλο μέγεθος και πολλές φορές περιέχουν σήματα πολυαδενυλίωσης, γεγονός που πιθανώς τα καθιστά ιδιαίτερα επιβλαβή όταν εντίθενται στο εσωτερικό γονιδίων, γι' αυτό και δεν απαντώνται συχνά στο εσωτερικό τους. Αντίθετα, τα SINE είναι σχετικά μικρές αλληλουχίες και πιθανώς έχουν μικρότερο αντίκτυπο στη λειτουργία των γονιδίων, γεγονός που υποστηρίζεται και από το ότι τα Alu απαντώνται πολύ συχνά στο εσωτερικό γονιδίων και σε περιοχές του γονιδιώματος που περιέχουν μεγάλο αριθμό γονιδίων [99, 102].

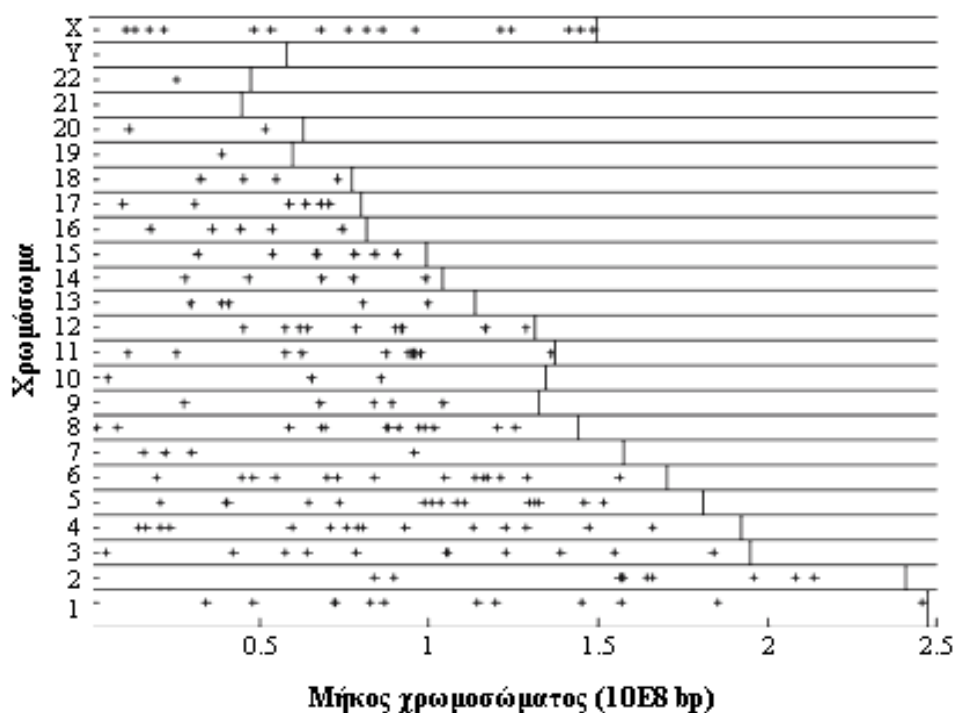
Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η πιθανότητα ενσωμάτωσης ενός μεταθετού στοιχείου στο εσωτερικό κάποιου άλλου μεταθετού στοιχείου είναι αυξημένη κατά 4 περίπου φορές σε σχέση με οποιαδήποτε άλλη αλληλουχία του γονιδιώματος που δεν περιέχει μεταθετά στοιχεία. Μάλιστα, έχει προταθεί ότι η ένθεση γίνεται με συγκεκριμένο προσανατολισμό και σε συγκεκριμένες θέσεις της αλληλουχίας του ήδη ενσωματωμένου μεταθετού στοιχείου [103].

Στον Πίνακα 2 και στην Εικόνα 7 δίνεται η σχετική κατανομή των ρετροτρανσποζονίων HERV-K10 και L1, αντίστοιχα, στα χρωμοσώματα του ανθρώπου.

Χρωμόσωμα	Παρουσία/ Απουσία	Περιοχή χρωμοσώματος	Χρωμόσωμα	Παρουσία / Απουσία	Περιοχή χρωμοσώματος
1	+	1p31, 1q21	13	-	
2	-		14	+	
3	+	3q21, 3q26.3, 3q27	15	+	
4	+		16	-	
5	+		17	-	
6	+	6p21.2, 6q24	18	-	
7	+	7p22, 7q21, 7q22->q31, 7q33->q35	19	+	
8	-		20	+	
9	-		21	+	
10	+	10p13, 10p24- >p23	22	+	22q11.2, 22q13
11	+	11q22, 11q23	X	-	
12	+	12q15, 12q14.2	Y	+	

Πίν. 2. Εντοπισμός των HERV-K10 στα ανθρώπινα χρωμοσώματα [104].

Αντίγραφα του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 υπάρχουν στην πλειοψηφία των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου.

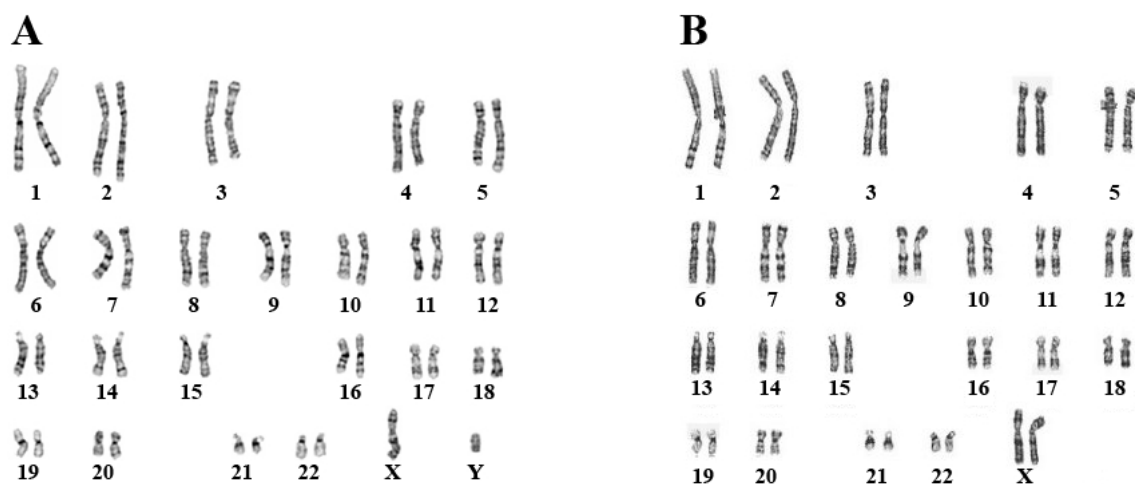


Εικ. 7. Κατανομή των πλήρους μήκους στοιχείων L1 στα χρωμοσώματα του ανθρώπου [105]. Σε όλα σχεδόν τα χρωμοσώματα του ανθρώπου υπάρχει μεγάλος αριθμός αντιγράφων των ρετρομεταθετών στοιχείων L1.

6. ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ

Ο καρύοτυπος αποτελεί την απεικόνιση των χρωμοσωμάτων, τα οποία τοποθετούνται σε ζεύγη ομόλογων χρωμοσωμάτων και ταξινομούνται κατά σειρά ελαττούμενου μεγέθους. Τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα αριθμούνται 1-23 με βάση το μέγεθός τους από το μεγαλύτερο στο μικρότερο, με εξαίρεση τα χρωμοσώματα 10 και 11 που είναι μικρότερα από το χρωμόσωμα 12 και το χρωμόσωμα 22 που είναι μικρότερο από το 21 (Εικ. 8). Ο καρύοτυπος του κάθε ατόμου περιγράφεται με μια συντομογραφία, βάσει διεθνών οδηγιών [106].

Στην τυπική χρωμοσωμική ανάλυση εξετάζονται τα χρωμοσώματα στη μετάφαση. Σε αυτή τη φάση του κυτταρικού κύκλου τα χρωμοσώματα έχουν διπλασιαστεί, είναι στην πιο συμπυκνωμένη τους μορφή και αποτελούνται από δύο αδελφές χρωματίδες οι οποίες συγκρατούνται στο κεντρομερίδιο. Η κάθε χρωματίδα έχει ένα μικρό (p, από το γαλλικό petite = μικρός) κι ένα μεγάλο (q, που είναι το επόμενο γράμμα της αλφαβήτου) βραχίονα. Όταν το κεντρομερίδιο βρίσκεται στο κέντρο της χρωματίδας, ώστε οι δύο βραχίονες να έχουν σχεδόν το ίδιο μέγεθος, το χρωμόσωμα ονομάζεται μετακεντρικό. Αν το κεντρομερίδιο είναι κάπως έκκεντρα τοποθετημένο, το χρωμόσωμα ονομάζεται υπομετακεντρικό. Τέλος, στα ακροκεντρικά χρωμοσώματα το κεντρομερίδιο βρίσκεται κοντά στο άκρο του ενός βραχίονα, οπότε το μέγεθος του μικρού βραχίονα είναι πολύ μικρό. Τα ακροκεντρικά χρωμοσώματα πολλές φορές διαθέτουν δορυφόρους στο άκρο του μικρού βραχίονα, οι οποίοι συχνά διαχωρίζονται από τον υπόλοιπο μικρό βραχίονα μέσω μιας δευτερογενούς περισφιξης, αν και δεν είναι πάντα ορατοί. Τα χρωμοσώματα διακρίνονται σε επτά ομάδες (A – G) ανάλογα με το μέγεθος και τη θέση του κεντρομεριδίου (Πίν. 3) [107].



Εικ. 8. Φυσιολογικός καρυότυπος (Α) άρρενος 46, XY και (Β) θήλεος 46, XX άτομου.

Ομάδα	Αυτοσωμικά Χρωμοσώματα	Φυλετικά Χρωμοσώματα	Μέγεθος Χρωμοσώματος και Θέση Κεντρομεριδίου	Αριθμός Χρωμοσωμάτων	
				Άνδρες	Γυναίκες
A	1-3		Μεγάλα, μετακεντρικά ή υπομετακεντρικά	6	6
B	4-5		Μεγάλα υπομετακεντρικά	4	4
C	6-12	X	Μεσαίου μεγέθους μετακεντρικά ή υπομετακεντρικά	15	16
D	13-15		Μεγάλα ακροκεντρικά	6	6
E	16-18		Μικρά μετακεντρικά ή υπομετακεντρικά	6	6
F	19-20		Μικρά μετακεντρικά	4	4
G	21-22	Y	Μικρά ακροκεντρικά	5	4

Πίν. 3. Σύστημα Denver για την κατηγοριοποίηση των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου.

Τα χρωμοσώματα του ανθρώπου διακρίνονται σε επτά ομάδες (Α–Γ) ανάλογα με το μέγεθός τους και τη θέση του κεντρομεριδίου.

Τα χρωμοσώματα μπορούν να μελετηθούν σε οποιονδήποτε ιστό άλλα συνήθως χρησιμοποιούνται τα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος τα οποία έχουν δύο βασικές ιδιότητες που εξυπηρετούν στην κυτταρογενετική ανάλυση: α) λαμβάνονται εύκολα και β) διεγείρονται εύκολα ώστε να εισέλθουν στη μίτωση. Φυσιολογικά τα λεμφοκύτταρα δε διαιρούνται υπό συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας, αλλά ο πολλαπλασιασμός τους μπορεί να επαχθεί με τη χρήση διάφορων λεκτινών (μιτογόνες ουσίες). Η πιο διαδεδομένη και ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η φυτοαιμαγλουτανίνη (phytohemagglutinin, PHA), η οποία παράγεται από τον οργανισμό *Phaseolus vulgaris* και ενεργοποιεί τα Τ λεμφοκύτταρα [108]. Σε περίπτωση που χρειάζεται η ανάλυση κι ενός δεύτερου ιστού, χρησιμοποιούνται ινοβλάστες του δέρματος, ενώ στην προγεννητική διάγνωση χρησιμοποιούνται κύτταρα από αμνιακό υγρό ή χοριακές λάχνες για τον έλεγχο της χρωμοσωμικής σύστασης του εμβρύου.

Με την ανάλυση του καρυοτύπου μπορούν να ανιχνευτούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, καθώς σε κάθε βιολογικό είδος, τα χρωμοσώματα έχουν χαρακτηριστικό αριθμό, μορφολογία και πρότυπο ζώνωσης. Σήμερα, η ανάλυση των χρωμοσωμάτων στα πλαίσια της εξέτασης του καρυοτύπου πραγματοποιείται στο στάδιο της προμετάφασης και η διακριτική ικανότητα της μεθόδου έχει αυξηθεί κατακόρυφα, φτάνοντας από το αρχικό επίπεδο των ~300 ζωνών σε >700 ζώνες. Μάλιστα, μετά την εισαγωγή και εφαρμογή των τεχνικών μοριακής κυτταρογενετικής, οι οποίες συνεχώς εξελίσσονται, η διακριτική ικανότητα της κυτταρογενετικής ανάλυσης μπορεί να φτάσει ακόμη και τις μερικές εκατοντάδες ζεύγη βάσεων.

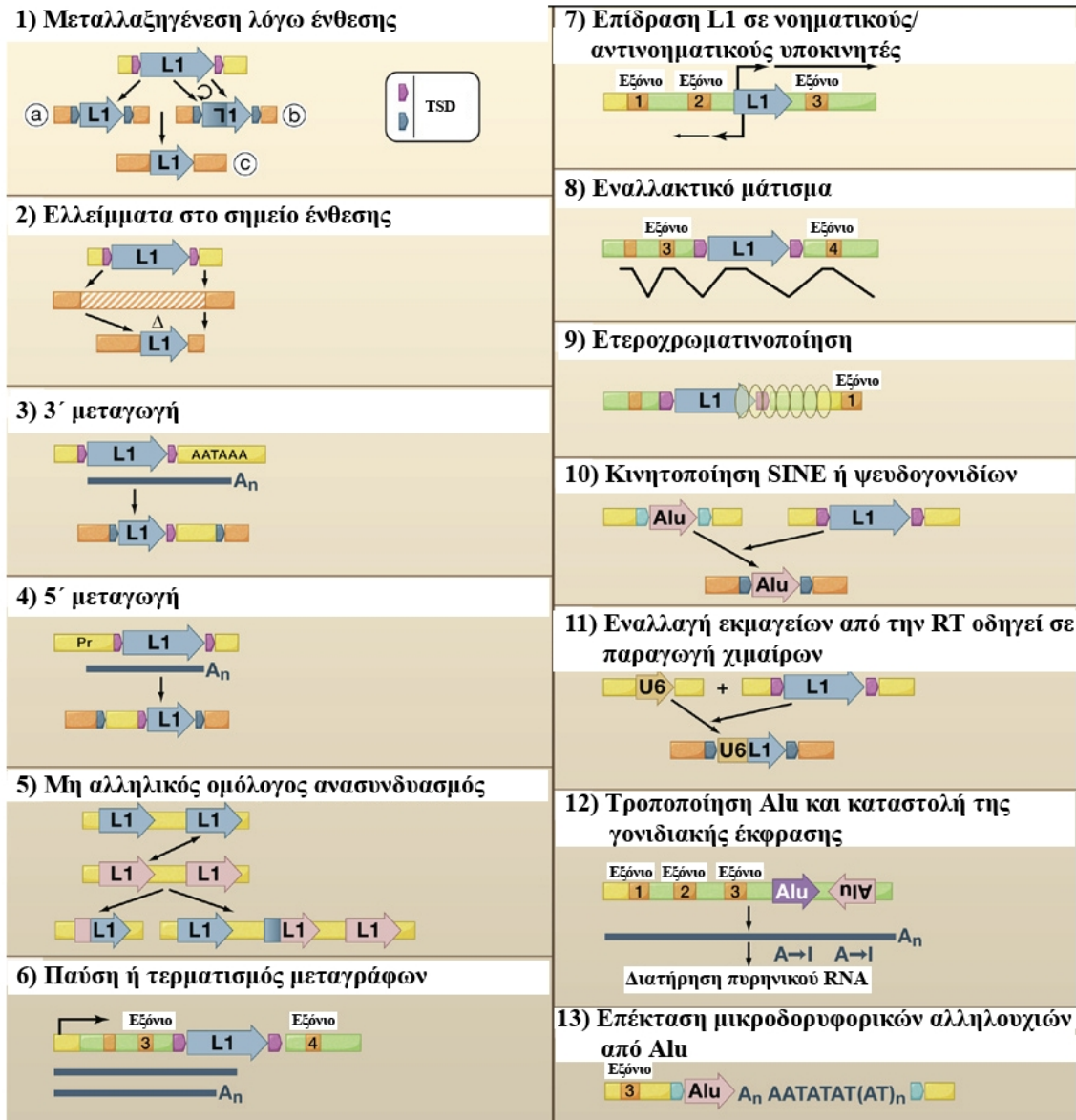
7. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Αν και τα χρωμοσώματα κατανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα κατά την κυτταρική διαίρεση με πολύ συγκεκριμένο και απόλυτα ελεγχόμενο τρόπο, παρόλα αυτά, μπορεί ορισμένες φορές να συμβούν λάθη. Οποιαδήποτε αλλαγή στον αριθμό ή τη δομή των χρωμοσωμάτων αποτελεί χρωμοσωμική ανωμαλία και είναι πιθανό να έχει συνέπειες στο φαινότυπο. Ως αριθμητικές ανωμαλίες ή ετεροπλοειδίες αναφέρονται οι διαταραχές του αριθμού των χρωμοσωμάτων. Όταν ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του απλοειδούς αριθμού, τότε υπάρχει ευπλοειδία, ενώ όταν ο αριθμός των χρωμοσωμάτων είναι οποιοσδήποτε άλλος, τότε ονομάζεται ανευπλοειδία. Οι αριθμητικές ανωμαλίες αφορούν κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη ενός επιπλέον (τρισωμία) ή ενός λιγότερου (μονοσωμία) χρωμοσώματος. Οι δομικές ανωμαλίες των χρωμοσωμάτων προκύπτουν συνήθως από τη θραύση και τον ανασυνδυασμό χρωμοσωμάτων και διακρίνονται σε μεταθέσεις, ελλείμματα, διπλασιασμούς, αναστροφές, δακτυλιοειδή χρωμοσώματα, ισοχρωμοσώματα, δικεντρικά χρωμοσώματα και μικρά χρωμοσώματα δείκτες.

Ο σχηματισμός των γαμετών αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο της μεταβίβασης των χρωμοσωμάτων στην επόμενη γενιά. Έτσι, δίνεται πολύ μεγάλη σημασία στα πιθανά προβλήματα κατά τη μείωση που θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή γαμετών με μη φυσιολογική χρωμοσωμική σύσταση και, τελικά, τη σύλληψη εμβρύου με χρωμοσωμική ανωμαλία. Φυσικά, χρωμοσωμικές ανωμαλίες μπορούν να προκύψουν και κατά την ενήλικη ζωή και αποτελούν τη βάση των περισσότερων μορφών καρκίνου. Τέλος, οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες θα μπορούσαν να έχουν κληρονομηθεί από τους γονείς.

8. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Δεδομένου ότι στα γονιδιώματα των οργανισμών υπάρχουν δεκάδες χιλιάδες γονίδια και εκατοντάδες χιλιάδες μέχρι και εκατομμύρια μεταθετά στοιχεία, η απουσία αλληλεπίδρασης μεταξύ τους θα προκαλούσε έκπληξη. Σε αυτά τα πλαίσια, έχει σε πολλές περιπτώσεις παρατηρηθεί ότι αφενός τα μεταθετά στοιχεία και οι ρετροϊοί χρησιμοποιούν γονίδια του κυττάρου προς όφελός τους και αφετέρου, πολλά γονίδια του ξενιστή ενσωμάτωσαν κατά την εξέλιξη αλληλουχίες των μεταθετών στοιχείων, είτε ως ρυθμιστικές αλληλουχίες ή ως τμήμα της κωδικής τους αλληλουχίας. Έτσι, λοιπόν, ακόμη και σε περιπτώσεις ανενεργών μεταθετών στοιχείων, η παρουσία τους στο γονιδίωμα του ξενιστή έχει αφήσει κάποια σημάδια τόσο σε επίπεδο αλληλουχίας όσο και βιολογικών λειτουργιών (Εικ. 9).



Εικ. 9. Πως τα ρετροτρανσποζόνια επηρεάζουν τη λειτουργία του κυττάρου [42].

8.1. ΣΥΜΒΟΛΗ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Τα ρετροτρανσποζόνια έχουν συμβάλει καθοριστικά στην εξέλιξη του γονιδιώματος των πρωτευόντων μέσω ρετρομεταθέσεων, χρωμοσωμικών μεταθέσεων και ανασυνδυασμών [109-111]. Ομόλογοι ανασυνδυασμοί που συνέβησαν μεταξύ ρετροϊικών αλληλουχιών που βρίσκονται διάσπαρτες στο γονιδίωμα προκάλεσαν γενετική ποικιλομορφία και πολυμορφισμούς στους οποίους επέδρασαν εξελικτικές πιέσεις και μηχανισμοί επιλογής [112]. Μάλιστα ορισμένοι πολύπλοκοι μηχανισμοί που εμφανίστηκαν κατά την εξέλιξη των σπονδυλωτών, όπως για παράδειγμα ο ανασυνδυασμός των γονιδίων V(D)J, θα ήταν μάλλον αδύνατο να εμφανιστούν χωρίς την καίριας σημασίας συμμετοχή των μεταθετών στοιχείων [113]. Τέλος, τα μεταθετά στοιχεία συμβάλλουν ενεργά στο σχηματισμό γονιδίων με νέες ιδιότητες μέσω είτε μεταγωγής αλληλουχιών ή διπλασιασμού γονιδίων [114, 115], επιταχύνοντας με αυτόν τον τρόπο την εξέλιξη στον άνθρωπο αλλά και σε άλλα θηλαστικά [116].

8.2. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΗ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΚΑΙ ΤΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΞΕΝΙΣΤΗ

Είναι γνωστή η συμμετοχή των ρετρομεταθετών στοιχείων στο σχηματισμό της ετεροχρωματινής. Ένα ποσοστό των κεντρομεριδίων αλλά και των ζωνών G των χρωμοσωμάτων του ανθρώπου αποτελείται από ρετροτρανσποζόνια, τα οποία προσδίδουν σε αυτές τις περιοχές χαρακτηριστικά ετεροχρωματινής [18, 117]. Η παρουσία ρετρομεταθετών στοιχείων πιθανώς συμβάλλει και στην οργάνωση της χρωματινής σε τοπικό επίπεδο, καθώς αφενός μεν τα μεθυλιωμένα Alu αποτελούν κέντρα *de novo* μεθυλίωσης από τα οποία ξεκινά και εξαπλώνεται η μεθυλίωση προς τις γειτονικές αλληλουχίες DNA [118], αφετέρου δε τα LINE λειτουργούν ως «σταθμοί» κατά την αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X [119, 120].

Τα ρετροτρανσποζόνια θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν ως αρχιτέκτονες του ανθρώπινου γονιδιώματος, καθώς υπάρχουν στο γονιδίωμα πολλαπλά αντίγραφα σχεδόν πανομοιότυπων αλληλουχιών, οι οποίες αποτελούν ιδανικό έδαφος για ανακατατάξεις, όπως ανασυνδυασμοί, διπλασιασμοί, ελλείμματα και μεταθέσεις. Μάλιστα, ανασυνδυασμοί μεταξύ αλληλουχιών ρετροϊών που βρίσκονται σε μεγάλη απόσταση μεταξύ τους στο γονιδίωμα είναι δυνατό να οδηγήσουν σε μεγάλης κλίμακας ανακατατάξεις [112, 121, 122].

Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι ένζυμα με δραστικότητα ενδονουκλεάσης που κωδικοποιούνται από ρετρομεταθετά στοιχεία μπορούν να δημιουργήσουν δίκλωνες θραύσεις στην έλικα του DNA [123], ενώ αντίστοιχα, η αντίστροφη μεταγραφή των μεταθετών στοιχείων συμμετέχει στην επιδιόρθωση χρωμοσωμικών θραύσεων [124]. Τέλος, το ένζυμο τελομεράση που είναι υπεύθυνο για το διπλασιασμό και τη σταθεροποίηση των άκρων των χρωμοσωμάτων προέρχεται από κάποια RT που κωδικοποιείται από μεταθετό στοιχείο [125].

8.3. ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΤΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ

Σε πολλές περιπτώσεις οι ρυθμιστικές αλληλουχίες της μεταγραφής των ρετρομεταθετών στοιχείων, ιδιαίτερα οι LTR των HERV και LINE, προσαρμόζονται στο νέο περιβάλλον και αναλαμβάνουν νέους ρόλους προκειμένου να έχουν κάποια χρήσιμη λειτουργία στο γονιδίωμα του ξενιστή. Πολλά ρετρομεταθετά στοιχεία βρίσκονται στο εσωτερικό μεταγραφικών μονάδων και μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφή. Επίσης, οι αλληλουχίες των ρετρομεταθετών στοιχείων περιλαμβάνουν θέσεις πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που είναι δυνατό να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση [126]. Μάλιστα, μπορεί κανείς να συμπεράνει τη σημασία των μεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή έκφραση αναλογιζόμενος το γεγονός ότι περίπου το ένα τέταρτο όλων των υποκινητών γονιδίων του ανθρώπου φέρουν αλληλουχίες που προέρχονται από τα στοιχεία αυτά [127]. Είναι δυνατό να λειτουργούν ως ιστοειδικοί ή μη ενισχυτές ή καταστολείς [128-130], υποκινητές της πολυμεράσης II [131, 132], υποκινητές δύο κατευθύνσεων [133, 134], δότες ή αποδέκτες ματίσματος [135-138] και σήματα πολυαδενυλίωσης [139, 140]. Η συνεξέλιξη ρυθμιστικών περιοχών που προέρχονται από ρετροτρανσποζόνια με γονίδια του οργανισμού ξενιστή επιτρέπει την έκφραση σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, αλλά και την αποσιώπηση στα σωματικά κύτταρα [141]. Ακόμη, πολλά γονίδια περιέχουν κοντά στο 5' άκρο των νησίδων CpG τους ένα ή περισσότερα Alu, τα οποία πιθανώς

σηματοδοτούν τη θέση όπου ξεκινά η βασική αλληλουχία του υποκινητή του γονιδίου [142]. Η πλειοψηφία, όμως, των ενθέσεων ρετρομεταθετών στοιχείων μέσα ή κοντά σε γονίδια δεν ήταν ευνοϊκές για τον ξενιστή και είτε δεν σταθεροποιήθηκαν στον πληθυσμό ή απομακρύνθηκαν μακροπρόθεσμα [99, 143].

8.4. ΕΚΦΡΑΣΗ ΡΕΤΡΟΤΡΑΝΣΠΟΖΟΝΙΑΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ

Τα ρετρομεταθετά στοιχεία πολλές φορές προσφέρουν στον ξενιστή νέες ενεργότητες που δε θα διέθετε υπό φυσιολογικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα κυτταροπλασματικών μεμβρανικών πρωτεϊνών [144], δομικών και δεσμευόμενων σε νουκλεϊκά οξέα πρωτεϊνών που συμμετέχουν στο πακετάρισμα του RNA, dUTPάσης [145], πρωτεάσης [146], εξαρτώμενης από RNA DNA πολυμεράσης με δραστικότητα RNάσης H [147], ιντεγκράσης [148], πρωτεΐνης του φακέλου που προσδένεται σε μια πρωτεΐνη επιφανείας του ξενιστή και διαμεμβρανικής πρωτεΐνης που προκαλεί σύντηξη μεμβρανών και πιθανώς ανοσοκαταστολή [149]. Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις οι ενεργότητες των ενδογενών ρετροϊών είναι πλέον απαραίτητες για τη φυσιολογική ανάπτυξη, με χαρακτηριστικότερη την περίπτωση των προϊόντων των γονιδίων εν των HERV-W [150] και του αυξητικού παράγοντα πλειοτροπίνη [151] που είναι απαραίτητα για το φυσιολογικό σχηματισμό και λειτουργία του πλακούντα .

Ένα ακόμη πλεονέκτημα που προσφέρει η ενσωμάτωση και η έκφραση πρωτεϊνών των HERV στους ξενιστές τους είναι η μερική ανθεκτικότητα στη μόλυνση από τους αντίστοιχους εξωγενείς ρετροϊούς [152-154].

9. Η ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ

Η Κυτταρογενετική ασχολείται με τη μελέτη των χρωμοσωμάτων και των σχετιζόμενων παθολογικών καταστάσεων που προκαλούνται από αριθμητικές και δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες μεγέθους >4Mb. Σε συνδυασμό με μεθόδους Μοριακής Κυτταρογενετικής και Μοριακής Γενετικής είναι δυνατή η βελτίωση της διακριτικής ικανότητας για ανίχνευση διαταραχών στο επίπεδο του γονιδιώματος. Σήμερα, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι για να έχει κανείς μια σφαιρική άποψη του γονιδιώματος, της λειτουργίας του και της ρύθμισής του θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη του και τον αντίκτυπο των τροποποιήσεων ή μεταβολών που συμβαίνουν σε επίπεδο επιγονιδιώματος.

Η Επιγενετική μελετά κληρονομούμενα χαρακτηριστικά που δε σχετίζονται με αλλαγές στην ίδια την αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικοί παράγοντες αποτελούν κληρονομούμενο, αλλά αντιστρεπτό και δυναμικό τρόπο ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, χωρίς όμως να αλλάζει η αλληλουχία του DNA. Οι επιγενετικές τροποποιήσεις είναι ομοιοπολικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν είτε στο ίδιο το DNA είτε στις πρωτεΐνες που βρίσκονται σε στενή συσχέτιση με αυτό (ιστόνες στα σωματικά κύτταρα και ιστόνες και πρωταμίνες στο σπέρμα). Είναι πολύ σημαντικές καθώς συμμετέχουν στην τροποποίηση της γονιδιακής έκφρασης χωρίς να αλλάζει ο γενετικός κώδικας. Το σύνολό τους αποτελεί το επιγονιδίωμα, το οποίο ρυθμίζει την πορεία και τη λειτουργία του κυττάρου [155-158]. Από την άλλη, το επιγονιδίωμα μπορεί υπό συνθήκες να διαταραχθεί ή να τροποποιηθεί, οδηγώντας στην εκδήλωση ασθενειών [159].

9.1. ΤΑ ΕΙΔΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ

Οι κυριότεροι τύποι επιγενετικής ρύθμισης είναι η μεθυλίωση του DNA, οι ιστονικές τροποποιήσεις και η ρύθμιση μέσω της δράσης miRNA.

Η μεθυλίωση του DNA αφορά στην τροποποίηση του γονιδιώματος των σπονδυλωτών με την προσθήκη μιας μεθυλομάδας στο 5' άτομο άνθρακα του δακτυλίου της κυτοσίνης, κυρίως στις 5'-CpG-3'. Η μεθυλίωση του DNA παίζει ρόλο-κλειδί σε αρκετές βιολογικές διεργασίες, όπως η γονιδιακή αποτύπωση [160], η αδρανοποίηση του χρωμοσώματος X [161], η αποσιώπηση ξένου DNA [162] και η ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου [163]. Επιπλέον, αποτελεί καθοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης, της διαφοροποίησης και της γήρανσης [164-166], ενώ έχει ακόμη προταθεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία της μακροχρόνιας μνήμης [167]. Η μεθυλίωση του DNA αποτελεί μια από τις βασικές συνιστώσες της συγκεκριμένης μελέτης και για το λόγο αυτό εξετάζεται αναλυτικά παρακάτω.

Οι *N-τελικές ουρές των ιστονών* μπορούν να υποστούν ομοιοπολικές, αλλά δυναμικές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικιτινυλίωση και σουμουλύωση. Οι τροποποιήσεις αυτές καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις των ιστονών με άλλες πρωτεΐνες, ρυθμίζοντας τελικά τη δομή και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης [168].

Ένας επιπλέον μηχανισμός επιγενετικού ελέγχου συνίσταται στη μετα-μεταγραφική δράση μεταγράφων, όπως μη κωδικά RNA (π.χ. XIST), μη κωδικά αντινοσηματικά RNA (π.χ. TSIX) και παρεμβατικά RNA (RNA interference, RNAi), τα οποία οδηγούν στη αποσιώπηση γονιδίων. Τα μη κωδικά RNA ρυθμίζουν σημαντικές διαδικασίες, όπως την πρόσδεση της HP1 στη χρωματίνη [169]. Τα αντινοσηματικά RNA, συμμετέχουν στην αποσιώπηση ορισμένων γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση [170], καθώς επίσης και στην καταστολή της έκφρασης του XIST στο ενεργό χρωμόσωμα X από το αντινοσηματικό μετάγραφο TSIX και στη συσσώρευση του Xist *in situ* [171]. Μελέτες σχετικά με την κατανομή μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNA ή miRNA) στο γονιδίωμα έδειξε ότι συχνά βρίσκονται σε εύθραυστα σημεία και σε θέσεις που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου [172, 173]. Τα τελευταία χρόνια έχει ενταθεί η μελέτη της δράσης των miRNA και η συμμετοχή τους στην επιγενετική ρύθμιση και, από το πλήθος των μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί, έχει προκύψει ότι τα miRNA παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιγενετική ρύθμιση γονιδίων [174-177].

Τέλος, έχει επίσης αναφερθεί η επιγενετική ρύθμιση μέσω της δράσης πρωτεϊνών των οικογενειών Polycomb (PcG) και Trithorax (TrxG). Πρόκειται για ομάδα μορίων που τροποποιούν τη χρωματίνη μέσω του σχηματισμού συστήματος κυτταρικής μνήμης υπεύθυνου για τον έλεγχο της προσβασιμότητας στη χρωματίνη και τη διατήρησης της μεταγραφής στα πρώτα στάδια της εμβρυονικής ζωής, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, αλλά και στην ενήλικη ζωή [178]. Οι πρωτεΐνες αυτές συνήθως έχουν ανταγωνιστική δράση στα γονίδια-στόχους, τα οποία περιλαμβάνουν γονίδια που ρυθμίζονται ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και τη φάση του κυτταρικού κύκλου. Οι πρωτεΐνες PcG λειτουργούν ως αναστολείς ενώ οι TrxG επάγουν τη διατήρηση της γονιδιακής δραστηριότητας, και μάλιστα πιστεύεται ότι η ρύθμιση της πρόσδεσης των πρωτεϊνών αυτών στις θέσεις-στόχους τους γίνεται μέσω ενός κοινού μονοπατιού [179, 180].

10. Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA

Η μεθυλίωση των νουκλεϊνικών οξέων μελετήθηκε για πρώτη φορά στις αρχές της δεκαετίας του '60 [181], ενώ μια δεκαετία αργότερα αποδείχθηκε ότι η μεθυλίωση των κυτοσινών του DNA σχετίζεται με τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης και τη διαφοροποίηση [182]. Η μεθυλίωση του DNA πραγματοποιείται μέσω της βιοχημικής προσθήκης μιας μεθυλομάδας (-CH₃) στις βάσεις του DNA και είναι η σημαντικότερη ίσως χημική τροποποίηση του γονιδιώματος, καθώς υφίσταται σε όλους σχεδόν τους ζωντανούς οργανισμούς (βακτήρια, μύκητες, φυτά, ασπόνδυλα, σπονδυλωτά) [183]. Υπάρχουν τρία γνωστά είδη μεθυλίωσης νουκλεοτιδικών βάσεων του DNA και συγκεκριμένα, μεθυλίωση **α)** της αδενίνης στη θέση N-6 σε βακτήρια και πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς [184, 185], **β)** της κυτοσίνης στη θέση N-4, κυρίως σε θερμοφιλά βακτήρια [186, 187] και, τέλος, **γ)** της κυτοσίνης στη θέση C-5, που είναι η συνηθέστερη τροποποίηση και παρατηρείται σε όλους τους οργανισμούς [188].

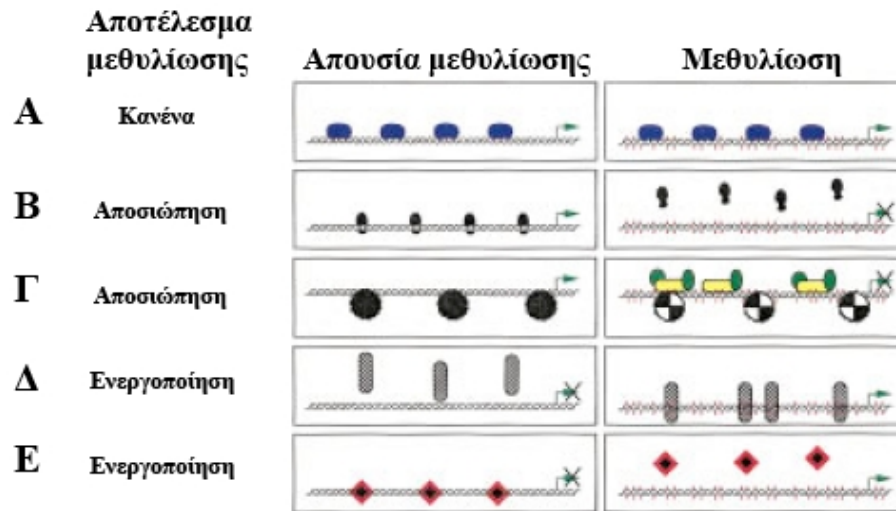
10.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Η δομή της χρωματίνης σε ρυθμιστικές περιοχές γονιδίων αποτελεί αναπόσπαστο στοιχείο του μηχανισμού ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Εικ. 10). Έτσι, η δομή της χρωματίνης στην περιοχή ενός γονιδίου μπορεί να είναι εναλλακτικά είτε σε ενεργή είτε σε ανενεργή κατάσταση, με την ενεργή κατάσταση να εμφανίζεται στα κύτταρα όπου το γονίδιο εκφράζεται [189]. Η χρωματίνη μπορεί να διακριθεί σε δύο κατηγορίες, την ευχρωματίνη και την ετεροχρωματίνη. Η ετεροχρωματίνη χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερα συμπυκνωμένη δομή, που μοιάζει με τη δομή του μιτωτικού χρωμοσώματος, και καταστολή της γονιδιακής έκφρασης. Οι αλληλουχίες CpG είναι συνήθως μεθυλιωμένες και οι ιστόνες υπο-ακετυλιωμένες. Αντίθετα, στη μεταγραφικά ενεργή ευχρωματίνη τα ινίδια είναι λιγότερο συμπυκνωμένα, το γενετικό υλικό φαίνεται να είναι σχετικά διάσπαρτο και καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα. Η ετεροχρωματίνη περιέχει ακετυλιωμένες ιστόνες και αντιγράφεται νωρίς κατά την φάση S του κυτταρικού κύκλου. Στις περιοχές που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση παρατηρούνται μεγάλες διαφορές στη διαμόρφωση της χρωματίνης μεταξύ των δύο αλληλομόρφων, που αφορούν σε διαφορετικές ιστονικές τροποποιήσεις, αλλά και μη-συγχρονισμένο διπλασιασμό [190].

Στα φυσιολογικά κύτταρα, οι περιοχές του γονιδιώματος όπου τα δινουκλεοτίδια CpG δεν είναι συχνά εμφανίζουν συνήθως αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης, ενώ αντίθετα, οι περιοχές όπου είναι συχνά (νησίδες CpG) γενικά δεν είναι μεθυλιωμένες. Οι νησίδες CpG έχουν συνήθως μέγεθος 1-2 Kb και εντοπίζονται στους υποκινητές γονιδίων. Κατ' εξαίρεση, οι νησίδες CpG των υποκινητών είναι μεθυλιωμένες στο φαινόμενο της γονιδιωματικής αποτύπωσης και στην αδρανοποίηση του ενός χρωμοσώματος X των θήλεων ατόμων στα θηλαστικά [192]. Μεθυλίωση σε φυσιολογικά μη μεθυλιωμένες νησίδες CpG έχει αναφερθεί σε αθανατοποιημένα και μετασχηματισμένα κύτταρα καθώς και σε κακοήθεις όγκους [193].

Η μεθυλίωση των νησίδων CpG στους υποκινητές γονιδίων φαίνεται πως συνήθως δρα ως σήμα αποσιώπησης των γονιδίων αυτών. Στην αποσιώπηση συμμετέχουν πρωτεΐνες οι οποίες αναγνωρίζουν τις μεθυλιωμένες CpG και προσδένονται σε αυτές (methyl-binding CpG proteins, MBP). Μετά από την ειδική πρόσδεσή τους στο μεθυλιωμένο DNA, οι MBP στρατολογούν κάποιον παράγοντα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως για παράδειγμα τις αποακετυλάσες των ιστονών (Histone

Deacetylases, HDAC), δρώντας έτσι ως ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης. Το κυριότερο μέλος της οικογένειας των MBP είναι η πρωτεΐνη 2 που προσδένεται σε μεθυλ-CpG (methyl-CpG binding protein 2, MeCP2), η οποία προσδένεται σε συμμετρικά μεθυλιωμένες κυτοσίνες στο γονιδίωμα, και προκαλεί αποσιώπηση της μεταγραφής [194].

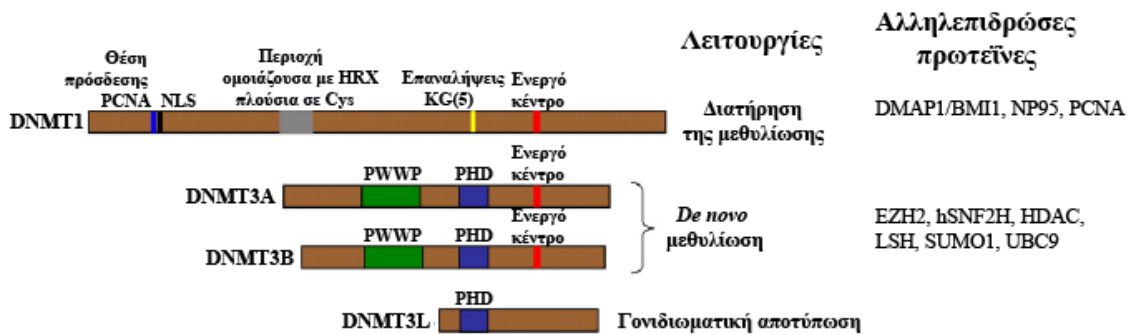


Εικ. 10. Μηχανισμοί τροποποίησης της μεταγραφής μέσω μεθυλίωσης [191].

(A) Η μεθυλίωση δεν έχει αντίκτυπο στη γονιδιακή έκφραση. (B) Ευαίσθητοι προς τη μεθυλίωση μεταγραφικοί παράγοντες αδυνατούν να ενεργοποιήσουν ένα μεθυλιωμένο υποκινητή. (Γ) Μετά από μεθυλίωση μεταγραφικά ενεργών υποκινητών, προσδένονται πρωτεϊνικά σύμπλοκα (π.χ. MECP, αποακετυλάσες) που τροποποιούν τα νουκλεοσώματα (σκουροί κύκλοι), προκαλώντας γονιδιακή αποσιώπηση. (Δ) Για την πρόσδεση ορισμένων μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν τη γονιδιακή έκφραση απαιτείται η μεθυλίωση των αλληλουχιών-στόχων τους. (E) Απελευθέρωση καταστολέα λόγω μεθυλίωσης.

10.2. ΟΙ ΜΕΘΥΛΟΤΡΑΝΣΦΕΡΑΣΕΣ

Η μεθυλίωση των κυτοσινών απαιτεί τη δράση συγκεκριμένων ενζύμων, των μεθυλοτρανσφερασών (DNA methyltransferases, DNMTs) (Εικ. 11). Η πρώτη μεθυλοτρανσφεράση που περιγράφηκε ήταν η Dnmt1 η οποία είναι απαραίτητη για την αποκατάσταση της μεθυλίωσης στο ημιμεθυλιωμένο DNA που προκύπτει εξαιτίας του ημισυντηρητικού μηχανισμού αντιγραφής του DNA (δραστικότητα διατήρησης). Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί ακόμη τέσσερα γονίδια μεθυλοτρανσφερασών (*Dnmt2*, *Dnmt3a*, *Dnmt3b* και *Dnmt3L*). Η *Dnmt2* έχει ήπια δραστηριότητα μεθυλοτρανσφεράσης και δρα ως tRNA μεθυλοτρανσφεράση [195], ενώ οι *Dnmt3a* και *Dnmt3b* εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα στα εμβρυονικά κύτταρα κι έχουν δραστηριότητα *de novo* μεθυλοτρανσφεράσης. Επομένως, μετά από την καθολική απομεθυλίωση που συμβαίνει προεμφυτευτικά, οι *Dnmt3a* και *Dnmt3b* είναι υπεύθυνες για την έναρξη της μεθυλίωσης του DNA κατά την πρώιμη εμβρυονική ανάπτυξη. Οι *Dnmt3a* και *Dnmt3b* πιθανώς συνεργάζονται με την *Dnmt1* για τη σταθερή διατήρηση των προτύπων μεθυλίωσης του DNA και μάλιστα απενεργοποίηση των *Dnmt3a* και *Dnmt3b* στα σωματικά κύτταρα οδηγεί σε αστάθεια των χρωμοσωμάτων [168]. Η *Dnmt3L* αλληλεπιδρά με τις *Dnmt3a* και *Dnmt3b* και τις ενεργοποιεί [196].



Εικ. 11. Η μηχανή μεθυλίωσης του DNA [197].

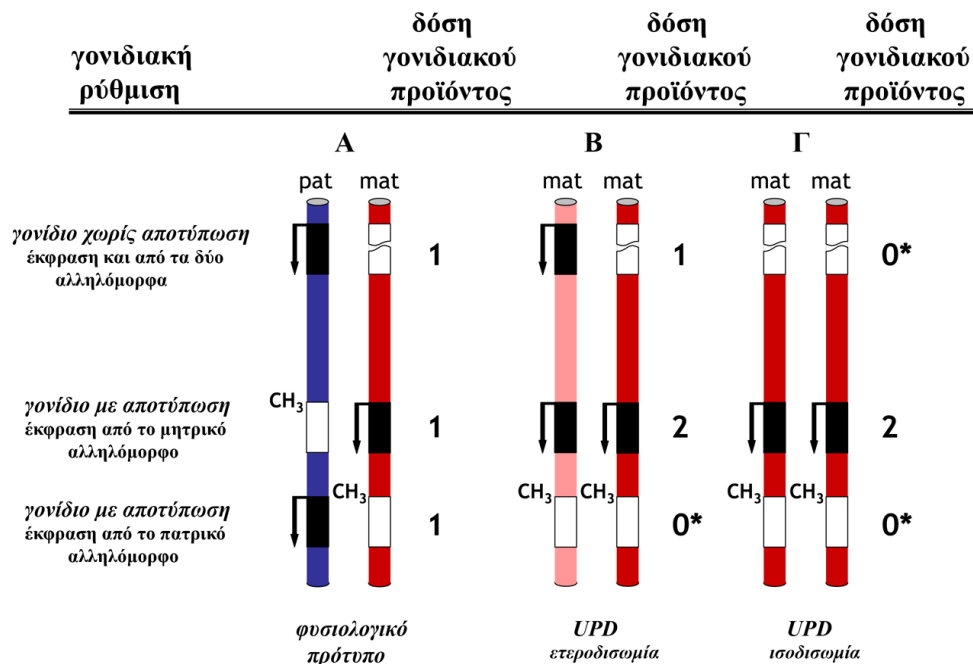
Οι μεθυλοτρανσφεράσες των θηλαστικών περιλαμβάνουν τις DNMT1, DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L. Η DNMT1 είναι η μεθυλοτρανσφεράση διατήρησης της μεθυλίωσης, καθώς μεθυλιώνει το ημιμεθυλιωμένο DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του DNA. Οι DNMT3A και DNMT3B δρουν ως *de novo* μεθυλοτρανσφεράσες, ενώ η DNMT3L συμμετέχει στη μεθυλίωση γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση. Στην εικόνα δίνεται σχηματική απεικόνιση των DNA μεθυλοτρανσφερασών, όπου υποδηλώνονται οι κυριότερες λειτουργικές δομικές τους περιοχές, καθώς και οι περιοχές μέσω των οποίων αλληλεπιδρούν με άλλες πρωτεΐνες. Όλες οι ενεργές μεθυλοτρανσφεράσες περιλαμβάνουν ενεργό κέντρο στο C-τελικό άκρο τους. Η DNMT1 περιέχει μια περιοχή μέσω της οποίας αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), συμπαραγόνα της DNA πολυμεράσης δέλτα, δίπλα στην οποία βρίσκεται ένα σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Nuclear localization signal, NLS). Η N-τελική περιοχή της DNMT1 περιλαμβάνει μια περιοχή πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης που προσομοιάζει στην πρωτεΐνη HRX, καθώς και μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία καταλοίπων λυσίνης-γλυκίνης (KG(5)). Οι DNMT3A και DNMT3B περιλαμβάνουν δομικές περιοχές PHD (plant homeodomain) και συντηρημένα μοτίβα προλίνης-θρυπτοφάνης-θρυπτοφάνης-προλίνης (δομική περιοχή PWWP), περιοχές απαραίτητες για τη στόχευση της περικεντρομεριδιακής ετεροχρωματίνης από τις DNMT3A και DNMT3B. Δίνονται επίσης ορισμένες από τις πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις μεθυλοτρανσφεράσες.

Τα απαραίτητα άτομα άνθρακα για τη διατήρηση της μεθυλίωσης προέρχονται κυρίως από τον κύκλο του φολικού οξέος, για την πραγματοποίηση του οποίου απαιτείται η συντονισμένη δράση πολλών γονιδιακών προϊόντων αλλά και άλλων σημαντικών θρεπτικών μικροσυστατικών, όπως η βιταμίνη B12, η βιταμίνη B6, η χολίνη και η μεθειονίνη που λαμβάνονται μέσω της διατροφής. Όλα αυτά τα στοιχεία απαιτούνται άμεσα ή έμμεσα για τη μετατροπή της ομοκυστεΐνης σε μεθειονίνη, που είναι το άμεσο πρόδρομο μόριο της S-αδενοσυλ-μεθειονίνης (S-adenosyl-methionine, SAM), του κύριου ενδοκυτταρικού δότη μεθυλομάδων για τη διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA, των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Αφού δώσει τη μεθυλομάδα της, η SAM μετατρέπεται σε S-αδενυλομοκυστεΐνη (S-adenylhomocystein, SAH), η οποία, μετά από απώλεια μιας αδενοσίνης, μετατρέπεται σε ομοκυστεΐνη [198].

11. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Στις αρχές της δεκαετίας του 1980 αποδείχτηκε ότι το μητρικό και το πατρικό γονιδίωμα δε συμβάλλουν με ισοδύναμο τρόπο κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς επίσης και ότι είναι απολύτως απαραίτητη η παρουσία και των δύο για τη φυσιολογική ανάπτυξη [199, 200]. Φυσιολογικά, τα χρωμοσώματα των κυττάρων ενός οργανισμού σχηματίζουν ζεύγη στα οποία το ένα χρωμόσωμα προέρχεται από τον πατέρα και το άλλο από τη μητέρα. Έτσι, λέμε ότι έχουμε αμφιγονεϊκή δισωμία.

Αντίθετα, ως μονογονεϊκή δισωμία (uniparental disomy, UPD) χαρακτηρίζεται η κατάσταση όπου και τα δύο ομόλογα χρωμοσώματα προέρχονται από τον ίδιο γονέα [201]. Η UPD μπορεί να αναφέρεται είτε σε ολόκληρο το χρωμόσωμα είτε σε μέρος αυτού (μερική μονογονεϊκή δισωμία, segmental UPD). Διακρίνεται σε ισοδισωμία, όπου υπάρχουν δύο αντίγραφα του ίδιου γονεϊκού χρωμοσώματος και προκαλείται από μη διαχωρισμό στη δεύτερη μειωτική διαίρεση, και ετεροδισωμία, όπου υπάρχει ένα αντίγραφο από το κάθε ομόλογο χρωμόσωμα του ενός γονέα και προκαλείται από μη διαχωρισμό κατά την πρώτη μειωτική διαίρεση (Εικ. 12) [202].



Εικ. 12. Συνέπειες της ισοδισωμίας και της ετεροδισωμίας [203].

(Α) Φυσιολογική κατάσταση: δύο χρωμοσώματα που προέρχονται το ένα από τον πατέρα και το άλλο από τη μητέρα. (Β) Μητρική μονογονεϊκή ετεροδισωμία: δύο διαφορετικά χρωμοσώματα που προέρχονται από τη μητέρα. Εκδήλωση διαταραχής που οφείλεται στη μη έκφραση γονιδίου με αποτύπωση το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο. (Γ) Μητρική μονογονεϊκή ισοδισωμία: δύο αντίγραφα του ίδιου μητρικού χρωμοσώματος. Εκδήλωση διαταραχής που οφείλεται σε μετάλλαξη γονιδίου χωρίς αποτύπωση και διαταραχής που οφείλεται στη μη έκφραση γονιδίου με αποτύπωση το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο.

Μπλε: πατρικό αλληλόμορφο, ροζ και κόκκινο: μητρικό αλληλόμορφο. Ο αστερίσκος υποδηλώνει την εκδήλωση κλινικού φαινοτύπου.

Γονιδιωματική αποτύπωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση ενός γονιδίου από το ένα μόνο αλληλόμορφο, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση. Πειραματικά στοιχεία υποδεικνύουν ότι η γονιδιωματική αποτύπωση εμφανίστηκε κατά την εξέλιξη πριν από περίπου 150 εκατομμύρια χρόνια σε έναν κοινό πρόγονο που ήταν ζωτόκο θηλαστικό και διαχωρίστηκε από τα ωτόκα ζώα [204]. Η γονιδιακή έκφραση του ενός μόνο αλληλομόρφου εξασφαλίζεται με μια σειρά επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως η μεθυλίωση των κυτοσινών και ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών [205]. Η ταυτοποίηση των πρώτων ενδογενών γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική

αποτύπωση επετεύχθη μετά από μια σχεδόν δεκαετία μελετών του φαινομένου στον μύ [206-208]. Στον άνθρωπο μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί περίπου 100 γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση [209], ενώ έχει διατυπωθεί η εκτίμηση ότι θα μπορούσαν να φτάνουν ακόμη και τα 200 [210].

Παρά το ότι είναι γνωστό εδώ και αρκετό καιρό ότι η μεθυλίωση DNA αποτελεί έναν από τους μηχανισμούς αποτύπωσης, οι λεπτομέρειες για το πώς εγκαθίστανται τα αποτυπώματα στα γονεϊκά γαμετικά κύτταρα, διατηρούνται στα έμβρυα και χρησιμοποιούνται για να επάγουν ή να αναστείλουν την έκφραση ενός γονιδίου παρέμεναν για πολλά χρόνια αδιευκρίνιστες. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί κάποια πρόοδος: **α)** Προσδιορίστηκαν οι *cis*-δρώσες περιοχές που παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της αποτύπωσης. **β)** Αναλύθηκε στη βάση της ανάπτυξης το πώς και το πότε εκαθιδρύονται τα αποτυπώματα στα γαμετικά κύτταρα και το πότε απαλείφονται. **γ)** Διευκρινίστηκε με ποιον τρόπο διατηρούνται τα σήματα αυτά, ιδιαίτερα κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη, στη διάρκεια της οποίας συμβαίνουν σημαντικές αλλαγές στη μεθυλίωση ολόκληρου του γονιδιώματος. Τέλος, **δ)** διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση βρίσκονται συνήθως σε ομάδες ή συστοιχίες (clusters) και στοιχεία που συμμετέχουν στον επιγενετικό έλεγχο της συγκεκριμένης περιοχής είναι κοινά μεταξύ των γονιδίων της συστοιχίας [191].

Ο έλεγχος της αποτύπωσης γίνεται σε επίπεδο χρωμοσωμικής περιοχής και όχι γονιδιώματος. Τα κέντρα ελέγχου γονιδιωματικής αποτύπωσης (Imprinting Centers, IC) που δρουν *in cis* ελέγχουν τοπικά τόσο την εγκαθίδρυση όσο και τη διατήρηση του γονιδιωματικού «αποτυπώματος» [211]. Σχεδόν όλα τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση διαθέτουν διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (Differentially Methylated Regions, DMR), οι οποίες συμβάλλουν στη διάκριση των δύο αλληλομόρφων [212]. Οι DMR διακρίνονται σε πρωτογενείς, όπου η εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης γίνεται κατά τη γαμετογένεση και διατηρείται κατόπιν καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, και σε δευτερογενείς όπου η μεθυλίωση συμβαίνει μετά τη γονιμοποίηση, κατά τα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης. Οι πρωτογενείς DMR φαίνεται ότι περιέχουν τα IC [213]. Στα περισσότερα γονίδια και των δύο κατηγοριών τα σήματα μεθυλίωσης προέρχονται από το ωάρια, καθώς έχουν ταυτοποιηθεί πολύ λίγα γονίδια με πατρικό αποτύπωμα [212, 214, 215].

Παρά τη σημαντική πρόοδο που έχει επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια ως προς την κατανόηση του ρόλου και του μηχανισμού της γονιδιωματικής αποτύπωσης, θα πρέπει να τονιστεί ότι πρόκειται για μια πολύπλοκη διαδικασία της οποίας ο ακριβής μηχανισμός δεν έχει ακόμη εξακριβωθεί σε όλες του τις λεπτομέρειες.

12. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΟ DNA

Η μεθυλίωση του επαναλαμβανόμενου DNA έχει κατ' εξοχήν μελετηθεί, καθώς το 90% περίπου των αλληλουχιών του γονιδιώματος στις οποίες ανιχνεύεται μεθυλίωση αντιστοιχούν σε επαναλαμβανόμενο DNA [198]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι ευθείες διαδοχικές επαναλήψεις (Tandem Direct Repeats, TDR) CpG που υπάρχουν στις διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (Differentially Methylated Regions, DMR) των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση (Εικ. 13) [216]. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η θεωρία ότι ο μηχανισμός αποτύπωσης έχει προκύψει από τον αμυντικό μηχανισμό μεθυλίωσης του DNA του κυττάρου-ξενιστή. Έτσι, λοιπόν, αλληλουχίες με ιδιότητες «ξένου» DNA είχαν πιθανώς αναγνωριστεί αρχικά από το σύστημα

μεθυλίωσης και τελικά υπέστησαν τροποποιήσεις ειδικές για το κάθε αλληλόμορφο, από τις οποίες προέκυψε με τη σειρά της η αποτύπωση [217].

Παρά το ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ του αριθμού και της δομής των επαναλήψεων των DMR διαφορετικών γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση [191], φαίνεται πως έχουν κάποιο ρόλο στην εγκαθίδρυση και τη διατήρηση του αποτυπώματος. Επομένως, είναι πιθανό να λειτουργούν ως περιοχές αναγνώρισης όπου πρέπει να γίνει η μεθυλίωση και ειδική του αλληλομόρφου ρύθμιση της έκφρασης, αλλά δεν επαρκούν από μόνες τους. Θα πρέπει αφενός να αλληλεπιδράσουν με άλλες χαρακτηριστικές περιοχές της αλληλουχίας και αφετέρου να είναι τοποθετημένες στο κατάλληλο μικροπεριβάλλον της αλληλουχίας του DNA [218]. Σύμφωνα με τα παραπάνω, προκύπτει ένα μοντέλο όπου τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση ρυθμίζονται από ένα σύνολο συνδυαστικών *cis*-δρώντων στοιχείων. Τελικά, θα είναι η οργάνωση και οι σχετικές θέσεις των στοιχείων αυτών που θα οδηγήσουν σε αποτύπωση ή όχι της περιοχής. Αυτά τα στοιχεία πιθανώς να σχηματίζουν ένα δίκτυο που βρίσκεται υπό τον έλεγχο των κέντρων ελέγχου της γονιδιωματικής αποτύπωσης (Imprinting Centers, IC) και αποκρίνεται σε αυτά [191].

12.1. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

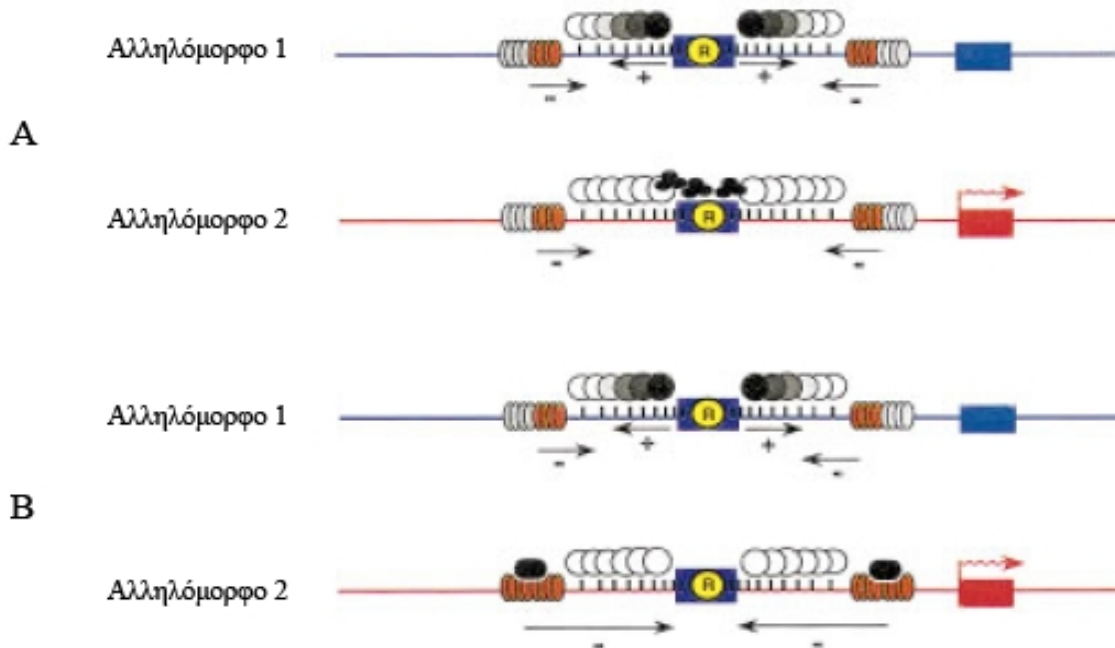
Περίπου το 40-50% του γονιδιώματος των θηλαστικών καταλαμβάνεται από ρετροτρανσποζόνια και πιθανότατα υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί που καταστέλλουν τη δραστηριότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων, με τη μεθυλίωση να αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους. Η μεθυλίωση του DNA περιορίζει τη δυνατότητα των ρετρομεταθετών στοιχείων να ενεργοποιούνται, να μεταγράφονται και να συμμετέχουν στο φαινόμενο του ανασυνδυασμού, επομένως, η μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων και των προϊόντων πιθανότατα αντισταθμίζει επίσης την τάση τους να θέτουν σε κίνδυνο τη σταθερότητα του γονιδιώματος μέσω του πολλαπλασιασμού τους και του ανασυνδυασμού [219]. Η ρύθμιση των ρετροτρανσποζονίων πραγματοποιείται τόσο συνολικά και αφορά στα ρετρομεταθετά στοιχεία της ιδιοστατικής και εναλλακτικής ετροχρωματίνης, όσο και πιο εντοπισμένα σε κάθε ρετροτρανσποζόνιο ξεχωριστά [105, 220]. Παρότι, λοιπόν, η πλειοψηφία των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι μεθυλιωμένα σε μεγάλο βαθμό στα σωματικά κύτταρα, ένα ποσοστό αυτών που φτάνει το 10-15% είναι μη μεθυλιωμένο [105].

12.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ HERV

Παρά το γεγονός ότι οι αλληλουχίες των HERV έχουν σχετικά χαμηλή περιεκτικότητα σε δινουκλεοτίδια CpG, για παράδειγμα, υπάρχουν λιγότερα από 20 στις Μακρές Τελικές Επαναλήψεις (Long Terminal Repeats, LTR), θεωρείται ότι η μεθυλίωση αποτελεί έναν από τους βασικότερους μηχανισμούς άμυνας του οργανισμού έναντι των ενδογενών αυτών ρετροϊών [219, 221].

Για τη μελέτη των προτύπων μεθυλίωσης των HERV-K θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι τα διαφορετικά μέλη της οικογένειας εμφανίζουν διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης, τόσο μεταξύ διαφορετικών αντιγράφων όσο και σε διαφορετικές κυτταρικές σειρές αλλά και σε διαφορετικούς ιστούς [222-224]. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποστηρίζουν ότι οι προίοι και τα solo LTR είναι, υπό φυσιολογικές συνθήκες, στην πλειοψηφία τους μεθυλιωμένα τόσο στον πλακούντα όσο και στο περιφερικό αίμα [224], όχι όμως και στα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα [89]. Η

μεθυλίωση των HERV δεν είναι πολύ καλά μελετημένη, αλλά, όπως και με τα υπόλοιπα μεταθετά στοιχεία, θα μπορούσε κανείς να υποστηρίξει ότι είναι πολύ πιθανό οι ενδογενείς ρετροϊοί να φέρουν αλληλουχίες ή επιγενετικές τροποποιήσεις παρόμοιες με εκείνες των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση. Έτσι λοιπόν, είναι πιθανό η ρύθμιση των προτύπων μεθυλίωσης των ενδογενών ρετροϊών και των γονιδίων με αποτύπωση να πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο και να προκύπτει μέσω κοινών μηχανισμών [225].



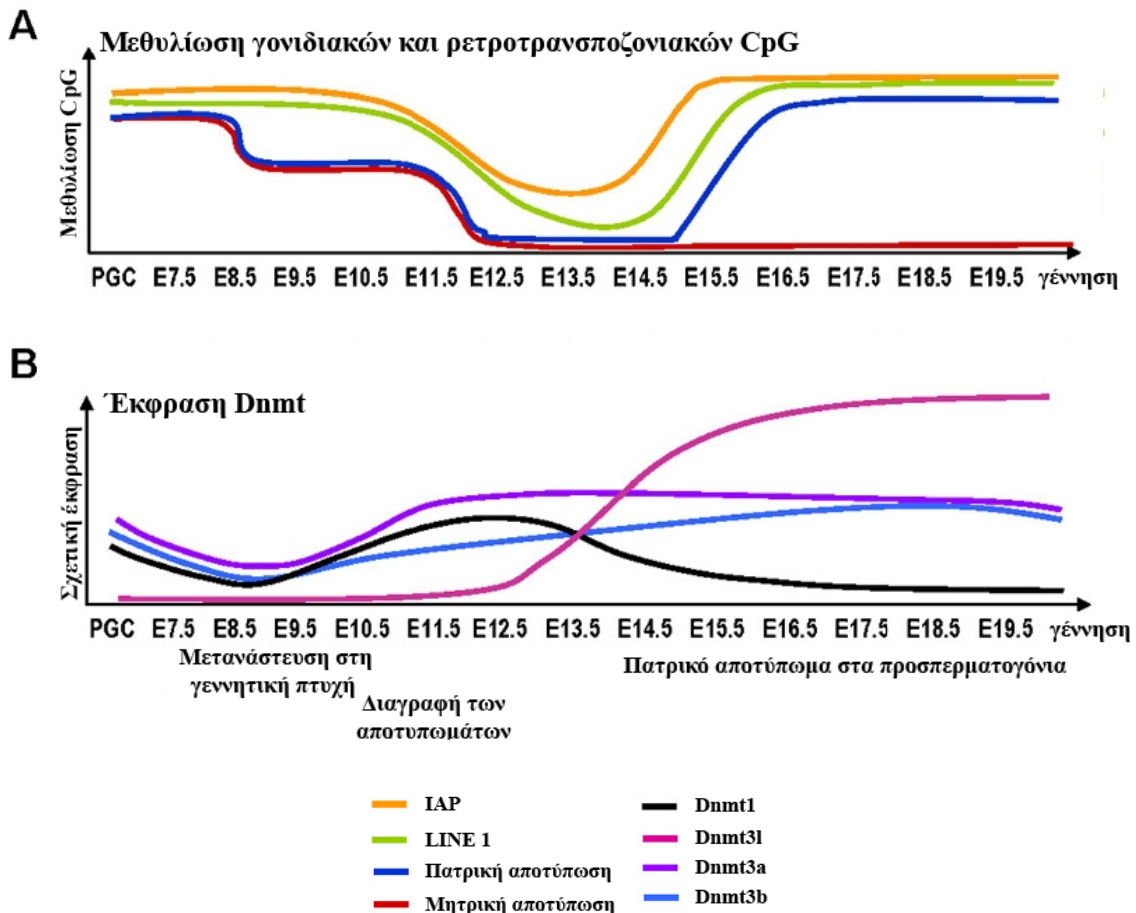
Εικ. 13. Ο υποθετικός ρόλος των ευθέων διαδοχικών επαναλήψεων στην εγκαθίδρυση των ειδικών για το κάθε αλληλόμορφο προτύπων μεθυλίωσης στα γονίδια με αποτύπωση [191]. Τα πρότυπα αυτά προκύπτουν από την αλληλεπίδραση σημάτων μεθυλίωσης (+) και απομεθυλίωσης (-). (A) Οι επαναλήψεις (R) είναι δυνατό να δράσουν ως κέντρα μεθυλίωσης, προσελκύοντας ή διασπείροντας τη μεθυλίωση στην αλληλουχία του DNA. Η μεθυλίωση μπορεί να σταματήσει εξαιτίας σημάτων απομεθυλίωσης. (B) Λόγω της δράσης άλλων παραγόντων *in trans* είναι πιθανό να επικρατήσει το σήμα της απομεθυλίωσης σε ολόκληρη την περιοχή.

13. Η ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΣΗΜΑΙΟΥ

Κατά τη γαμετογένεση, στα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα πραγματοποιείται το κρίσιμο βήμα της απαλοιφής των επιγενετικών σημαδιών που ήδη υπάρχουν και τα οποία κληρονομήθηκαν από την προηγούμενη γενιά, ενώ ακολουθεί η εγκαθίδρυση των νέων σημάτων σύμφωνα με το φύλο του γαμετικού κυττάρου στους ώριμους γαμέτες (Εικ. 14). Τα ειδικά του φύλου του γονέα επιγενετικά σημάδια διατηρούνται και μετά τη γονιμοποίηση και μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά [183]. Έχουν διατυπωθεί δύο πιθανά μοντέλα για το πώς μπορεί αυτό να συμβαίνει [226]. Σύμφωνα με το πρώτο, διατηρείται ο επιγονότυπος (το αποτύπωμα) στο χρωμόσωμα που προέρχεται από τον γονέα του ίδιου φύλου, ενώ αντιστρέφεται αυτό του αντίθετου φύλου. Αυτό θα μπορούσε να γίνει σε ένα βήμα. Εναλλακτικά, οι υπάρχουσες επιγενετικές τροποποιήσεις αρχικά απαλείφονται και από τα δύο γονεϊκά χρωμοσώματα και στις δύο γαμετικές σειρές και στη συνέχεια σε επόμενο στάδιο τα αποτυπώματα εγκαθιδρύονται με τρόπο ειδικό του φύλου.

13.1. ΤΑ ΠΡΟΤΥΠΑ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA ΤΩΝ ΑΡΡΕΝΩΝ ΓΑΜΕΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός των γαμετικών κυττάρων στους άνδρες συμβαίνει κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού τους και της μετανάστευσης προς τη γεννητική πτυχή [227]. Η *de novo* μεθυλίωση του DNA γονιδίων που υπόκειται σε αποτύπωση και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ξεκινά προγεννητικά (στα προσπερματογόνια) και τα πρότυπα μεθυλίωσης έχουν ολοκληρωθεί μέχρι το τέλος του σταδίου της παχυταινίας της μείωσης [228]. Παρόλα αυτά, έχουν αναφερθεί ορισμένα γονίδια που εκφράζονται νωρίς κατά τη σπερματογένεση αλλά αποσιωπούνται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των σπερματίδων, αφού οι υποκινητές τους μεθυλιώνονται σταδιακά μετά από τη μείωση (Εικ. 14Α) [229].



Εικ. 14. Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός κατά την ανάπτυξη των γαμετών του αρσενικού μυ [225].

Επίπεδα (A) μεθυλίωσης αλληλουχιών DNA και (B) έκφρασης μεθυλοτρανσφερασών.

PGC: πρώιμα γαμετικά κύτταρα (primordial germ cells), E: ημέρα εμβρυϊκής ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών υποδεικνύουν ότι το επιγονιδίωμα των σπερματοζωαρίων διαφέρει σημαντικά από εκείνο των σωματικών κυττάρων, αλλά εμφανίζει πολλές ομοιότητες με το αντίστοιχο των εμβρυονικών βλαστικών (Embryonic Stem Cells, ESC) και των εμβρυονικών γαμετικών κυττάρων (Embryonic Germ Cells, EGC) [228, 230, 231]. Υποκινητές γονιδίων που κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες που εκφράζονται νωρίς κατά την ανάπτυξη, καθώς επίσης

και σηματοδοτικές πρωτεΐνες είναι υπομεθυλιωμένοι στα γαμετικά κύτταρα και το DNA των γονιδίων αυτών είναι συνδεδεμένο με ιστόνες. Μάλιστα, σε πολλούς από τους αντίστοιχους υποκινητές των ανθρώπινων ES κυττάρων προσδένονται μεταγραφικοί παράγοντες του δικτύου αυτοανανέωσης [232]. Επομένως, παράγοντες της πολυδυναμίας πιθανώς συμμετέχουν στην εγκαθίδρυση και διατήρηση της μεθυλίωσης του DNA στο σπέρμα [158].

13.2. Ο ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ ΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ ΣΤΑ ΓΑΜΕΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Στα μεταθετά στοιχεία επίσης γίνεται επαναπρογραμματισμός της μεθυλίωσης του DNA στα γαμετικά κύτταρα. Ο βιολογικός ρόλος αυτής της διεργασίας, αν πράγματι υπάρχει κάποιος, παραμένει αδιευκρίνιστος, αλλά πιθανολογείται ότι τα ενεργά τρανσποζόνια, έχουν συσσωρευθεί κοντά σε γονίδια με αποτύπωση προκειμένου να επωφεληθούν του επαναπρογραμματισμού της μεθυλίωσης του DNA των περιοχών αυτών [233, 234]. Εναλλακτικά, θα μπορούσε να ισχύει ότι οι αλληλουχίες των μεταθετών στοιχείων έχουν κάποια κοινά χαρακτηριστικά με αυτές των διαφορικά μεθυλιωμένων περιοχών των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση, ώστε τελικά επιτυγχάνεται η απομεθυλίωση και έκφρασή τους στα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα [235].

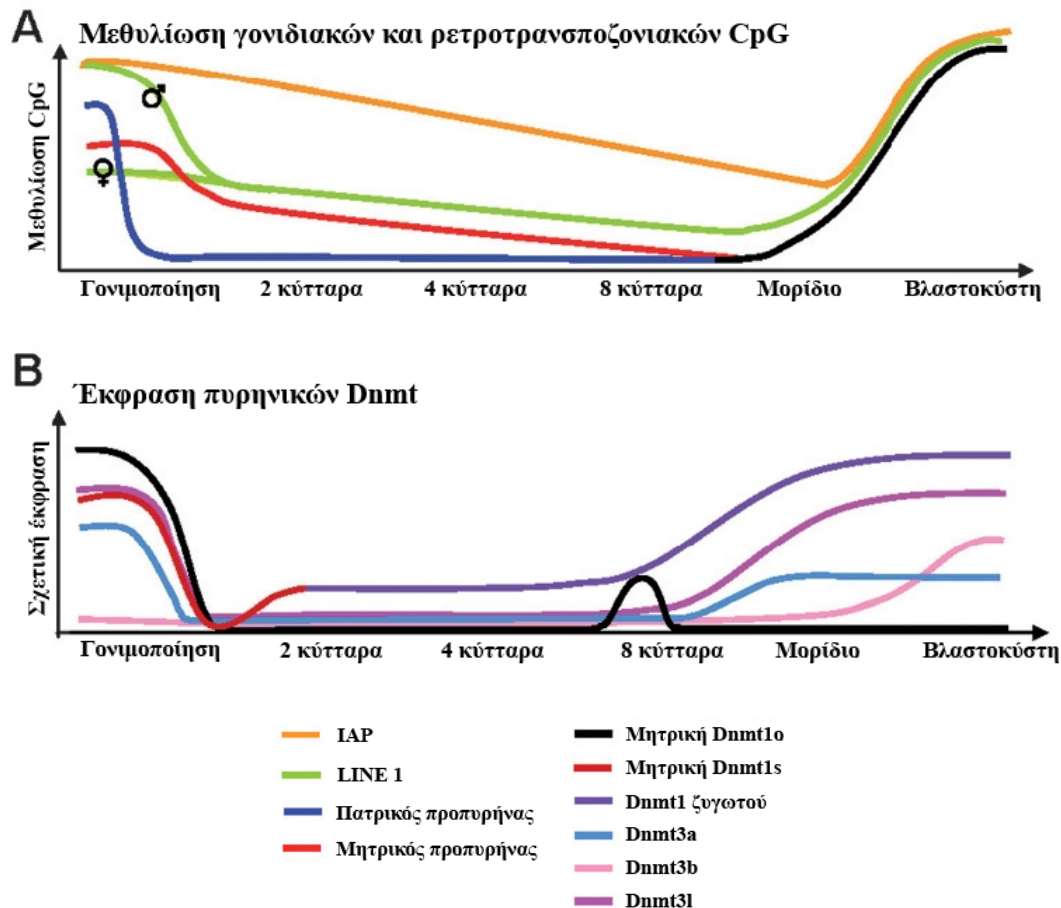
Ο επαναπρογραμματισμός των μεταθετών στοιχείων ξεκινά περίπου κατά την ίδια χρονική περίοδο στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα και των δύο φύλων και συγκεκριμένα κατά τον εοικισμό των γονάδων (Εικ. 14) [236-238]. Στη διαδικασία της απομεθυλίωσης του DNA των μεταθετών στοιχείων είναι πιθανό να συμμετέχουν μηχανισμοί τόσο ενεργής όσο και παθητικής απομεθυλίωσης [239]. Αντίθετα, η *de novo* μεθυλίωση των μεταθετών στοιχείων γίνεται σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο στα δύο φύλα, δηλαδή προγεννητικά στους άνδρες και μεταγεννητικά στις γυναίκες, ενώ επιπλέον διαφέρει σε σχέση με την έναρξη της μείωσης, λόγω της διαφορετικής πορείας ωρίμανσής τους. Συγκεκριμένα, στα θήλεα άτομα, η *de novo* μεθυλίωση έπεται της εισόδου στη μείωση καθώς και της μειωτικής πρόφασης I και συμβαίνει στα αναπτυσσόμενα ωοκύτταρα μετά από τη γέννηση [237, 240]. Αντίθετα, στα αρρενα άτομα, πραγματοποιείται στα μη διαιρούμενα εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα, πολύ πριν από την έναρξη της μείωσης [236, 238]. Έτσι λοιπόν, στα προσπερματογόνια, μετά από τη *de novo* μεθυλίωση των γονιδιακών τόπων που υπόκεινται σε αποτύπωση, γίνεται *de novo* μεθυλίωση όλων των ρετροτρανσποζονίων [238, 241].

Όσον αφορά τις μεθυλοτρανσφεράσες που συμμετέχουν στη μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων έχει βρεθεί ότι τα SINE-B1 μεθυλιώνονται κυρίως από τη Dnmt3a, ενώ τα LINE-1 και IAP τόσο από τη Dnmt3a όσο και από τη Dnmt3b. Η παρουσία της Dnmt3L απαιτείται για τη μεθυλίωση και των τριών αυτών κατηγοριών τρανσποζονίων, γεγονός που υπογραμμίζει τη σημασία του συγκεκριμένου παράγοντα για τη *de novo* μεθυλίωση αλλά και το μεγάλο εύρος ειδικότητας που διαθέτει [238].

13.3. Ο ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΖΥΓΩΤΟ

Εξαιτίας της γονιδιωματικής αποτύπωσης, τα γονιδιώματα των γονέων εμφανίζουν κατά τη γονιμοποίηση επιγενετική ασυμμετρία, η οποία είναι απαραίτητη για τη

φυσιολογική ανάπτυξη του ζυγωτού [242]. Αυτές οι επιγενετικές διαφοροποιήσεις όχι μόνο διατηρούνται αλλά και ενισχύονται στο ζυγωτό. 0-5 ώρες μετά από τη γονιμοποίηση τα γονεϊκά χρωμοσώματα είναι ελεύθερα να αλληλεπιδράσουν άμεσα με τους κυτταροπλασματικούς παράγοντες του ωοκυττάρου, ενώ στη συνέχεια σχηματίζονται οι μεμβράνες των προπυρήνων και η πρόσβαση των κυτταροπλασματικών παραγόντων ελέγχεται.



Εικ. 15. Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη του μυ [225]. Επίπεδα (A) μεθυλίωσης αλληλουχιών DNA και (B) έκφρασης μεθυλοτρανσφερασών.

Κατά τη διάρκεια αυτών των πρώτων ωρών μετά από τη γονιμοποίηση παρατηρούνται δραματικές επιγενετικές διαφορές μεταξύ των γονεϊκών γονιδιωμάτων. Το πατρικό γονιδίωμα υφίσταται απομεθυλίωση, ενώ το μητρικό γονιδίωμα, το οποίο φέρει τα περισσότερα επιγενετικά σημάδια αποτύπωσης, υφίσταται περαιτέρω *de novo* μεθυλίωση [243, 244]. Η απομεθυλίωση του πατρικού γονιδιώματος ίσως είναι απαραίτητη ώστε να καταστεί δυνατή η πρόιμη ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος [245]. Μετά από την παθητική απομεθυλίωση του εμβρυϊκού γονιδιώματος που συμβαίνει στο στάδιο του μοριδίου, στο στάδιο της βλαστοκύστης οι μεθυλοτρανσφεράσες μετακινούνται από το κυτταρόπλασμα προς τον πυρήνα των κυττάρων της εσωτερικής κυτταρικής μάζας, όπου εγκαθίσταται το νέο, εμβρυϊκό πια, πρότυπο μεθυλίωσης (Εικ. 15) [246-248]. Σε περίπτωση απαλοιφής των γονιδίων των μεθυλοτρανσφερασών, τα έμβρυα πεθαίνουν στο στάδιο του μοριδίου, γεγονός που επιβεβαιώνει τη

σπουδαιότητα της μεθυσίας και της γονιδιωματικής αποτύπωσης κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη [249].

Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση προστατεύονται από την καθολική απομεθυσία και εμφανίζουν πολύ δυναμικό πρότυπο μεθυσίας κατά τη διάρκεια της προεμφυτευτικής ανάπτυξης [191, 250]. Οι ενδογενείς ρετροϊοί επίσης εμφανίζουν ανθεκτικότητα στην απομεθυσία σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια. Έτσι, τα επίπεδα μεθυσίας τους παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στα γαμετικά κύτταρα και το ζυγωτό, φτάνοντας μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και το 98%, ενώ μειώνονται στο στάδιο της βλαστοκύστης, παραμένοντας, όμως, πάντα σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με το μέσο όρο για το σύνολο του γονιδιώματος. Αντίθετα, τα μη LTR ρετροτρανσποζόνια, αν και είναι ιδιαίτερα μεθυσμένα στο σπέρμα, υφίστανται πολύ πιο εκτεταμένη απομεθυσία μετά από τη γονιμοποίηση [247, 248, 251].

14. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Παρότι μικρός αριθμός ελεγχόμενων γεγονότων ρετρομετάθεσης σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης και συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους, θα μπορούσαν να είναι επωφελή για το κύτταρο, η ανεξέλεγκτη έκφραση και κινητοποίηση των ρετρομεταθετών στοιχείων είναι δυνατό να έχει ιδιαίτερα επιβλαβείς συνέπειες για το κύτταρο-ξενιστή, προκαλώντας ακόμη και ασθένειες [42, 252-254]. Τα SVA αποτελούν, μαζί με τα Alu, τα μόνα ενεργά μη αυτόνομα ρετροτρανσποζόνια που προκαλούν ασθένειες στον άνθρωπο [40].

Μέχρι σήμερα έχουν αναφερθεί περιπτώσεις *de novo* ενθέσεων L1, Alu [39] και SVA [40, 255-258] στο εσωτερικό γονιδίων που οδήγησαν στην εμφάνιση ασθενειών. Χαρακτηριστικά είναι τα παράδειγμα της αιμορροφολίας A λόγω ένθεσης L1 στο γονίδιο του παράγοντα VIII [39, 259], αλλά και της νευροϊνομάτωσης λόγω ένθεσης Alu στο γονίδιο NF1 [260]. Αντίθετα, τις περισσότερες φορές, νέες ενθέσεις σε σωματικά κύτταρα δεν έχουν σημαντικές επιπτώσεις, εκτός αν επηρεάζονται άμεσα πρωτο-ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια ή άλλα γονίδια που σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου [261, 262]. Αρκετά είναι τα δεδομένα σε σχέση με την έκφραση διαφόρων ρετροτρανσποζονίων σε όγκους [263].

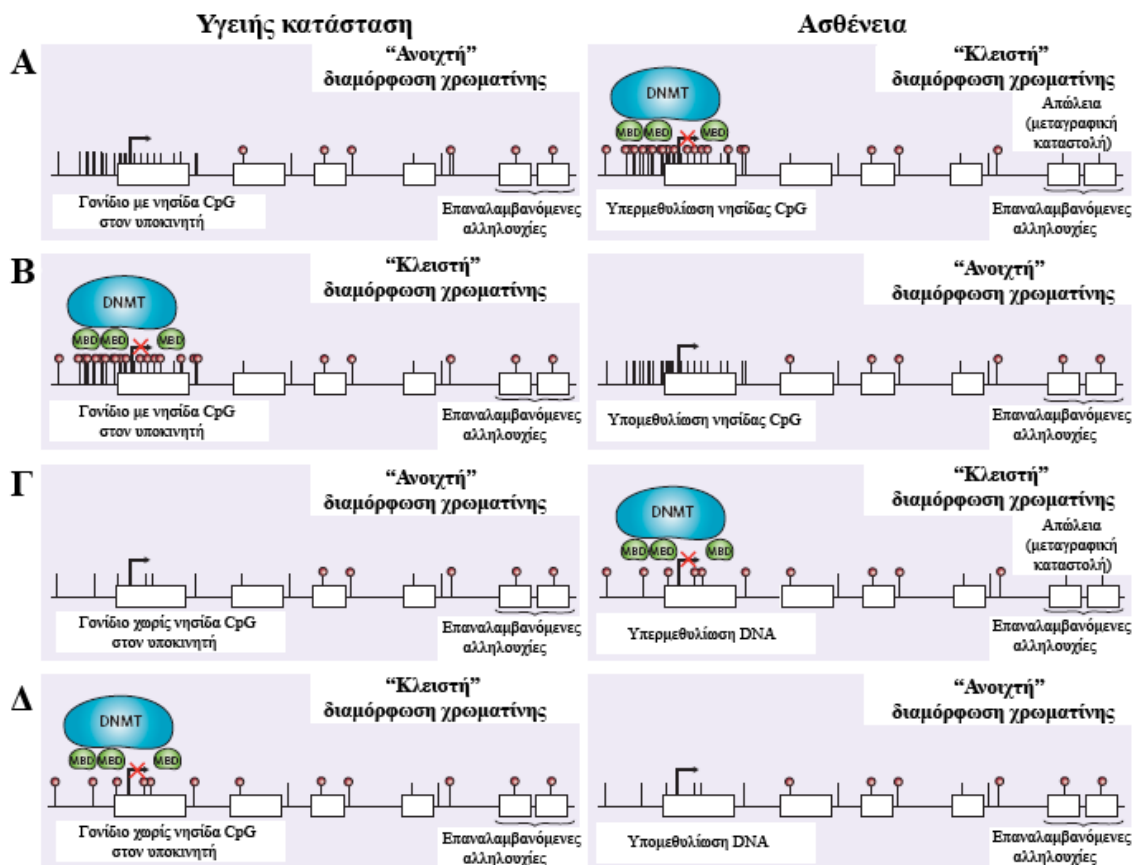
14.1. HERV ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα στοιχεία HERV συμμετέχουν στην εμφάνιση διάφορων παθολογικών καταστάσεων στον άνθρωπο, κυρίως καρκίνου και αυτοάνοσων νοσημάτων [364-266]. Σε ότι αφορά τις αυτοάνοσες παθήσεις, ορισμένες πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από HERV πιθανώς δρουν ως υπεραντιγόνα [267], δηλαδή πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν μη ειδική ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων, οδηγώντας στην εμφάνιση διαβήτη τύπου 1 [268-271], συστηματικού ερυθματώδους λύκου (SLE) [272], σκλήρυνσης κατά πλάκας [273-274] και ρευματοειδούς αρθρίτιδας [275, 276]. Η έκφραση του HERV-K10 έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση σχιζοφρένειας και άλλων νευροψυχιατρικών διαταραχών [277-280]. Έχει επίσης αναφερθεί πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ένθεσης ενός HERV-K και εμφάνισης ψωρίασης [281].

Τέλος, σχηματισμός VLP των HERV έχει παρατηρηθεί στο σύνδρομο Sjogren's [282], σε σεμινώματα [283], σε μελανώματα [284], στη σχιζοφρένεια [285] και στη σκλήρυνση κατά πλάκας [286].

15. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΑ ΣΥΝΔΡΟΜΑ

Ορισμένες φορές είναι πιθανό το γαμετικό κύτταρο να μην καταφέρει να ολοκληρώσει τον επαναπρογραμματισμό της γενετικής πληροφορίας ή ακόμη να συμβούν λάθη κατά την επανεγκαθίδρυση του αποτυπώματος. Κάτι τέτοιο θα οδηγούσε σε επιγενετική κληρονόμηση μέσω της γαμετικής σειράς και εμφάνιση επιγενετικού νοσήματος (Εικ. 16) [168, 287]. Οι ασθένειες και διαταραχές του ανθρώπου που οφείλονται σε γονιδιωματική αποτύπωση είναι πολυάριθμες και εμφανίζονται ως αποτέλεσμα ελλείμματος, μονογονεϊκής δισωμίας ή διαταραχής του προτύπου μεθυλίωσης κάποιου γονιδίου ή χρωμοσωμικής περιοχής [248, 288]. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί 9 σύνδρομα που οφείλονται σε διαταραχές της γονιδιωματικής αποτύπωσης στον άνθρωπο, με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα Prader-Willi, Angelman, Silver-Russell και Beckwith-Wiedemann και, πιο πρόσφατα, τη μονογονεϊκή δισωμία 14 (τόσο η πατρική όσο και η μητρική) (Πίν. 4) [289]. Επιπλέον, η μη φυσιολογική γονιδιωματική αποτύπωση που οδηγεί σε απώλεια της ετεροζυγωτίας συμβάλλει στην εμφάνιση κακοηθειών [290].



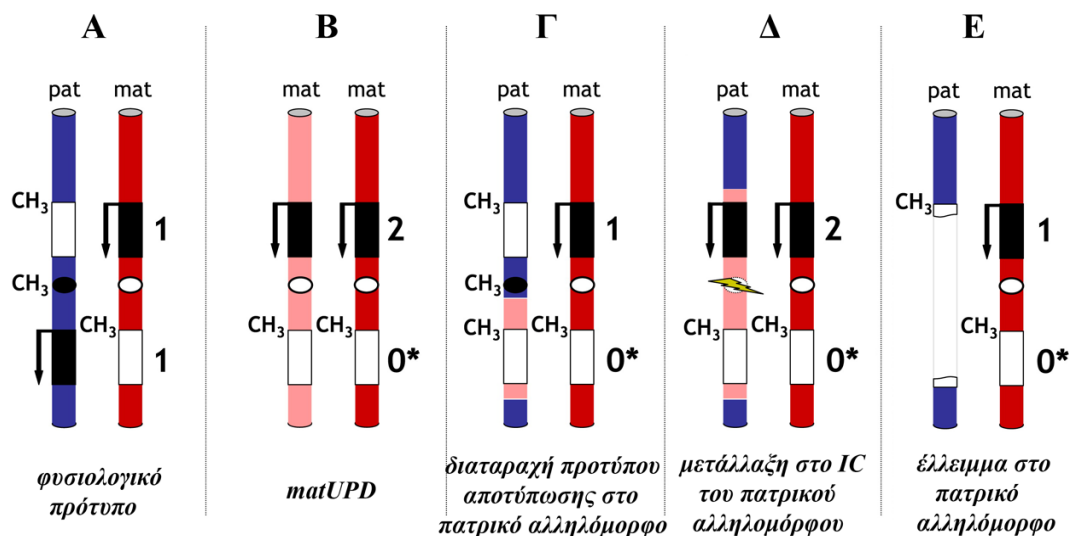
Εικ. 16. Πρότυπα μεθυλίωσης DNA σε υγιείς και παθολογικές καταστάσεις [291].

Φαίνονται τα φυσιολογικά πρότυπα μεθυλίωσης (αριστερά) καθώς επίσης και η διαταραχή τους που οδηγεί στην εμφάνιση ασθενειών (δεξιά). Υπερμεθυλίωση (A) της νησίδας CpG της περιοχής που βρίσκεται κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής ή (Γ) του υποκινητή, με ταυτόχρονη απώλεια μεθυλίωσης επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Υπομεθυλίωση (B) της νησίδας CpG της περιοχής που βρίσκεται κοντά στο σημείο έναρξης της μεταγραφής ή (Δ) του υποκινητή. Η έντονη μεθυλίωση των CpG αλληλουχιών προκαλεί αποσίωπηση των αντίστοιχων γονιδίων, εξαιτίας της κλειστής διαμόρφωσης που λαμβάνει η χρωματίνη στην περιοχή των υποκινητών τους.

Μικρές γραμμές με κόκκινες κουκκίδες: μεθυλωμένα CpG, Μικρές γραμμές χωρίς κουκκίδες: μη μεθυλωμένα CpG, DNMT: DNA μεθυλοτρανσφεράση, MBD: πρωτεΐνη που περιέχει δομική περιοχή για δέσμευση σε μεθυλωμένα CpG (methyl-CpG binding domain protein).

Νόσημα	Συχνότητα εμφάνισης	Ποσοστό που οφείλεται σε ανωμαλία αποτύπωσης
Prader-Willi	1/25,000-1/10,000	~1%
Angelman	1/20,000-1/12,000	~4%
Beckwith-Wiedemann	1/15,000	~60%
Silver-Russel	1/100,000-1/3,000	~50%
Παροδικός νεογνικός σακχαρώδης διαβήτης	1/400,000	~30%
Ψευδοπαραθυρεοειδισμός Ib	Άγνωστο	>90%
matUPD(14) - Σύνδρομο Temple	Άγνωστο	Άγνωστο

Πίν. 4. Συχνότητα εμφάνισης νοσημάτων που προκαλούνται από ανωμαλίες της γονιδιοματικής αποτύπωσης [292].



Εικ. 17. Μοριακές διαταραχές που είναι πιθανό να οδηγήσουν σε ασθένειες εξαιτίας διαταραχής της αποτύπωσης [293]

(Α) Φυσιολογική κατάσταση: δύο χρωμοσώματα που προέρχονται το ένα από τον πατέρα και το άλλο από τη μητέρα. (Β) Μητρική μονογονεϊκή ετεροδισωμία: δύο διαφορετικά χρωμοσώματα που προέρχονται από τη μητέρα. Εκδήλωση διαταραχής που οφείλεται στη μη έκφραση γονιδίου με αποτύπωση το οποίο φυσιολογικά εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο. (Γ) Διαταραχή της αποτύπωσης που οφείλεται σε αλλαγή του προτύπου μεθύλιωσης στο πατρικό αλληλόμορφο. (Δ) Διαταραχή της αποτύπωσης που οφείλεται σε μετάλλαξη στο IC του γονιδίου με αποτύπωση στο πατρικό αλληλόμορφο. (Ε) Διαταραχή της αποτύπωσης που οφείλεται σε έλλειμμα στο πατρικό αλληλόμορφο που περιλαμβάνει το IC και την αλληλουχία του γονιδίου με αποτύπωση. Οι DMR (οβάλ σχήματα μεταξύ των γονιδίων) λειτουργούν ως IC που ελέγχουν τα πρότυπα μεθύλιωσης της περιοχής.

15.1. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 11

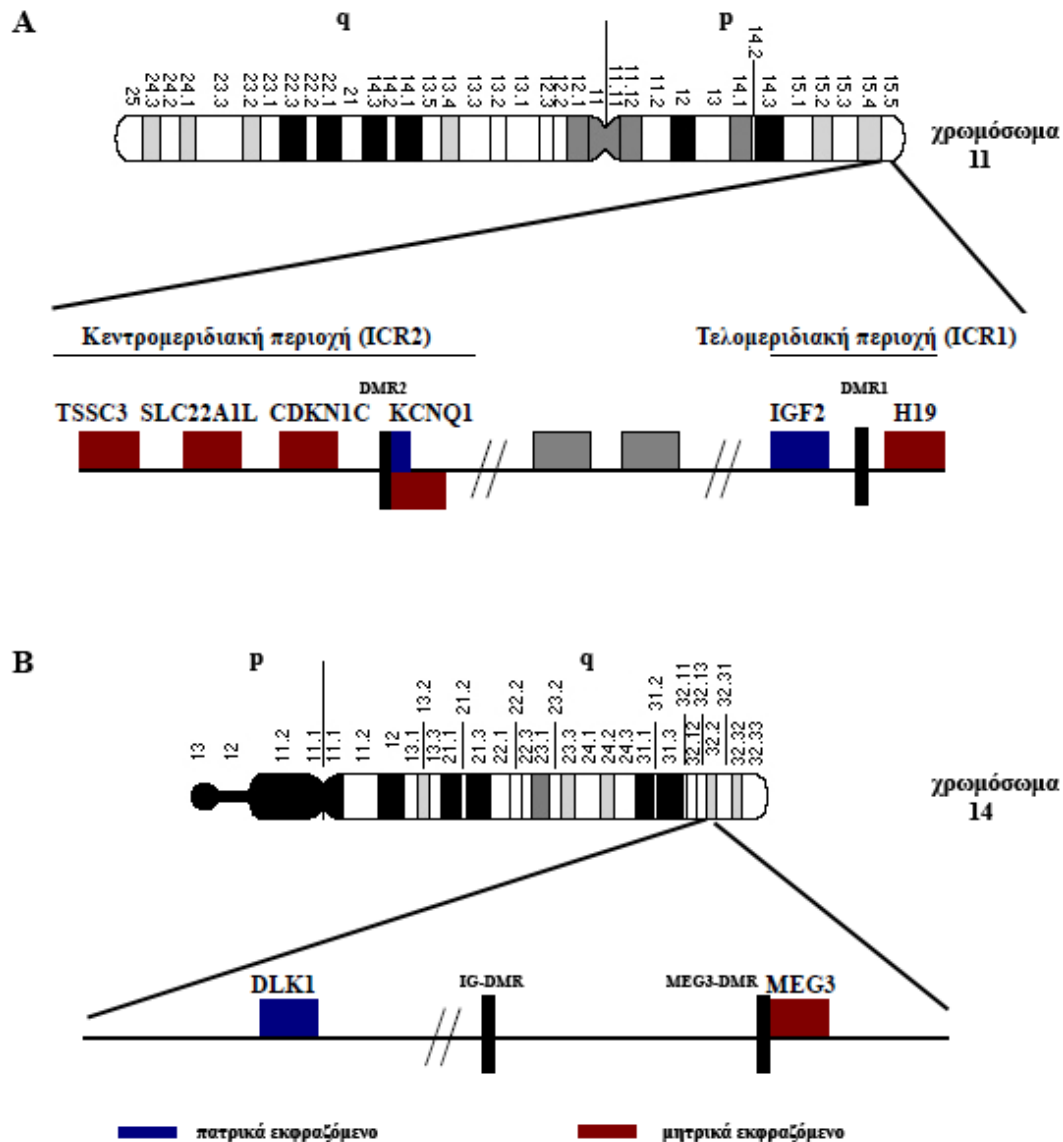
Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS) [294, 295] εμφανίζεται γενικά σποραδικά, αλλά σε ένα ποσοστό 10-15% των περιστατικών κληρονομείται με αυτοσωμικό επικρατή τρόπο. Στην πλειοψηφία των ασθενών με BWS δεν ανευρίσκεται χρωμοσωμική ανωμαλία, αντίθετα, πολύ συχνά είναι τα επιγενετικά σφάλματα, που συνήθως σχετίζονται με μη φυσιολογική μεθυλίωση της περιοχής 11p15.5 και ιδιαίτερα των γονιδίων H19 (imprinted maternally expressed transcript) και IGF2 (insulin-like growth factor 2). Άλλο ένα γνωστό σύνδρομο που έχει συσχετιστεί με επιγενετικές αλλαγές στην περιοχή 11p15.5 είναι το σύνδρομο Silver-Russell (SRS) [296, 297]. Και σε αυτήν την περίπτωση οι περισσότεροι ασθενείς είναι σποραδικοί και περιστασιακά μόνο εμφανίζονται κάποιες οικογενείς μορφές. Η πλειοψηφία των ασθενών έχει φυσιολογικό καρυότυπο, παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί ορισμένες περιπτώσεις δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών των χρωμοσωμάτων 7, 8, 11, 15, 17 και 18 [298, 299]. Το SRS οφείλεται κατά κύριο λόγο σε επιγενετικές αλλαγές της περιοχής 11p15.5, όπου η μοριακή υπογραφή αντιστοιχεί σε απώλεια της μεθυλίωσης της DMR του H19, σε αντίθεση με το BWS στο οποίο η μεθυλίωση της περιοχής αυτής αυξάνεται [300].

Η περιοχή 11p15.5 περιλαμβάνει αρκετά γονίδια που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση και εκφράζονται είτε από το πατρικό ή από το μητρικό αλληλόμορφο, όπως τα IGF2 (πατρικά εκφραζόμενο), H19 (μητρικά εκφραζόμενο), CDKN1C (cyclin-dependent kinase inhibitor 1C, p57^{KIP2}) (μητρικά εκφραζόμενο), KVLQT1 (potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 1) (μητρικά εκφραζόμενο), και KCNQ1OT1 (KCNQ1 overlapping transcript 1, LIT1) (πατρικά εκφραζόμενο) [290]. Τα γονίδια της περιοχής 11p15 είναι οργανωμένα σε δύο ξεχωριστά IC, μία τελομεριδιακή περιοχή (ICR1) και μία κεντρομεριδιακή (ICR2) (Εικ. 18Α). Μια από τις συχνότερες επιγενετικές αλλαγές που εμφανίζεται σε ασθενείς με BWS είναι η μη φυσιολογική (αμφιαλληλική) έκφραση του γονιδίου IGF2 που κωδικοποιεί για ένα εμβρυϊκό μιτογόνο που επάγει την αύξηση. Το μητρικά εκφραζόμενο γονίδιο H19 κωδικοποιεί για ένα μη κωδικό mRNA με σήμα πολυαδενυλίωσης το οποίο θεωρείται ότι δρα ως παράγοντας καταστολής της αύξησης [301-303].

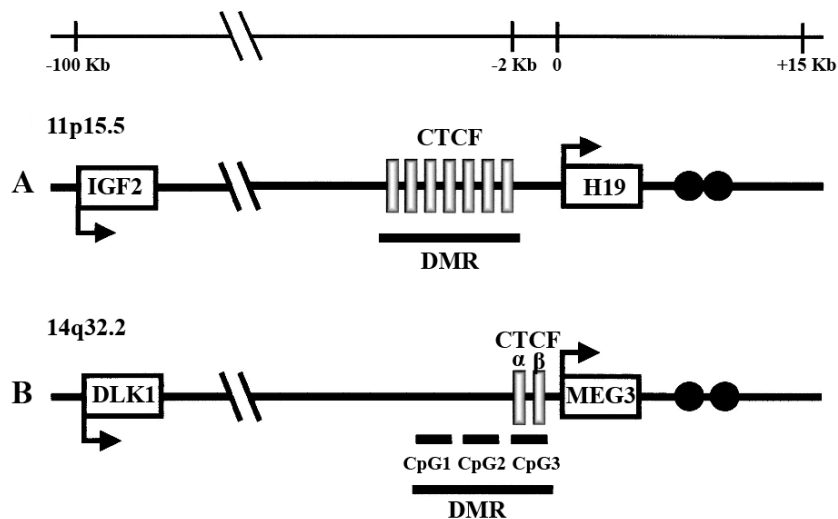
Τα γονίδια IGF2 και H19 αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα ρύθμισης μέσω περιοχών με συγκεκριμένο πρότυπο μεθυλίωσης (Εικ. 19Α). Ανοδικά του H19 και καθοδικά του IGF2 έχει ταυτοποιηθεί μία DMR, η οποία δρα ως μονωτικό στοιχείο (insulator). Συγκεκριμένα, αλληλεπιδρά με ενισχυτές που βρίσκονται καθοδικά του H19 και λειτουργεί ως όριο στη χρωματίνη, ρυθμίζοντας την αποτύπωση του IGF2. Στο μητρικό χρωμόσωμα, η CTCF (CCCTC-binding factor), μια πρωτεΐνη με ρόλο αναστολέα, προσδένεται στη DMR, παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση των ενισχυτών με τον υποκινητή του IGF2, ευνοώντας έτσι την έκφραση του H19. Αντίθετα, στο πατρικό χρωμόσωμα, η DMR μεθυλιώνεται, επομένως η CTCF δε μπορεί να προσδεθεί σε αυτήν, επιτρέποντας την έκφραση του IGF2 αλλά όχι του H19 [304, 305]. Το 5% των περιπτώσεων BWS οφείλεται σε υπερμεθυλίωση της περιοχής ICR1 [290].

Η κεντρομεριδιακή περιοχή ICR2 ρυθμίζει την έκφραση των CDKN1C (p57^{KIP2}), KCNQ1 και άλλων γονιδίων του μητρικού αλληλομόρφου. Από το KCNQ1OT1 (LIT1), που εδράζεται στο ιντρόνιο 9 του γονιδίου KCNQ1, μεταγράφεται ένα ακόμη μη κωδικό RNA της περιοχής 11p15, το οποίο εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο και πιθανότατα καταστέλλει το γονίδιο CDKN1C (p57^{KIP2}), το οποίο

κωδικοποιεί για έναν κυκλινοεξαρτώμενο αναστολέα κινασών. Απώλεια της μεθυλίωσης της μητρικής περιοχής ICR2 συσχετίζεται με την έκφραση του KCNQ1OT1 (LIT1). Το 40% των οικογενών και το 5-10% των σποραδικών περιστατικών BWS οφείλεται σε μεταλλάξεις του γονιδίου CDKN1C (p57^{KIP2}). Σε ασθενείς με BWS, υπομεθυλίωση της ICR2 και σημειακές μεταλλάξεις του CDKN1C (p57^{KIP2}) οδηγούν σε υπερέκφραση του CDKN1C και υπερανάπτυξη. Τέλος, το 50% των περιστατικών του συνδρόμου οφείλεται σε απώλεια της γονιδιωματικής αποτύπωσης του KCNQ1OT1 (LIT1) [290, 303].



Εικ. 18. Δομή περιοχών των χρωμοσωμάτων 11 και 14 με γονιδιωματική αποτύπωση. (A) Τα γονίδια της περιοχής 11p15 είναι οργανωμένα σε δύο ξεχωριστά IC, μία τελομεριδιακή περιοχή (ICR1) και μία κεντρομεριδιακή (ICR2). (B) Η έκφραση των γονιδίων DLK1 και MEG3 της περιοχής 14q32 ρυθμίζεται μέσω δύο DMR, της IG-DMR και της MEG3-DMR.



Εικ. 19. Σύγκριση της περιοχής IGF2/H19 του χρωμοσώματος (A) 11p15.5 με την περιοχή (B) DLK1/MEG3 του χρωμοσώματος 14q32 [306].

Οι περιοχές ανοδικά των H19 και MEG3 περιέχουν DMR στις οποίες περιλαμβάνονται 7 και 2 θέσεις πρόσδεσης του CTCF, αντίστοιχα. Η γονιδιακή έκφραση ρυθμίζεται επιπλέον από την παρουσία ρυθμιστικών στοιχείων με ρόλο ενισχυτή που βρίσκονται περίπου 8-10 Kb καθοδικά των γονιδίων. Τα γονίδια IGF2 και H19 απέχουν μεταξύ τους ~90 Kb, όπως ακριβώς και τα DLK1 και MEG3.

Στο επάνω μέρος του διαγράμματος δίνονται οι φυσικές αποστάσεις. Δίνονται επίσης οι θέσεις πρόσδεσης του CTCF (σκιασμένα κάθετα πλαίσια) και οι θέσεις αλληλουχιών με ρόλο ενισχυτή (μαύροι κύκλοι). Η μεταγραφική μονάδα του κάθε γονιδίου υποδηλώνεται με πλαίσιο, ενώ η κατεύθυνση της μεταγραφής σημειώνεται με βέλος στο επάνω ή το κάτω μέρος του πλαισίου ανάλογα με το αν το γονίδιο εκφράζεται από το μητρικό ή το πατρικό αλληλόμορφο, αντίστοιχα.

15.2. Η ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΟΣ 14

Οι Wang και συν. [307] και Temple και συν. [308] περιέγραψαν το 1991 διαφορετικούς φαινοτύπους σε άτομα με πατρική και μητρική μονογονεϊκή δισωμία (Uniparental disomy, UPD) του χρωμοσώματος 14. Η μητρική UPD (matUPD) 14, η κληρονόμηση και των δύο ομόλογων χρωμοσωμάτων 14 από τη μητέρα, προκύπτει συνήθως λόγω μεταθέσεων του χρωμοσώματος 14, και μπορεί να έχει κοινά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά με το σύνδρομο Prader-Willi [309, 310]. Παιδιά με mat(14)UPD παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο σποραδικών μορφών καρκίνου ή ασθένειων που σχετίζονται με καρκινογενέσεις [311]. Η πατρική μονογονεϊκή δισωμία 14 (pat(14)UPD) έχει χαρακτηριστικό φαινότυπο με έντονα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά [312]. Οφείλεται σε σφάλματα της γονιδιωματικής αποτύπωσης, ενώ έχει αναφερθεί και μερική μονογονεϊκή δισωμία της υποπεριοχής 14q32 που υποδηλώνει την ύπαρξη κάποιας κρίσιμης περιοχής στο τμήμα αυτό [310, 313, 314].

Γονίδια της περιοχής 14q32 που υπόκεινται σε αποτύπωση είναι το εκφραζόμενο από το πατρικό αλληλόμορφο DLK1 (delta, Drosophila homologue-like 1), μια διαμεμβρανική σηματοδοτική πρωτεΐνη που έχει ρόλο ρυθμιστή της ανάπτυξης και είναι ομόλογη πρωτεϊνών του σηματοδοτικού μονοπατιού Notch/delta [313], το εκφραζόμενο από το μητρικό αλληλόμορφο γονίδιο MEG3 (maternally expressed gene 3) ή GTL2 (gene trap locus 2), το οποίο δεν περιλαμβάνει λειτουργικό ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και από το οποίο μεταγράφεται ένα μη κωδικό RNA [315], καθώς και μια μεγάλη συστοιχία άλλων μη κωδικών RNA. Τα γονίδια DLK1 και MEG3

βρίσκονται σε απόσταση περίπου 90 Kb μεταξύ τους. Η ρύθμιση των DMR που καθορίζει την έκφραση της συγκεκριμένης συστοιχίας (DLK1/MEG3) εμφανίζει σημαντικές ομοιότητες με εκείνη της συστοιχίας IGF2/H19 (Εικ. 18B, 19B) [306].

16. ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

16.1. ΟΙ ΑΙΤΙΕΣ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ

Η συχνότητα της υπογονιμότητας αυξάνεται συνεχώς και πλέον 1 στα 7 ζευγάρια του δυτικού κόσμου αδυνατεί να συλλάβει αυθόρμητα. Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί την αιτία του 50% περίπου περιπτώσεων υπογονιμότητας. Η αιτία παραμένει αδιευκρίνιστη στο 50% περίπου των υπογόνιμων ανδρών, κι έχει προταθεί ότι πιθανώς εμπλέκονται γενετικοί παράγοντες [316]. Οι αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: δυσλειτουργίες πριν τον όρχι (ορμονικές, γενετικές, κ.α.), δυσλειτουργίες του όρχι (σύνδρομο Sertoli-cell-only, παύση της σπερματογένεσης, κρυπορχία κ.α.) και δυσλειτουργίες μετά τον όρχι (παρεμπόδιση, μολύνσεις, και ανοσολογικές αιτίες) [317]. Κάποιες από τις συχνές αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας είναι ενδοκρινολογικές, αναπτυξιακές και ανατομικές ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος και μειωμένος αριθμός ή/και ελαττωμένη κινητικότητα των σπερματοζωαρίων [318]. Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει τεράστια βήματα με σκοπό την κατανόηση της φυσιολογίας της ανθρώπινης αναπαραγωγής, σε πολλές περιπτώσεις η αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας δε μπορεί να διευκρινιστεί [319].

Την τελευταία δεκαετία δίνεται ιδιαίτερη βαρύτητα σε γενετικούς παράγοντες, οι οποίοι πιθανώς να αποτελούν την κύρια πηγή της παθολογίας της αναπαραγωγής του άνδρα. Γενετικοί παράγοντες που συμμετέχουν στην ανδρική υπογονιμότητα είναι χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μονογονιδιακές διαταραχές, πολυπαραγοντικά νοσήματα και ενδοκρινολογικές δυσλειτουργίες γενετικής φύσης [320]. Επίσης, μεγάλη σημασία για τη γονιμότητα έχει η διατήρηση της σταθερότητας και της ακεραιότητας της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων, η οποία διασφαλίζεται με την αντικατάσταση του 85% των ιστονών από πρωταμίνες, μέσω της οποίας εξασφαλίζεται η μέγιστη συμπύκνωση του DNA [321]. Τέλος, η ακριβής μεταβίβαση της επιγενετικής πληροφορίας επιδρά σημαντικά στη γονιμότητα των ίδιων των ανδρών και πιθανώς των απογόνων τους [322].

16.2. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Τα τελευταία χρόνια υποστηρίζεται ολοένα και περισσότερο ο ρόλος των επιγενετικών παραγόντων στην εμφάνιση ανδρικής υπογονιμότητας. Οι τροποποιήσεις των ιστονών επιδρούν στη γονιδιακή έκφραση, η καθεμιά ξεχωριστά ή σε συνδυασμό και η μη φυσιολογική τροποποίηση των ιστονών των σπερματοζωαρίων θα μπορούσαν να αποτελέσουν παράγοντα υπογονιμότητας αλλά και να επηρεάζουν την επικείμενη εμβρυογένεση [323]. Από την άλλη, το πρότυπο μεθυλίωσης του DNA μεταβάλλεται, τουλάχιστον στα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση, στους ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες και στους άνδρες στους οποίους παρατηρείται εσφαλμένη αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες [324-329]. Επίσης, σε ασθενείς με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπερμοδιαγράμματος έχει αναφερθεί μια ευρύτερη μεταβολή του προτύπου μεθυλίωσης στο σπέρμα που αφορά

τόσο σε νησίδες CpG που βρίσκονται ανοδικά υποκινητών γονιδίων με αποτύπωση, όσο και σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες [330]. Μάλιστα, οι διαταραχές της μεθυλίωσης, σε διαφορετικές αυτή τη φορά θέσεις, μπορεί να επεκτείνονται ακόμη και σε άνδρες με σχετικά φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων, αλλά με προβλήματα στο πακετάρισμα της χρωματινής [329]. Επομένως, ο κίνδυνος παρουσίας, άρα και μεταβίβασης στην επόμενη γενιά, επιγενετικών διαταραχών μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος της υπογονιμότητας,

16.3. Η ΜΕΤΑΒΙΒΑΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΣΦΑΛΜΑΤΩΝ

Στον άνθρωπο, τα στοιχεία για τη μεταβίβαση επιγενετικών σφαλμάτων μέσω των γαμετικών κυττάρων προέρχονται αποκλειστικά σχεδόν από επιδημιολογικές μελέτες, ενώ οι αναφορές γέννησης παθολογικών ατόμων είναι περιορισμένες [331, 332]. Η μεταβίβαση επιγενετικών αλλαγών από γενιά σε γενιά δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα, αλλά πιστεύεται ότι μπορεί να συμβεί αν η μεθυλίωση του DNA δεν έχει επανεγκαθιδρυθεί σωστά και από την αρχή στα πρώιμα γαμετικά κύτταρα (Primordial Germ Cells, PGC) ή στο έμβρυο εξαιτίας της παρουσίας ρετρομεταθετών στοιχείων ή ιστονικών τροποποιήσεων [158].

Τα τελευταία χρόνια δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στη μεταβίβαση επιγενετικών σφαλμάτων μέσω των Τεχνικών Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής (Assisted Reproduction Techniques, ART), καθώς έχει αναφερθεί ότι σημαντικό ποσοστό των εμβρύων που προκύπτουν φέρει διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης σε πολλούς γενετικούς τόπους που υπόκεινται σε αποτύπωση. Μάλιστα, φαίνεται πως ένα μέρος αυτών πιθανώς αντιστοιχεί σε διαταραχές που προέκυψαν στο έμβρυο, ενώ ένα άλλο οφείλεται σε μη φυσιολογική υπομεθυλίωση που κληρονομήθηκε από τον πατέρα [328].

17. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΤΟΥ DNA ΚΑΙ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΥΠΟΒΟΗΘΟΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Υπολογίζεται ότι από το 1987 που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά με επιτυχία τεχνικές η *in vitro* γονιμοποίηση (*In Vitro* Fertilization, IVF) [333] μέχρι και σήμερα έχουν γεννηθεί ~3 εκατομμύρια παιδιά με τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Μάλιστα στις μέρες μας, το 1-3% των κήσεων στις ανεπτυγμένες χώρες προέρχονται από ART, ενώ οι αριθμοί αυτοί φαίνεται να αυξάνονται συνεχώς [334]. Μελέτες παρακολούθησης (follow-up studies) σχετικά με τις μακροπρόθεσμες συνέπειες στην υγεία αυτών των παιδιών, έχει αναφερθεί αυξημένη συχνότητα εμβρυϊκής ενδομήτριας καθυστέρησης ανάπτυξης (Intra-Uterine Growth Restriction, IUGR), πρόωρη γέννηση και μικρότερο βάρος γέννησης στις μονές κήσεις μετά από IVF σε σχέση με τις φυσιολογικές συλλήψεις, καθώς και χρωμοσωμικές ατυπίες των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Πρόσφατα αναφέρθηκε επίσης αυξημένος κίνδυνος περιγεννητικής θνησιμότητας, συγγενών ανωμαλιών και επιγενετικών διαταραχών σε παιδιά που γεννιούνται μετά από IVF [335-339].

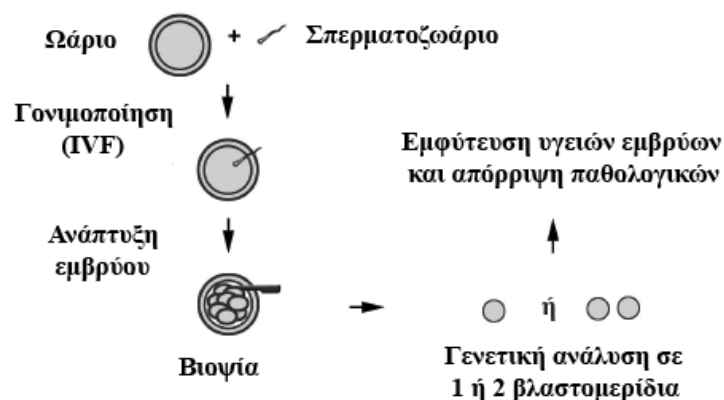
Οι αιτίες που προκαλούν τις αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης ανωμαλιών στα παιδιά αυτά δεν είναι γνωστές, αλλά έχει προταθεί ότι η ποιότητα των γαμετών από άτομα με βαριάς μορφής υπογονιμότητα τα οποία ακολουθούν IVF θα μπορούσε να συμβάλλει προς την κατεύθυνση αυτή [340-342]. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί μη φυσιολογική μεθυλίωση των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση σε γαμέτες

υπογόνιμων ανδρών και σε παιδιά που έχουν γεννηθεί μετά από IVF [343-345]. Μάλιστα, έχει αναφερθεί αυξημένος κίνδυνος γέννησης παιδιού με σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (Beckwith-Wiedemann Syndrome, BWS) και Angelman (Angelman Syndrome, AS) μετά από IVF [343-345]. Δεν έχει ακόμη διασαφηνιστεί εάν η αυξημένη συχνότητα γέννησης παιδιών με διαταραχές της αποτύπωσης μετά από IVF οφείλεται στις φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας [346], στους *in vitro* χειρισμούς των γαμετών ή/και του εμβρύου [334], στην έκθεση των γαμετών σε στρεσογόνο περιβάλλον τόσο *in vitro* όσο και ενδομήτρια [347, 348], ή απλά κληρονομούνται από τους γαμέτες των υπογόνιμων γονέων στους οποίους προϋπάρχουν επιγενετικές αλλαγές [325-328, 349].

Αυτά τα πρώτα αποτελέσματα στον άνθρωπο παρουσιάζουν ενδιαφέρον, αλλά είναι περιορισμένα και προσφέρουν λιγοστά στοιχεία σχετικά με τις αιτίες που οδηγούν σε αυτή την κατάσταση ή/και τους μηχανισμούς που έχουν πιθανώς διαταραχθεί (π.χ. ενεργοποίηση ρετροτρανσποζονίων, αλλαγές σε γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση, κλπ.). Παρόλα αυτά, δεν έχει μέχρι σήμερα αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής στη γονιδιωματική αποτύπωση, ούτε έχει μελετηθεί ο αντίκτυπος της δράσης στρεσογόνων ερεθισμάτων στη μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων.

18. Η ΠΡΟΕΜΦΥΤΕΥΤΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD) αποτελεί σχετικά νέα προσέγγιση, η οποία χρησιμοποιείται για το γενετικό έλεγχο εμβρύων που έχουν προκύψει από IVF. Εφαρμόζεται σήμερα τόσο για την αποφυγή χρωμοσωμικών ανωμαλιών (αριθμητικών και δομικών) όσο και μονογονιδιακών νοσημάτων (φυλοσύνδετα, αυτοσωμικά υπολειπόμενα, αυτοσωμικά επικρατή, μιτοχονδριακά). Επιτρέπει σε ζευγάρια που είναι φορείς γενετικών νοσημάτων να αποκτήσουν υγιές παιδί, χωρίς να υπάρχει πιθανότητα διακοπής της κύησης, σε περίπτωση παθολογικού εμβρύου, καθώς, μετά από εξέταση, εμφυτεύονται μόνο τα υγιή έμβρυα (Εικ. 20) [350, 351].



Εικ. 20. Βασικά βήματα της προεμφυτευτικής γενετικής διάγνωσης.

Μετά από υποβοηθούμενη αναπαραγωγή πραγματοποιείται βιοψία και γενετική ανάλυση των κυττάρων που έχουν απομονωθεί. Εμφυτεύονται μόνο τα υγιή έμβρυα.

Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες προσεγγίσεις προεμφυτευτικής διάγνωσης είναι:

α) Βιοψία *Πολικού Σωματίου* (Polar Body, PB). Τα πολικά σωματίδια σχηματίζονται κατά την ασυμμετρική κυτταρική διαίρεση κατά τη διάρκεια της ωογένεσης. Το πρώτο πολικό σωματίδιο ιδανικά θα πρέπει να αφαιρεθεί μέσα σε 6 ώρες από την ωοληψία, ενώ το δεύτερο πολικό σωματίδιο αφαιρείται από το ζυγωτό [352].

β) Βιοψία *Βλαστομεριδίου* (στάδιο των 6-8 κυττάρων). Την τρίτη ημέρα της ανάπτυξης, όταν το έμβρυο είναι στο στάδιο των 6-8 κυττάρων, μπορούν να αφαιρεθούν δύο κύτταρα χωρίς να επηρεαστεί ο μεταβολισμός ή η ανάπτυξη του εμβρύου [353]. Περισσότερα από 90% των εμβρύων επιβιώνουν της διαδικασίας, ενώ η βιοψία είναι επιτυχής στο 97% των περιπτώσεων [354]. Για να πραγματοποιηθεί η βιοψία απαιτείται η διάρρηξη της διαφανούς ζώνης και η αναρρόφηση των βλαστομεριδίων. Ο περιορισμός της μεθόδου είναι ότι μπορούν να αφαιρεθούν μόνο 1-2 κύτταρα, ενώ ο διαθέσιμος χρόνος για την ολοκλήρωση της ανάλυσης είναι μόλις 24 ώρες, αφού την τέταρτη ημέρα θα πρέπει να γίνει η εμβρυομεταφορά.

γ) Βιοψία *Βλαστοκύστης*. Η βιοψία βλαστοκύστης γίνεται 5-6 ημέρες μετά από τη γονιμοποίηση [355] και μπορούν να αφαιρεθούν 10-30 κύτταρα του τροφοεκτοδέρματος χωρίς να διαταραχθούν τα κύτταρα της εσωτερικής κυτταρικής μάζας. Με αυτή τη μέθοδο ξεπερνιούνται τα προβλήματα των δύο παραπάνω προσεγγίσεων που οφείλονται στο μικρό αριθμό διαθέσιμων κυττάρων για ανάλυση.

Η PGD εφαρμόστηκε για πρώτη φορά στον άνθρωπο πριν από είκοσι περίπου χρόνια [353, 356] και από τότε έχουν πραγματοποιηθεί περίπου 50,000 κύκλοι παγκοσμίως. Το 2004 οι γεννήσεις μετά από PGD έφτασαν τις 1,000 [357], και υπολογίζεται ότι από τότε έχουν γεννηθεί 10,000 επιπλέον παιδιά μετά από PGD, καθώς εφαρμόζεται πλέον κατά κόρον [358].

18.1. PGD ΚΑΙ ΠΙΘΑΝΟΙ ΚΙΝΔΥΝΟΙ

Η αφαίρεση ενός ή περισσότερων βλαστομεριδίων, ή οποιουδήποτε αριθμού εμβρυονικών κυττάρων, μπορεί όπως είναι λογικό να μειώνει την επιβίωση ή την ικανότητα εμφύτευσης του εμβρύου κι επομένως τα ποσοστά εγκυμοσύνης. Παρόλα αυτά, η ολοδύναμη φύση των εμβρυονικών βλαστικών κυττάρων δεν αναμένεται να επιτρέψει την εμφάνιση ανωμαλιών σε επίπεδο οργάνων στα παιδιά που θα γεννηθούν. Η απώλεια ενός ή περισσότερων κυττάρων πριν από τον οριστικό προσανατολισμό τους προς ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό μονοπάτι αναπληρώνεται από κάποιο άλλο κύτταρο που έχει τη δυνατότητα να εξυπηρετήσει τον ίδιο σκοπό. Επομένως, το ποσοστό εμφάνισης ανωμαλιών αναμένεται να είναι ίδιο με αυτό που παρατηρείται στο γενικό πληθυσμό ή, σωστότερα, περίπου ίδιο με αυτό που παρατηρείται στις εγκυμοσύνες μετά από ART αλλά χωρίς PGD, δηλαδή περίπου 30% [359]. Τα μέχρι σήμερα δεδομένα δεν υποδεικνύουν αύξηση του ποσοστού αυτού στα παιδιά που έχουν γεννηθεί μετά από PGD και, συνολικά, η PGD θεωρείται ασφαλής μέθοδος [360-361].

Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες του προτύπου μεθυλίωσης του DNA σε παιδιά που έχουν γεννηθεί μετά από PGD. Μια τέτοια μελέτη θα ήταν ιδιαίτερα χρήσιμη, καθώς η τεχνική αυτή, επιπλέον των χειρισμών που πραγματοποιούνται στα πλαίσια της εφαρμογής των ART, περιλαμβάνει και άλλους, οι οποίοι αφορούν στη χρονική περίοδο κατά την οποία λαμβάνει χώρα ο επιγενετικός επαναπρογραμματισμός του εμβρύου.

B. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα ασχολείται όλο και συχνότερα με τα ρετρομεταθετά στοιχεία, καθώς αποδεικνύεται πλέον ότι δεν αποτελούν άχρηστο κομμάτι του γονιδιώματος, αντίθετα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των γονιδιωμάτων, τη διαμόρφωση της γενετικής ποικιλομορφίας αλλά και την εμφάνιση ασθενειών. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει κάποια ξεκάθαρη απόδειξη ότι οι HERV είναι ικανοί προς ρετρομετάθεση, αλλά τα στοιχεία που οδηγούν προς αυτήν την κατεύθυνση συνεχώς αυξάνονται. Συγκεκριμένα, είναι γνωστό ότι τα HERV-K10 ενεργοποιούνται μεταγραφικά σε καρκινικά κύτταρα, ενώ επιπλέον έχει ανιχνευθεί ενεργότητα RT των HERV-K. Παραμένει λοιπόν η πιθανότητα να υπάρχει στο ανθρώπινο γονιδίωμα κάποιο αντίγραφο ενός πλήρους μήκους, δυνητικά ενεργού στοιχείου HERV, το οποίο θα μπορούσε να είναι ενεργό σε κάποια συχνότητα. Λαμβάνοντας υπόψη τα σημεία αυτά, στη παρούσα εργασία ασχοληθήκαμε με τον ενδογενή ρετροϊό HERV-K10 και μελετήσαμε την έκφραση και τη ρετρομετάθεσή του.

Είναι γνωστό ότι υπάρχει κοινή πορεία επιγενετικής ρύθμισης των ρετρομεταθετών στοιχείων και των γονιδίων με αποτύπωση. Η επιγενετική ρύθμιση της έκφρασης τόσο των ρετροτρανσποζονίων – συγκεκριμένα δε η αποσιώπησή τους – όσο και γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση έχει ιδιαίτερη σημασία για τη σωστή λειτουργία του γονιδιώματος και κατά συνέπεια του οργανισμού στο σύνολό του. Ο πιθανός επιγενετικός κίνδυνος που απορρέει από την εφαρμογή των ART σχετίζεται με τη διαταραχή της εμβρυονικής ανάπτυξης εξαιτίας της διαταραχής των προτύπων μεθυλίωσης του DNA στις DMR, οδηγώντας στην εκδήλωση ορισμένων διαταραχών της αποτύπωσης. Ο φόβος ύπαρξης τέτοιου κινδύνου υποστηρίζεται από αναφορές ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ **α)** επιγενετικών σφαλμάτων στους γαμέτες που χρησιμοποιούνται για IVF καθώς και **β)** της ίδια της διαδικασίας της IVF με την εμφάνιση συνδρόμων που προκαλούνται από διαταραχές της αποτύπωσης. Επιπλέον έχει προταθεί ότι συνθήκες στρες συντελούν στην έκφραση των HERV, ενώ και η γονιδιακή αποτύπωση διαταράσσεται σε συνθήκες στρες. Τέλος, η ενεργοποίηση ρετροτρανσποζονίων έχει συσχετιστεί με υπογονιμότητα. Για τους παραπάνω λόγους, μελετήσαμε τα πρότυπα μεθυλίωσης τόσο του HERV-K10 όσο και γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση, τα οποία είναι γνωστό ότι οδηγούν στην εμφάνιση συνδρόμων, σε σχέση με την εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και προεμφυτευτικού ελέγχου (ART/PGD) όσο και την ύπαρξη υπογονιμότητας του ανδρικού παράγοντα.

II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία αφορούν σε ιστούς από υπογόνιμους άνδρες (ορχικός ιστός, σπερματικό υγρό, περιφερικό αίμα), υπογόνιμες γυναίκες (ανώριμα ωάρια) και παιδιά που γεννήθηκαν μετά από Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση και φυσιολογικές συλλήψεις (DNA από χοριακές λάχνες). Η συλλογή των δειγμάτων έγινε με τη σύμφωνη γνώμη των συμμετεχόντων και σύμφωνα με τις ισχύουσες διατάξεις για τη διασφάλιση των προσωπικών δεδομένων. Τα προσωπικά στοιχεία όλων των συμμετεχόντων παρέμειναν εμπιστευτικά. Η ανωνυμία διασφαλίστηκε με τη χρήση κωδικών ονομάτων και απόλυτη διαφύλαξη όλων των προσωπικών στοιχείων. Ο χειρισμός όλων των δειγμάτων έγινε υπό αυστηρά ασηπτικές συνθήκες προκειμένου να αποφευχθούν μολύνσεις από εξωγενές DNA.

1.1. ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΡΧΕΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΑΙΜΑ

Τα δείγματα από βιοψία όρχεων προήλθαν από 33 αζωοσπερμικούς άνδρες οι οποίοι προσήλθαν στην Ουρολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων με προβλήματα υπογονιμότητας. Όλοι οι αζωοσπερμικοί άνδρες ήταν αναπαραγωγικής ηλικίας και είχαν φυσιολογικό καρυότυπο (46, XY).

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 μικροχειρουργική μέθοδος ανοιχτής βιοψίας. Και οι δύο μέθοδοι αποσπών ορχικό ιστό όχι περισσότερο από 0.2 g και είναι επιτυχείς στην «αναζήτηση» σπερματοζωαρίων στο 40% των περιπτώσεων. Τα δείγματα αμέσως μετά τη συλλογή τους τοποθετούνταν για φύλαξη σε υγρό άζωτο μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα των ίδιων αζωοσπερμικών ασθενών. Πρόκειται για φυσιολογικά κατά τα άλλα άτομα, επομένως το πρότυπο μεθυλίωσης στο αίμα δεν αναμένεται να είναι παθολογικό. Για την απομόνωση DNA από περιφερικά λευκοκύτταρα χρησιμοποιήθηκε περιφερικό αίμα που συλλέχθηκε σε σωληνάκια που περιείχαν EDTA ως αντιπηκτικό.

1.2. ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΟ ΥΓΡΟ (ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ)

Τα δείγματα σπερματικού υγρού προήλθαν από υπογόνιμους άνδρες οι οποίοι προσήλθαν για ανάλυση σπερμοδιαγράμματος σε συνεργαζόμενα Εργαστήρια. Η απομόνωση DNA από σπερματοζωάρια έγινε είτε αμέσως μετά τη δειγματοληψία και την ανάλυση του σπερμοδιαγράμματος ή μετά από αποθήκευση των δειγμάτων στους -20°C. Αναλύθηκαν συνολικά 32 δείγματα σπερματοζωαρίων που προέρχονταν από υπογόνιμους άνδρες αναπαραγωγικής ηλικίας, οι οποίοι εμφάνιζαν διαταραχές της συγκέντρωσης, της κινητικότητας και της μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (ολιγοασθενοτεροσπερμία).

1.3. ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ

Τα ανώριμα ωάρια στο στάδιο των Βλαστικών Κυστιδίων (Germinal Vesicles, GV) προήλθαν από υπογόνιμα ζευγάρια τα οποία προσήλθαν στο Εργαστήριο Γενετικής της Ανθρώπινης Αναπαραγωγής της Γυναικολογικής Κλινικής του

Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων καθώς και συνεργαζόμενα Εργαστήρια προκειμένου να ακολουθήσουν Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και συγκεκριμένα Ενδοκυτταροπλασματική Έγχυση Σπερματοζωαρίου (μικρογονιμοποίηση) (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI). Πριν από την ICSI πραγματοποιείται απομάκρυνση των περιφερικών κυττάρων (cumulus, corona cells) με υαλορουνιδάση, γεγονός που επιτρέπει την αναγνώριση του σταδίου ωρίμανσης στο οποίο βρίσκονται τα ωάρια. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ανώριμα διπλοειδή ωάρια στο στάδιο των GV, στα οποία είχε παρατηρηθεί αναστολή της ανάπτυξης για 20 τουλάχιστον ώρες. Τα GV συλλέχθηκαν με μικροπιπέτα και είτε χρησιμοποιήθηκαν άμεσα ή αποθηκεύτηκαν σε διάλυμα γλυκερόλης σε υγρό άζωτο προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αργότερα.

1.4. DNA ΑΠΟ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ

Τα δείγματα DNA χοριακών λαχνών παιδιών που γεννήθηκαν μετά από Προεμφυτευτική Γενετική Διάγνωση (Preimplantation Genetic Diagnosis, PGD), καθώς και τα αντίστοιχα δείγματα ελέγχου προήλθαν από το Εργαστήριο Γενετικής του Νοσοκομείου Παιδών «Αγία Σοφία» (Τμήμα Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθήνας), το οποίο είναι ένα από τα λίγα κέντρα στην Ελλάδα που ασχολούνται με την PGD. Αναλύθηκαν συνολικά 35 δείγματα που προέρχονταν από παιδιά που γεννήθηκαν μετά από PGD και 55 αντίστοιχα δείγματα ελέγχου μετά από φυσιολογικές συλλήψεις.

2. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΟΥ DNA

2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

2.1.1. Απομόνωση DNA από περιφερικό αίμα

Για την απομόνωση DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος, χρησιμοποιήθηκε μια μη εμπορική μέθοδος, η μέθοδος TKM.

Σε 700 μl αίματος και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος TKM [10 mM Tris-HCl (SIGMA), 10 mM KCl (SIGMA), 2 mM EDTA (SIGMA), 4 mM MgCl₂ (SIGMA)] και 2 σταγόνες απορρυπαντικού IGEPAL (SIGMA). Μετά από καλή ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10,000 rpm για 1 λεπτό. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και προστίθενται 500 μl TKM. Αφού το ίζημα επαναιωρηθεί πλήρως, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 10,000 rpm για 1 δευτερόλεπτο. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβάνεται ακόμη 2-3 φορές μέχρι το ίζημα να μην έχει καθόλου κόκκινο χρώμα. Έπειτα, προστίθενται 200 μl TKM και αναδεύουμε μέχρι να διαλυθεί το ίζημα. Στη συνέχεια, προστίθενται 15 μl 10% (w/v) SDS (SIGMA) και μετά από καλή ανάδευση, το μείγμα επωάζεται στους 55°C για 5 λεπτά τουλάχιστον. Ακολουθεί προσθήκη 85 μl 6 M NaCl και φυγοκέντρηση στις 12,000 rpm για 3 min. Αφού το υπερκείμενο μεταφερθεί σε νέο σωληνάριο προστίθενται 750 μl 100% αιθανόλης (SIGMA) -20°C και το DNA συλλέγεται, διαλυτοποιείται σε 50 μl 1xTE [10 mM, Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8] και φυλάσσεται στους 4°C.

2.1.2. Απομόνωση DNA από βιοψίες όρχεων

Για την απομόνωση DNA από ορχικό ιστό χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προϊόντων QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που

προτείνεται από τη εταιρεία για την απομόνωση DNA από ιστό.

Συγκεκριμένα, 25 mg από κάθε δείγμα τοποθετούνται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml. Προστίθενται 180 ml διαλύματος ATL και 20 ml πρωτεϊνάσης K. Το μείγμα αναδεύεται και επωάζεται στους 56°C για 15-17 ώρες, ενώ κατά τη διάρκεια της επώασης το δείγμα αναδεύεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα προκειμένου να διασφαλιστεί η πλήρης λύση του ιστού.

Στη συνέχεια προστίθενται 200 ml διαλύματος AL και ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους 70°C για 10 λεπτά προκειμένου να απενεργοποιηθεί η πρωτεϊνάση K. Έπειτα προστίθενται 200 ml 100% αιθανόλης και το διάλυμα αναδεύεται ήπια για 15 δευτερόλεπτα, που έχει ως αποτέλεσμα την κατακρήμνιση του DNA. Το διάλυμα του DNA μεταφέρεται στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10,000 rpm για 1 λεπτό, οπότε το DNA συγκρατείται στον ηθμό της στήλης. Για τον καθαρισμό του DNA από πρωτεΐνες προστίθενται 500 ml διαλύματος AW1 και ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 10,000 rpm για 1 λεπτό. Ο καθαρισμός ολοκληρώνεται με την προσθήκη 500 ml διαλύματος AW2 και τη φυγοκέντρωση στις 14,000 rpm για 3 λεπτά. Για να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα των διαλυμάτων έκπλυσης από το DNA η στήλη φυγοκεντρείται άλλη μία φορά στις 14,000 rpm για 1 λεπτό. Η έκλυση του DNA γίνεται με την προσθήκη 200 ml ddH₂O στη στήλη και φυγοκέντρωση στις 10,000 rpm για 1 λεπτό. Το DNA διατηρείται στους 4°C.

2.1.3. Απομόνωση DNA από σπερματοζώαρια

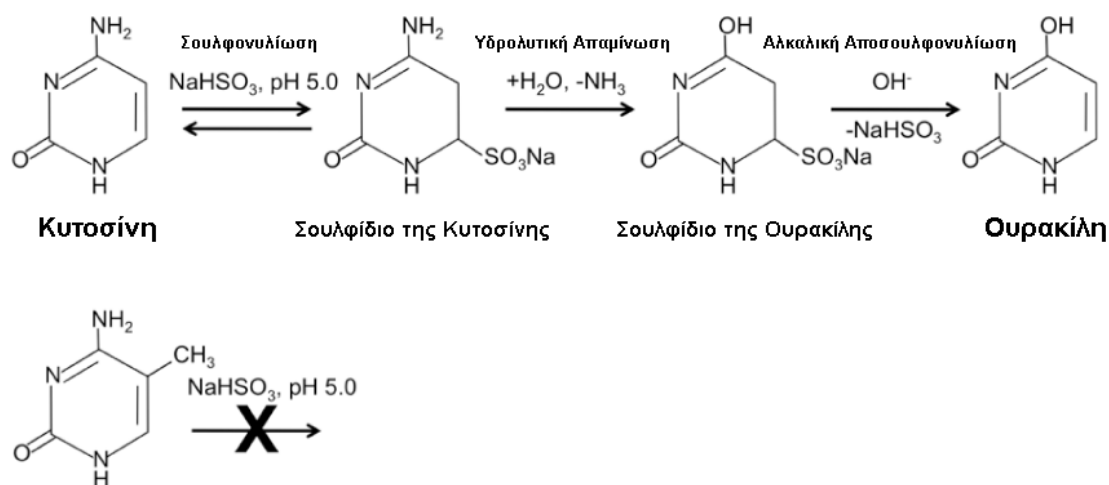
Σε μικροφυγοκεντρικό φιαλίδιο 1.5 ml τοποθετείται τόσο σπερματικό υγρό ώστε αυτό να περιέχει περίπου 5×10^6 σπερματοζώαρια και προσθέτουμε ίσο όγκο ισότονου διαλύματος 1xPBS [139 mM NaCl (SIGMA), 5.4 mM KCl (SIGMA), 0.37 mM Na₂HPO₄ (SIGMA), 0.44 mM KH₂PO₄ (SIGMA), 4.16 mM NaHCO₃ (SIGMA), pH 7.2]. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκεντρούμε στις 3,000 rpm για 6 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναιωρείται σε 200 ml 1xPBS. Το επαναιώρημα φυγοκεντρείται στις 10,000 rpm για 1 δευτερόλεπτο και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα επαναιωρείται εκ νέου σε 200 ml 1xPBS και προστίθενται 15 ml 10% (w/v) SDS, 13 ml 1 M DTT (SIGMA) και 10 ml 20 mg/ml πρωτεϊνάση K (SIGMA) και ακολουθεί επώαση 55°C για 2 ώρες. Στη συνέχεια προστίθενται 85 ml 6 M NaCl και αφού το διάλυμα αναδευτεί φυγοκεντρείται στις 12,000 rpm για 3.5 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και σε αυτό προστίθενται 750 ml παγωμένης (-20°C) 100% αιθανόλης. Το DNA συλλέγεται, διαλυτοποιείται σε 50 ml 1xTE και μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα στους 4°C.

2.2. ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ DNA ΜΕ NaHSO₃

Η δυνατότητα χημικής τροποποίησης των βάσεων του DNA με NaHSO₃ είναι γνωστή από τη δεκαετία του '70 [362, 363]. Παρόλα αυτά, εφαρμόστηκε ευρέως από τις αρχές της δεκαετίας το '90 και αποτέλεσε μια καινοτόμα τεχνική για τη μελέτη της μεθυλίωσης μεμονωμένων νησίδων CpG του γονιδιώματος [364]. Οι τεχνικές που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε ήταν πολύ λίγες και οι περισσότερες από αυτές απαιτούσαν σχετικά μεγάλες ποσότητες DNA (της τάξης των 10 μg).

Με την τεχνική αυτή επιδρούμε με NaHSO₃ στις κυτοσίνες μορίων DNA που έχουν προηγουμένως υποστεί αποδιάταξη. Ακολουθούν διαδοχικές αντιδράσεις

σουλφονυλίωσης, απαμίνωσης και αποσουλφονυλίωσης που οδηγούν στη μετατροπή των μη μεθυλωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες, ενώ οι 5-μεθυλοκυτοσίνες (5-mC) παραμένουν ως έχουν (Εικ. 21). Συγκεκριμένα, αρχικά πραγματοποιείται προσθήκη HSO_3^- στον 5,6-διπλό δεσμό του δακτυλίου κυτοσίνης (σουλφονυλίωση), ακολουθεί απελευθέρωση NH_4 με υδρόλυση (υδρολυτική απαμίνωση) και, τέλος, απελευθέρωση HSO_3^- (αλκαλική αποσουλφονυλίωση). Αποτέλεσμα αυτής της σειράς αντιδράσεων είναι η μετατροπή της κυτοσίνης σε ουρακίλη. Στις 5-mC, η μεθυλομάδα δυσχεραίνει την προσθήκη του HSO_3^- στον διπλό δεσμό, αφενός λόγω στεreoχημικής παρεμπόδισης και, αφετέρου, μέσω επαγωγικού φαινομένου. Επιπλέον, η υδρολυτική απαμίνωση πραγματοποιείται πιο αργά (η αντίδραση αυτή έχει υποδιπλάσια απόδοση). Επομένως, μετά από την επίδραση με NaHSO_3 οι μη μεθυλωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι μεθυλωμένες κυτοσίνες δεν υφίστανται τροποποίηση.



5-Μεθυλοκυτοσίνη

Εικ. 21. Αντιδράσεις που συμβαίνουν κατά τη χημική τροποποίηση του DNA με NaHSO_3 που οδηγεί τελικά στη μετατροπή των μη μεθυλωμένων καταλοίπων C σε U.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

Αρχικά πραγματοποιείται *τροποποίηση με δισουλφίδιο*. Συγκεκριμένα, 1-2 μg DNA τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml και προστίθεται ddH_2O μέχρι τελικού όγκου 50 μl και 5.5 μl 3 M NaOH (SIGMA). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 15 λεπτά και κατόπιν στους 95°C για 3 λεπτά, οπότε και γίνεται η αποδιάταξη του DNA. Το διάλυμα τοποθετείται στον πάγο για 1 λεπτό και προστίθενται 30 μl 10 mM υδροκινόνης (SIGMA) και 520 μl 3 M NaHSO_3 (SIGMA) (pH 5.0). Στη συνέχεια, γίνεται επώαση στους 55°C για 15-17 ώρες στο σκοτάδι, καθώς η υδροκινόνη είναι φωτοευαίσθητη. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε όξινο pH καθώς το σύμπλοκο κυτοσίνης-θειικής ομάδας είναι σταθερότερο σε αυτές τις συνθήκες. Από τη άλλη, όμως το χαμηλό pH μπορεί να οδηγήσει την οξείδωση του SO_3^- και το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν καταστροφή του DNA. Η υδροκινόνη είναι αλκαλιωτικό αντιοξειδωτικό και σχηματίζει μια p-βενζοκινόνη, δρώντας με αυτόν τον τρόπο ως αναστολέας της ανεπιθύμητης αντίδρασης οξείδωσης του δισουλφιδίου. Επιπλέον, αποτρέπει την θραύση των αλυσίδων του DNA που μπορεί να προκληθεί από την αποπουρίνωση.

Ακολουθεί ο καθαρισμός του τροποποιημένου DNA, που αποτελεί καθοριστικό βήμα της διαδικασίας. Τόσο το άλας του δισουλφιδίου όσο και τα υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση θα πρέπει να απομακρυνθούν, καθώς η παρουσία τους θα μπορούσε να παρεμποδίσει την επιτυχή ολοκλήρωση των παρακάτω βημάτων. Για τον καθαρισμό του τροποποιημένου DNA χρησιμοποιείται το πακέτο προϊόντων Wizard DNA clean-up system (Promega). Σε κάθε δείγμα προστίθενται 900μl διαλύματος καθαρισμού, το δείγμα τοποθετείται σε στήλη με ηθμό και διηθείται υπό κενό. Το DNA, που συγκρατείται στον ηθμό, εκπλένεται με 2 ml 80% (v/v) ισοπροπανόλης (SIGMA). Μετά από την απομάκρυνση της ισοπροπανόλης από τη στήλη, ο ηθμός τοποθετείται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml και φυγοκεντρείται στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν τα υπολείμματα ισοπροπανόλης. Αφού ο ηθμός μεταφερθεί σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο, προστίθενται 50 μl ddH₂O 70°C και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και έκλουση του DNA με φυγοκέντρωση στη μέγιστη ταχύτητα για 20 δευτερόλεπτα.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται η αποσουλφονυλίωση του DNA, οπότε θα πρέπει το DNA να είναι μονόκλωνο. Η αποδιάταξη του DNA πραγματοποιείται με την προσθήκη 5.5 μl 3 M NaOH (SIGMA) και επώαση στους 37°C για 15 λεπτά. Το δείγμα τοποθετείται στον πάγο και προστίθενται 17 μl 10 M CH₃COONH₄ (SIGMA) και 1 μl 20 μg/ml γλυκογόνου (Invitrogen), και 220μl 100% αιθανόλης. Με την προσθήκη του οξικού αμμωνίου το διάλυμα ουδετεροποιείται. Το οξικό αμμώνιο θα μετατρέψει την σουλφονυλιωμένη ουρακίλη, η παρουσία της οποίας παρεμποδίζει την πραγματοποίηση οποιασδήποτε αντίδρασης PCR στη συνέχεια, σε ουρακίλη. Το γλυκογόνο δρα ως μόριο-μεταφορέας και βοηθά στην ανάκτηση ακόμη και μικρών ποσοτήτων τροποποιημένου DNA η κατακρήμνιση του οποίου θα γίνει με τη βοήθεια της αιθανόλης στους -80°C για 4 ώρες τουλάχιστον.

Μετά το πέρας των 4 ωρών ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 15 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, και γίνεται έκπλυση του DNA (ίζημα) με 500 μl 70% αιθανόλης και φυγοκέντρωση στις 13,000 rpm για 15 λεπτά. Αφού αφαιρεθούν όλα τα υπολείμματα αιθανόλης το DNA επαναιωρείται σε 30μl ddH₂O και φυλάσσεται στους -80°C.

2.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι απλή μέθοδος με πολύ μεγάλο αντίκτυπο και πολλές δυνατότητες. Αναπτύχθηκε το 1983 από τον Mullis [365] και από τότε εφαρμόζεται κατά κόρον, καθώς η ικανότητά της να πολλαπλασιάζει επιλεκτικά ένα τμήμα DNA ή RNA κατά εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες έφερε επανάσταση στη μοριακή διάγνωση και ανάλυση γενετικών νοσημάτων. Χρησιμοποιείται για να δημιουργήσει έναν ικανοποιητικό αριθμό αντιγράφων μιας καθορισμένης αλληλουχίας του DNA

Η PCR βασίζεται στον ενζυμικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA, εκατέρωθεν του οποίου βρίσκονται δύο εκκινητές, δηλαδή δύο μικρά ολιγονουκλεοτίδια γνωστής αλληλουχίας που υβριδοποιούνται ειδικά στις συμπληρωματικές αλυσίδες της αλληλουχίας-στόχου. Οι εκκινητές, που το μήκος τους συνήθως φτάνει τα 20-35 νουκλεοτίδια, συντίθενται χημικά.

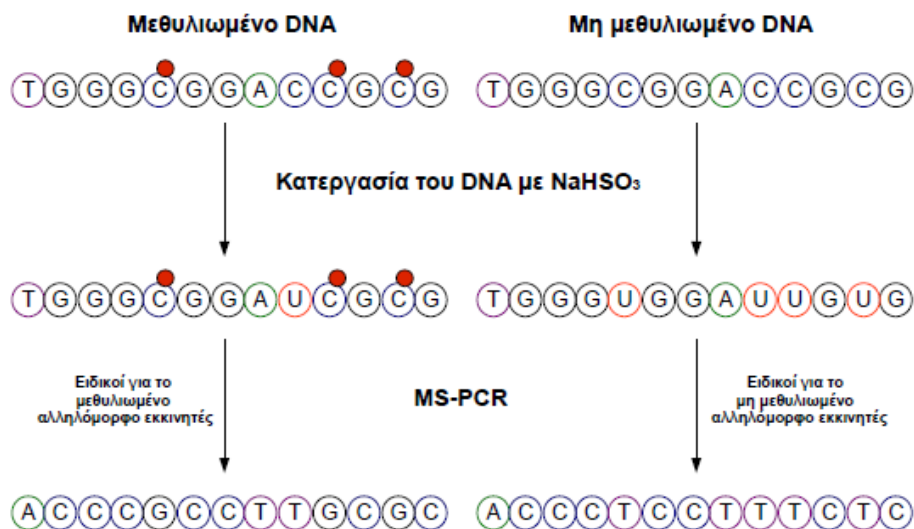
Η διαδικασία της PCR έχει ως εξής:

Αρχικά, οι δύο αλυσίδες του DNA αποδιατάσσονται με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (94-95°C). Έπειτα, επιτρέπεται στους εκκινητές, οι οποίοι βρίσκονται

σε περίσσεια, να βρουν τη συμπληρωματική αλληλουχία-στόχο στο αποδιατεταγμένο DNA και να υβριδοποιηθούν. Η θερμοκρασία υβριδοποίησης (T_{an}) είναι ειδική για το ζεύγος των εκκινητών και εξαρτάται από την αλληλουχία τους. Τέλος, με τη βοήθεια της Taq DNA πολυμεράσης, ενός ενζύμου που εμφανίζει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, πραγματοποιείται η επιμήκυνση των εκκινητών (72°C) χρησιμοποιώντας το γενωμικό DNA ως εκμαγείο. Η Taq πολυμεράση έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*, είναι σταθερή σε υψηλές θερμοκρασίες και πολυμερίζει νουκλεοτίδια με κατεύθυνση 5' προς 3', επιμηκώνοντας τον ήδη προσκολλημένο εκκινητή. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 30-40 κύκλους και τα προϊόντα του προηγούμενου κύκλου αποτελούν υποστρώματα για τον επόμενο κύκλο, επομένως ο αριθμός αντιγράφων της αρχικής αλληλουχίας-στόχου αυξάνεται εκθετικά.

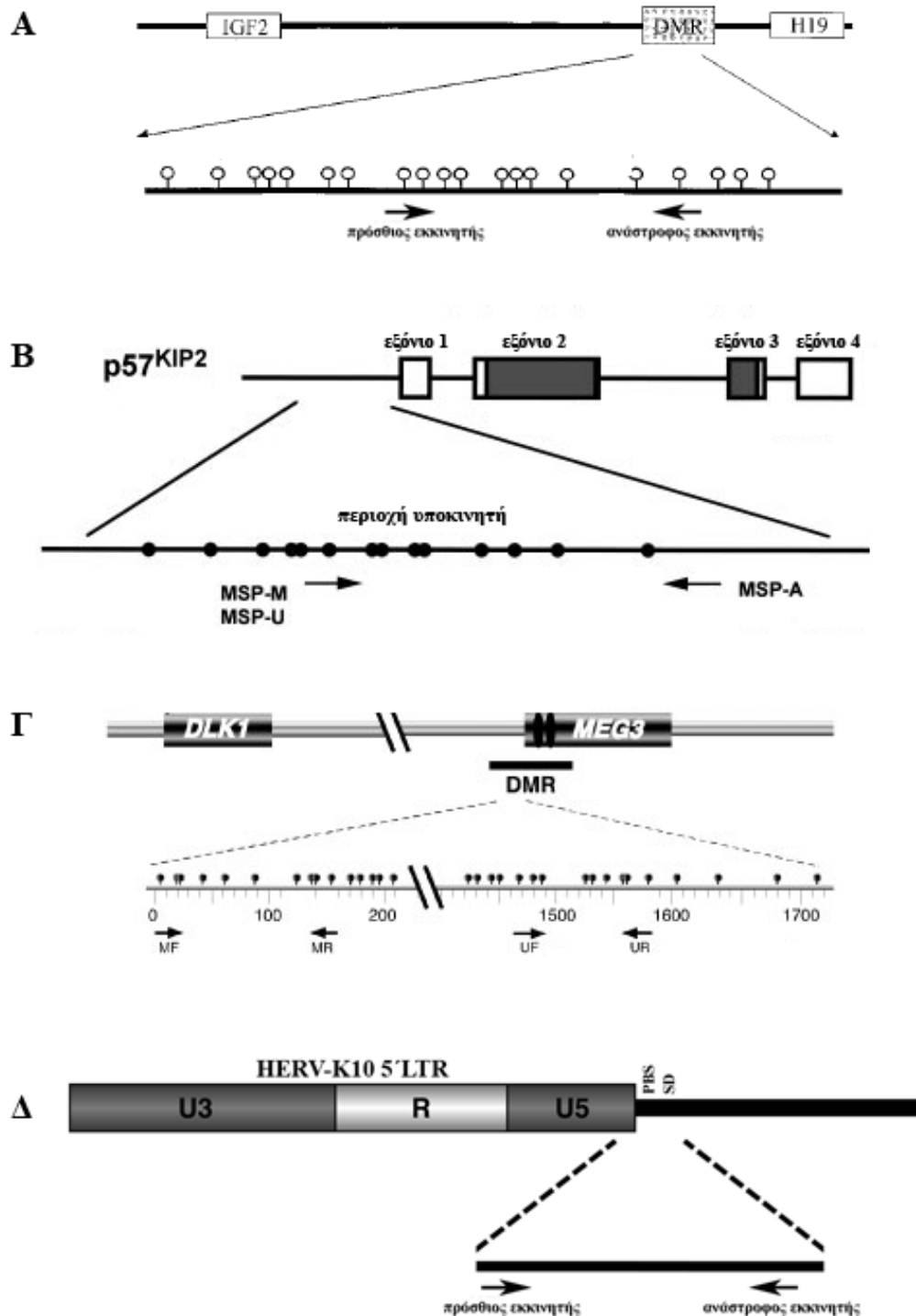
2.3.1. Ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (MS-PCR)

Η ειδική για τη μεθυλίωση αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction, MS-PCR) αποτελεί μια ιδιαίτερη περίπτωση αντίδρασης PCR. Αρχισε να χρησιμοποιείται στα μέσα περίπου της δεκαετίας του '90, μετά από τη διάδοση της τροποποίησης του DNA με NaHSO_3 . Αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο για τη μελέτη της μεθυλίωσης νησίδων CpG και βασίζεται στο σχεδιασμό δύο ζευγών εκκινητών, όπου το ένα αναγνωρίζει το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο και το άλλο το μη μεθυλιωμένο. Συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μετά από κατεργασία με του DNA με NaHSO_3 , οι μη μεθυλιωμένες κυτοσίνες μετατρέπονται σε ουρακίλες, ενώ οι 5-mC παραμένουν ως έχουν. Έτσι, λοιπόν, σχεδιάζονται δύο ζεύγη εκκινητών για την περιοχή που μας ενδιαφέρει με βάση την αλληλουχία που αναμένεται να προκύψει μετά την τροποποίηση, ένα για την περίπτωση που οι κυτοσίνες είναι μεθυλιωμένες και ένα ακόμη για την περίπτωση που δεν υπάρχει μεθυλίωση στο συγκεκριμένη νησίδα CpG. Χρησιμοποιώντας το τροποποιημένο DNA ως εκμαγείο για την αντίδραση MS-PCR κι ένα από τα ζεύγη των εκκινητών κάθε φορά, μπορούμε να καταλήξουμε για την παρουσία μεθυλιωμένου ή/και μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου στο υπό εξέταση γονιδίωμα, ανάλογα με το αν προκύπτει ή όχι προϊόν (Εικ. 22).



Εικ. 22. Σχηματική απεικόνιση χημικής τροποποίησης DNA με NaHSO_3 και MS-PCR. Φαίνονται τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας και τα αποτελέσματα για το μεθυλιωμένο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

Στη συγκεκριμένη εργασία μελετήθηκε η μεθυλίωση περιοχών των χρωμοσωμάτων 11 και 14 που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση, καθώς και η μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων HERV-K10, χρησιμοποιώντας ζεύγη εκκινητών ειδικά για το μεθυλιωμένο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο (Εικ.23).



Εικ. 23. Σχηματική απεικόνιση των σχετικών θέσεων των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τις MS-PCR.

(A) DMR της IGF2/H19, (B) υποκινητής CDKN1C (p57^{KIP2}), (Γ) DMR της περιοχής DLK1/MEG3 και (Δ) νησίδα CpG του HERV-K10.

2.3.1.1. IGF2/H19

Μελετήθηκε η διαφορικά μεθυλιωμένη περιοχή μεταξύ των γονιδίων IGF2 και H19 [366].

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Χημικά τροποποιημένο DNA	5 µl
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1x
50 mM MgCl ₂	2.5 mM
2 mM dNTPs (Invitrogen)	200 µM
10 µM πρόσθιος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 µM
10 µM ανάστροφος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 µM
5 U/µl Taq πολυμεράση (Invitrogen)	1.25 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 50 µl

Πίν. 5. Σύσταση αντίδρασης MS-PCR IGF2/H19.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
IGF2-MF	5'-TTAATTGGGGTTCGTTTCG-3'	118 bp
IGF2-MR	5'-CCCGACCTAAAAATCTAATACGA-3'	
Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
IGF2-UF	5'-GGTTTGTTTGTGGAAATGTTTT-3'	110 bp
IGF2-UR	5'-CCCAACCTAAAAATCTAATACAA-3'	

Πίν. 6. Αλληλουχία εκκινητών MS-PCR IGF2/H19.

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης για το μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο είναι:

Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο
95°C, 8 λεπτά		95°C, 8 λεπτά
95°C, 45 δευτερόλεπτα	x 45	95°C, 45 δευτερόλεπτα
55°C, 20 δευτερόλεπτα		49°C, 20 δευτερόλεπτα
72°C, 20 δευτερόλεπτα		72°C, 20 δευτερόλεπτα
72°C, 10 λεπτά		72°C, 10 λεπτά

2.3.1.2. CDKN1C (p57^{KIP2})

Μελετήθηκε η μεθυλίωση της νησίδας CpG που βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου CDKN1C (p57^{KIP2}) [367].

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Χημικά τροποποιημένο DNA	5 μ l
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
50 mM MgCl ₂	2 mM
2 mM dNTPs (Invitrogen)	200 μ M
10 μ M πρόσθιος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 μ M
10 μ M ανάστροφος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 μ M
5 U/ μ l Taq πολυμεράση (Invitrogen)	1 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 25 μ l

Πίν. 7. Σύσταση αντίδρασης MS-PCR CDKN1C (p57^{KIP2}).

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
MSP-M	5'-CGCGGTCGTTAATTAGTCGC-3'	263 bp
MSP-A	5'-ACACAACGCACTTAACCTATAA-3'	
Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
MSP-U	5'-TTTGT TTTGTGGTTGTTAATTAGTTGT-3'	270 bp
MSP-A	5'-ACACAACGCACTTAACCTATAA-3'	

Πίν. 8. Αλληλουχία των εκκινητών MS-PCR CDKN1C (p57^{KIP2}).

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε έχει ως εξής:

Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο

95°C, 5 λεπτά
 95°C, 30 δευτερόλεπτα
 63°C, 30 δευτερόλεπτα
 72°C, 30 δευτερόλεπτα
 72°C, 7 λεπτά

| x 35

Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο

95°C, 5 λεπτά
 95°C, 30 δευτερόλεπτα
 56°C, 30 δευτερόλεπτα
 72°C, 30 δευτερόλεπτα
 72°C, 7 δευτερόλεπτα

| x 35

2.3.1.3. DLK1/MEG3

Μελετήθηκε η διαφορικά μεθυλιωμένη περιοχή μεταξύ των γονιδίων DLK1 και MEG3 που περιλαμβάνει τμήμα του υποκινητή του MEG3 [368].

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Χημικά τροποποιημένο DNA	5 μ l
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1x
50 mM MgCl ₂ (μεθυλιωμένο / μη μεθυλιωμένο)	3 / 2.4 mM
2 mM dNTPs (Invitrogen)	200 μ M
10 μ M πρόσθιος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 μ M
10 μ M ανάστροφος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 μ M
5 U/ μ l Taq πολυμεράση (Invitrogen)	1.25 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 25 μ l

Πίν. 9. Σύσταση αντίδρασης MS-PCR DLK1/MEG3.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
MEG3-MF	5'-GTTAGTAATCGGGTTTGTTCGGC-3'	160 bp
MEG3-MR	5'-AATCATAACTCCGAACACCCGCG-3'	
Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
MEG3-UF	5'-GAGGATGGTTAGTTATTGGGGT-3'	120 bp
MEG3-UR	5'-CCACCATAACCAACACCCCTATAATCACA-3'	

Πίν. 10. Αλληλουχία εκκινητών MS-PCR DLK1/MEG3.

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης που εφαρμόστηκε έχει ως εξής:

94°C, 3 λεπτά	
94°C, 30 δευτερόλεπτα	x 5
70°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 30 δευτερόλεπτα	
94°C, 30 δευτερόλεπτα	x 5
65°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 30 δευτερόλεπτα	
94°C, 30 δευτερόλεπτα	x 30
60°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 5 λεπτά	

2.3.1.4. *HERV-K10*

Μελετήθηκε η μεθυλίωση της νησίδας CpG του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10. Για το σχεδιασμό των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε το διαδικτυακό λογισμικό Methprimer (www.urogene.org/methprimer/) βάσει της αλληλουχίας M14123. Σε σχέση με τη θέση έναρξης της μεταγραφής, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν είναι συμπληρωματικοί με την αλληλουχία του HERV-K10 στις εξής θέσεις: HERV-K10-UF: 959-983 bp, HERV-K10-MF: 958-983 bp, HERV-K10-UR και HERV-K10-MR: 1036-1060 bp.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Χημικά τροποποιημένο DNA	5 µl
10 x Ρυμιστικό Διάλυμα	1x
50 mM MgCl ₂	2.5 mM
2 mM dNTPs (Invitrogen)	200 µM
10 µM πρόσθιος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 µM
10 µM ανάστροφος εκκινητής (Invitrogen)	0.4 µM
5 U/µl Taq πολυμεράση (Invitrogen)	1.25 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 25µl

Πίν. 11. Σύσταση αντίδρασης MS-PCR HERV-K10.

<i>Εκκινήτης</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
Μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
HERV-K10-MF	5'-TTATTTTTATATTTGGTGTTTAACGT-3'	103 bp
HERV-K10-MR	5'-AATATACTCGAAATCTCTCGTCGAC-3'	
Μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο		
HERV-K10-UF	5'-TATTTTTATATTTGGTGTTTAATGT-3'	102 bp
HERV-K10-UR	5'-AATATACTCAAAATCTCTCATCAAC-3'	

Πίν. 12. Αλληλουχία εκκινήτων MS-PCR HERV-K10.

Το πρόγραμμα κυκλοποίησης που ακολουθήθηκε είναι:

95°C, 5 λεπτά	x 35
95°C, 30 δευτερόλεπτα	
59°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 10 λεπτά	

2.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η ευκολότερη και συνηθέστερη μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης DNA. Πρόκειται για μία μέθοδο που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για το διαχωρισμό αλυσίδων DNA ανάλογα με το μέγεθος, καθώς και για τον καθορισμό του μεγέθους των αλυσίδων που διαχωρίστηκαν, μετά από σύγκριση με αλυσίδες γνωστού μήκους.

Με την εφαρμογή τάσης, τα αρνητικά φορτισμένα τμήματα του DNA αναγκάζονται να μετακινηθούν προς το θετικό πόλο, μέσω του δικτύου που σχηματίζει το πήκτωμα. Τα μικρότερα μόρια κινούνται γρηγορότερα σε σχέση με τα μεγαλύτερα, διανύοντας, έτσι, μεγαλύτερη απόσταση στο ίδιο χρονικό διάστημα. Το πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαχωρισμό τμημάτων DNA από 50 bp μέχρι μερικές μεγαβάσεις.

Οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές μέσω προσθήκης βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) στο πήκτωμα. Το EtBr προσδέεται ισχυρά στο DNA διεισδύοντας μεταξύ των βάσεων και δημιουργώντας σύμπλοκα. Τα σύμπλοκα αυτά, με την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας, φθορίζουν και εμφανίζονται σαν ορατή δέσμη πορτοκαλί χρώματος.

Η ταχύτητα μετακίνησης των μορίων του DNA μέσα από το δίκτυο των μορίων της αγαρόζης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Ένας από αυτούς, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι το μέγεθος του μορίου. Όσο μικρότερο είναι το μόριο τόσο γρηγορότερα κινείται. Ακόμη, σημαντικό ρόλο παίζει η συγκέντρωση της αγαρόζης, καθώς μεγαλύτερη συγκέντρωση σημαίνει και μεγαλύτερη δυσκολία μετακίνησης των μορίων. Από την άλλη, όμως, όσο μικρότερη είναι η συγκέντρωση, τόσο μικρότερη είναι και η διαχωριστική ικανότητα της μεθόδου. Έτσι, για μεγάλα τμήματα DNA, προτιμάται μικρή συγκέντρωση αγαρόζης, ενώ για μικρά και παρόμοιου μεγέθους τμήματα καταλληλότερα είναι πηκτώματα με μεγάλη

συγκέντρωση αγαρόζης. Η διαμόρφωση του DNA, είναι ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την κινητικότητα στο πήκτωμα αγαρόζης. Μόρια ανοιχτού κύκλου, ευθύγραμμο μόρια και υπερελικωμένα κλειστά μόρια παρατηρείται ότι εμφανίζονται κατ' αντίστοιχη σειρά αυξανόμενης κινητικότητας. Επίσης, η παρουσία του EtBr και η αλληλεπίδρασή του με τα μόρια DNA προκαλεί επιβράδυνση της κίνησής τους. Τέλος, η εφαρμοζόμενη τάση, η οποία μπορεί να είναι τόσο υψηλή ώστε να μην επηρεάζει την ανάλυση (~5-8 V/cm), επιδρά στην ταχύτητα μετακίνησης. Μεγαλύτερη τάση συνεπάγεται και μεγαλύτερη ταχύτητα κίνησης των μορίων προς το θετικό πόλο μέσα από το δίκτυο του πηκτώματος. Όσο, όμως, χαμηλότερη τάση πεδίου εφαρμόζεται, τόσο καλύτερος διαχωρισμός επιτυγχάνεται. Οι αρνητικά φορτισμένοι δείκτες, όπως το κυανό της βρωμοφαινόλης, που περιέχονται στο ρυθμιστικό διάλυμα φόρτωσης, υποδεικνύουν τη θέση του DNA.

Για την παρασκευή του πηκτώματος ζυγίζεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης (Invitrogen) και στη συνέχεια διαλύεται σε 100 ml 1xTBE [10.8% (w/v) Tris-HCl (SIGMA), 5.5% (w/v) βορικό οξύ (SIGMA), 20 mM EDTA (SIGMA)]. Αφού το διάλυμα θερμανθεί σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι γίνει διαυγές, το αφήνουμε να κρυώσει λίγο και πριν αυτό στερεοποιηθεί προστίθεται κατάλληλη ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου (SIGMA), ώστε η τελική του συγκέντρωση στο πήκτωμα να είναι 0.5 µg/ml. Στη συνέχεια, αποχύνεται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης στο ένα άκρο της οποίας έχει προσαρμοστεί χτένα δημιουργίας πηγαδιών, αφήνεται να στερεοποιηθεί και κατόπιν προστίθεται διάλυμα 1xTBE, ως διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Πριν την ηλεκτροφόρηση, τα δείγματα αναμειγνύονται με διάλυμα φόρτωσης [0.4% (w/v) μπλε της βρωμοφαινόλης (SIGMA), 0.4% (w/v) κυανό του ξυλενίου (SIGMA), 25% (w/v) φικόλης (SIGMA) σε ddH₂O] σε αναλογία 5 : 1. Ακολούθως τα δείγματα φορτώνονται στα πηγάδια του πηκτώματος αγαρόζης και ηλεκτροφορούνται παράλληλα με δείκτες γνωστών μοριακών βαρών (100 bp ladder, Invitrogen). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί παρατήρηση του πηκτώματος υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογράφιση με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή.

Για τη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε ανάλυση χ^2 τεστ. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

2.5. ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Έγινε ανάλυση της αλληλουχίας DNA των γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση και με τα οποία ασχοληθήκαμε, προκειμένου να ταυτοποιηθεί η ύπαρξη τυχόν επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε το ελεύθερο διαδικτυακό πρόγραμμα RepeatMasker (έκδοση open-3.3.0) (www.repeatmasker.org) για την ανάλυση των αλληλουχιών H19 (NC_000011.9), CDKN1C (p57^{KIP2}) (NG_008022.1) και MEG3 (NG_016853.1), καθώς και της περιοχής μεταξύ των γονιδίων DLK1/MEG3 (NT_026437.12 νουκλεοτίδια 101,201,467-101,292,445).

3. ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΦΘΟΡΙΖΟΥΣΑ *in situ* ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ (FISH) ΣΕ ΜΕΤΑΦΑΣΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Η φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση (Fluorescent *in situ* Hybridization, FISH) είναι

μια μέθοδος μοριακής μυτταρογενετικής που δίνει τη δυνατότητα αναγνώρισης συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA σε χρωμοσώματα αλλά και σε μεσοφασικούς πυρήνες (interphase FISH). Αποτέλεσε τη μεγάλη καινοτομία στον τομέα της κυτταρογενετικής τη δεκαετία του 1990. Στη FISH χρησιμοποιούνται ανιχνευτές που έχουν σημειωθεί με κάποια φθορίζουσα χρωστική για την ανίχνευση μικροανακατατάξεων μεγέθους <4Mb αλλά και για το χαρακτηρισμό ορατών χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Οι περισσότεροι ανιχνευτές FISH που χρησιμοποιούνται αναγνωρίζουν αλληλουχίες που μπορούν να ενταχθούν σε μία από τις εξής κατηγορίες: μοναδική αλληλουχία, επαναλαμβανόμενη αλληλουχία ή ολόκληρο το χρωμόσωμα. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ανιχνευτές ειδικοί για συγκεκριμένες αλληλουχίες ρετρομεταθετών στοιχείων.

3.1.1. Παρασκευή μεταφασικών χρωμοσωμάτων από κύτταρα σε καλλιέργεια

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε τρυβλίο 6 cm ώστε την επόμενη μέρα να έχουν καλύψει το 60-70% της επιφάνειάς του. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα ελέγχονται ως προς την ανάπτυξή τους, αναρροφάται το θρεπτικό υλικό και προστίθενται 4 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού και κολσεμίδιο (GIBCO) σε τελική συγκέντρωση 0.1 μg/ml. Η κυτταρική καλλιέργεια επιστρέφει στον επωαστικό κλίβανο για 3 ώρες, μετά το πέρας των οποίων τα κύτταρα θρυψινοποιούνται και συλλέγονται σε πλαστικό φυγοκεντρικό σωληνάριο των 15 ml. Το κυτταρικό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 1,100 rpm για 5 λεπτά και το ίζημα επαναιωρείται σε 5 ml διαλύματος 75 mM KCl (SIGMA). Ακολουθεί επώαση στους 37°C για 20 λεπτά, έπειτα προστίθεται 1 ml φρέσκου παγωμένου μονιμοποιητικού διαλύματος [μεθανόλη (MERCK) : οξικό οξύ (MERCK) σε αναλογία 3:1] και μετά από ήπια ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1,100 rpm για 5 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και στο ίζημα, αφού αυτό προηγουμένως επαναιωρηθεί στο ελάχιστο εναπομείναν υπερκείμενο, προστίθενται σταγόνα σταγόνα και υπό ανάδευση 5 ml μονιμοποιητικού διαλύματος. Έπειτα το δείγμα φυγοκεντρείται εκ νέου στις 1,100 rpm για 5 λεπτά. Ακολουθεί μία ακόμη έκπλυση του ιζήματος με 5 ml μονιμοποιητικού διαλύματος και το ίζημα τελικά επαναιωρείται σε 3 ml μονιμοποιητικού διαλύματος. Το δείγμα διατηρείται στους -20°C.

3.1.2. Δημιουργία παρασκευασμάτων μεταφασικών χρωμοσωμάτων

Η διαδικασία της επίστρωσης των μεταφασικών κυττάρων σε αντικειμενοφόροι πλάκες αποτελεί μια ευαίσθητη διαδικασία, η οποία πραγματοποιείται υπό ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος και συγκεκριμένα σχετική υγρασία 60-70% και θερμοκρασία 20-25°C. Αρχικά, τα δείγματα φυγοκεντρούνται στις 1,100 rpm για 7 λεπτά. Αφαιρείται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε μικρή ποσότητα μονιμοποιητικού διαλύματος.

Για να διασφαλιστεί η καλή ποιότητα των παρασκευασμάτων οι αντικειμενοφόροι πλάκες θα πρέπει να είναι απόλυτα καθαρές. Για το λόγο αυτό, πριν από τη χρήση τους, εκπλένονται σε μεθανόλη κι αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσουν. Στη συνέχεια, με πλαστική πιπέττα Pasteur προστίθενται στο κέντρο της αντικειμενοφόρου πλάκας 1-2 σταγόνες κυτταρικού εναιωρήματος και μία σταγόνα μονιμοποιητικού διαλύματος. Τέλος, τα παρασκευάσματα αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ελέγχονται σε οπτικό μικροσκόπιο με αντίθεση φάσης ως προς την ποιότητα και την πυκνότητα των μεταφάσεων που περιέχουν.

3.1.3. Παρασκευή σημασμένου DNA

Οι σημασμένοι ανιχνευτές παρασκευάστηκαν με τη χρήση του πακέτου προϊόντων PCR Fluorescein Labeling Mix (Roche), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για το γονίδιο EGFP και το ρετροτρανσποζόνιο HERV-K10, νουκλεοτίδια επισημασμένα με FITC και ως εκμαγείο 1 ng από το πλασμίδιο pEGFP-N1 (Clontech) [369] και προϊόντα PCR HERV-K10 από απομονωμένους βακτηριακούς κλώνους [370], αντίστοιχα, κατασκευάστηκαν μέσω αντίδρασης PCR ειδικοί ανιχνευτές DNA, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για FISH.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
DNA	1 ng
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
50 mM MgCl ₂	1.5 mM
2 mM σημασμένα dNTPs	200 μM
0.5 μg/μl πρόσθιος εκκινητής (Minotech)	0.25 μg
0.5 μg/μl ανάστροφος εκκινητής (Minotech)	0.25 μg
5 U/μl Ταq πολυμεράση (Invitrogen)	1.25 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 100 μl

Πίν. 13. Σύσταση αντίδρασης PCR για την παρασκευή σημασμένων ανιχνευτών.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
EGFP		
GFP968	5'-GCACCATCTTCTTCAAGGACGAC-3'	342 bp
GFP1013	5'-TCTTTGCTCAGGGCGGACTG-3'	
HERV-K10 / SVA		
HERV134U	5'-CCAACCCCGTGCTCTCTGAA-3'	606 / 240 bp
HERV720L	5'-TTGTGGGGAGAGGGTCAGCA-3'	

Πίν. 14. Αλληλουχία εκκινητών για την παρασκευή σημασμένων ανιχνευτών.

Για την παραγωγή σημασμένου DNA ειδικού για HERV-K10/SVA και το γονίδιο EGFP οι συνθήκες κυκλοποίησης ήταν:

<u>HERV-K10/SVA</u>	<u>EGFP</u>
95°C, 5 λεπτά	95°C, 5 λεπτά
95°C, 30 δευτερόλεπτα	95°C, 30 δευτερόλεπτα
59°C, 30 δευτερόλεπτα	61°C, 30 δευτερόλεπτα
72°C, 2 λεπτά	72°C, 2 λεπτά
72°C, 10 λεπτά	72°C, 10 λεπτά
x 35	x 35

3.1.4. DNA FISH

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας είναι η προετοιμασία του παρασκευάσματος των μεταφασικών χρωμοσωμάτων, τα οποία επιστρώνονται σε αντικειμενοφόρο πλάκα όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.2. Δημιουργία παρασκευασμάτων μεταφασικών

χρωμοσωμάτων και η κατάλληλη περιοχή σημειώνεται με διαμάντι από την κάτω πλευρά της αντικειμενοφόρου πλάκας. Για την προετοιμασία των χρωμοσωμάτων γίνεται διαδοχική εμφύσηση των πλακιδίων για 2 λεπτά σε μπανάκια που περιέχουν 2xSSC και σειρά αιθανολών (70%, 85% και 95% αιθανόλη) για αφυδάτωση του δείγματος. Το παρασκεύασμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Για την προετοιμασία των ανιχνευτών, αρχικά, παρασκευάζεται το διάλυμα υβριδοποίησης [8xSSC (SIGMA), 40% (w/v) dextran sulfate (SIGMA), 4 mg/ml salmon sperm DNA (Promega)]. Έπειτα, ο κάθε σημασμένος ανιχνευτής προκύπτει αναμιγνύοντας 1-2 μl σημασμένου και καθαρισμένου DNA, 5 μl διαλύματος υβριδοποίησης και φορμαμίδιου (MERCK) 60% (v/v), σε τελικό όγκο 20 μl.

Ακολουθεί η αποδιάταξη τόσο των χρωμοσωμάτων όσο και του ανιχνευτή. Χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση της ταυτόχρονης αποδιάταξης χρωμοσωμάτων – ανιχνευτή σε θερμαινόμενη πλάκα (hot plate). 20 μl του διαλυμένου ανιχνευτή εφαρμόζονται στην περιοχή του παρασκευάσματος που είχε προσημειωθεί, τοποθετείται καλυπτρίδα (22x22 cm) και το δείγμα σφραγίζεται με βενζινόκολλα. Ακολούθως τοποθετείται σε θερμαινόμενη πλάκα στους 72°C για 2.5 λεπτά. Έπειτα, τα δείγματα υβριδοποιούνται στους 37°C σε σκοτεινό θάλαμο με υγρασία για 15-17 ώρες.

Μετά την υβριδοποίηση ακολουθεί σειρά εκπλύσεων του δείγματος προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του αδέσμευτου ανιχνευτή καθώς και οι αλληλουχίες του ανιχνευτή που προσκολλήθηκαν μη ειδικά. Αρχικά αφαιρείται προσεκτικά η κόλλα και η καλυπτρίδα αφήνεται να απομακρυνθεί με ανακίνηση του παρασκευάσματος μέσα σε διάλυμα 2xSSC. Η έκπλυση ξεκινά με εμφύσηση για 15 λεπτά σε διάλυμα 50% φορμαμίδιο / 1xSSC στους 45°C. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις των 5 λεπτών η καθεμία σε 0.1xSSC στους 60°C και τέλος, τρεις εκπλύσεις των 5 λεπτών η καθεμία σε 1xPBS / 0.2% (v/v) Tween-20 (SIGMA) στους 37°C. Μετά από μια στιγμιαία εμφύσηση σε 1xPBS, το παρασκεύασμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Προκειμένου να είναι ορατά τα χρωμοσώματα γίνεται πρόσθετη χρώση τους με κατάλληλη φθορίζουσα χρωστική, ενώ για την καλύτερη παρατήρηση των παρασκευασμάτων χρησιμοποιείται διάλυμα επικάθησης και παρεμπόδισης αποχρωματισμού [DAPI/antifade (Cytocell) ή PI/antifade (Vysis)]. Τοποθετούνται 20 μl του διαλύματος στην περιοχή όπου έχει γίνει υβριδοποίηση και στο παρασκεύασμα τοποθετείται καλυπτρίδα η οποία σφραγίζεται με μανό. Αφού παραμένει στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, μπορεί να γίνει παρατήρηση του παρασκευάσματος σε μικροσκόπιο φθορισμού.

Τέλος, τα παρασκευάσματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο Microphot FXA (Nikon) με φίλτρα UV και FITC και φωτογραφίζονται με προσαρμοσμένη ψηφιακή φωτογραφική μηχανή JVC, με τη βοήθεια του λογισμικού Isis του συστήματος ανάλυσης Metasystems.

3.2. RNA FISH ΣΕ ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ

Προκειμένου να μελετηθεί η μεταγραφική έκφραση των ρετρομεταθετών στοιχείων HERV-K10 σε GV έγινε RNA-FISH [371], με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών επισημασμένων με FITC που κατασκευάστηκαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 3.1.3. Παρασκευή σημασμένου DNA. Είναι πολύ σημαντικό να έχει

διασφαλιστεί ότι όλα τα διαλύματα και τα σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν είναι ελεύθερα RNAσών.

3.2.1. Μονιμοποίηση ωαρίων

Η περιοχή της αντικειμενοφόρου πλάκας όπου θα τοποθετηθούν τα ωάρια οριοθετείται με τη βοήθεια διαμαντίου (η χαραγμένη επιφάνεια θα πρέπει να είναι από την κάτω πλευρά). Οι αντικειμενοφόροι πλάκες αφήνονται για τουλάχιστον 15 ώρες σε διάλυμα μεθανόλης : 1/100 HCl (SIGMA) σε αναλογία 1 : 1 (για την παρασκευή 1/100 HCl αναμιγνύονται πυκνό HCl και ddH₂O σε αναλογία 1 : 99). Μετά το πέρας των 15 ωρών εκπλένονται διαδοχικά με τρεχούμενο νερό βρύσης, ddH₂O, 100% αιθανόλη και 100% μεθανόλη. Τέλος, αφήνονται εμβαπτισμένες σε 100% μεθανόλη μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Η διαδικασία της προετοιμασίας και μονιμοποίησης των ωαρίων πραγματοποιείται στο στερεοσκόπιο κι έχει ως εξής:

Στην περίπτωση που τα ωάρια έχουν αποθηκευτεί στο υγρό άζωτο σε τριχοειδές σωληνάριο παρουσία γλυκερόλης (Invitrogen) γίνεται η προετοιμασία των ωαρίων. Το βήμα αυτό δεν είναι απαραίτητο αν τα ωάρια λαμβάνονται άμεσα από καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, σε τρυβλίο 6 cm τοποθετούνται σε απόσταση 2 σταγόνες 1xPBS (περίπου 200 μl η καθεμιά). Τα ωάρια απομακρύνονται από το υγρό άζωτο και τα αφήνονται 1-2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου να ξεπαγώσουν. Με αποστειρωμένο ψαλίδι κόβεται η μια άκρη του τριχοειδούς, τοποθετείται ακριβώς πάνω από την πρώτη σταγόνα 1xPBS και με προσοχή κόβεται και η δεύτερη άκρη ώστε τα ωάρια να απελευθερωθούν στο διάλυμα. Με τη βοήθεια μικροπιπέτας απομακρύνεται όλη την ποσότητα του υγρού από το σωληνάριο κι έπειτα αυτό ξεπλένεται με 200 μl 1xPBS (για να διασφαλιστεί ότι έχουν μεταφερθεί στη σταγόνα όλα τα ωάρια).

Ακολουθεί ξέπλυμα των ωαρίων σε 1xPBS ώστε να απομακρυνθεί η γλυκερόλη. Χρησιμοποιώντας ειδική γυάλινη μικροπιπέτα για χειρισμό ωαρίων και εμβρύων (embryo-handling pipette) προσαρμοσμένη σε ειδικό φυσητήρα τα ωάρια μεταφέρονται στη δεύτερη σταγόνα PBS και αφήνονται για 5 λεπτά περίπου.

Η αντικειμενοφόρος πλάκα απομακρύνεται από τη μεθανόλη και την αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, φροντίζοντας πάντα η χαραγμένη επιφάνεια να βρίσκεται από την κάτω πλευρά. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την επιτυχή μονιμοποίηση των ωαρίων που θα ακολουθήσει η επιφάνεια μονιμοποίησης να είναι εξαιρετικά καθαρή.

Η διαδικασία μονιμοποίησης έχει ως εξής [372]:

Τα ωάρια μεταφέρονται προσεκτικά με γυάλινη μικροπιπέτα εμβρυομεταφοράς στη σημειωμένη περιοχή, προσπαθώντας να συμεταφερεί όσο το δυνατό μικρότερη ποσότητα διαλύματος. Το δείγμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά ο χρόνος αναμονής δε θα πρέπει σε καμία περίπτωση να υπερβαίνει τα 2 λεπτά. Ακολουθεί μονιμοποίηση με τη χρήση των διαλυμάτων Fix 1 (μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O σε αναλογία 5 : 1 : 4) για 3 λεπτά, Fix 2 (μεθανόλη : οξικό οξύ σε αναλογία 3 : 1) για 7 λεπτά και Fix 3 (μεθανόλη : οξικό οξύ : ddH₂O σε αναλογία 3 : 3 : 1) για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου. Όλα τα διαλύματα θα πρέπει να είναι φρέσκα και παρασκευάζονται λίγο πριν χρησιμοποιηθούν.

Αναλυτικά, με προσοχή προστίθεται ελάχιστη ποσότητα (2-3 μl) διαλύματος Fix 1

στην περιοχή όπου έχουν τοποθετηθεί τα ωάρια. Αν η αρχική ποσότητα εξατμιστεί πριν περάσουν τα 3 λεπτά που θα πρέπει να παραμείνει το Fix 1 στο πλακάκι, προστίθενται ακόμη 2 μl. Το Fix 1 συμβάλλει στην απομάκρυνση της διάφανης ζώνης. Η παρατεταμένη παραμονή των ωαρίων στο διάλυμα αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διάλυσή τους, ενώ αν έχει απομείνει μεγάλη ποσότητα θρεπτικού πριν την προσθήκη του ή/και μεγάλη ποσότητα του Fix 1 πριν την προσθήκη του Fix 2, τα ωάρια δεν προσκολλώνται στην αντικειμενοφόρο πλάκα και μπορούν εύκολα να χαθούν. Ακολουθεί το Fix 2, όπου αρχικά προστίθενται 3-4 μl, ενώ στη συνέχεια μπορούν να προστεθούν και μεγαλύτερες ποσότητες (10 μl τη φορά) μέχρι να παρέλθουν τα 7 λεπτά. Το Fix 2 εξατμίζεται σχεδόν αμέσως και πρέπει συνεχώς να προστίθεται νέο. Κατά το στάδιο αυτό τα ωάρια προσκολλώνται στην επιφάνεια της αντικειμενοφόρου πλάκας. Τέλος, προστίθεται 2 μl Fix 3 για 1 λεπτό. Στο στάδιο αυτό τα ωάρια γίνονται πιο πεπλατυσμένα. Αν δεν έχει εξατμιστεί όλη η ποσότητα του Fix 3 μετά το 1 λεπτό η αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται σε θερμαινόμενη πλάκα στους 37°C. Τα μονιμοποιημένα ωάρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να διατηρηθούν στους 4°C για 1-2 ημέρες.

3.2.2. RNA FISH

Πριν τη φθορίζουσα υβριδοποίηση πραγματοποιείται ένα ακόμη βήμα μονιμοποίησης που περιλαμβάνει την εμβάπτιση σε 4% φορμαμίδιο / 5% οξικό οξύ για 5 λεπτά. Τα δείγματα εκπλένονται 2 φορές σε 1xPBS κι έπειτα αποθηκεύονται σε 70% αιθανόλη στους -20°C για 15 ώρες τουλάχιστον, ενώ μπορούν να παραμείνουν αποθηκευμένα μέχρι και 2 εβδομάδες. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα προετοιμάζονται για την RNA-FISH. Αρχικά τοποθετούνται σε διάλυμα 0.1 M Tris / 0.15 M NaCl για 10 λεπτά σε θερμοκρασία σωματίου και ακολουθεί επώαση σε 0.01% πενίνη (SIGMA) / 0.01 M HCl στους 37°C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε 3.7% φορμαλδεΰδη (SIGMA) / 1xPBS σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και εκπλένονται 2 φορές σε 1xPBS. Ακολουθεί αφυδάτωση σε σειρά αιθανολών και συγκεκριμένα, 70% αιθανόλη για 2 λεπτά, 90% αιθανόλη για 2 λεπτά και 100% αιθανόλη για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Τέλος, αφού τα παρασκευάσματα στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την υβριδοποίηση.

Οι σημασμένες αλληλουχίες DNA που δημιουργήθηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.3. Παρασκευή σημασμένου DNA χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των ανιχνευτών για το γονίδιο EGFP και το ρετροτρανσποζόνιο HERV-K10. Η τελική συγκέντρωση του σημασμένου DNA για κάθε ανιχνευτή είναι 3.5 ng/μl και διαλύεται σε διάλυμα υβριδοποίησης [50% φορμαμίδιο, 2xSSC, 200 ng/μl salmon sperm DNA, 5x Denhardts (SIGMA), 1 mM EDTA, 50 mM Na₂HPO₄, pH 7.0]. Για το κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 12 μl του ανιχνευτή. Τα 12 μl του κάθε ανιχνευτή που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα τοποθετούνται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και αποδιατάσσονται στους 80°C για 5 λεπτά κι ακολούθως στους 37°C για 30 λεπτά. Οι ανιχνευτές είναι έπειτα έτοιμοι για την υβριδοποίηση.

Ο αποδιατεταγμένος ανιχνευτής τοποθετείται στην περιοχή του παρασκευάσματος που είχε προσημειωθεί, εφαρμόζεται καλυπτρίδα (22x22 cm) και το δείγμα σφραγίζεται με βενζινόκωλλα. Η υβριδοποίηση πραγματοποιείται στους 37°C σε σκοτεινό θάλαμο με υγρασία για 15-17 ώρες. Μετά το πέρας της υβριδοποίησης αφαιρείται η κόλλα και η καλυπτρίδα αφήνεται να απομακρυνθεί με ανακίνηση του παρασκευάσματος μέσα σε διάλυμα 2xSSC. Ακολουθούν τρεις διαδοχικές εκπλύσεις

σε 2xSSC στους 42°C για 10 λεπτά η καθεμία και μία έκπλυση σε διάλυμα TNT [0.1 M Tris, 0.15 M NaCl, 0.05 % (v/v) Tween-20 (SIGMA)] σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Το παρασκεύασμα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Προκειμένου να είναι ορατό το πυρηνικό DNA και για την καλύτερη παρατήρηση των παρασκευασμάτων χρησιμοποιείται DAPI/antifade (Cytocell). Τοποθετούνται 10 μl του διαλύματος στην περιοχή όπου έχει γίνει υβριδοποίηση και καλυπτρίδα 22x22 cm η οποία σφραγίζεται με μανό. Αφού τα δείγματα παραμείνουν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, ακολουθεί παρατήρηση σε μικροσκόπιο φθορισμού Nikon E400 σε ορατό και υπεριώδες φως με τη χρήση των φίλτρων B-2A και UV-2B για το FITC και το DAPI, αντίστοιχα. Η φωτογράφιση έγινε με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής Nikon CoolPix 990.

3.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ ΑΔΕΛΦΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΔΑΣ

Κατά τη διάρκεια της φάσης S του κυτταρικού κύκλου το DNA αντιγράφεται και το κάθε χρωμόσωμα διπλασιάζεται, οπότε αποτελείται πλέον από δύο αδελφές χρωματίδες οι οποίες συνδέονται στο κεντρομερίδιο. Οι αδελφές χρωματίδες είναι διακριτές στο τέλος της πρόφασης και στην αρχή της μετάφασης της μίτωσης, πριν από το διαχωρισμό τους στα θυγατρικά κύτταρα. Η ανταλλαγή αδελφής χρωματίδας (Sister Chromatid Exchange, SCE) είναι η διαδικασία κατά την οποία οι αδελφές χρωματίδες υφίστανται θραύση και στη συνέχεια επανενώνονται η μία με την άλλη, ανταλλάσσοντας τελικά τμήματά τους.

Η πρώτη μέθοδος για την οπτικοποίηση των SCE αναπτύχθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1950, αλλά η διακριτική ικανότητα ήταν τότε πολύ χαμηλή [373]. Πολύ αργότερα ανακαλύφθηκε ότι με τη χρήση του αναλόγου βάσης του DNA 5'-βρωμοδεοξουριδίνη (Bromodeoxyuridine, BrdU) σε συνδυασμό με χρώση με τη φθορίζουσα ουσία Hoechst 33258 μπορεί να γίνει διάκριση των αδελφών χρωματίδων κι επομένως να αποκαλυφθούν γεγονότα SCE [374]. Η BrdU έχει παρόμοια δομή με τη θυμιδίνη, και ενσωματώνεται αποτελεσματικά στις νεοσυντιθέμενες αλυσίδες του DNA κατά το διπλασιασμό. Η κλασική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των SCE βασίζεται σε χρώση των χρωμοσωμάτων με φθορίζουσα χρωστική ουσία και με Giemsa (Fluorescence Plus Giemsa, FPG) μετά από καλλιέργεια των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό που περιέχει BrdU [375]. Επειδή, ως γνωστόν, η αντιγραφή του DNA γίνεται με ημισυντηρητικό τρόπο, όλη η ποσότητα της BrdU ενσωματώνεται στη νέα θυγατρική αλυσίδα της κάθε διπλής έλικας. Μετά από την ολοκλήρωση ενός δευτέρου κυτταρικού κύκλου παρουσία BrdU, οι δύο αδελφές χρωματίδες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ποσότητα BrdU που περιέχουν. Η αδελφή χρωματίδα η οποία φέρει την αρχική αλυσίδα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο, αποτελείται πλέον από μια αλυσίδα φυσιολογικού DNA και μία που περιέχει BrdU. Η άλλη αδελφή χρωματίδα έχει ενσωματωμένο BrdU και στις δύο αλυσίδες. Η BrdU έχει την ιδιότητα να δίνει στο DNA μια ξεθωριασμένη όψη, έτσι, η χρωματίδα που περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα BrdU φαίνεται πιο ανοιχτόχρωμη σε σχέση με αυτή που περιέχει μικρότερη ποσότητα BrdU.

Οι SCE αποτελούν γεγονότα που συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την αντιγραφή του DNA και συγκεκριμένα με τη φυσιολογική αποδιοργάνωση της θηλιάς αντιγραφής, ενώ υπολογίζεται ότι συμβαίνουν 3-4 ανταλλαγές ανά κύτταρο ανά κυτταρικό κύκλο υπό συνθήκες όπου η ενσωμάτωση της BrdU κυμαίνεται σε πολύ

χαμηλά έως και μηδενικά επίπεδα [376]. Η ενσωμάτωση της BrdU αυτή καθ' εαυτή συμβάλλει στο σχηματισμό SCE [377, 378], πιθανότατα αυξάνοντας τα επίπεδα των θραύσεων μονής αλυσίδας (Single Strand Breaks, SSB) [379]. Η BrdU μετατρέπεται σε ουρακίλη, η οποία απομακρύνεται στη συνέχεια από την γλυκοσυλάση της ουρακίλης του DNA, δημιουργώντας SSB, οι οποίες αποτελούν ενδιάμεσες δομές του DNA που επάγουν το σχηματισμό SCE [380].

Αύξηση του αριθμού των SCE αναμένεται να προκύψει ως αποτέλεσμα της απόκρισης του κυττάρου σε οποιονδήποτε σχεδόν γενετοξικό παράγοντα [381-383]. Το πιο απλό μονοπάτι μέσω του οποίου πιστεύεται ότι συμβαίνουν οι SCE είναι με επανασχηματισμό της θηλιά αντιγραφής μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού (Homologous Recombination, HR) όταν η αρχική θηλιά έρχεται αντιμέτωπη με θραύση ή κενό στη μία πατρική αλυσίδα [384].

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη μελέτη γεγονότων SCE βασίζεται σε χρώση των χρωμοσωμάτων με φθορίζουσα χρωστική ουσία και Giemsa (Fluorescence Plus Giemsa, FPG) μετά από ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία BrdU και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.3.1. Καλλιέργεια και παρασκευή μεταφασικών χρωμοσωμάτων

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε τρυβλίο καλλιέργειας των 10 cm και επωάζονται για τρεις κυτταρικές γενεές παρουσία 10 $\mu\text{g/ml}$ BrdU (SIGMA). Ο κυτταρικός διπλασιασμός για τις κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν συμβαίνει κάθε 18-20 ώρες, οπότε για να διασφαλιστεί η παραγωγή τριών κυτταρικών γενεών παρουσία BrdU τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για περίπου 60 ώρες σε σχετικά χαμηλή κυτταρική πυκνότητα προκειμένου να παραμένουν πολλαπλασιαστικά ενεργά. Την ημέρα της συλλογής τα κύτταρα θα πρέπει να καλύπτουν το 60-70% της επιφάνειας του τρυβλίου καλλιέργειας. Με το πέρας των 60 ωρών το θρεπτικό υλικό που περιείχε BrdU αναρροφάται, γίνεται έκπλυση με 1xPBS και προστίθεται φρέσκο θρεπτικό που περιέχει κολσεμίδιο. Στη συνέχεια ακολουθείται η διαδικασία συγκομιδής όπως αυτή έχει περιγραφεί στην ενότητα 3.1.1. Παρασκευή μεταφασικών χρωμοσωμάτων από κύτταρα σε καλλιέργεια.

3.3.2 Προετοιμασία και χρώση παρασκευασμάτων για οπτικοποίηση των SCE

Τα παρασκευάσματα προετοιμάζονται όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.1.2. Δημιουργία παρασκευασμάτων μεταφασικών χρωμοσωμάτων. Στη συνέχεια, ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία για τη χρώση των παρασκευασμάτων και την οπτικοποίηση των SCE. Αρχικά, γίνεται χρώση των δειγμάτων με 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 (SIGMA) / 1xPBS για 15 λεπτά στο σκοτάδι. Το διάλυμα της Hoechst είναι αποθηκευμένο στους 4°C σε φιάλη σκούρου χρώματος σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$. Το διάλυμα εργασίας επιθυμητής συγκέντρωσης παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση του και χρησιμοποιείται μόνο μία φορά. Στη συνέχεια τα παρασκευάσματα εκπλένονται σε δοχείο που περιέχει διάλυμα Sorensen [5/12 M KH_2PO_4 (SIGMA) : 5/12 M NaH_2PO_4 (SIGMA) σε αναλογία 1 : 1] με γρήγορες και έντονες κινήσεις. Πριν προλάβουν να στεγνώσουν τα παρασκευάσματα, προσθέτουμε 1-2 σταγόνες διαλύματος Sorensen, καλύπτουμε με καλυπτρίδα και σφραγίζουμε με μια λεπτή στρώση μανό. Τα δείγματα παραμένουν εκτεθειμένα σε φως για 24 τουλάχιστον ώρες. Στη συνέχεια, αφού αφαιρεθεί το στρώμα μανό με βαμβάκι εμποτισμένο με ακετόνη, απομακρύνεται η καλυπτρίδα και τα παρασκευάσματα αφήνονται να στεγνώσουν καλά. Έπειτα, τα παρασκευάσματα εκπλένονται σε 2xSSC στους 60-

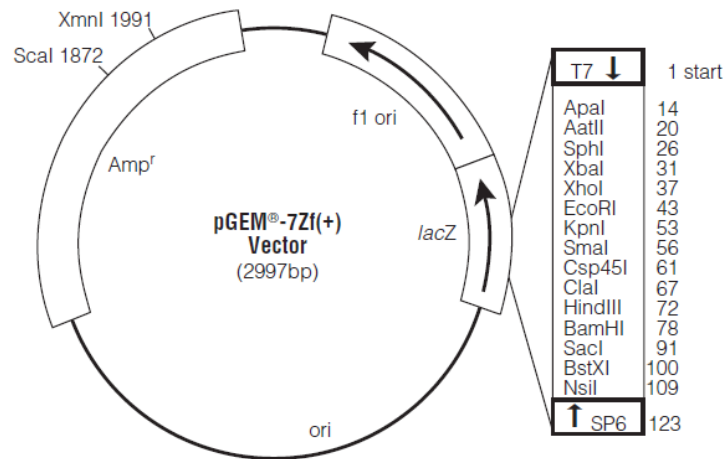
65°C για 15 λεπτά κι έπειτα με απεσταγμένο νερό. Ακολουθεί χρώση σε 5% Giemsa (MERCK) σε νερό βρύσης και διαδοχικές εκπλύσεις σε Sorensen και απεσταγμένο νερό. Αφού στεγνώσουν καλά, τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε ξυλόλη (SIGMA) και πριν αυτή στεγνώσει σφραγίζονται με 1-2 σταγόνες DPX (BDH) και καλυπτρίδα σε θερμαινόμενη πλάκα στους 75°C για 1.5 ώρα περίπου. Η παρατήρησή τους και η καταμέτρηση των SCE γίνεται την επόμενη ημέρα σε οπτικό μικροσκόπιο Microphot-FXA (Nikon) χρησιμοποιώντας καταδυτικό φακό 100 x.

4. ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΟΥ ΠΛΑΣΜΙΔΙΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

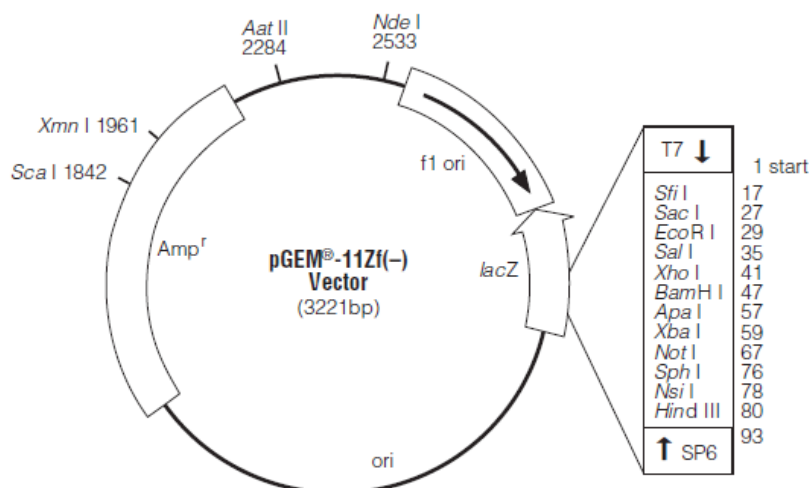
4.1. ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ

Οι πλασμιδιακοί φορείς που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση αλληλουχιών του υπό μελέτη ρετρομεταθετού στοιχείου είναι οι εξής:

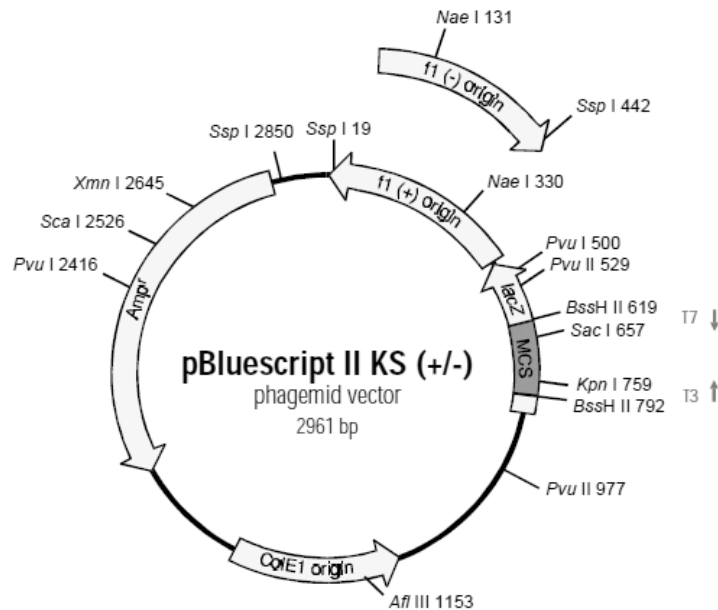
α) pGEM-7Zf(+) (Promega)



β) pGEM-11Zf(-) (Promega)



γ) pBluescriptII KS (Stratagene)



Οι συγκεκριμένοι φορείς περιέχουν:

α) Περιοχή πολυκλωνοποίησης (Multiple Cloning Region, MCR), εκατέρωθεν της οποίας βρίσκονται υποκινητές των φάγων T7 και SP6 [pGEM-7Zf(+) και pGEM-11Zf(-)] και T3 και T7 (pBluescriptII KS), μέσω των οποίων είναι δυνατή η *in vitro* μεταγραφή του κλωνοποιημένου γονιδίου.

β) Θέση έναρξης της αντιγραφής του ινώδους φάγου f1 (f1 origin), η οποία επιτρέπει την *in vivo* παραγωγή μονόκλωνων ανασυνδυασμένων φαγιδίων, όταν το κύτταρο-ξενιστής που φέρει το φορέα συμμολυνθεί με ένα ινώδη βοηθό φάγο.

γ) Θέση έναρξης της αντιγραφής (Origin of Replication, ori), ColE1 που χρησιμοποιείται απουσία του βοηθού φάγου.

δ) Τμήμα του γονιδίου lacZ, που επιτρέπει τη δοκιμή α-συμπληρωματικότητας για την επιλογή των βακτηριακών κλώνων που φέρουν τους ανασυνδυασμένους φορείς βάσει του λευκού ή μπλε χρώματός τους.

ε) Γονίδιο ανθεκτικότητας έναντι του αντιβιοτικού αμπικιλίνη.

4.2. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΜΟΡΙΩΝ DNA

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης κατασκευάστηκαν ανασυνδυασμένοι ρετροϊοί HERV-K10 σημασμένοι με την ειδική κασέτα EGFP για ανίχνευση της ρετρομετάθεσης. Τα βήματα που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης έχουν ως εξής:

α) Πέψεις με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Αρχικά, το προς ένθεση τμήμα DNA, καθώς επίσης και ο πλασμιδιακός φορέας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί, υφίστανται πέψη με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα για τη δημιουργία συμβατών άκρων.

β) Έλεγχος παρασκευής μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA

Στην περίπτωση ελέγχου παρασκευής μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, ακολουθείται η ίδια διαδικασία, αλλά αυτή τη φορά η αντίδραση περιορισμού πραγματοποιείται σε μικρότερο όγκο.

γ) Ανάκτηση επιθυμητού τμήματος DNA

Ακολουθεί η ανάκτηση του τμήματος DNA από το πήκτωμα αγαρόζης ή ο καθαρισμός του προϊόντος της ενζυμικής αντίδρασης, χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα πακέτα προϊόντων.

δ) Δημιουργία ισοτελικών άκρων

Όταν οι πειραματικές ανάγκες το απαιτούν, τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα μετατρέπονται από προεξέχοντα σε ισοτελικά, με τη βοήθεια του ενζυμικού θραύσματος Klenow.

ε) Αποφωσφορυλίωση άκρων πλασμιδιακού φορέα

Αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα απαιτείται αν αυτά είναι συμπληρωματικά μεταξύ τους, προκειμένου να αποτραπεί η επανασύνδεσή τους κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύνδεσης.

στ) Αντίδραση σύνδεσης των τμημάτων DNA

Η αντίδραση πραγματοποιείται με τη βοήθεια του ενζύμου λιγάση και οδηγεί στο σχηματισμό νέου πλασμιδίου στο οποίο έχει εντεθεί μια επιθυμητή αλληλουχία DNA.

ζ) Μετασχηματισμός επιλεκτικών βακτηρίων

Τα προϊόντα της αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιούνται για τον μετασχηματισμό επιλεκτικών βακτηρίων. Η επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων, οι οποίοι φέρουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο, πραγματοποιείται σε τρυβλία στερεού θρεπτικού υλικού που περιέχει το ανάλογο αντιβιοτικό.

η) Απομόνωση βακτηριακών κλώνων και παρασκευή DNA

Οι μετασχηματισμένοι βακτηριακοί κλώνοι απομονώνονται και καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό υλικό που περιέχει το ανάλογο αντιβιοτικό. Μετά από την παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα, οι κλώνοι ελέγχονται με τα κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα για την ορθότητα της κατασκευής και, τέλος, παρασκευάζεται πλασμιδιακό DNA των ανασυνδυασμένων κατασκευών σε μεγάλη κλίμακα.

4.3. ΥΛΙΚΑ ΕΝΖΥΜΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA (κλωνοποίηση) πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια μιας σειράς ενζύμων, όπως περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αλκαλική φωσφατάση, ενζυμικό θραύσμα Klenow και λιγάση των εταιρειών New England Biolabs, Takara, Fermentas, Minotech και Promega.

4.3.1. Πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Μία τυπική περιοριστική αντίδραση περιλαμβάνει πλασμιδιακό DNA, ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης του ενζύμου, αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, BSA) όποτε απαιτείται και περιοριστικό ένζυμο.

Αντιδραστήριο	Τελική συγκέντρωση
Πλασμιδιακό DNA	1 μg
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
100 x BSA	1 x
Περιοριστική ενδονουκλεάση	10 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 50 μl

Πίν. 15. Σύσταση τυπικής αντίδρασης περιοριστικής πέψης πλασμιδιακού DNA.

Για τον έλεγχο παρασκευής μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA με την κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση, η αντίδραση περιορισμού πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 20 µl, χρησιμοποιώντας 4 µl του DNA που απομονώθηκε.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Πλασμιδιακό DNA	4 µl
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
100 x BSA	1 x
Περιοριστική ενδονουκλεάση	10 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 20 µl

Πίν. 16. Σύσταση τυπικής αντίδρασης περιοριστικού ελέγχου μικρής κλίμακας πλασμιδιακού DNA.

Το μείγμα των αντιδράσεων επωάζεται σε υδατόλουτρο στους 37°C για 15-17 ώρες. Τα προϊόντα της πέψης ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0.9 % (w/v).

4.3.2. Δημιουργία ισοτελικών άκρων

Τα άκρα του πλασμιδιακού φορέα μπορούν να μετατραπούν από προεξέχοντα σε ισοτελικά, με τη βοήθεια του ενζυμικού θραύσματος Klenow, το οποίο έχει δραστηριότητα εξωνουκλεάσης 3' προς 5'.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Πλασμιδιακό DNA μετά από πέψη	1 µg
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
2 mM dNTPs	120 µM
Πολυμεράση Klenow	1 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 50 µl

Πίν. 17. Σύσταση αντίδρασης Klenow (Minotech).

Η αντίδραση επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και διακόπτεται με την προσθήκη όγκου ίσου με αυτόν της αντίδρασης (50 µl) ddH₂O. Ακολουθεί καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.4.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA.

4.3.3. Αποφωσφορυλίωση των άκρων του πλασμιδιακού φορέα

Για να διασφαλιστεί ότι δε θα συμβεί επανένωση των συμπληρωματικών άκρων πλασμιδιακού φορέα με συμπληρωματικά άκρα κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σύνδεσης, πραγματοποιείται αποφωσφορυλίωση των άκρων του φορέα. Η απομάκρυνση των 5' φωσφορικών ομάδων γίνεται με τη βοήθεια του ενζύμου αλκαλική φωσφατάση.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
Πλασμιδιακό DNA μετά από πέψη	1 µg
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
Αλκαλική φωσφατάση	1 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 50 µl

Πίν. 18. Τυπική σύσταση αντίδρασης αποφωσφορυλίωσης.

Το μείγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 37°C για 30 λεπτά. Ακολουθεί απενεργοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης με προσθήκη ddH₂O ίσου όγκου με αυτόν της αντίδρασης (50 μl) και επώαση στους 65°C για 15 λεπτά. Τέλος πραγματοποιείται καθαρισμός του προϊόντος της αντίδρασης όπως περιγράφεται στην ενότητα 4.4.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA.

4.3.4. Αντίδραση σύνδεσης

Η αντίδραση χρησιμοποιείται για τη σύνδεση φορέα κλωνοποίησης-ενθέματος. Η ποσότητα του φορέα που χρησιμοποιείται συνήθως είναι 50 ng, ενώ η ποσότητα του ενθέματος εξαρτάται από το μέγεθος του φορέα, το μέγεθος του ενθέματος και την επιθυμητή στοιχειομετρία της αντίδρασης. Για μοριακή αναλογία φορέα : ενθέματος 1 : 1, η ποσότητα του ενθέματος που θα χρησιμοποιηθεί υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\text{Ποσότητα ενθέματος} = [(\text{Μέγεθος ενθέματος}) * (\text{Ποσότητα φορέα})] / (\text{Μέγεθος φορέα})$$

Η αναλογία φορέα : ενθέματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 1 : 4 έως 1 : 6. Η επώαση των αντιδράσεων έγινε σε υδατόλουτρο στους 15°C για 15-17 ώρες.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
DNA φορέα	50 ng
DNA ενθέματος	X ng
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
10 mM ATP	1 mM
Λιγάση	5 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 20 μl

Πίν. 19. Σύσταση τυπικής αντίδρασης σύνδεσης.

4.4. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΤΗΣΗ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

4.4.1. Ηλεκτροφόρηση DNA

Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης για την ταυτοποίηση και την περαιτέρω ανάλυση πλασμιδιακού και χρωμοσωμικού DNA. Χρησιμοποιήθηκαν πήκτωμα συγκέντρωσης 0.9-1.6% (w/v), ανάλογα με το μέγεθος των αναλυόμενων τμημάτων DNA.

Ως μάρτυρες γνωστών μοριακών μεγεθών χρησιμοποιήθηκαν οι δείκτες λ/HindIII (Minotech), λ/EcoRI (Minotech) και pBR322/HinfI (Minotech). Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται υπό σταθερή τάση 50 V σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί παρατήρηση σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV transilluminator, Ultra Violet Products Inc) και φωτογράφισή της με ψηφιακή μηχανή KODAK EDAS 290.

4.4.2. Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Με τη διαδικασία αυτή είναι δυνατή η ανάκτηση μορίων DNA μεγέθους από 70 bp έως 4 Kb από πήκτωμα αγαρόζης και ακολούθως ο καθαρισμός τους, με τη χρήση ειδικής στήλης. Η ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του πακέτου προϊόντων MinElute Gel Extraction kit (Qiagen), σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή, και αναλυτικά έχει ως εξής:

Αρχικά, παρασκευάζεται πήκτωμα αγαρόζης κατάλληλης συγκέντρωσης και

πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση του επιθυμητού δείγματος DNA. Μετά την ολοκλήρωσή της, η ζώνη που αντιστοιχεί στο τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει αφαιρείται από το πήκτωμα σε συσκευή υπερϊώδους ακτινοβολίας με χαμηλά ένταση (ένδειξη preparative) προκειμένου να αποφευχθεί ο κατακερματισμός του DNA. Το τμήμα που έχει αποκοπεί τοποθετείται σε προζυγισμένο φυγοκεντρικό σωλήνα και ζυγίζεται εκ νέου, προκειμένου να προσδιοριστεί ο όγκος του πηκτώματος βάσει της σχέσης 100 mg = 100 μ l. Σε 1 όγκο πηκτώματος προστίθενται 3 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος QC και η επαναδιαλυτοποίηση του πηκτώματος επιτυγχάνεται με επώαση στους 50°C για 10 λεπτά και έντονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα (2-3 λεπτά) κατά τη διάρκεια της επώασης. Στη συνέχεια προστίθεται 1 όγκος ισοπροπανόλης, το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε στήλη MinElute. Το DNA δεσμεύεται στη μεμβράνη πυριτικού οξέος μετά από φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό. Έπειτα προστίθενται 500 μ l διαλύματος QC και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Η στήλη εκπλένεται με 750 μ l ρυθμιστικού διαλύματος PE με φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό και τα υπολείμματα του διαλύματος έκπλυσης που πιθανώς έχουν μείνει στη στήλη απομακρύνονται με μία ακόμη φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τέλος, προστίθενται 20 μ l διαλύματος 0.5xTE και η στήλη αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό προκειμένου το DNA να διαλυτοποιηθεί στο ρυθμιστικό διάλυμα. Η έκλυση επιτυγχάνεται με φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό.

Η ποσοτικοποίηση του απομονωμένου DNA πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης παράλληλα με δείγματα DNA γνωστών συγκεντρώσεων και κατόπιν σύγκρισης της φωτεινότητας των αντίστοιχων ζωνών.

4.4.3. Καθαρισμός τμημάτων DNA

Ο καθαρισμός τμημάτων DNA από διαλύματα μετά από ενζυμική αντίδραση (πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, αποφωσφορυλίωση ή μεταχείριση Klenow) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του πακέτου προϊόντων QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρεία, και έχει ως εξής:

Σε 1 όγκο της ενζυμικής αντίδρασης προστίθενται 5 όγκοι ρυθμιστικού διαλύματος PB και το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται σε στήλη φυγοκέντρησης QIAquick. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 rpm για 1 λεπτό προκειμένου να προσδεθεί το DNA στη στήλη. Η έκπλυση πραγματοποιείται με 750 μ l ρυθμιστικού διαλύματος PE και φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες. Τα υπολείμματα του PE απομακρύνονται με μία επιπλέον φυγοκέντρηση. Το DNA εκλύεται με την προσθήκη 20 μ l 0.5xTE στη στήλη και, μετά την πάροδο 1 λεπτού, πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις προαναφερθείσες συνθήκες και συλλογή του DNA σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο.

5. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

5.1. ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν ως ξενιστές, είναι τροποποιημένα βακτηριακά στελέχη που έχουν την ικανότητα να παράγουν μεγάλες ποσότητες πλασμιδιακού DNA μετά από μετασχηματισμό και περαιτέρω καλλιέργεια. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν βακτηριακά στελέχη MC1061, DH5 α , JM109 και Top10. Για τις τελικές πλασμιδιακές κατασκευές χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά

στελέχη XL1-blue (Stratagene), One Shot® Mach1™-T1^R (Invitrogen) και SURE® 2 (Stratagene), λόγω της ικανότητάς τους να προσλαμβάνουν πλασμίδια μεγάλου μεγέθους.

5.2. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Η καλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών έγινε τόσο σε υγρή όσο και σε στερεά μορφή σε πλήρες θρεπτικό υλικό Luria Bertani (LB) [1% (w/v) θρυπτόνη, 0.5% (w/v) εκχύλισμα ζύμης, 1% (w/v) NaCl]. Το θρεπτικό υλικό LB, μετά την παρασκευή του, αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (AES-75, RAYPA) στους 121°C για 30 λεπτά και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση του.

Στα θρεπτικά υλικά ανάπτυξης ως δείκτης επιλογής των μετασχηματισμένων βακτηριακών κλώνων χρησιμοποιήθηκε αμπικιλίνη (SIGMA) σε τελική συγκέντρωση 100 µg/ml. Το υδατικό διάλυμα του αντιβιοτικού αποστειρώνεται με διήθηση μέσω φίλτρου με πόρους διαμέτρου 0.22 µm (Corning®) και φυλάσσεται στους -20°C. Η προσθήκη του αντιβιοτικού στο θρεπτικό υλικό γίνεται μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης και αφού το θρεπτικό ψυχθεί σε θερμοκρασία 50°C.

Η ανάπτυξη των υγρών καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκε σε ειδικό κλίβανο τροχιακής περιστροφής (Model G25, New Brunswick Scientific Co Inc), στους 37°C και υπό ανάδευση (200 rpm), προκειμένου να εξασφαλίζεται ο αερισμός των βακτηρίων. Οι στερεές καλλιιεργειες πραγματοποιούνται σε τρυβλία Petri, που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό LB στο οποίο έχει προστεθεί άγαρ σε τελική συγκέντρωση 1.5% (w/v). Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται στους 37°C και επώαση διάρκειας τουλάχιστον 12 ωρών τοποθετώντας τα τρυβλία σε επωαστικό κλίβανο (Memmert).

Τέλος, η μακροχρόνια αποθήκευση των βακτηριακών στελεχών γίνεται σε σωληνάρια ψύξης (cryovial, CML) με την προσθήκη 0.8 ml υγρής βακτηριακής καλλιιεργειας και 0.2 ml αποστειρωμένης γλυκερόλης υπό ασηπτικές συνθήκες. Το μείγμα αναδεύεται και φυλάσσεται στους -70°C.

5.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΔΕΚΤΙΚΩΝ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ

Για να επιτευχθεί η εισαγωγή εξωγενούς DNA σε βακτηριακά κύτταρα θα πρέπει προηγουμένως να διανοιχτούν πόροι στην κυτταρική τους μεμβράνη, μέσω των οποίων θα διέλθουν τα μόρια του DNA. Για την παρασκευή βακτηρίων δεκτικών μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε η πειραματική προσέγγιση της κατεργασία με διάλυμα χλωριούχου ασβεστίου.

Συγκεκριμένα, 100 µl βακτηριακών κυττάρων που ήταν αποθηκευμένα στους -70°C προστίθενται σε 10 ml θρεπτικού υλικού LB, υπό ασηπτικές συνθήκες και καλλιιεργούνται για 2 ώρες σε τροχιακό επωαστικό κλίβανο στους 37°C υπό ανάδευση 200 rpm, μέχρι η καλλιιεργεια να φτάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης ($OD_{590nm} = 0.4$). Στη συνέχεια, η βακτηριακή καλλιιεργεια επωάζεται για 10 λεπτά στον πάγο και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (Hettich, UNIVERSAL II) στις 4,000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml παγωμένου διαλύματος $CaCl_2$ [60mM $CaCl_2$ (SIGMA), 15% (v/v) γλυκερόλη, 10mM PIPES, pH 7.0], το οποίο έχει αποστειρωθεί με διήθηση μέσω φίλτρου. Σε αυτή τη φάση στόχος μας είναι να απομακρυνθεί

πλήρως το θρεπτικό υλικό της καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 3,500 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται, το ίζημα επαναιωρείται σε 2 ml παγωμένου διαλύματος CaCl_2 και επώάζεται για 30 λεπτά στον πάγο, κατά τη διάρκεια των οποίων γίνεται η διάνοιξη των πόρων στις μεμβράνες των βακτηριακών κυττάρων. Ακολούθως, το βακτηριακό εναιώρημα φυγοκεντρείται στις 3,500 rpm για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Το ίζημα, το οποίο περιέχει βακτηριακά κύτταρα δεκτικά μετασχηματισμού, επαναιωρείται σε 1 ml παγωμένου διαλύματος CaCl_2 και αναδεύεται ήπια. Το εναιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 100 μl που αποθηκεύονται στους -70°C .

5.4. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Ως βακτηριακός μετασχηματισμός ορίζεται η διαδικασία εισαγωγής εξωγενούς DNA σε βακτήρια ξενιστές. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα μόρια του πλασμιδιακού DNA εισέρχονται μέσω των πόρων που δημιουργήθηκαν στα τοιχώματα της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Η μεταφορά επιτυγχάνεται λόγω παθητικής διάχυσης, η οποία διευκολύνεται από θερμικό σοκ. Όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες.

Η πειραματική διαδικασία έχει ως εξής:

100 μl εναιωρήματος βακτηριακών κυττάρων δεκτικών μετασχηματισμού ανασύρονται από την βαθιά κατάψυξη (-70°C) και τοποθετούνται σε πάγο προκειμένου να αποψυχθούν σταδιακά. Στη συνέχεια, μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml, αναμειγνύονται με 50-100 ng πλασμιδιακού DNA, το οποίο προέρχεται είτε από ακέραιους πλασμιδιακούς φορείς ή αποτελεί προϊόν κλωνοποίησης. Η μεταφορά του DNA στα βακτηριακά κύτταρα γίνεται σε δύο στάδια. Αρχικά, το μείγμα επιδεκτικών κυττάρων-πλασμιδιακού DNA επώάζεται σε πάγο για 30 λεπτά. Ακολούθως, τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 42°C για 2 λεπτά, οπότε και πραγματοποιείται θερμικό σοκ, το οποίο ευνοεί θερμοδυναμικά τη μεταφορά μορίων DNA στο εσωτερικό των βακτηρίων. Στη συνέχεια, προστίθεται στο μείγμα 1 ml θρεπτικού υλικού LB και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C για 60 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης, αφενός επιτυγχάνεται η επούλωση των πόρων στα τοιχώματα της κυτταρικής μεμβράνης και, αφετέρου, τα βακτήρια αναπτύσσονται. Δεδομένου ότι ο χρόνος αναδιπλασιασμού των στελεχών *Escherichia Coli* είναι περίπου 20 λεπτά πραγματοποιούνται 3 κυτταρικοί πολλαπλασιασμοί. Στη συνέχεια, 50, 100 και 200 μl βακτηριακού εναιωρήματος επιστρώνονται με τη βοήθεια κεκλιμένης πιπέτας Pasteur σε τρυβλία στερεού θρεπτικού υλικού που περιέχουν αμπικιλίνη, προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών στην επιθυμητή πυκνότητα. Τα τρυβλία αφήνονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου για να απορροφήσουν τα βακτήρια και επώάζονται ανεστραμμένα σε κλίβανο 37°C για 15-17 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης παρατηρείται η ανάπτυξη αποικιών βακτηριακών κλώνων που προέρχονται από μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα, καθώς μόνο αυτά φέρουν το πλασμίδιο που περιέχει το γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη.

5.5. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΙΚΡΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Προκειμένου να ελεγχθεί το πλασμιδιακό DNA μετασχηματισμένων βακτηριακών

κλώνων που απομονώθηκαν μετά από την επιλογή, έγινε παρασκευή πλασμιδιακού DNA σε μικρή κλίμακα. Η απόδοση της συγκεκριμένης μεθόδου είναι 0.5-1.5 μg πλασμιδιακού DNA ανά ml βακτηριακής καλλιέργειας.

Η πειραματική διαδικασία περιγράφεται παρακάτω:

10-20 μονήρεις αποικίες μεταφέρονται από το τρυβλίο καλλιέργειας σε αντίστοιχους πλαστικούς σωλήνες βακτηριακής καλλιέργειας των 10 ml (Vive), οι οποίοι περιέχουν 3 ml θρεπτικού υλικού LB/αμπικιλίνη υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα βακτήρια επωάζονται σε κλίβανο τροχιακής περιστροφής στους 37°C υπό ανάδευση 200 rpm για 15-17 ώρες. Μετά το πέρας της επώασης, 1 ml από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml, φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο (Centrifuge 5415D, Eppendorf) στις 13,000xg για 10 λεπτά και το υπερκείμενο απομακρύνεται πλήρως. Το ίζημα επαναιωρείται σε 70 μl διαλύματος STET [8% (w/v) σουκρόζη (SIGMA), 5% (v/v) Triton X-100 (SIGMA), 50mM EDTA pH 8.0, 50mM Tris-Hcl pH 8.0]. Προστίθενται 25 μl διαλύματος λυσοζύμης (SIGMA) 10mg/ml και ακολουθεί επώαση για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται λύση των βακτηριακών τοιχωμάτων και μεμβρανών. Στη συνέχεια, η λυσοζύμη απενεργοποιείται στους 100°C για 45 δευτερόλεπτα και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000xg για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο, προστίθενται 100 μl ισοπροπανόλης και το DNA κατακρημνίζεται στους -70°C για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000xg για 10 λεπτά, το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, το ίζημα επαναιωρείται σε 20 μl διαλύματος 1xTE pH 7.5 [10mM Tris, 1mM EDTA].

5.6. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΜΕΓΑΛΗΣ ΚΛΙΜΑΚΑΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Για την απομόνωση πλασμιδιακού DNA σε μεγάλη κλίμακα χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προϊόντων QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με τη μέθοδο αυτή απομονώνονται 300-500 μg πλασμιδιακού DNA υψηλής καθαρότητας, το οποίο ελέγχεται στη συνέχεια με πέννη με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Αποθηκευμένα βακτηριακά κύτταρα ανασύρονται από τους -70°C και 50 μl εμβολιάζονται σε 3 ml θρεπτικού υλικού LB/αμπικιλίνη. Αφού αναπτυχθούν για 15-17 ώρες σε κλίβανο τροχιακής περιστροφής στους 37°C υπό ανάδευση 200 rpm, 2 ml της βακτηριακής καλλιέργειας που προκύπτει εμβολιάζονται σε 500 ml LB/αμπικιλίνη, και επωάζονται εκ νέου στις ίδιες συνθήκες. Την επόμενη ημέρα, η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 250 ml (Beckman) και φυγοκεντρείται σε φυγόκεντρο Avanti™ J-25 (BECKMAN COULTER™) με τη χρήση της κεφαλής κεφαλή JA-14 (Beckman) στις 6,000xg για 15 λεπτά στους 4°C. Το βακτηριακό ίζημα επαναιωρείται σε 10 ml διαλύματος επαναιώρησης P1 (50mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA, 100 μg/ml RNase A) και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml (Beckman). Προστίθενται 10 ml διαλύματος λύσης P2 [200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS] και ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου. Έντονη ανάδευση θα μπορούσε να οδηγήσει σε καταστροφή του DNA. Έπειτα, προστίθενται 10 ml παγωμένου διαλύματος εξουδετέρωσης P3 [3 M οξικό κάλιο pH 5.5] και, μετά από ήπια ανάδευση, το μείγμα επωάζεται για 20 λεπτά στον πάγο. Στο στάδιο αυτό σχηματίζονται συσσωματώματα που προέρχονται από τα κυτταρικά τοιχώματα και τις μεμβράνες των βακτηρίων καθώς επίσης και πρωτεΐνες. Το DNA παραμένει στη διαλυτή φάση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση με τη χρήση της κεφαλής JA-20 (Beckman) στις 20,000xg για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA, συλλέγεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα των 30 ml (Greiner Bio-one). Σε περίπτωση που τα συσσωματώματα δεν έχουν απομακρυνθεί πλήρως πραγματοποιείται μία ακόμη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις ίδιες συνθήκες. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται η στήλη καθαρισμού του πλασμιδιακού DNA QIAGEN-tip 500 μιας χρήσης, η οποία περιέχει στοιβάδες ρητίνης και λειτουργεί με ροή λόγω της βαρύτητας. Αρχικά, η στήλη ενεργοποιείται με την προσθήκη 10 ml διαλύματος εξισορρόπησης QBT [750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% (v/v) ισοπροπανόλη, 0.15% (v/v) Triton X-100]. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις της στήλης, με 30 ml διαλύματος έκπλυσης QC [1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% (v/v) ισοπροπανόλη] η καθεμιά. Τέλος, το πλασμιδιακό DNA εκλύεται με την προσθήκη 15 ml διαλύματος έκλυσης QF [1.25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 8.5, 15% (v/v) ισοπροπανόλη] και συλλέγεται σε αποστειρωμένο φυγοκεντρικό σωλήνα των 50 ml. Στο διάλυμα προστίθενται 10.5 ml ισοπροπανόλης και, μετά από έντονη ανάδευση, ακολουθεί φυγοκέντρηση με τη χρήση της κεφαλής JA-20 στις 15,000xg για 30 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, ενώ στο ίζημα πλασμιδιακού DNA προστίθενται με 5 ml διαλύματος 70% αιθανόλης και εκπλένεται με φυγοκέντρηση με τη χρήση της κεφαλής JA-20 στις 15,000xg για 10 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται προσεκτικά και το ίζημα αφήνεται να ξηραθεί σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Το DNA επαναιωρείται σε 300 μl διαλύματος 1xTE και μεταφέρεται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού του πλασμιδιακού DNA. Στο διαλυτοποιημένο DNA προστίθενται 18 μl 5M NaCl και 640 μl παγωμένης 100% αιθανόλης και ακολουθεί έντονη ανάδευση και κατακρήμνιση του DNA στους -20°C για 15-17 ώρες. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000xg για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και έκπλυση με 800 μl παγωμένου διαλύματος 70% (v/v) αιθανόλης. Μετά από φυγοκέντρηση στις 9,000xg για 9 λεπτά, το καθαρισμένο πλασμιδιακό DNA ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και επαναδιαλυτοποιείται σε 1xTE στους 37°C για 10 λεπτά.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του απομονωμένου και καθαρισμένου πλασμιδιακού DNA πραγματοποιείται μετά από φωτομέτρηση του δείγματος στα 260 nm σε φωτόμετρο GeneQuant (Pharmacia), βάσει της σχέσης:

$$1 \text{ μονάδα οπτικής πυκνότητας} = 50 \text{ } \mu\text{g DNA/ml}$$

6. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

6.1. ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Οι κυτταρικές σειρές, που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι οι ακόλουθες:

α) *HeLa*

Πρόκειται για επιθηλιακά κύτταρα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στην

επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Απομονώθηκαν από αδενοκαρκίνωμα του τραχήλου της μήτρας και προέρχονται από μια 31-χρονη έγχρωμη ασθενή. Κυτταρογενετική ανάλυση των κυττάρων HeLa έχει αποκαλύψει ότι όλα τα κύτταρα είναι ανευπλοειδικά και φέρουν συνήθως 82 χρωμοσώματα, αλλά, ως καρκινικά κύτταρα, έχουν ιδιαίτερα ασταθή αριθμό χρωμοσωμάτων, που κυμαίνεται μεταξύ 70 και 164. Υπάρχει ένας μικρός αριθμός τελοκεντρικών χρωμοσωμάτων στο 98% των κυττάρων και τέσσερα τυπικά χρωμοσώματα δείκτες, (M1-M4). Τα M1 και M2 υπάρχουν σε ένα αντίγραφο ανά κύτταρο, το M3 σε τέσσερα ή πέντε και το M4 σε δύο αντίγραφα. Το M1 προκύπτει από ανασυνδυασμό του μεγάλου βραχίονα και του κεντρομεριδίου του χρωμοσώματος 1 και του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 3. Το M2 αποτελεί συνένωση του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 3 και του μεγάλου βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Το M3 είναι ισοχρωμόσωμα του μικρού βραχίονα του χρωμοσώματος 5. Τέλος, το M4 αποτελείται από το μεγάλο βραχίονα του χρωμοσώματος 11 κι ένα βραχίονα του χρωμοσώματος 19. Έχει αναφερθεί ότι τα κύτταρα HeLa εκφράζουν την ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 σε χαμηλά επίπεδα. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι 18-20 ώρες.

β) A549

Πρόκειται για κύτταρα επιθηλιακού τύπου που αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Απομονώθηκαν από καλλιέργεια καρκινικού ιστού που προερχόταν από έναν 58-χρονο Καυκάσιο ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα. Κυτταρογενετική ανάλυση των απέδειξε ότι πρόκειται για υποτριπλοειδική κυτταρική σειρά με τυπικό αριθμό 66 χρωμοσωμάτων στο 24% των κυττάρων. Σε αρκετά μεγάλες συχνότητες εντοπίζονται ακόμη κύτταρα με 64 (22%), 65, και 67 χρωμοσώματα, ενώ μεγαλύτερος αριθμός χρωμοσωμάτων εμφανίζεται σε πολύ μικρό αριθμό κυττάρων (0.4%). Σε όλα τα κύτταρα A549 υπάρχουν 6 χρωμοσώματα δείκτες σε ένα αντίγραφο: der(6)t(1;6)(q11;q27), del(6)(p23), del(11)(q21), del(2)(q11), M4 και M5. Τα περισσότερα κύτταρα είχαν δύο αντίγραφα των χρωμοσωμάτων X και Y, παρόλα αυτά ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων (περίπου 40%) έχει απολέσει το ένα ή και τα δύο χρωμοσώματα Y. Τα χρωμοσώματα 2 και 6 βρίσκονται σταθερά σε 1 αντίγραφο, ενώ συνήθως υπάρχουν τέσσερα αντίγραφα των χρωμοσωμάτων 12 και 17. Ο χρόνος διπλασιασμού των κυττάρων είναι περίπου 22 ώρες.

γ) H1299

Πρόκειται για κύτταρα του επιθηλίου του πνεύμονα που αναπτύσσονται προσκολλημένα στην επιφάνεια του δοχείου καλλιέργειας. Απομονώθηκαν από μεταστατικό οζίδιο των λεμφαδένων ενός 43-χρονου Καυκάσιου ασθενή και προέρχονται από μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Τα κύτταρα είναι ομόζυγα για ένα μερικό έλλειμμα του γονιδίου της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53 που οδηγεί σε απουσία έκφρασης της πρωτεΐνης. Ο χρόνος διπλασιασμού τους είναι 18-20 ώρες.

6.2. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο που διατηρείται στείρος με χρήση υπερϊώδους ακτινοβολίας, ενώ όλοι οι πειραματικοί χειρισμοί πραγματοποιήθηκαν σε εστία κάθετης νηματικής ροής (AURA 2000 MAC, BIOAIR

Instruments) προς αποφυγή μολύνσεων. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε επωαστικό κλίβανο (Forma Scientific, CO₂ Water-jacketed Incubator) στους 37°C και σε ατμόσφαιρα εμπλουτισμένη σε 5% (v/v) CO₂, που συμβάλλει στη διατήρηση του pH του θρεπτικού υλικού της καλλιέργειας στα επιθυμητά επίπεδα. Τα κύτταρα αναπτύχθηκαν σε ειδικά σκεύη κυτταρικής καλλιέργειας μιας χρήσης, και συγκεκριμένα πλαστικές φιάλες επιφάνειας καλλιέργειας 25 και 75 cm² (Greiner CELLSTAR®), πλαστικά τρυβλία διαμέτρου 6 και 10 cm (Greiner®) ή γυάλινες καλυπτρίδες διαστάσεων 22x22 και 22x40 cm. Η παρατήρηση της ανάπτυξης και της μορφολογίας των κυττάρων έγινε με τη βοήθεια ανάστροφου μικροσκοπίου με φίλτρο αντίθεσης φάσης (Olympus, IM).

6.3. ΥΛΙΚΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

6.3.1. Θρεπτικά υλικά

Για την ανάπτυξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), το οποίο παρασκευάστηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Biochrom). Το θρεπτικό υλικό παραλαμβάνεται ως λυοφιλιωμένη σκόνη και, αφού επαναιωρηθεί σε ddH₂O, προστίθενται L-γλουταμίνη (SIGMA) σε τελική συγκέντρωση 2 mM και αντιβιοτικά, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη (PAA), σε συγκεντρώσεις 10⁵ U και 10⁵ μg/l, αντίστοιχα, προς αποφυγή μικροβιακών μολύνσεων. Ακολούθως, αποστειρώνεται μέσω διήθησης (συσκευή διήθησης XX6700P10, MILIPORE) χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα προφίλτρα (MILIPORE: Filter type AP, AP1504200) και φίλτρα (MILIPORE: Filter type HA 0.45μm, HATF04700). Το θρεπτικό υλικό μπορεί να διατηρηθεί στους 4°C για 2 περίπου μήνες. Πριν χρησιμοποιηθεί, στο θρεπτικό υλικό προστίθεται εμβρυϊκός ορός μόσχου (Foetal Calf Serum, FCS – Biochrom) σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v). Ο FCS αποτελεί πηγή πρωτεϊνών και περιέχει απαραίτητους για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό αναπτυξιακούς παράγοντες.

6.3.2. Διάλυμα έκπλυσης

Για τις εκπλύσεις των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (Phosphate Buffered Saline, PBS), ελλειματικό σε ιόντα Ca²⁺ και Mg²⁺ (139 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.37 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 4.16 mM NaHCO₃, pH 7.2). Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο (AES-75, RAYPA), στους 121°C για 30 λεπτά και διατηρείται στους 4°C για 2-3 μήνες.

6.3.3. Διάλυμα θρυψίνης/EDTA

Με τη χρήση διαλύματος θρυψίνης/EDTA (PAA) 0.05%/0.02% (w/v) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS επιτυγχάνεται η αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια των σκευών κυτταρικής καλλιέργειας. Το χηλικό αντιδραστήριο EDTA δεσμεύει δισθενή κατιόντα (Ca²⁺ και Mg²⁺) από τα κύτταρα συμβάλλοντας έτσι στην απώλεια της ικανότητας πρόσδεσής τους στην επιφάνεια ανάπτυξης, ενώ συγχρόνως, υπό την επίδραση του παγκρεατικού ενζύμου θρυψίνη, το οποίο έχει πρωτεολυτική δράση, τα κύτταρα αποκτούν σφαιρικό σχήμα και αποκολλώνται μεταξύ τους, οπότε λαμβάνονται πλέον ως μονήρη επιπλέοντα κύτταρα. Η δράση της θρυψίνης μειώνεται σε pH μικρότερο του 7.0, ενώ μπορεί να αποβεί καταστρεπτική για τα κύτταρα σε τιμές pH μεγαλύτερες του 8.0, καθώς επίσης και μετά από παρατεταμένη επώαση με

το ένζυμο. Το διάλυμα θρυψίνης/EDTA διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για μικρά διαστήματα, ενώ η μακροχρόνια αποθήκευσή του γίνεται στους -20°C.

6.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διατήρηση των κυττάρων σε κατάσταση συνεχούς πολλαπλασιασμού εξασφαλίζεται με τη διαδικασία της επανακαλλιέργειας, βασικό βήμα της οποίας αποτελεί η θρυψινοποίηση.

Η διαδικασία της συντήρησης της κυτταρικής καλλιέργειας έχει ως εξής:

Το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από το σκεύος κυτταρικής καλλιέργειας και πραγματοποιούνται δύο διαδοχικές εκπλύσεις με PBS, προκειμένου να απομακρυνθούν πλήρως τα συστατικά του θρεπτικού υλικού και να επιδράσει το διάλυμα θρυψίνης/EDTA. Προστίθεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος θρυψίνης/EDTA ώστε να καλυφθεί η επιφάνεια καλλιέργειας και ακολουθεί επώαση για 3 λεπτά περίπου στους 37°C. Μετά από την αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια ανάπτυξης, η θρυψίνη απενεργοποιείται με την προσθήκη φρέσκου θρεπτικού υλικού και το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται σε σκεύος καλλιέργειας στην κατάλληλη συγκέντρωση κυττάρων. Τέλος, το σκεύος συμπληρώνεται με θρεπτικό υλικό μέχρι τον προκαθορισμένο τελικό όγκο και επανατοποθετείται στον επωαστικό κλίβανο.

6.5. ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΣΕΙΡΩΝ

Η αποθήκευση των κυτταρικών σειρών θα πρέπει να γίνεται από τις πρώτες κιόλας ανακαλλιέργειες των κυττάρων. Η διαδικασία της αποθήκευσης των κυττάρων περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

Η κυτταρική καλλιέργεια υφίσταται θρυψινοποίηση όπως περιγράφηκε αμέσως παραπάνω (6.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ). Κυτταρικό εναιώρημα που περιέχει $4-5 \times 10^6$ κύτταρα φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια φυγόκεντρο (SORVALL® TC6) στις 1,500 rpm για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε FCS που περιέχει διμεθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO) ως αντιψυκτικό σε τελική συγκέντρωση 10% (v/v). Το DMSO συμβάλλει στην αποφυγή δημιουργίας κρυστάλλων νερού που θα οδηγούσε στην καταστροφή του κυττάρου. Το εναιώρημα των κυττάρων μεταφέρεται σε ειδικό σωληνάριο ψύξης (NUNCT™) και τοποθετείται αρχικά στους -70°C για 3-17 ώρες, ώστε να η κατάψυξη των κυττάρων να γίνει σταδιακά, και στη συνέχεια σε δοχείο υγρού αζώτου (-192°C) για τη μακροχρόνια αποθήκευσή τους.

6.6. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΕΞΩΓΕΝΟΥΣ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΣΕ ΕΥΚΑΡΥΩΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Η εισαγωγή εξωγενούς DNA στο γονιδίωμα ευκαρυωτικών κυτταρικών σειρών (διαμόλυνση) έγινε χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικές προσεγγίσεις: αφενός με τη χρήση κατιοντικών λιπιδίων και συγκεκριμένα των πακέτων προϊόντων Effectene® (Qiagen) και PolyFect® (Qiagen), κι αφετέρου με ηλεκτροδιάτρηση. Η ύπαρξη γονιδίου ανθεκτικότητας σε συγκεκριμένο αντιβιοτικό στο πλασμιακό DNA επιτρέπει την απομόνωση κυτταρικών κλώνων από τα κύτταρα που έχουν προσλάβει

DNA. Για το σκοπό αυτό, μετά από τη διαμόλυνση τα κύτταρα καλλιεργούνται παρουσία κατάλληλου αντιβιοτικού, στη συγκεκριμένη περίπτωση υδρομυκίνη Β (SIGMA) σε συγκεντρώσεις 100-150 µg/ml ανάλογα με την κυτταρική σειρά, για 16-18 ημέρες. Οι ανθεκτικοί κλώνοι, που αντιστοιχούν σε κυτταρικούς κλώνους που έχουν προσλάβει DNA, απομονώνονται ως μονήρεις κλώνοι αλλά και ως μαζικός πληθυσμός κλώνων.

Στην περίπτωση των ανθρώπινων ωαρίων, το πλασμιδιακό DNA μεταφέρθηκε στο εσωτερικό των κυττάρων μηχανικά με μικροένεση.

6.6.1. Μεταφορά εξωγενούς DNA με κατιοντικά λιπίδια

Πρόκειται για μέθοδο μεταφοράς DNA που βασίζεται σε εμπορικά διαθέσιμα πρωτόκολλα με ιδιαίτερα υψηλή αποδοτικότητα, καθώς επιτυγχάνεται διαμόλυνση στο 25-70% του αρχικού κυτταρικού πληθυσμού που χρησιμοποιείται.

α) Effectene

Το αντιδραστήριο Εφεκτίνη (Effectene) χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με ουσία που έχει ρόλο Ενισχυτή (Enhancer) και Ρυθμιστικό Διάλυμα συμπύκνωσης του DNA (DNA-condensation buffer, EC), προκειμένου να αυξηθεί η αποδοτικότητα της διαμόλυνσης. Αρχικά, το DNA συμπυκνώνεται εξαιτίας της αλληλεπίδρασής του με τον Ενισχυτή στο κατάλληλο περιβάλλον που δημιουργεί το Ρυθμιστικό Διάλυμα EC. Στη συνέχεια, στο συμπυκνωμένο DNA προστίθεται Εφεκτίνη, ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα Εφεκτίνης-DNA, τα οποία προστίθενται απευθείας στα κύτταρα. Η Εφεκτίνη έχει την ιδιότητα να σχηματίζει αυθόρμητα μικύλλια συγκεκριμένης δομής και μεγέθους, χαρακτηριστικό που εξασφαλίζει επαναληψιμότητα στο σχηματισμό του συμπλόκου διαμόλυνσης και καθιστά την Εφεκτίνη ιδιαίτερα αποτελεσματική για τη μεταφορά DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα.

Το πρωτόκολλο διαμόλυνσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το ακόλουθο:

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm και αναπτύσσονται ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης τα κύτταρα να καλύπτουν το 40% της επιφάνειας του τρυβλίου. Αρχικά, απομακρύνεται το θρεπτικό υλικό από το τρυβλίο της καλλιέργειας, πραγματοποιούνται 2 εκπλύσεις των κυττάρων με PBS και προστίθενται 3 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού. 2.5 µg DNA προστίθενται σε Ρυθμιστικό Διάλυμα EC, μέχρις τελικού όγκου 150 µl. Ακολούθως, προστίθενται 16 µl Ενισχυτή και το μείγμα αναδεύεται και επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 20 µl Εφεκτίνης και μετά από ήπια ανάδευση με την πιπέττα, ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να σχηματιστεί το σύμπλοκο διαμόλυνσης. Τέλος, προστίθεται 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, αναδεύεται και προστίθεται αμέσως στάγδην στα κύτταρα. Τα κύτταρα αναπτύσσονται για 48 ώρες και στη συνέχεια θρυψινοποιούνται, μεταφέρονται σε φιάλη 75 cm² και αναπτύσσονται για 24 ώρες πριν την έναρξη της επιλογής.

β) Polyfect

Το PolyFect είναι ένα ενεργοποιημένο δενδρομερές αντιδραστήριο με σφαιρική αρχιτεκτονική και διακλαδώσεις οι οποίες εκτείνονται ακτινοειδώς από ένα κεντρικό κορμό καταλήγοντας σε φορτισμένες αμινομάδες. Το αντιδραστήριο συγκροτεί συμπαγείς δομές στις οποίες περικλύεται το DNA. Τα θετικά φορτισμένα σύμπλοκα PolyFect-DNA προσδένονται σε αρνητικά φορτισμένους υποδοχείς της επιφάνειας

των ευκαρυωτικών κυττάρων, και εισέρχονται στο κύτταρο υπό μορφή ενδοσωμάτων. Μετά τη σύντηξη λυσοσώματος-ενδοσώματος το PolyFect συμβάλλει στη εξουδετέρωση του pH, αναστέλλοντας έτσι τη δράση των υδρολυτικών ενζύμων του λυσοσώματος και διασφαλίζοντας τη σταθερότητα του συμπλόκου PolyFect-DNA και κατ' επέκταση τη μεταφορά ακέραιου του πλασμιδιακού DNA στον πυρήνα.

Η διαδικασία μεταφοράς εξωγενούς DNA περιγράφεται παρακάτω:

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε τρυβλίο διαμέτρου 6 cm και αναπτύσσονται ώστε την ημέρα της διαμόλυνσης τα κύτταρα να καλύπτουν το 40% της επιφάνειας του τρυβλίου. Αρχικά, το θρεπτικό υλικό απομακρύνεται από το τρυβλίο της καλλιέργειας και αντικαθίσταται με 3 ml φρέσκου θρεπτικού υλικού, μετά από 2 εκπλύσεις των κυττάρων με PBS. 2.5 µg πλασμιδιακού DNA αραιώνονται σε θρεπτικό υλικό DMEM το οποίο δεν περιέχει ορό, μέχρις τελικού όγκου 150 µl, και αναδεύονται ισχυρά. Αφού προστεθούν 15 µl αντιδραστήριου PolyFect[®], το διάλυμα αναδεύεται και αφήνεται 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να σχηματιστούν τα σύμπλοκα PolyFect-DNA. Στη συνέχεια, προστίθεται 1 ml πλήρους θρεπτικού υλικού, αναδεύεται και προστίθεται αμέσως στάγδην στα κύτταρα. Τα κύτταρα αναπτύσσονται για 48 ώρες και στη συνέχεια θρυψινοποιούνται, μεταφέρονται σε φιάλη 75 cm² και αναπτύσσονται για 24 ώρες πριν την έναρξη της επιλογής.

6.6.2. Μεταφορά εξωγενούς DNA με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου

Με την τεχνική της ηλεκτροδιάτρησης, εφαρμόζεται στα κύτταρα ηλεκτρικό ρεύμα υψηλής τάσης και χαμηλής έντασης για πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Ως αποτέλεσμα, διανοίγονται μεταπτωτικοί πόροι στην κυτταρική μεμβράνη, μέσω των οποίων διέρχεται το πλασμιδιακό DNA προς το κυτταρόπλασμα [385]. Η μέθοδος αυτή έχει χαμηλότερη αποδοτικότητα σε σχέση με την χρήση λιπιδίων αλλά υψηλότερη σε σχέση με άλλες εναλλακτικές μεθόδους. Για τη μεγιστοποίηση της αποδοτικότητας απαιτείται η χρησιμοποίηση μεγάλων ποσοτήτων DNA.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Η κυτταρική καλλιέργεια υφίσταται θρυψινοποίηση όπως περιγράφηκε στην ενότητα 6.4. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ. Κυτταρικό εναιώρημα που περιέχει 5×10^6 κύτταρα φυγοκεντρείται στις 1,500 rpm για 3 λεπτά, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 500 µl PBS και μεταφέρεται σε αποστειρωμένη κυβέττα. Στο κυτταρικό εναιώρημα προστίθενται 10 µg πλασμιδιακού DNA και, αφού αναδευτεί ήπια, εφαρμόζεται ηλεκτρικό ρεύμα συγκεκριμένης Τάσης (Voltage, V), Αντίστασης (Resistance, R) και Χωρητικότητας (Capacitor, C) ανά κυτταρική σειρά.

	V (V)	R (Ω)	C (F)
HeLa	270	725	850
A549	270	-	950
H1299	270	-	950

Πίν. 20. Παράμετροι ρεύματος για την ηλεκτροδιάτρηση κυτταρικών σειρών.

Τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρυβλίο διαμέτρου 10 cm και αναπτύσσονται για 48 ώρες. Στη συνέχεια θρυψινοποιούνται, μεταφέρονται σε φιάλη 75 cm² και αναπτύσσονται για 24 ώρες πριν την έναρξη της επιλογής.

6.6.3. Μεταφορά εξωγενούς DNA με μικροένεση

Λόγω του μικρού αριθμού των διαθέσιμων ωοκυττάρων και προκειμένου να διασφαλιστεί η μεταφορά του πλασμιδιακού DNA σε αυτά, επιλέξαμε την προσέγγιση της μηχανικής διαμόλυνσης με μικροένεση. Συγκεκριμένα, σε ωοκύτταρα στο στάδιο των GV που καλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Sydney (CooK) εγχύθηκαν με μικροβελόνα *in vitro* γονιμοποίησης ~1–2 µg πλασμιδιακού DNA. Τα GV παρέμειναν στους 37°C στο θρεπτικό υλικό καλλιέργειας για 24 ώρες και στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν είτε για μικροσκοπία φθορισμού είτε για απομόνωση DNA και PCR.

7. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

7.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΑΝΩΡΙΜΑ ΩΑΡΙΑ

Για την παρασκευή RNA από ανώριμα ωοκύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν GV από τα οποία είχε προηγουμένως αφαιρεθεί ο πυρήνας με τη βοήθεια μικροβελόνας. Τα ωοκύτταρα συλλέχθηκαν σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο σε ειδικό θρεπτικό μέσο καλλιέργειας Sydney που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της IVF και στο οποία διατηρούνταν και πριν το χειρισμό. Ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 1,600xg για 1 λεπτό, απομάκρυνση του υπερκειμένου και επαναιώρηση σε 20 µl ddH₂O. Στη συνέχεια, έγινε διάρρηξη των κυτταρικών μεμβρανών με τρεις διαδοχικούς κύκλους ψύξης σε υγρό άζωτο και απόψυξης σε υδατόλουτρο στους 37°C. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επώαση με 250 µg/ml πρωτεΐνάσης K στους 55°C για 15-17 ώρες. Μετά από απενεργοποίηση του ενζύμου στους 95°C για 15 λεπτά στο δείγμα προστέθηκε DNάση (Qiagen).

7.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ RNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

Η απομόνωση RNA από καλλιεργούμενα κύτταρα έγινε με τη χρήση του πακέτου προϊόντων RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Η διαδικασία έχει ως εξής:

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε τρυβλίο 10 cm ώστε την επόμενη ημέρα να έχουν σχηματίσει ένα πλήρες ταπήτιο. Το θρεπτικό υλικό αναρροφάται πλήρως, καθώς τυχόν υπολείμματα του θα παρεμποδίσουν την παρακάτω πειραματική διαδικασία. Στο τρυβλίο προστίθενται 600 µl διαλύματος λύσης RLT και 6 µl β-μερκαπτοαιθανόλης (SIGMA). Για να επιτευχθεί πλήρης λύση των κυττάρων το διάλυμα θα πρέπει να καλύπτει πλήρως την επιφάνεια του τρυβλίου. Η β-μερκαπτοαιθανόλη αποτρέπει τη δράση των RNασών και αναμειγνύεται με το RLT πριν την προσθήκη στα κύτταρα. Στη συνέχεια τα κύτταρα συλλέγονται μηχανικά και τοποθετούνται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο. Το κυτταρικό εναιώρημα διέρχεται 5-10 φορές από βελόνα που έχει προσαρμοστεί σε σύριγγα ινσουλίνης, οπότε επιτυγχάνεται η ομογενοποίηση του προϊόντος της κυτταρικής λύσης. Προστίθεται ίσος όγκος (600 µl) 70% αιθανόλης και γίνεται πολύ καλή ανάδευση με την πιπέττα. Το δείγμα φορτώνεται στη στήλη RNeasy spin column η οποία βρίσκεται προσαρμοσμένη σε σωληνάριο συλλογής 2 ml και φυγοκεντρείται στις 8,000xg για 15 δευτερόλεπτα. Η χωρητικότητα της στήλης είναι 700 µl, έτσι το υπόλοιπο δείγμα φυγοκεντρείται σε δεύτερο χρόνο χρησιμοποιώντας την ίδια στήλη. Το RNA

κατακρατείται στη στήλη, ενώ το διάλυμα που διέρχεται κάθε φορά από αυτήν απορρίπτεται. Μεταξύ των σταδίων όπου χρησιμοποιούνται διαφορετικά διαλύματα, το σωληνάριο συλλογής αντικαθίσταται με νέο. Στη στήλη προστίθενται 700 µl του διαλύματος έκπλυσης RW1 και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 8,000xg για 15 δευτερόλεπτα. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 500 µl διαλύματος έκπλυσης RPE κάθε φορά. Η πρώτη έκπλυση γίνεται με φυγοκέντρηση στις 8,000xg για 15 δευτερόλεπτα, ενώ τη δεύτερη για 2 λεπτά. Ακολουθεί μία ακόμη φυγοκέντρηση στη μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό χωρίς να έχει προηγηθεί η προσθήκη κάποιου διαλύματος προκειμένου να απομακρυνθούν όλα τα υπολείμματα του RPE. Η στήλη προσαρμόζεται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο 1.5 ml. Ακολουθεί η έκλυση του RNA, η οποία γίνεται σε δύο βήματα, προκειμένου να ανακτηθεί όσο το δυνατό περισσότερο από το RNA που απομονώθηκε, σε τελικό όγκο 35 µl αποστειρωμένου νερού ελεύθερου RNασών. Αρχικά προστίθενται 20 µl στη στήλη και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 8,000xg για 1 λεπτό και στη συνέχεια τα υπόλοιπα 15 και το δείγμα φυγοκεντρείται και πάλι στις ίδιες συνθήκες. Το RNA διατηρείται στους -80°C.

Η ποσοτικοποίηση του RNA που απομονώθηκε γίνεται με φωτομέτρηση και υπολογισμό της απορρόφησης του δείγματος στα 260 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης γίνεται βάσει της σχέσης:

$$1 \text{ Μονάδα Απορρόφησης (260 nm)} = 40 \text{ µg/ml}$$

7.3. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ (RT-PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης ανάστροφης μεταγραφής (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό της γονιδιακής έκφρασης. Πραγματοποιείται με ενζυμική ενίσχυση του RNA μέσω ενός ενδιάμεσου μορίου συμπληρωματικού DNA (Complementary DNA, cDNA) με την τεχνική της PCR.

7.3.1. Παρασκευή συμπληρωματικού DNA

Για την παρασκευή cDNA χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προϊόντων PrimeScript 1st strand cDNA synthesis (Takara), βάσει του πρωτοκόλλου που προτείνεται από τον κατασκευαστή με κάποιες τροποποιήσεις.

Αρχικά προετοιμάζεται το μείγμα της αντίδρασης (master mix) (Πίν. 21). Το μείγμα αναδεύεται 8-10 φορές με μικροπιπέττα και μεταφέρεται σε πάγο μέχρι τη χρησιμοποίησή του.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
5 x Ρυθμιστικό διάλυμα	4 µl
40 U/µl Αναστολέας RNασών	0.5 µl
ddH ₂ O ελεύθερο RNασών	4.5 µl

Πίν. 21. Σύσταση μείγματος αντίδρασης.

Στη συνέχεια, προετοιμάζονται οι αντιδράσεις (Πίν. 22). Ακολουθεί ανάδευση 8-10 φορές και επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 42°C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια οι αντιδράσεις μεταφέρονται σε πάγο για 2 λεπτά. Στο μείγμα της αντίδρασης που

είχε προετοιμαστεί αρχικά προστίθεται 1 μl 200 U/μl PrimerScript RTάση, αναδεύεται 12-15 φορές και τα 10 μl του μείγματος μεταφέρονται στο σωληνάριο της κάθε αντίδρασης. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκυκλοποιητή στους 45°C για 30 λεπτά και στους 72°C για 15 λεπτά. Το προϊόν της αντίδρασης φυλάσσεται στους -20°C.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Ποσότητα</i>
Εκμαγείο RNA	1.5 μg
50 μM Εκκινητής ΟλιγοdT	1 μl
10 mM dNTPs	1 μl
ddH ₂ O ελεύθερο RNAσών	Μέχρις τελικού όγκου 10 μl

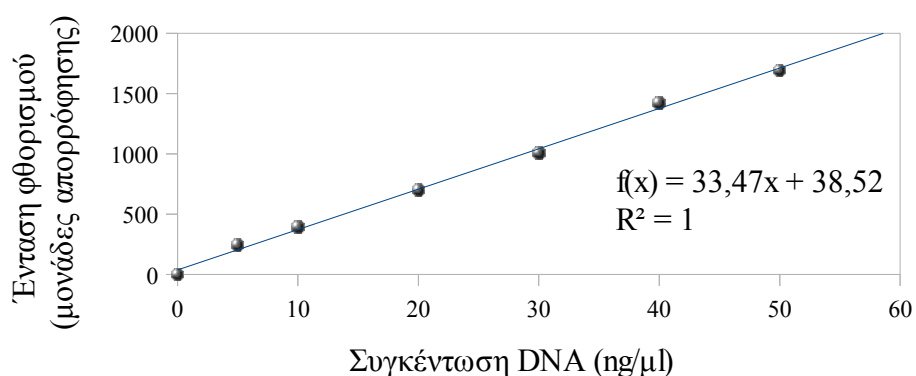
Πίν. 22. Σύσταση αντιδράσεων.

7.3.2. Ποσοτικοποίηση του cDNA

Η μέτρηση της συγκέντρωσης των cDNA πραγματοποιήθηκε μέσω χρώσης του προϊόντος με τη φθορισμογόνο ουσία Hoechst 33258, η οποία προσδένεται ειδικά στο DNA σε διμερή αδενίνης-θυμίνης. Η Hoechst διεγείρεται στα 356 nm και το φάσμα εκπομπής της παρουσιάζει μέγιστη τιμή στα 455-461 nm. Η ποσοτικοποίηση του cDNA έγινε μέσω φθορισμομετρίας ως εξής:

Αρχικά, 1 μl cDNA αραιώνεται σε 74 μl PBS και προστίθενται 75 μl διαλύματος 1 μg/ml Hoechst 33258, ώστε η τελική συγκέντρωση της Hoechst στο δείγμα να είναι 0.5 μg/ml. Το διάλυμα της Hoechst παρασκευάζεται σε συγκέντρωση 50 ng/μl και διατηρείται στους 4°C στο σκοτάδι για 2-3 μήνες. Μετά από καλή ανάδευση το δείγμα αφήνεται στο σκοτάδι για 15 λεπτά για να γίνει η πρόσδεση της Hoechst στο DNA και ακολουθεί φθορισμομετρία.

Η φθορισμομετρική ανάλυση πραγματοποιείται με τη βοήθεια φασματοφθορισμομέτρου (F-2500 Hitachi Fluorescence Spectrophotometer). Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης σε ng/μl γίνεται με μέτρηση της απορρόφησης στα 365 nm και βάσει της ακόλουθης καμπύλης αναφοράς.



Εικ. 24. Καμπύλη αναφοράς για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του cDNA.

7.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Ακολουθούν αντιδράσεις PCR για τα HERV-K10 (Πίν. 23), την πολυμεράση των HERV-K10 (Πίν. 24) και τη β-ακτίνη (Πίν. 23).

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
cDNA	5 ng
10 x Ρυθμιστικό διάλυμα	1 x
50 mM MgCl ₂	1.5 mM
2 mM dNTPs (Invitrogen)	210 μM
0.5 μg/μl Πρόθιος εκκινητής (Invitrogen)	0.25 μg
0.5 μg/μl Ανάστροφος εκκινητής (Invitrogen)	0.25 μg
5 U/μl Taq πολυμεράση (Invitrogen)	2.5 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 100 μl

Πίν. 23. Σύσταση αντιδράσεων RT-PCR HERV-K10, HERV-K10-pol και β-ακτίνης.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>
HERV-K10	
HERV134U	5'-CCAACCCCGTGCTCTCTGAA-3'
HERV720L	5'-TTGTGGGGAGAGGGTCAGCA-3'
HERV-pol	
HERV-K10 pol B	5'-TCAGGATCCGTAGAGCCTCCTAAACCC-3'
HERV-K10 pol C	5'-TCAGCGGCCGCTAAGCATGAAGTTCTTGTGC-3'
β-ακτίνη	
β-actin F	5'-CTGGCTGGCCGGGACCTGAC-3'
β-actin R	5'-ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATGA-3'

Πίν. 24. Αλληλουχία εκκινητών RT-PCR HERV-K10, HERV-K10-pol και β-ακτίνης.

Οι συνθήκες κυκλοποίησης για το HERV-K10, την HERV-K10-pol και τη β-ακτίνη ήταν:

<u>HERV-K10 και β-ακτίνη</u>	<u>HERV-K10-pol</u>
94°C, 5 λεπτά	95°C, 5 λεπτά
94°C, 30 δευτερόλεπτα	95°C, 1 λεπτό
59°C, 30 δευτερόλεπτα	55°C, 1 λεπτό
72°C, 2 λεπτά	72°C, 2 λεπτά
72°C, 10 λεπτά	72°C, 10 λεπτά
x 24	x 35

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v).

8. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

8.1. ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΑ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ

Ο σχεδιασμός της ανασυνδυασμένης κατασκευής, η οποία περιέχει το ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10, προβλέπει την έκφραση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP μόνο μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε μικροσκοπία φθορισμού προκειμένου να πιστοποιηθούν γεγονότα ρετρομετάθεσης σε κυτταρικό επίπεδο μέσω παρατήρησης κυττάρων που παράγουν

EGFP. Η παρατήρηση των δειγμάτων έγινε σε μικροσκόπιο φθορισμού (Nikon eclipse E400) με τη χρήση φίλτρου FITC και φωτογραφήθηκαν με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής (Nikon CoolPix 990).

8.1.1. Καλλιεργούμενα κύτταρα

Κύτταρα ενοφθαλμίζονται σε αποστειρωμένες γυάλινες καλυπτρίδες, τοποθετούνται σε τρυβλία διαμέτρου 6 cm και αναπτύσσονται μέχρι να καταλαμβάνουν το 70% περίπου της διαθέσιμης επιφάνειας του τρυβλίου.

Ακολουθεί η μονιμοποίηση των κυττάρων που γίνονται ως εξής: Αρχικά, γίνονται 2 εκπλύσεις των κυττάρων με 3 ml διαλύματος PBS η καθεμιά και ακολούθως προστίθενται 3 ml διαλύματος 3.8% παραφορμαλδεΐδης (Riedel de Haën)/PBS (w/v) για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, το διάλυμα μονιμοποίησης απομακρύνεται και προστίθενται 3 ml διαλύματος σβέσης 50mM NH₄Cl/PBS για 5 λεπτά, προκειμένου να απενεργοποιηθεί η παραφορμαλδεΐδη και να απομακρυνθεί η περίσσειά της από το κυτταρικό ταπήτιο. Ακολουθεί έκπλυση με 3 ml διαλύματος PBS κι έπειτα οι καλυπτρίδες, πάνω στις οποίες βρίσκονται τα κύτταρα, μεταφέρονται και τοποθετούνται σε αντικειμενοφόρους πλάκες στις οποίες έχει τοποθετηθεί 1 σταγόνα διαλύματος 50% γλυκερόλης/PBS (v/v).

8.1.2. Ανώριμα ωάρια

Ωοκύτταρα στο στάδιο των GV στα οποία έγινε έγχυση του γενετικά τροποποιημένου ελλειμματικού ρετροϊού pHERV-K10*/EGFP-INT, μονιμοποιούνται 24 ώρες μετά από την έγχυση όπως περιγράφεται στην ενότητα 3.2.1. Μονιμοποίηση ωαρίων. Στην αντικειμενοφόρο προστίθεται 1 σταγόνα διαλύματος 50% γλυκερόλης/PBS (v/v) και τοποθετείται καλυπτρίδα.

8.2. ΚΥΤΤΑΡΟΜΕΤΡΙΑ ΡΟΗΣ

Ως κυτταρομετρία ορίζεται η μέτρηση φυσικών ή/και χημικών χαρακτηριστικών των κυττάρων. Με την κυτταρομετρία ροής πραγματοποιούνται ταυτόχρονα μετρήσεις πολλαπλών φυσικοχημικών ή/και φαινοτυπικών χαρακτηριστικών, καθώς τα κύτταρα διέρχονται, το ένα πίσω από το άλλο, από το κυτταρόμετρο σε νηματοειδή ροή. Πλεονέκτημά της αποτελεί η δυνατότητα ανάλυσης μαζικών κυτταρικών πληθυσμών. Ακόμη, καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση της έντασης φθορισμού ανά μονήρες κύτταρο, η ανάλυση βιοχημικών παραμέτρων, ο προσδιορισμός της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου και η επιλογή κυττάρων με συγκεκριμένες ιδιότητες.

8.2.1. Φθορισμο-ενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (FACS)

Η φθορισμο-ενεργοποιούμενη κυτταρική σάρωση (Fluorescence-Activated Cell Scanning, FACS) είναι τεχνική, με την οποία είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί η ένταση φθορισμού που παράγεται από μονήρη κύτταρα, αλλά και να διαχωριστούν τα κύτταρα ενός πληθυσμού βάσει συγκεκριμένων χαρακτηριστικών τους, όπως η ένταση φθορισμού, το μέγεθος ή η κοκκίωση και η βιωσιμότητα με κυτταρομετρία ροής. Μονήρη κύτταρα διαπερνούν το κυτταρόμετρο, εισέρχονται σε κυψελίδα ροής και δέχονται ακτινοβολία από μία εστιασμένη δέσμη laser. Η εκπομπή φθορισμού από τα κύτταρα αλλά και το σκεδασμένο φως που παράγεται καθώς η ακτίνα προσπίπτει σε αυτά παρέχουν τριών ειδών δεδομένα:

α) Πρόσθια σκέδαση (Forward Scatter, FSC), που μετράται σε μικρή γωνία 1-19° και καθορίζει το μέγεθος των κυττάρων.

β) Πλευρική σκέδαση (Side Scatter, SSC), που μετράται υπό γωνία 90° και καθορίζει την κοκκίωση των κυττάρων

γ) Εκπομπή φθορισμού (Fluorescence Emission, FL), που καθορίζει την ένταση φθορισμού των κυττάρων.

Η πρόσθια και η πλευρική σκέδαση χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του υπό εξέταση κυτταρικού πληθυσμού μέσω του ορισμού μιας διόδου (gate), αποκλείοντας έτσι τα κυτταρικά θραύσματα (debris) και τα νεκρά κύτταρα.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε FACS για τη μέτρηση συχνότητας ρετρομετάθεσης, δεδομένου ότι ένα γεγονός ρετρομετάθεσης ανιχνεύεται από την έκφραση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Επομένως, η ποσοτικοποίηση των επιπέδων ρετρομετάθεσης ενός κυτταρικού πληθυσμού είναι δυνατή μέσω της μέτρησης του αριθμού των EGFP-φθοριζόντων, δηλαδή των θετικών σε ρετρομετάθεση, κυττάρων.

Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Μονήρεις αλλά και μαζικοί κλώνοι κυττάρων που φέρουν το ανασυνδυασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10 αναπτύσσονται απουσία του αντιβιοτικού για 3 ημέρες. Ακολούθως, θρυψινοποιούνται, συλλέγονται σε 4 ml θρεπτικού υλικού DMEM και φυγοκεντρώνονται στις 1,500xg για 3 λεπτά. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται με 4 ml PBS. Μετά από φυγοκέντρηση στις ίδιες συνθήκες, το ίζημα επαναιωρείται σε 1 ml PBS και μεταφέρεται σε σωληνάρια πολυστυρενίου των 5 ml (Becton Dickinson). Αντιστοίχως, προετοιμάζονται και μη διαμολυσμένα κύτταρα της ίδιας κυτταρικής σειράς, τα οποία χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες για την εκτίμηση του αυτοφθορισμού (background fluorescence). Σε κυτταρόμετρο FACScan analysis tabletop instrument (Becton Dickinson), με δέσμη laser (blue argon laser, 488 nm) και φίλτρου φλουορεσκεΐνης, 530/30 διαπερώσας δέσμης, αναλύονται 20,000 κύτταρα ανά δείγμα ως προς την ένταση φθορισμού.

PARAMETER	DETECTOR	VOLTAGE	MODE
P1	FSC	E00	Log
P2	SSC	216	Log
P3	FL1	550	Log
P4	FL2	439	Log
P5	FL3	536	Log

Πίν. 25. Ρυθμίσεις κυτταρομέτρου για τις μετρήσεις.

Ο πληθυσμός των ζωντανών κυττάρων στα οποία μετράται η ένταση φθορισμού επιλέγεται βάσει του προφίλ πρόσθιας-πλευρικής σκέδασης. Τα δεδομένα της μέτρησης αναλύονται με τη χρήση του λογισμικού CellQuest v.3.1. Ο προσδιορισμός του ποσοστού των EGFP-φθοριζόντων κυττάρων στο εξεταζόμενο δείγμα γίνεται ως εξής:

Βάσει της κατανομής της έντασης φθορισμού του μάρτυρα ορίζονται τα κατώφλια έντασης φθορισμού, έτσι ώστε το 99.6% των κυττάρων να λαμβάνονται ως αρνητικά και το 0.4% ως λανθασμένα θετικά [386]. Τα κύτταρα της κατανομής του υπό εξέταση δείγματος των οποίων η ένταση φθορισμού βρίσκεται πέραν του κατωφλίου του 99.6% θεωρούνται θετικά σε ρετρομετάθεση, ενώ το καθαρό ποσοστό των

θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων υπολογίζεται αφαιρώντας το ποσοστό των λανθασμένα θετικών κυττάρων (0.4%).

8.2.2. Ανάλυση της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου

Με την κυτταρομετρία ροής είναι δυνατή η μέτρηση της ποσότητας του DNA των κυττάρων ενός κυτταρικού πληθυσμού, και κατ' επέκταση του αριθμού, άρα και του ποσοστού, των κυττάρων που βρίσκονται στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Για τον προσδιορισμό της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιήθηκε το πακέτο προϊόντων CycleTEST™ PLUS DNA Reagent kit (Becton Dickinson), σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή, ως εξής:

Κυτταρικό εναιώρημα που περιλαμβάνει 5×10^5 κύτταρα φυγοκεντρείται στις 1,500 rpm για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά από την απομάκρυνση του υπερκείμενου, τα κυτταρικά ιζήματα επαναιωρούνται ήπια σε 250 μl διαλύματος A, το οποίο περιέχει θρυψίνη, και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, κατά τη διάρκεια της οποίας γίνεται πέψη των κυτταρικών μεμβρανών και του κυτταροσκελετού. Στο δείγμα προστίθενται 200 μl διαλύματος B, που περιέχει αναστολέα της θρυψίνης και ριβονουκλεάση A. Μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά, προστίθενται 200 μl παγωμένου διαλύματος C, που περιέχει ιωδιούχο προπίδιο, το δείγμα αναδεύεται ήπια και επωάζεται σε σκοτεινό μέρος στους 4°C για 10 λεπτά. Τα κύτταρα μεταφέρονται σε σωλήνες πολυστυρενίου και 20,000 κύτταρα αναλύονται με FACS. Οι πυρήνες των κυττάρων που έχουν υποστεί χρώση με ιωδιούχο προπίδιο εκπέμπουν φθορισμό σε μήκη κύματος μεταξύ των 564 και 606 nm που ανιχνεύεται, με τη χρήση φίλτρου 585/42 διαπερώσας δέσμης, και αναλύεται με τη βοήθεια του λογισμικού CellQuest v.3.1. Η κατανομή φθορισμού του δείγματος απεικονίζεται ως ιστόγραμμα φθορισμού και συγκρίνεται με αυτό του μάρτυρα.

PARAMETER	DETECTOR	VOLTAGE	MODE
P1	FSC	E00	Lin
P2	SSC	375	Lin
P3	FL1	150	Lin
P4	FL2	392	Lin
P5	FL3	150	Lin

Πίν. 26. Ρυθμίσεις κυτταρομέτρου για την ανάλυση κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου.

8.2.3. Επιλογή και διαχωρισμός κυττάρων

Με τη χρήση κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατή η επιλογή και ο διαχωρισμός κυττάρων (cell sorting) που διαθέτουν συγκεκριμένες ιδιότητες. Προκειμένου να είναι δυνατή η καλλιέργεια των κυττάρων μετά τη συγκομιδή τους θα πρέπει η διαδικασία διαχωρισμού να πραγματοποιηθεί υπό ασηπτικές συνθήκες και για το λόγο αυτό απαιτείται καθαρισμός και απολύμανση των διόδων του κυτταρομέτρου ροής με PBS και 70% αιθανόλη. Οι σωλήνες στους οποίους θα συλλεχθούν τα κύτταρα (αποστειρωμένα corning των 50 ml) επιστρέφονται με 4 % (w/v) BSA/PBS τουλάχιστον για 1 ώρα στους 4°C. Με την έναρξη της διέλευσης των κυττάρων προσδορούμε τα κύτταρα που επιθυμούμε να διαχωριστούν και στο μενού Sort Setup ορίζουμε gate = G1. Από αυτήν τη στιγμή αρχίζει η συλλογή των κυττάρων που πληρούν τα όρια που έχουμε καθορίσει. Επίσης καθορίζονται ο βαθμός αυστηρότητας

κατά την επιλογή (single cell) αλλά και η ταχύτητα διέλευσης του δείγματος (Low). Για να σταματήσουμε τη διαδικασία επιλογής και διαχωρισμού των κυττάρων αρκεί να επιλέξουμε gate = No gate. Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής των κυττάρων οι δίοδοι του κυτταρομέτρου καθαρίζονται εκ νέου με 70% αιθανόλη και ddH₂O.

Το διάλυμα που περιέχει τα συλεχθέντα κύτταρα φυγοκεντρείται στις 2,000 rpm για 3 λεπτά, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε θρεπτικό υλικό και μεταφέρεται για καλλιέργεια σε σκεύος καλλιέργειας παρουσία 2.5 µg/ml Fungizone (SIGMA).

8.3. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

8.3.1. Εκχύλιση ολικού DNA από κύτταρα θηλαστικών

Η εκχύλιση ολικού DNA από κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια έχει ως εξής:

Κυτταρικό εναιώρημα που περιέχει 1.5×10^6 κύτταρα φυγοκεντρείται στις 1,600xg για 3 λεπτά. Το κυτταρικό ίζημα εκπλένεται με 4 ml διαλύματος PBS, φυγοκεντρείται σε συνθήκες όμοιες με τις παραπάνω. Τα κύτταρα επαναιωρούνται σε 1 ml PBS και μεταφέρονται σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1,600xg για 3 λεπτά, το κυτταρικό ίζημα επαναιωρείται σε 800 µl ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης [10mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη] και φυγοκεντρείται όπως πριν. Μετά από ήπια επαναιώρηση σε 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος λύσης [10mM Tris-HCl pH 8.4, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 0.001% (v/v) ζελατίνη, 0.1% (v/v) Triton X-100, 0.45% (v/v) Nonidet P-40, 0.45% (v/v) Tween-20], το κυτταρικό εναιώρημα θερμαίνεται στους 80°C για 10 λεπτά και, κατόπιν, αφήνεται να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολούθως, προστίθεται πρωτεΐνάση K, σε τελική συγκέντρωση 0.4 µg/µl, και το δείγμα επωάζεται στους 55°C για 15-17 ώρες. Μετά την επώαση, η πρωτεΐνάση απενεργοποιείται με θέρμανση του δείγματος στους 95°C για 15 λεπτά, ενώ στη συνέχεια το δείγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στις 1,600xg για 3 λεπτά και το υπερκείμενο, στο οποίο περιέχεται το DNA, συλλέγεται, μεταφέρεται σε αποστειρωμένο μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο και διατηρείται στους 4°C.

8.3.2. Εκχύλιση ολικού DNA από ανώριμα ωάρια

Η εκχύλιση του DNA από ανώριμα ωάρια γίνεται με λύση των ωοκυττάρων σε ένα βήμα [387] και, στη συνέχεια, το εκχύλισμα χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για PCR. Για την εκχύλιση του DNA, 6 ανώριμα ωάρια στο στάδιο των GV, στα οποία έχει μικροενεθεί το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο pHERV-K10*/EGFP-INT, εκπλένονται με PBS και μεταφέρονται σε ελάχιστο όγκο (0.5 µl) σε μικροφυγοκεντρικό σωληνάριο των 0.5 ml. Σε περίπτωση που ο όγκος μεταφοράς είναι μεγαλύτερος, το δείγμα ξηραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου σε θάλαμο νηματικής ροής για 15 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 4.5 µl διαλύματος λύσης [50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 40 µg/ml BSA, 0,5% (v/v) NP-40]. Στο δείγμα προστίθενται 2-3 σταγόνες παραφινέλαιου προς αποφυγήν της εξάτμισης του δείγματος, και έπειτα επωάζεται στους 65°C για 1 λεπτό και τοποθετείται σε πάγο. Ακολουθεί ανάλυση με PCR.

8.3.3. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Πραγματοποιήθηκε PCR, χρησιμοποιώντας ειδικά σχεδιασμένους συνθετικούς

εκκινητές για το γονίδιο της EGFP, προκειμένου να ανιχνευθούν γεγονότα ρετρομετάθεσης σε επίπεδο γονιδιώματος.

<i>Αντιδραστήριο</i>	<i>Τελική συγκέντρωση</i>
DNA	4 µl
10 x Ρυθμιστικό Διάλυμα	1 x
5 x διάλυμα Q	1 x
3 mM dNTPs (Invitrogen)	210 µM
0.5 µg/µl πρόσθιος εκκινητής (Minotech)	0.25 µg
0.5 µg/µl ανάστροφος εκκινητής (Minotech)	0.25 µg
5 U/µl Taq πολυμεράση (Qiagen)	2.5 U
ddH ₂ O	Μέχρις τελικού όγκου 50 µl

Πίν. 27. Σύσταση αντίδρασης PCR για το EGFP.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος προϊόντος</i>
EGFP		
GFP968	5'-GCA CCA TCT TCT TCA AGG ACG AC-3'	1240 / 342 bp
GFP1013	5'-TCT TTG CTC AGG GCG GAC TG-3'	

Πίν. 28. Αλληλουχία εκκινητών για PCR του EGFP.

Οι συνθήκες κυκλοποίησης ήταν:

95°C, 5 λεπτά	x 35
94°C, 30 δευτερόλεπτα	
59°C, 30 δευτερόλεπτα	
72°C, 2 λεπτά	
72°C, 10 λεπτά	

Τα προϊόντα της αντίδρασης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v).

B. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΜΕΛΕΤΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΚΑΙ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10

Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας διαπιστώσαμε τη έκφραση RNA του HERV-K10 σε υψηλά επίπεδα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές καθώς και φυσιολογικά λευκά αιμοσφαίρια του περιφερικού αίματος [368]. Σε επόμενο βήμα θελήσαμε να μελετήσουμε την ικανότητα ρετρομετάθεσης του HERV-K10 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

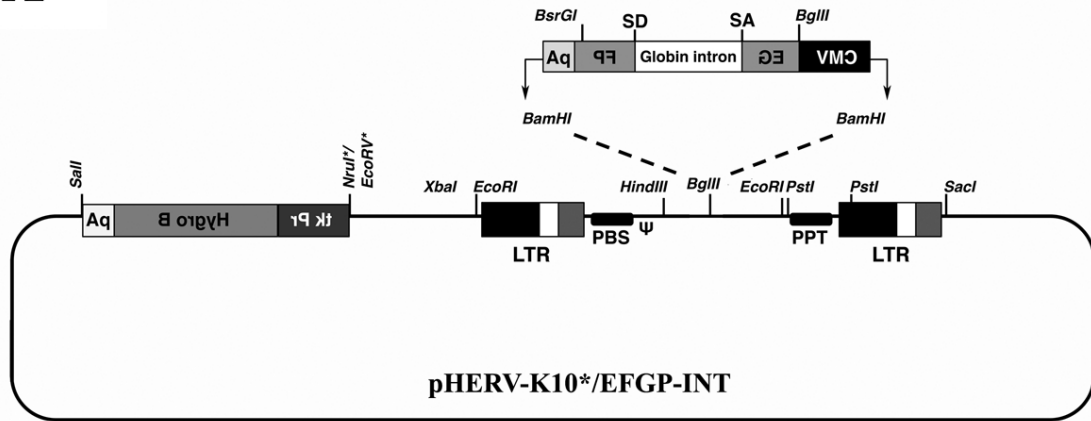
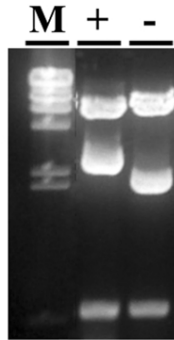
1.1. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΩΝ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ HERV-K

1.1.1. Κατασκευή ενός λειτουργικού για τη ρετρομετάθεση ανασυνδυασμένου στοιχείου HERV-K10

Στο DNA κάθε ανθρώπινου κυττάρου υπάρχουν ~550 αντίγραφα HERV-K. Επομένως είναι δύσκολη η ανίχνευση πιθανών γεγονότων ρετρομετάθεσης που έχουν προέλθει από ένα και μόνο από αυτά, άρα και ο προσδιορισμός της συχνότητας ρετρομετάθεσης του κάθε στοιχείου ξεχωριστά. Προκειμένου λοιπόν να καταστεί δυνατή η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης και να προσδιοριστεί η συχνότητα του φαινομένου, κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή ανασυνδυασμένων ρετρομεταθετών στοιχείων.

Συγκεκριμένα, κατασκευάσαμε ένα ανασυνδυασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10, pHERV-K10*/EGFP-INT, σημασμένο με ειδική κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης [386], που βασίζεται στην έκφραση της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης. Επίσης, κατασκευάσαμε το pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT, την αντίστοιχη ανενεργή μορφή, αφαιρώντας αλληλουχίες απαραίτητες για τη ρετρομετάθεση. Ως εκπρόσωπο των στοιχείων HERV-K, επιλέξαμε το στέλεχος HERV-K10, καθώς όπως έχει ήδη συζητηθεί αποτελεί έναν από τους ρετροϊούς που, εξαιτίας των χαρακτηριστικών του, θεωρείται πολύ πιθανό να είναι ικανός προς ρετρομετάθεση.

Η κατασκευή του pHERV-K10*/EGFP-INT (Εικ. 25A) βασίστηκε σε κλωνοποιημένες αλληλουχίες των 5'LTR και 3'LTR του HERV-K10, που παραχωρήθηκαν ευγενικά από τον Masao Ono, το πλασμίδιο pBSKS-EGFP-INT [386], καθώς και το πλασμίδιο pTK-Hyg [388]. Αναλυτικά, το 5'LTR κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pGEM-11Zf(-) ως θραύσμα SacI/EcoRI (~1.34 Kb) σε ορθό προσανατολισμό [(+) orientation], αφού είχε προηγουμένως ακυρωθεί («τυφλωθεί») η θέση XbaI. Το 3'LTR του ρετροϊού απομονώθηκε ως θραύσμα EcoRI/HindIII (~2 Kb) και κλωνοποιήθηκε σε αντίθετο προσανατολισμό [(-) orientation] σε φορέα κλωνοποίησης pGEM-7Zf(+). Ακολούθως, το 3'LTR μεταφέρθηκε στο pGEM-7Zf(+)-5'LTR ως θραύσμα HindIII/SacI (~1.92 Kb), σε ορθό πλέον προσανατολισμό [(+) orientation]. Σε φορέα κλωνοποίησης pBluescript II KS κλωνοποιήθηκε το θραύσμα SalI/NruI (~2 Kb) του πλασμιδίου pTK-Hyg, που φέρει την πλήρη μεταγραφική μονάδα της υδρομυκίνης, προσδίδοντας σε αυτό ανθεκτικότητα στην υδρομυκίνη B.

A**B**

Εικ. 25. Δομή λειτουργικού ανασυνδυσμένου HERV.

(A) Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυσμένου pHERV-K10*/EGFP-INT. Στην κατασκευή περιλαμβάνονται οι LTR καθώς και ορισμένες αλληλουχίες απαραίτητες για τη ρετρομετάθεση, δηλαδή η PPT, η ψ και η PBS, αλλά όχι οι κωδικές αλληλουχίες των γονιδίων gag, pol, prt και env του ρετρομεταθετού στοιχείου. (B) Προσανατολισμός ενσωματωμένης κασέτας ανίχνευσης ρετρομετάθεσης. Η διάκριση μεταξύ των δύο προσανατολισμών στους οποίους έχει ενσωματωθεί η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης μετά από πέψη με SacI. M: Δείκτης γνωστών μοριακών βαρών λ/HindIII, +: θετικός προσανατολισμός (μη επιθυμητός), -: αντίθετος προσανατολισμός (επιθυμητός).

Στη συνέχεια, τα 5'LTR-3'LTR μεταφέρθηκαν στο pBLS-Hygro B ως θραύσμα XbaI-SacI (~3.6 Kb), οπότε προέκυψε το πλασμίδιο pHygB/HERV-K10* (~8.5 Kb). Η μοναδική περιοριστική θέση NotI του pHygB/HERV-K10* που είχε συμμεταφερθεί μεταξύ των 5'LTR-3'LTR ακυρώθηκε («τυφλώθηκε») και δημιουργήθηκαν ισοτελικά άκρα με μεταχείριση Klenow. Στη θέση της εισήχθη μια νέα θέση BglII, με τη βοήθεια ειδικών συνδετικών τμημάτων που περιέχουν την αλληλουχία A|GATCT η οποία αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο περιοριστικό ένζυμο (BglII linkers).

Η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης αποτελείται από το γονίδιο EGFP που οδηγείται από τον υποκινητή CMV και καταλήγει σε ουρά tk poly-A. Το γονίδιο EGFP διακόπτεται από το γ-ιντρόνιο της σφαιρίνης, το οποίο βρίσκεται σε αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς την κωδική αλληλουχία του γονιδίου. Η κασέτα αυτή

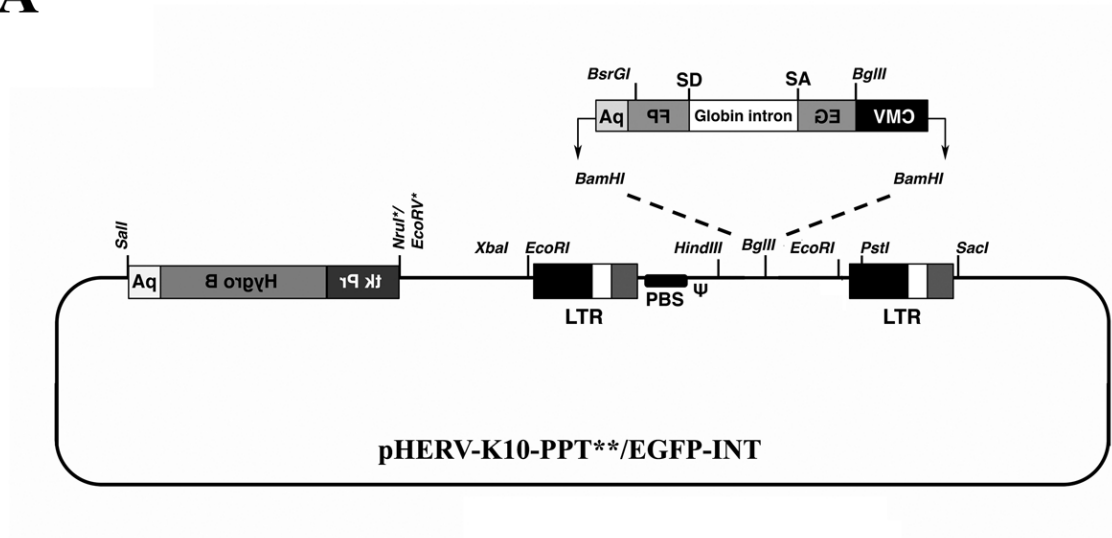
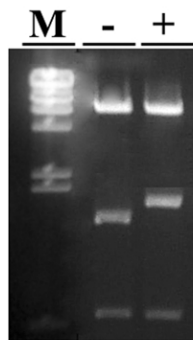
απομονώθηκε από το πλασμίδιο pBSKS-EGFP-INT και κλωνοποιήθηκε ως θραύσμα NotI/ApaI (~2.5 Kb) στα αντίστοιχα άκρα του πλασμιδιακού φορέα pGEM-11Zf(-), από όπου εξήχθη στη συνέχεια ως θραύσμα BamHI. Η περιοριστική ενδονουκλεάση BamHI αναγνωρίζει και κόβει αλληλουχίες G|GATCC. Επομένως τα άκρα των προϊόντων πέψης με BglII είναι συμβατά με εκείνα των προϊόντων μετά από πέψη με BamHI. Έτσι, λοιπόν, η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης (που είχε απομονωθεί ως θραύσμα BamHI) κλωνοποιήθηκε στη θέση BglII του πλασμιδίου pHygB/HERV-K10*, μετά από αποφωσφορυλίωση των άκρων τόσο του φορέα κλωνοποίησης όσο και του ενθέματος.

Όπως είναι λογικό, η κασέτα κλωνοποιήθηκε και προς τις δύο κατευθύνσεις σε διαφορετικά μόρια πλασμιδίων. Ο προσανατολισμός ελέγχθηκε με περιοριστική ανάλυση με το ένζυμο SacI, οπότε έγινε επιλογή των βακτηριακών στελεχών τα πλασμίδια των οποίων έφεραν την κασέτα σε αντίθετη μεταγραφική φορά σε σχέση με τα LTR του ιού (Εικ. 25B). Έτσι, προέκυψε ο pHERV-K10*/EGFP-INT (~11 Kb). Στη συγκεκριμένη κατασκευή περιλαμβάνονται ακέραια βασικά του στοιχείου της αλληλουχίας των LTR που είναι απαραίτητα για τη μετάθεση του στοιχείου, όπως η πρωμοδοτική θέση πρόσδεσης (PBS), το σήμα πακεταρίσματος ψ και η πολυουρινική περιοχή (PPT).

1.1.2. Κατασκευή ενός μη λειτουργικού για τη ρετρομετάθεση στοιχείου HERV-K10

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή ενός αντίστοιχου ανασυνδυσμένου ρετροϊού, ο οποίος όμως θα ήταν μη λειτουργικός, δηλαδή ανίκανος προς ρετρομετάθεση. Για το λόγο αυτό κατασκευάσαμε τον pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT (Εικ. 26A), από τον οποίο έχει αφαιρεθεί η απαραίτητη για την ολοκλήρωση ρετρομεταθέσεων πολυουρινική περιοχή (PPT). Η αλληλουχία των γεγονότων για την κατασκευή του pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT είναι παρόμοια με εκείνη της κατασκευής του pHERV-K10*/EGFP-INT που περιγράφηκε παραπάνω. Η ειδοποιός διαφορά είναι η ύπαρξη ενός επιπλέον βήματος για την αφαίρεση του PPT στα αρχικά στάδια της κλωνοποίησης.

Συγκεκριμένα, το 5'LTR κλωνοποιήθηκε σε πλασμίδιο pGEM-11Zf(-) ως θραύσμα SacI/EcoRI (~1.34 Kb) σε ορθό προσανατολισμό [(+) orientation], αφού είχε προηγουμένως ακυρωθεί («τυφλωθεί») η θέση XbaI. Το 3'LTR του ρετροϊού απομονώθηκε ως θραύσμα EcoRI/HindIII (~2 Kb) και κλωνοποιήθηκε σε αντίθετο προσανατολισμό [(-) orientation] σε φορέα κλωνοποίησης pGEM-7Zf(+). Μετά από αφαίρεση ολόκληρου του PPT (~380 bp) ως θραύσμα PstI, το 3'LTR-PPT** (~4.4 Kb) μεταφέρθηκε στο pGEM-7Zf(+)-5'LTR ως θραύσμα HindIII/SacI (~1.92 Kb), σε ορθό πλέον προσανατολισμό [(+) orientation]. Τα 5'LTR-3'LTR-PPT** μεταφέρθηκαν στο pBLS-Hygro B ως θραύσμα XbaI-SacI (~3.2 Kb), οπότε προέκυψε το πλασμίδιο pHygB/HERV-K10*. Η περιοριστική θέση NotI του pHygB/HERV-K10-PPT** αντικαταστάθηκε, όπως και πριν, από μια θέση BglII, όπου κλωνοποιήθηκε η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης ως θραύσμα BamHI. Ο σωστός προσανατολισμός της κασέτας στο pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT (~10.6 Kb) διαπιστώθηκε μετά από περιοριστική ανάλυση με SacI (Εικ. 26B).

A**B**

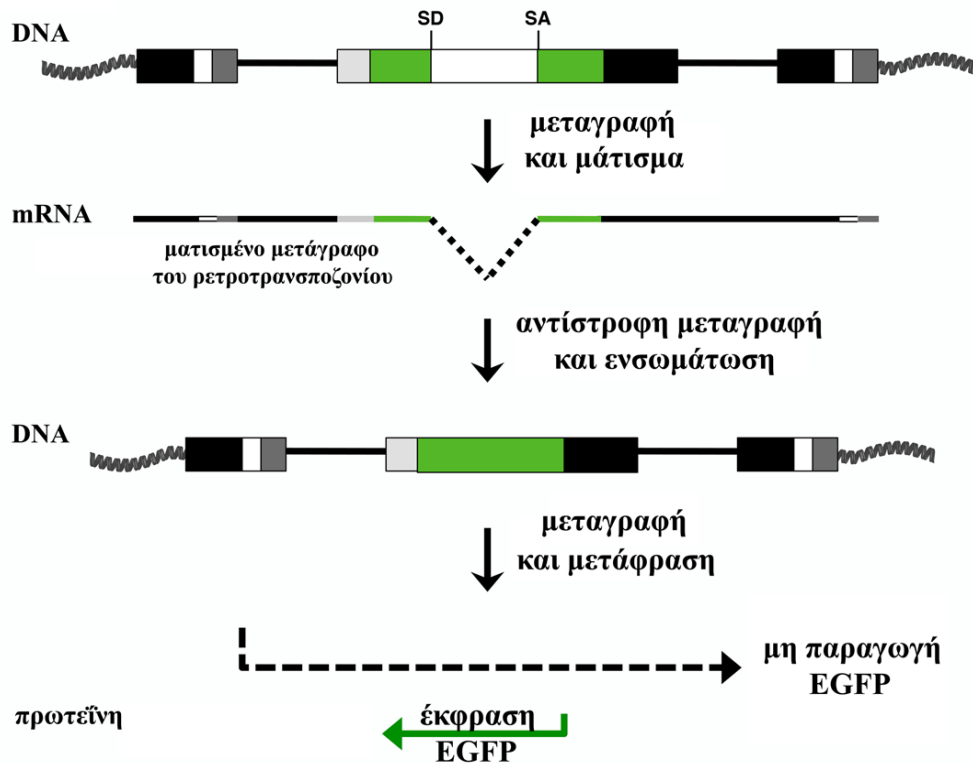
Εικ. 26. Δομή μη λειτουργικού προς ρετρομετάθεση ανασυνδυασμένου HERV. (A) Σχηματική απεικόνιση του ανασυνδυασμένου pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT. Από την κατασκευή έχει αφαιρεθεί η απαραίτητη για τη ρετρομετάθεση περιοχή PPT. (B) Προσανατολισμός ενσωματωμένης κασέτας ανίχνευσης ρετρομετάθεσης. Η διάκριση μεταξύ των δύο προσανατολισμών στους οποίους έχει ενσωματωθεί η κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης μετά από πέψη με SacI. M: Δείκτης γνωστών μοριακών βαρών λ/HindIII, +: θετικός προσανατολισμός (μη επιθυμητός), -: αντίθετος προσανατολισμός (επιθυμητός).

1.1.3. Λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης

Η λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης βασίζεται στην κλωνοποίηση της κασέτας σε αντίθετη μεταγραφική φορά ως προς εκείνη του ρετρομεταθετού στοιχείου. Όταν συμβαίνει μεταγραφή του στοιχείου, που δε συνεπάγεται απαραίτητα πραγματοποίηση γεγονότος ρετρομετάθεσης, το υβριδικό μεταγράφημα στοιχείου/κασέτας υφίσταται μάτισμα λόγω της ομόλογης μεταγραφικής φοράς του ιντρονίου, αλλά το γονίδιο της EGFP δεν εκφράζεται. Αντίθετα, μετά από αντίστροφη μεταγραφή και την ενσωμάτωση του ματισμένου μεταγραφήματος σε μια νέα θέση στο γονιδίωμα, δηλαδή μετά από κάθε γεγονός ρετρομετάθεσης, η EGFP εκφράζεται από τον υποκινητή CMV (Εικ. 27).

Οι κατασκευές pHERV-K10*/EGFP-INT και pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT αποτέλεσαν τα πειραματικά εργαλεία για τη μελέτη του φαινομένου της ρετρομετάθεσης HERV-K10 στον άνθρωπο. Η χρήση τους παρέχει τη δυνατότητα **α)**

άμεσης ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης, μέσω της έκφρασης της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP, και β) μέτρησης της συχνότητας του φαινομένου, βάσει των επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα το γονίδιο ανθεκτικότητας της υγρομυκίνης (Hygro B) εξυπηρετεί την επιλογή κυτταρικών κλώνων που φέρουν την κατασκευή, μετά από διαμόλυνση κυττάρων.



Εικ. 27. Λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης.

Σχηματική απεικόνιση της λογικής ανίχνευσης γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της παραγωγής της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP, με τη χρήση της ειδικής κασέτας ανίχνευσης EGFP. Η μεταγραφή του γονιδίου EGFP από τον υποκινητή CMV IE προϋποθέτει την πραγματοποίηση γεγονότος ρετρομετάθεσης.

1.2. ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΜΟΝΤΕΛΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ HERV-K10

Η κατασκευή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων pHERV-K10*/EGFP-INT και pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT μας παρέχει τη δυνατότητα περαιτέρω μελέτης του φαινομένου της ρετρομετάθεσης, μετά από διαμόλυνση κυτταρικών σειρών με αυτά. Προκειμένου λοιπόν να μελετηθεί διεξοδικότερα το φαινόμενο, κρίθηκε απαραίτητη η κατασκευή κυτταρικών σειρών οι οποίες εκφράζουν σταθερά το ανασυνδυασμένο στοιχείο HERV-K10.

Συγκεκριμένα, 0.25×10^6 κύτταρα HeLa, A549 και H1299, αντίστοιχα, διαμολύνθηκαν με την ανασυνδυασμένη κατασκευή pHERV-K10*/EGFP-INT. Μετά από επιλογή με 100-150 μg υγρομυκίνης ανά ml θρεπτικού υλικού για διάστημα 18 ημερών, απομονώθηκαν 15 μονήρεις ανθεκτικοί κυτταρικοί κλώνοι, καθώς επίσης και μαζικός πληθυσμός ανθεκτικών κυτταρικών κλώνων ανά περίπτωση.

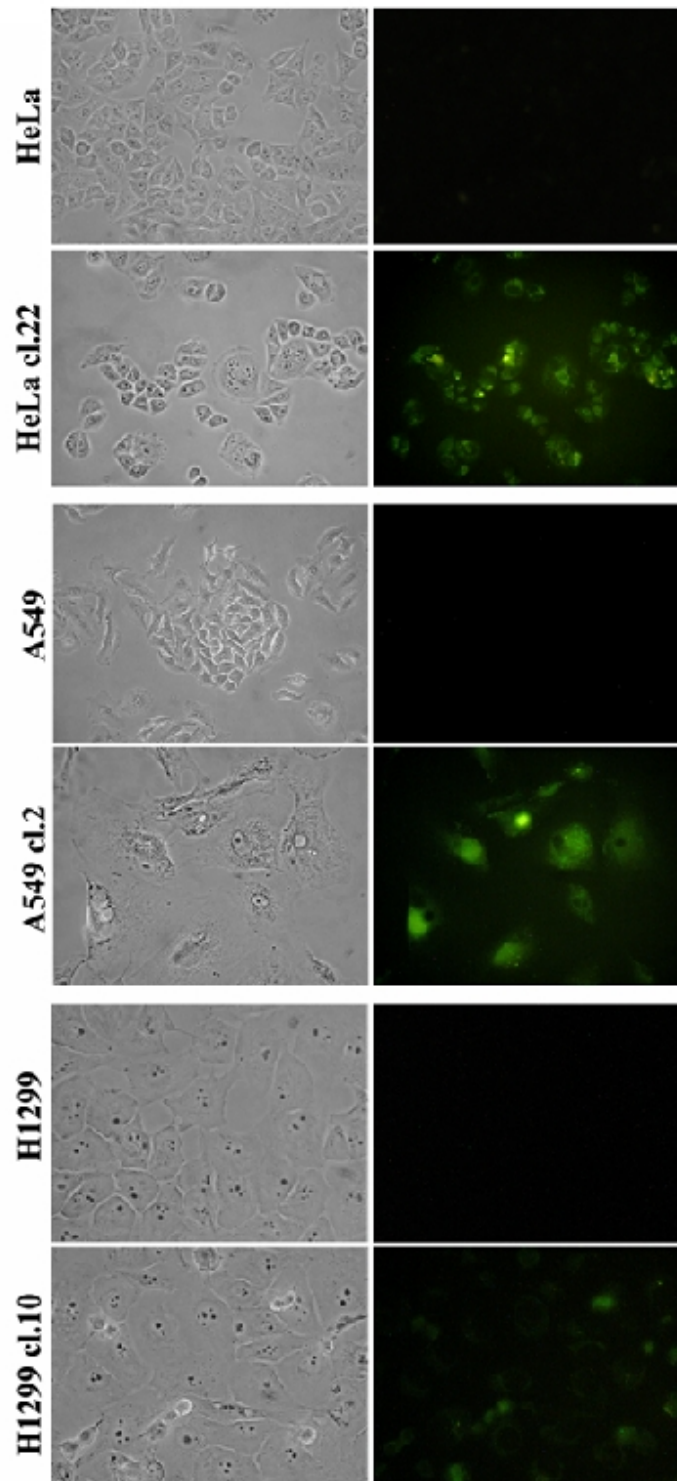
Ακολούθως, οι κυτταρικοί κλώνοι αναπτύχθηκαν περαιτέρω σε συνθήκες καλλιέργειας. Σε ορισμένους από αυτούς παρατηρήθηκε ιδιαίτερα αργή ανάπτυξη, ακόμη αύξηση του χρόνου διπλασιασμού κατά δύο φορές ή και περισσότερο σε σχέση με τα αρχικά μη διαμολυσμένα κύτταρα της αντίστοιχης κυτταρικής σειράς. Μάλιστα, το φαινόμενο αυτό ήταν ιδιαίτερα έντονο σε ορισμένους κλώνους των HeLa και στους περισσότερους μονήρεις κλώνους των A549.

1.3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ

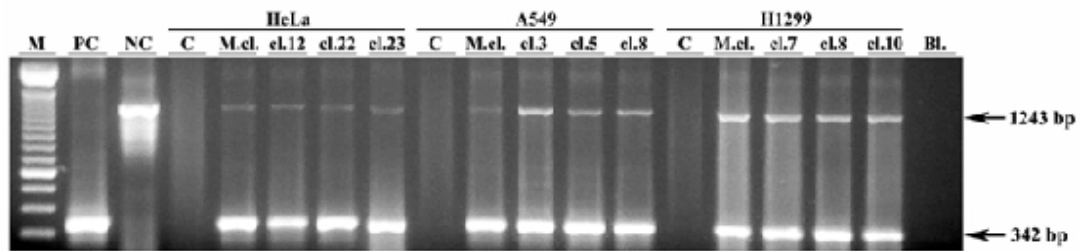
Αρχικά, η πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης εξετάστηκε σε επίπεδο κυττάρου, μέσω της παραγωγής της πράσινης φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Κύτταρα από τους απομονωμένους κυτταρικούς κλώνους αλλά και των αντίστοιχων κυτταρικών σειρών τα οποία δεν είχαν διαμολυνθεί, ως μάρτυρες, μονιμοποιήθηκαν και στη συνέχεια μελετήθηκαν με μικροσκοπία φθορισμού.

Στην περίπτωση του μη λειτουργικού για ρετρομετάθεση HERV-K10 αλλά και των κυττάρων μαρτύρων, δεν ανιχνεύθηκε έκφραση, όπως και αναμένονταν. Αντίθετα, σε κλώνους διαμολυσμένους με το δυνητικά ικανό προς ρετρομετάθεση ανασυνδυασμένο στοιχείο HERV-K10 διαπιστώθηκε έκφραση της EGFP, που σύμφωνα με τη λογική λειτουργίας της ενσωματωμένης κασέτας, υποδηλώνει την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης (Εικ. 28).

Για να επιβεβαιώσουμε τις νέες ρετρομεταθετικές ενσωματώσεις HERV-K10 σε νέες θέσεις στο γονιδίωμα, έγινε ανάλυση PCR για το γονίδιο της EGFP. Πράγματι, επιβεβαιώθηκε η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης μέσω της ανίχνευσης της διαγνωστικής για τη ρετρομετάθεση ζώνης των 342 bp σε κλώνους θετικούς σε EGFP. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε προϊόν για τα μη διαμολυσμένα κύτταρα μάρτυρα (Εικ. 29).

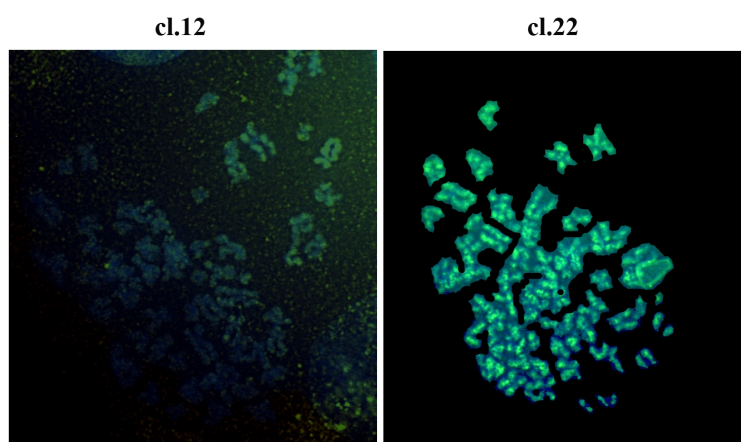


Εικ. 28. Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μικροσκοπία φθορισμού για την ανίχνευση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Ενδεικτικοί κλώνοι μετά από διαμόλυνση με το pHERV-K10*/EGFP-INT και οι αντίστοιχες μη διαμολυσμένες κυτταρικές σειρές ως μάρτυρες.



Εικ. 29. Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ανάλυση με PCR για την ανίχνευση νέων ενσωματώσεων ρετρομεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα. M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών 100 bp, PC: pEGFP-N1 ως θετικός μάρτυρας, NC: pHERV-K10*/EGFP-INT ως αρνητικός μάρτυρας, C: κύτταρα που δεν έχουν υποστεί διαμόλυση ως μάρτυρες, cl.: απομονωμένοι κλώνοι κυττάρων διαμολυσμένων με το HERV-K10*/EGFP-INT: μαζικοί και μονήρεις κλώνοι κυττάρων. Η ζώνη 342 bp είναι διαγνωστική για την παρουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v).

Στη συνέχεια επιχειρήθηκε η ανίχνευση των αντιγράφων του HERV-K10 και ο εντοπισμός πιθανών διαφορών στον αριθμό αντιγράφων του συγκεκριμένου στοιχείου μεταξύ διαφορετικών κλώνων σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. Γι' αυτό το λόγο παρασκευάστηκαν μεταφασικά χρωμοσώματα κυττάρων των κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.12 και cl.22 στους οποίους ανιχνεύθηκαν με FACS μηδενικά και ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα γεγονότων ρετρομετάθεσης, αντίστοιχα. Με τη χρήση ανιχνευτή ειδικού για τα HERV-K10 ο οποίος είχε σημαθεί με FITC μέσω PCR, πραγματοποιήθηκε FISH σε μεταφασικά χρωμοσώματα. Στην Εικόνα 30 φαίνεται το αποτέλεσμα της ανάλυσης FISH, όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών κλώνων. Η πλειάδα των σημάτων που ανιχνεύθηκαν πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι ο ανιχνευτής είναι ειδικός για αλληλουχίες LTR του στοιχείου, επομένως, αναγνωρίζονται τόσο πλήρους μήκους όσο και ελλειμματικοί ρετροϊοί, καθώς επίσης και solo LTR. Πιθανώς θα μπορούσε να γίνει ανάλυση σε επιμηκυσμένες χρωματίδες για μεγαλύτερη ανάλυση.



Εικ. 30. Ανάλυση FISH για την ανίχνευση αλληλουχιών HERV-K10. Ανίχνευση αντιγράφων HERV-K10 στα χρωμοσώματα αντιπροσωπευτικών κλώνων HeLa-pHERV-K10*/EGFP-INT.

Επίσης, επιχειρήθηκε ο εντοπισμός των νέων ενσωματώσεων του HERV-K10*/EGFP-INT στους ίδιους κλώνους, χρησιμοποιώντας ειδικούς ανιχνευτές για το γονίδιο EGFP, αλλά κάτι τέτοιο δεν κατέστη εφικτό λόγω τεχνικών δυσκολιών.

Συνολικά, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν ότι πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου.

1.4. Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10

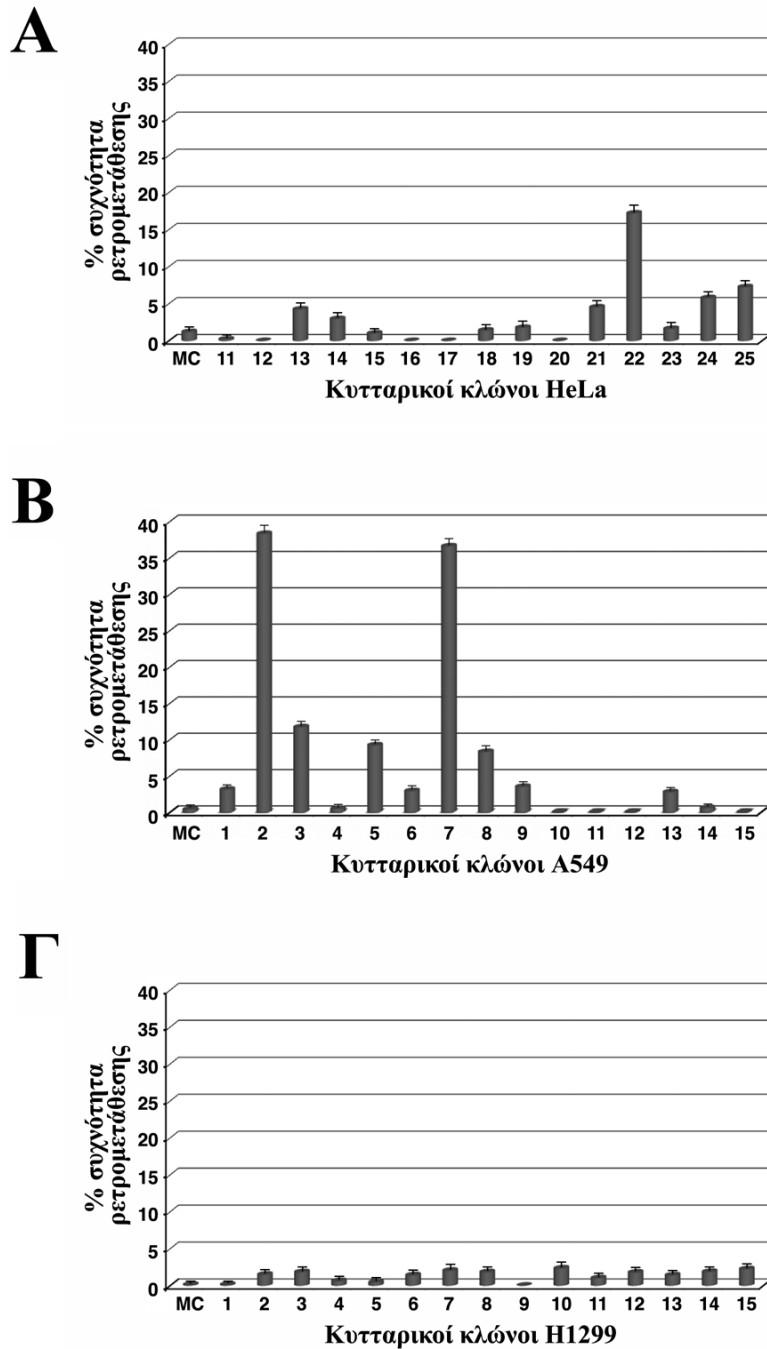
Η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης μας ώθησε να μελετήσουμε πως μεταβάλλεται η συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 τόσο μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών όσο και μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών κλώνων.

Για το σκοπό αυτό πραγματοποιήθηκε κυτταρομετρία φθορισμού. Συγκεκριμένα, μετρήθηκε η ένταση φθορισμού διαφορετικών κυτταρικών κλώνων, χρησιμοποιώντας δείγματα 20,000 κυττάρων ανά περίπτωση. Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν τα αντίστοιχα μη διαμολυσμένα κύτταρα HeLa, A549 και H1299. Τα κατώφλια για τον προσδιορισμό του ποσοστού των EGFP-φθορίζοντων κυττάρων ορίστηκαν βάσει της κατανομής έντασης φθορισμού στο μάρτυρα. Αναλυτικά, το 99.6% των κυττάρων θεωρούνται αρνητικά, καθώς αντιστοιχούν στον αυτοφθορισμό της δεδομένης κυτταρικής σειράς, ενώ το υπόλοιπο 0.4% των κυττάρων λαμβάνονται ως λανθασμένα θετικά. Τα δεδομένα της μέτρησης έδειξαν ότι οι κατανομές φθορισμού των κυττάρων που έχουν διαμολυνθεί με το ανασυνδυασμένο λειτουργικό HERV-K10 μετατοπίζονται σε υψηλότερες τιμές έντασης φθορισμού, οι οποίες αντιστοιχούν σε υψηλές συχνότητες ρετρομετάθεσης. Συγκεκριμένα η συχνότητα της ρετρομετάθεσης κυμάνθηκε σε τιμές μέχρι και 17.2% για τα κύτταρα HeLa, έφτασαν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έως και 38.3% για τα A549, ενώ στην περίπτωση των H1299 κυμάνθηκαν σε χαμηλότερες τιμές και συγκεκριμένα μέχρι 2.3% (Εικ. 31, 32).

Χαρακτηριστικό είναι ακόμη το εύρημα ότι – και στις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν – οι 11 από τους 15 μονήρεις κλώνους που απομονώθηκαν και αναλύθηκαν ήταν θετικοί για ρετρομετάθεση (Εικ. 31).

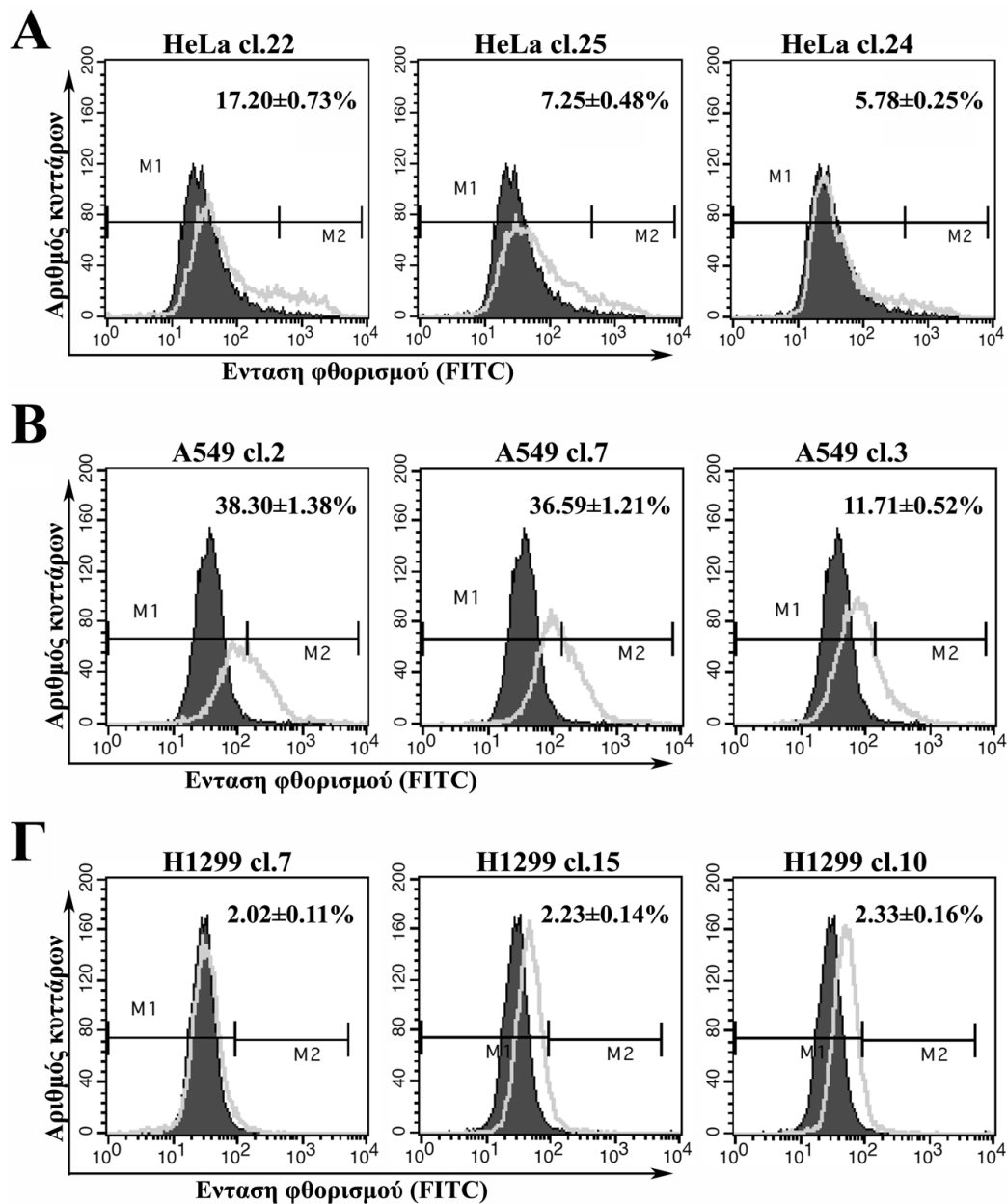
Όπως παρατηρήθηκε, η συχνότητα ρετρομετάθεσης στα κύτταρα A549 είναι υψηλότερη συγκριτικά με αυτή των κυττάρων HeLa, ενώ η συχνότητα ρετρομετάθεσης στα H1299 κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Το γεγονός αυτό πιθανώς οφείλεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των εν λόγω κυτταρικών σειρών. Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι κλώνοι HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 αλλά και A549-HERV-K10*/EGFP-INT cl.2, cl.3 και cl.7 που εμφάνισαν τα υψηλότερα επίπεδα ρετρομετάθεσης ήταν εκείνοι στους οποίους είχε παρατηρηθεί μεγαλύτερη αναστολή του διπλασιασμού τους. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του χρόνου διπλασιασμού στο σύνολο των κλώνων H1299-HERV-K10, στους οποίους και η συχνότητα ρετρομετάθεσης κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα.

Τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συμβαίνει σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές, γεγονός που συνοδεύεται από αναστολή του διπλασιασμού των κυττάρων.



Εικ. 31. Συχνότητα ρετρομετάθεσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μέτρηση με FACS της συχνότητας ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10 σε μονήρεις κλώνους και μαζικούς πληθυσμούς κυττάρων που απομονώθηκαν από καρκινικές κυτταρικές σειρές ανθρώπου μετά από διαμόλυνση με το πλασμίδιο pHERV-K10*/EGFP-INT. Ραβδογράμματα τιμών συχνότητας ρετρομετάθεσης κυτταρικών κλώνων κυττάρων (A) HeLa, (B) A549 και (Γ) H1299.

Τα κύτταρα των κλώνων που ελέγχονται των οποίων η ένταση φθορισμού είναι μετατοπισμένη πέραν των κατωφλίων που έχουν καθοριστεί θεωρούνται θετικά. Επομένως, το καθαρό ποσοστό των θετικών κυττάρων υπολογίζεται αφαιρώντας το ποσοστό των λανθασμένα θετικών κυττάρων (0.4%) από το ποσοστό που προκύπτει από την μέτρηση με FACS και την ανάλυση των δεδομένων. Οι τιμές συχνότητας της ρετρομετάθεσης αντιπροσωπεύουν τον μέσο όρο δύο δειγμάτων δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, ενώ φαίνονται και τα τυπικά σφάλματα.



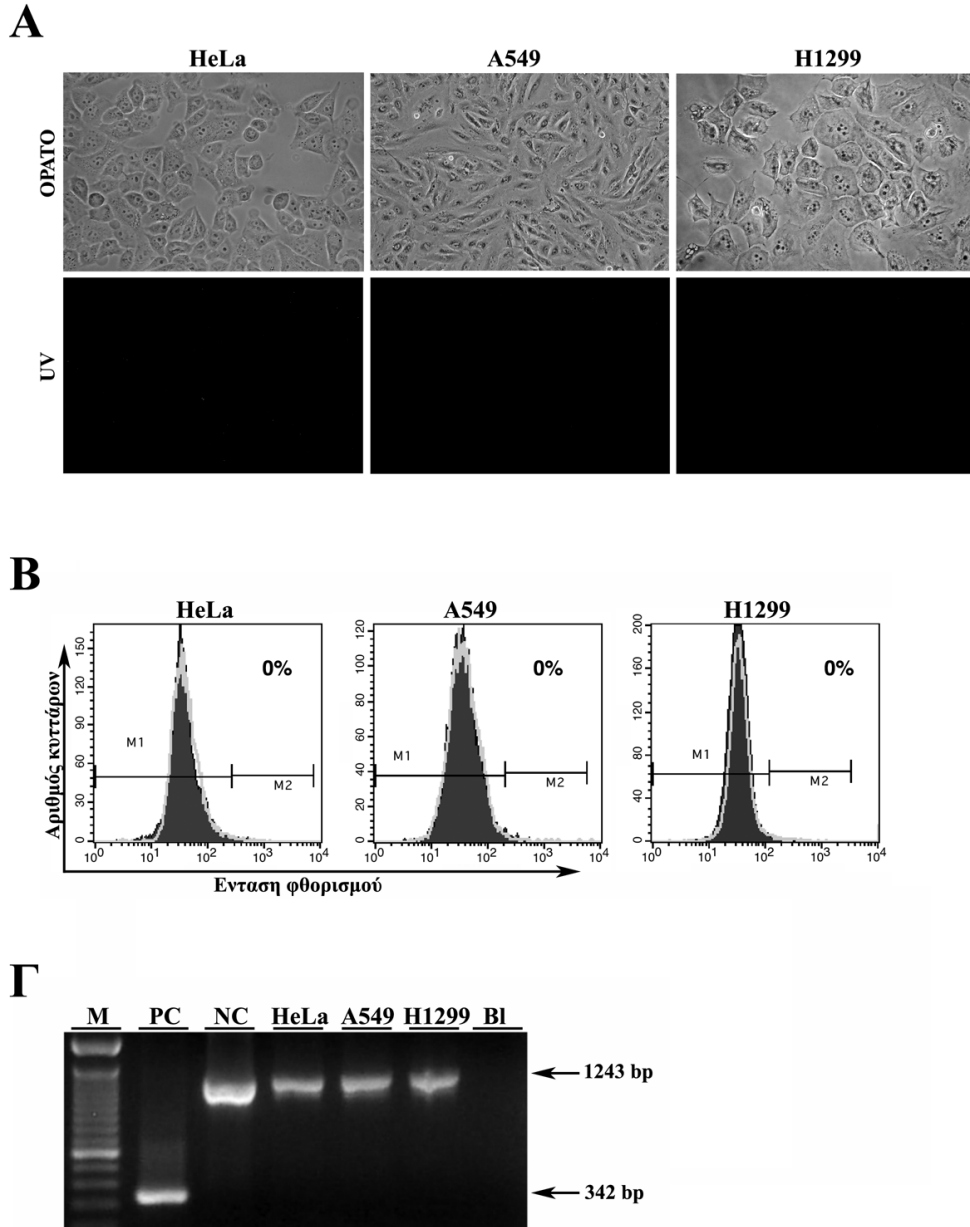
Εικ. 32. Συχνότητα ρετρομετάθεσης ενδεικτικών κλώνων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επικαλύψεις ιστογραμμάτων κατανομής φθορισμού κυττάρων μάρτυρα κυττάρων (Α) HeLa, (Β) A549 και (Γ) H1299 (μαύρο περίγραμμα) με τις αντίστοιχες ενδεικτικών εξεταζόμενων κλώνων (γκρι περίγραμμα). M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και λανθασμένα θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Το αναγραφόμενο % ποσοστό αντιπροσωπεύει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των επιμέρους κλώνων.

1.5. Η ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η έκφραση EGFP που ανιχνεύεται οφείλεται πράγματι στην πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης, κατασκευάσαμε ένα αντίστοιχο μεταλλαγμένο ανασυνδυασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο, από το οποίο όμως είχε αφαιρεθεί η ειδική για τη ρετρομετάθεση περιοχή PPT. Πράγματι σε κυτταρικές σειρές HeLa, A549 και H1299 δεν ανιχνεύθηκε παραγωγή EGFP, άρα και πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ανασυνδυασμένου στοιχείου. Το αποτέλεσμα επιβεβαιώθηκε σε κυτταρικό επίπεδο μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και FACS, αλλά και σε επίπεδο γονιδιώματος, αφού ανιχνεύθηκε η ζώνη των 1,243 bp, αλλά όχι και η διαγνωστική ζώνη των 342 bp (Εικ. 33).

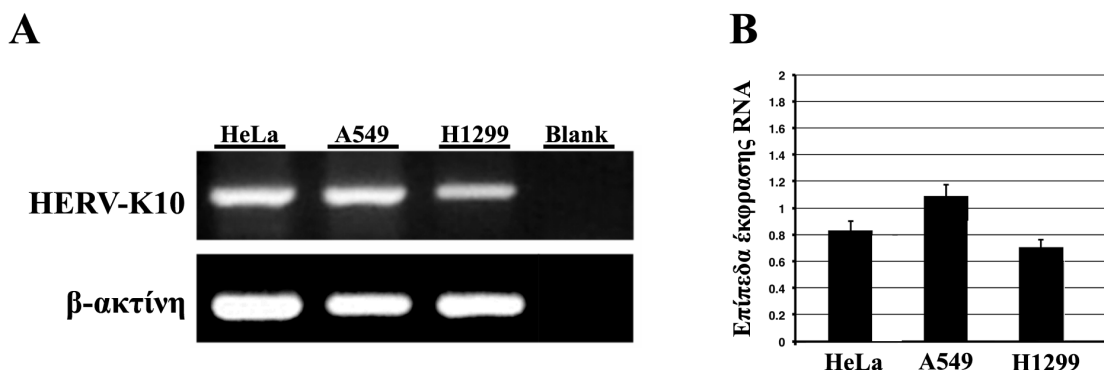
Επομένως, η παραγωγή EGFP που παρατηρήθηκε στην περίπτωση του pHERV-K10*/EGFP-INT οφείλεται σε γεγονότα ρετρομετάθεσης του συγκεκριμένου ανασυνδυασμένου στοιχείου και η παρουσία όλων των απαραίτητων για τη ρετρομετάθεση αλληλουχιών στο pHERV-K10*/EGFP-INT συμβάλλει καθοριστικά στην ολοκλήρωση της μετάθεσης του στοιχείου.

Στη συνέχεια θελήσαμε να διαπιστώσουμε αν τα γεγονότα αυτά επιβεβαιώνονται και με την παρουσία ειδικών μεταγραφημάτων HERV-K10, στοιχείο απαραίτητο για την ολοκλήρωση της ρετρομετάθεσης. Μετά από απομόνωση RNA και RT-PCR σε κύτταρα HeLa, A549 και H1299 διαπιστώθηκε η έκφραση των HERV-K10 στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές σε επίπεδο RNA (Εικ. 34A). Μάλιστα, μετά από ποσοτικοποίηση των επιπέδων έκφρασης των HERV-K10 και κανονικοποίηση βάσει των επιπέδων έκφρασης μεταγραφημάτων της β-ακτίνης, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα έκφρασης των HERV-K10 είναι αντίστοιχα των συχνοτήτων ρετρομετάθεσης που ανιχνεύθηκαν στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, δηλαδή A549>HeLa>H1299 (Εικ. 34B).



Εικ. 33. Μη ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης με τη χρήση του pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT.

(A) Μικροσκοπία φθορισμού για την ανίχνευση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Ενδεικτικοί κλώνοι μετά από διαμόλυνση με το pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT. (B) Κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP ρετρομετάθεσης ενδεικτικών κλώνων σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Επικαλύψεις ιστογραμμάτων κατανομής φθορισμού κυττάρων μάρτυρα κυττάρων HeLa, A549 και H1299 (μαύρο χρώμα) με τις αντίστοιχες ενδεικτικών εξεταζόμενων κλώνων (γκρι περίγραμμα). M1, M2: κατώφλια έντασης φθορισμού αρνητικών και λανθασμένα θετικών κυττάρων, αντίστοιχα. Το αναγραφόμενο % ποσοστό αντιπροσωπεύει τη συχνότητα ρετρομετάθεσης των επιμέρους κλώνων. (Γ) Ανάλυση με PCR για την ανίχνευση νέων ενσωματώσεων ρετρομεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα απομονωμένων κλώνων κυττάρων HeLa, A549 και H1299 διαμολυσμένων με το HERV-K10-PPT**/EGFP-INT. M: μάρτυρας γνωστών μοριακών βαρών 100 bp, PC: pEGFP-N1 ως θετικός μάρτυρας, NC: pHERV-K10*/EGFP-INT ως αρνητικός μάρτυρας, Η ζώνη 342 bp είναι διαγνωστική για την παρουσία γεγονότων ρετρομετάθεσης. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v).



Εικ. 34. Έκφραση HERV-K10 σε επίπεδο RNA. (A) RT-PCR σε κύτταρα HeLa, A549 και H1299 για την έκφραση HERV-K10 και β-ακτίνης σε επίπεδο RNA. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v). (B) Ποσοτικοποίηση επιπέδων έκφρασης HERV-K10 μετά από κανονικοποίηση βάσει των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης.

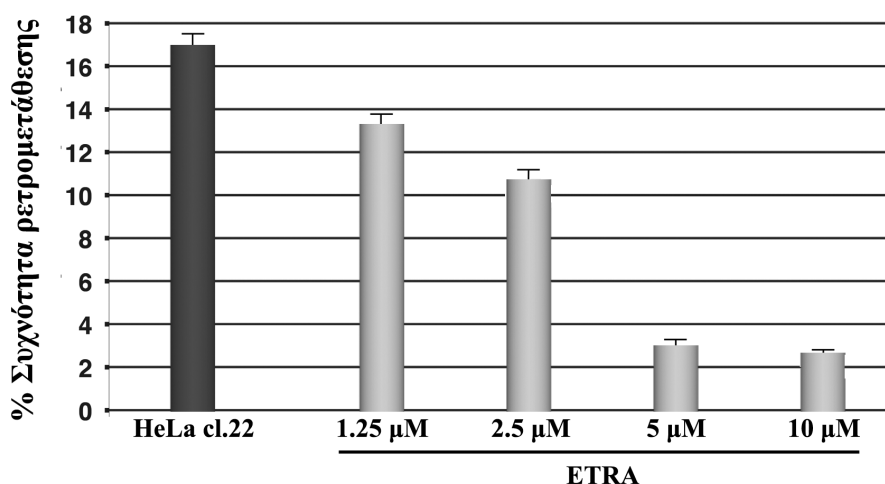
1.6. Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΑΝΑΣΤΟΛΕΑ ΕΤΡΑΒΙΡΙΝΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΩΝ ΟΔΗΓΕΙ ΣΕ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΗΣ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

Η συμμετοχή των αντίστροφων μεταγραφασών στην πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης είναι κρίσιμης σημασίας. Θελήσαμε, λοιπόν, να μελετήσουμε την επίδραση στο φαινόμενο της χρήσης ενός γνωστού αναστολέα της δράσης των αντίστροφων μεταγραφασών, της ετραβιρίνης.

Συγκεκριμένα, έγινε επώαση 1×10^6 κυττάρων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT c1.22 με αυξανόμενες συγκεντρώσεις (1.25, 2.5, 5 και 10 mM) ετραβιρίνης για 24 ώρες. Ακολούθησε μέτρηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης με FACS και τα αποτελέσματα του πειράματος δίνονται στην Εικ. 35. Παρατηρήσαμε ότι υπό την επίδραση του αναστολέα των RTασών σημειώνεται αντίστοιχη μείωση της συχνότητας γεγονότων ρετρομετάθεσης, η οποία μάλιστα εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναστολέα. Έτσι λοιπόν, ανιχνεύθηκε μείωση της παρατηρούμενης συχνότητας ρετρομετάθεσης κατά 1.3 έως και 7.7 φορές, ή με άλλα λόγια από 23% μέχρι και 87%, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναστολέα. Μάλιστα, σε συγκεντρώσεις ετραβιρίνης μεταξύ 5 και 10 mM φαίνεται να εμφανίζεται ένα πλατώ σε σχέση με την επίδραση του συγκεκριμένου αναστολέα ως προς τη δυνατότητα μείωσης των επιπέδων ρετρομετάθεσης λόγω αναστολής των RTασών (Εικ. 35).

Επομένως, η έκφραση και η δράση μιας ενεργής αντίστροφης μεταγραφάσης είναι απαραίτητη για την ολοκλήρωση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ανασυνδυασμένου στοιχείου HERV-K10 σε καρκινικά κύτταρα.

Σε επόμενο βήμα θελήσαμε να διαπιστώσουμε την προέλευση του ενζύμου που συμμετέχει στην ρετρομετάθεση των HERV-K10.



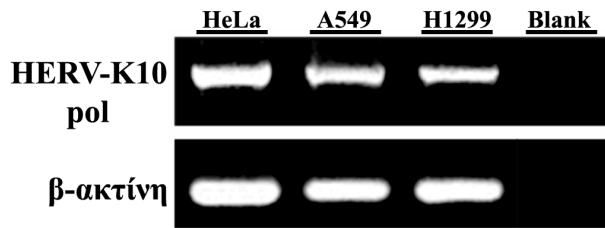
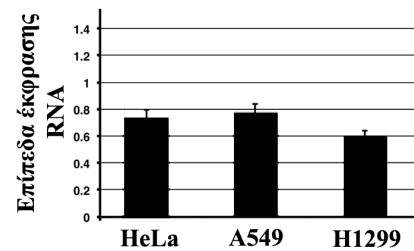
Εικ. 35. Αναστολή ρετρομετάθεσης μετά από επίδραση με ετραβιρίνη. Συχνότητα γεγονότων ρετρομετάθεσης στον κλώνο HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 μετά από επίδραση με αυξανόμενες συγκεντρώσεις ετραβιρίνης για 24 ώρες.

1.7. Η ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΤΩΝ HERV-K10 ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΕΙΤΑΙ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΗΣ ΕΙΔΙΚΗΣ ΓΙΑ ΤΑ HERV-K10

Όπως είναι γνωστό πολλά LTR ρετροτρανσποζόνια χρησιμοποιούν ενεργότητες αντίστροφης μεταγραφάσης που κωδικοποιούνται από τα ίδια. Μάλιστα, τα HERV-K10 φέρουν λειτουργικά γονίδια *pol* που κωδικοποιούν για αντίστροφη μεταγραφάση. Έτσι λοιπόν αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το ενδεχόμενο η RT που χρησιμοποιείται από το HERV-K10 που μελετούμε να είναι ενεργότητα που κωδικοποιείται από κάποιο HERV-K10.

Σε αυτά τα πλαίσια, πραγματοποιήθηκε RT-PCR με εκκινήτες για το γονίδιο *pol* των HERV-K10 με RNA από κύτταρα HeLa, A549 και H1299 (Εικ. 36). Πράγματι, ανιχνεύθηκε η έκφραση HERV-K10-*pol* και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα, τα οποία επίσης συνάδουν με τα αντίστοιχα επίπεδα συχνότητας ρετρομετάθεσης αλλά και έκφρασης σε επίπεδο RNA των HERV-K10 που ανιχνεύθηκαν σε αυτές τις κυτταρικές σειρές (ενότητες 1.4. Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10 και 1.5. Η ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10). Συγκεκριμένα, και σε αυτήν περίπτωση τα επίπεδα έκφρασης στις τρεις κυτταρικές σειρές είναι κατά μειούμενη ένταση A549>HeLa >H1299 (Εικ. 36).

Συνολικά, τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ότι συμβαίνουν γεγονότα ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές. Μάλιστα, ανάλογα με τη φύση της κάθε συγκεκριμένης κυτταρικής σειράς, σε πολλές περιπτώσεις η συχνότητα των γεγονότων ρετρομετάθεσης φτάνει σε πολύ υψηλά επίπεδα. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι ακόμη το εύρημα ότι η πραγματοποίηση των γεγονότων αυτών γίνεται μέσω της έκφρασης ενεργότητας αντίστροφης μεταγραφάσης ειδικής για τα HERV-K10 από τα ενδογενή στοιχεία του κυττάρου.

A**B**

Εικ. 36. Έκφραση RT-pol των HERV-K10 σε επίπεδο RNA.

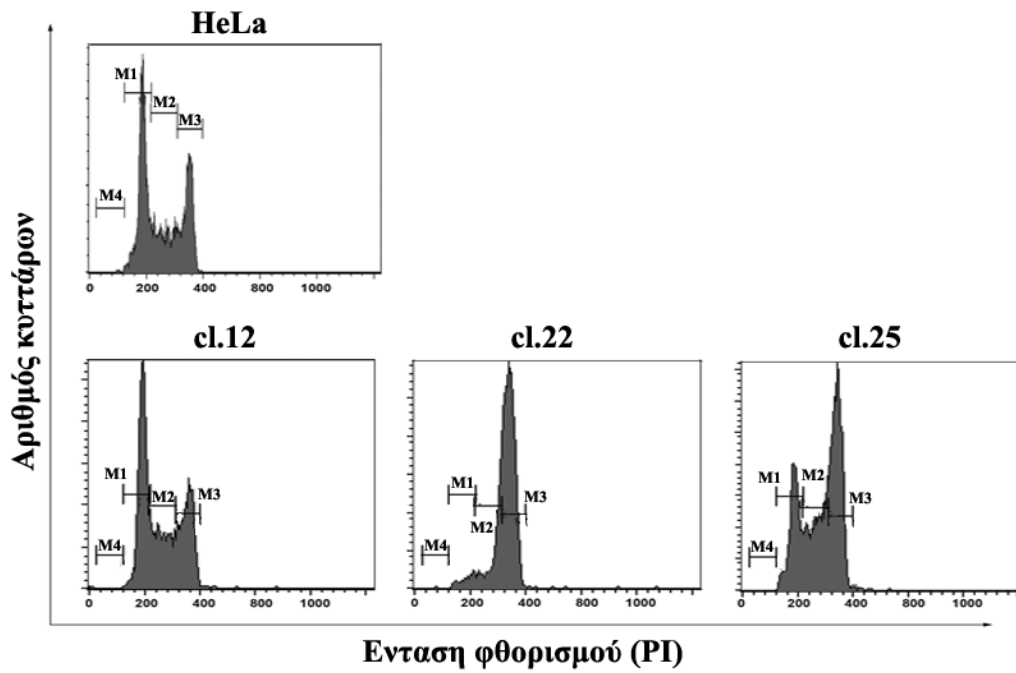
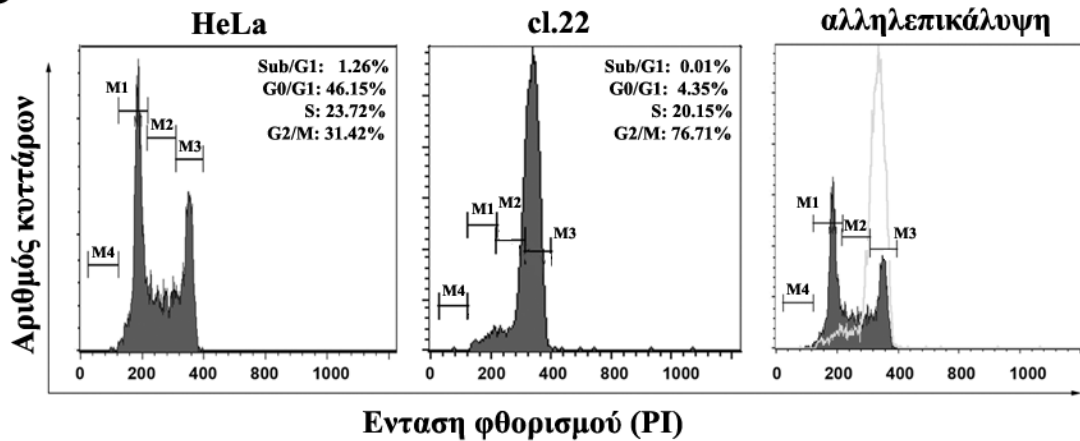
(A) RT-PCR σε κύτταρα HeLa, A549 και H1299 για την έκφραση της RT-pol των HERV-K10 και β-ακτίνης σε επίπεδο RNA. Ο διαχωρισμός των προϊόντων της αντίδρασης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (w/v). (B) Ποσοτικοποίηση επιπέδων έκφρασης HERV-K10 μετά από κανονικοποίηση βάσει των επιπέδων έκφρασης της β-ακτίνης.

1.8. Η ΠΡΑΓΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10 ΣΕ ΜΕΓΑΛΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΣΥΣΧΕΤΙΖΕΤΑΙ ΜΕ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω (ενότητα 1.4. Η ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ HERV-K10), παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου διπλασιασμού πολλών απομονωμένων κλώνων. Μάλιστα, ο ρυθμός διπλασιασμού μειωνόταν με την αύξηση της συχνότητας ρετρομετάθεσης. Με αφορμή αυτές τις παρατηρήσεις, αποφασίσαμε να εξετάσουμε την πιθανή συσχέτιση μεταξύ διαταραχών του κυτταρικού κύκλου και των υψηλών επιπέδων ρετρομετάθεσης.

Προς αυτή την κατεύθυνση, αναλύσαμε τον κυτταρικό κύκλο απομονωμένων κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.12, cl.22 και cl.25, στους οποίους παρατηρήθηκαν διαφορετικά επίπεδα γεγονότων ρετρομετάθεσης. Συγκεκριμένα, κύτταρα των κλώνων αναπτύχθηκαν σε συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας και δείγμα 20,000 κυττάρων αναλύθηκε με FACS για την κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου, χρησιμοποιώντας ως μάρτυρα μη διαμολυσμένα κύτταρα HeLa (Εικ. 37A).

Η ανάλυση για την κατανομή των φάσεων του κυτταρικού κύκλου κατέδειξε διαταραχή της κατανομής των κυττάρων στις διάφορες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα είναι η παρατήρηση ότι καθώς αυξάνονται τα επίπεδα ρετρομετάθεσης που έχουν ανιχνευθεί σε κάποιο κλώνο αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων του κλώνου που συσσωρεύονται στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου. Μάλιστα στην περίπτωση του HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 που παρουσίαζε τα υψηλότερα ποσοστά ρετρομετάθεσης μεταξύ των κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT, ο πληθυσμός των κυττάρων στη φάση G2/M αυξάνεται δραματικά, φτάνοντας σε ποσοστό 76.71%. Δηλαδή υπερβαίνει κατά 2.5 περίπου φορές το αντίστοιχο ποσοστό (31.42%) των κυττάρων μάρτυρα που βρίσκονται στην ίδια φάση (Εικ. 37B).

A**B**

Εικ. 37. Κατανομή φάσεων κυτταρικού κύκλου κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT. Προσδιορισμός της κατανομής των φάσεων του κυτταρικού κύκλου ενδεικτικών κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT με FACS. (A) Ιστογραμματικές κατανομές φθορισμού των φάσεων του κυτταρικού κύκλου κυττάρων μάρτυρα HeLa και των εξεταζόμενων κλώνων. (B) Αλληλεπικάλυψη κατανομών φθορισμού κυτταρικού κλώνου HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl. 22 (γκρι περίγραμμα) και μάρτυρα (μαύρο περίγραμμα). Τα αναγραφόμενα % ποσοστά αντιπροσωπεύουν τους πληθυσμούς κυττάρων ανά φάση του κυτταρικού κύκλου. M4: Sub-G1, M1: G0/G1, M2: S, M3: G2/M.

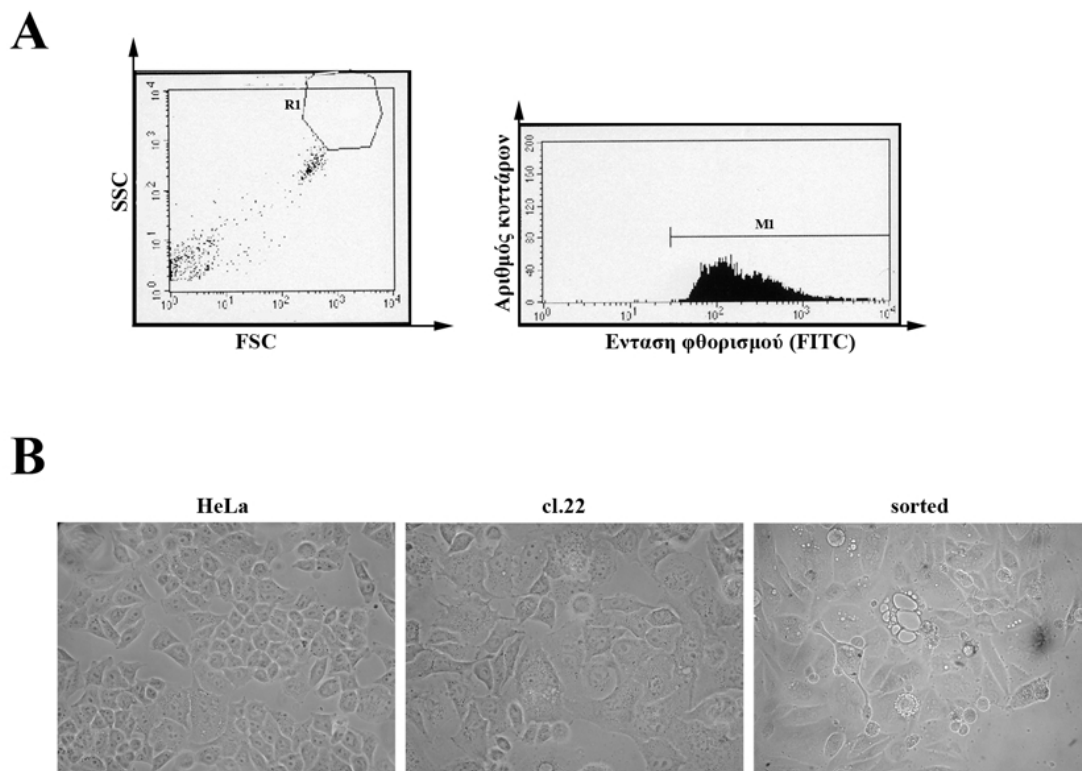
Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι αυξημένα ποσοστά γεγονότων ρετρομετάθεσης του HERV-K10 συσχετίζονται με διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα συσσώρευση μεγάλου αριθμού κυττάρων στη G2/M.

Για να διαπιστώσουμε αν πράγματι υπήρχε αυξημένο ποσοστό κυττάρων στη μετάφαση θελήσαμε να απομονώσουμε μεταφασικά χρωμοσώματα χωρίς την προσθήκη κολχικίνης στο μέσο καλλιέργειας. Πράγματι, παρατηρήθηκε μεγάλος αριθμός μεταφάσεων (high metaphase content) στο παρασκεύασμα, σε επίπεδα αντίστοιχα των παρασκευασμάτων στα οποία είχε χρησιμοποιηθεί κολχικίνη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συσχετίζεται με συσσώρευση κυττάρων στη μίτωση και πιθανώς παύση της πορείας του κυτταρικού κύκλου στη φάση αυτή σε καρκινικά κύτταρα.

1.9. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΕ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ

Για να καταστεί δυνατή η περαιτέρω παρατήρηση των θετικών σε ρετρομετάθεση κυττάρων έγινε διαχωρισμός των EGFP-φθορίζοντων κυττάρων με FACS (Εικ. 38A). Τα κύτταρα αυτά, αφού διαχωρίστηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες, καλλιεργήθηκαν για ιδιαίτερα μεγάλο χρονικό διάστημα, καθώς ο ρυθμός διπλασιασμού του ήταν δραματικά χαμηλός. Τα κύτταρα αυτά αποτέλεσαν ένα νέο κυτταρικό μοντέλο μελέτης των επιπτώσεων της ρετρομετάθεσης HERV-K10, τα HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted (Εικ. 38B).



Εικ. 38. Διαχωρισμός κυττάρων θετικών σε ρετρομετάθεση.

(A) Επιλογή και διαχωρισμός EGFP-φθορίζοντων κυττάρων με FACS. Αριστερά: Τα θετικά σε ρετρομετάθεση κύτταρα επιλέγονται βάσει της διόδου R1 (gate). Δεξιά: Η κατανομή των διαχωρισμένων κυττάρων μετά τον ορισμό του κατωφλίου φθορισμού των θετικών κυττάρων (M1). (B) Καλλιεργημένα κύτταρα μάρτυρα HeLa, αρχικού κλώνου HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 και διαχωρισμένων κυττάρων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted.

1.10. Η Ν-ΑΚΕΤΥΛΟ-ΚΥΣΤΕΪΝΗ ΑΝΑΣΤΡΕΦΕΙ ΤΗΝ ΕΠΑΓΩΜΕΝΗ ΑΠΟ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ ΑΝΑΣΤΟΛΗ ΤΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω οι κλώνοι A549-HERV-K10*/EGFP-INT cl.2, cl.3 και cl.7 παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ρετρομεταθέσεων, ενώ ο διαχωρισμένος κυτταρικός πληθυσμός HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted πολλαπλασιάζονταν σε δραματικά χαμηλούς ρυθμούς.

Έχει αναφερθεί ο βασικός ρόλος του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από δραστικές μορφές οξυγόνου στις επαγόμενες από ρετρομετάθεση διαταραχές του κυτταρικού κύκλου και συγκεκριμένα στον κυτταρικό θάνατο [389]. Προκειμένου λοιπόν να διασώσουμε τους συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς, αποφασίσαμε να χρησιμοποιήσουμε τη Ν-ακετυλο-κυστεΐνη (NAC), θειόλη που αποτελεί πηγή σουλφιδρυλικών ομάδων στα κύτταρα. Η NAC έχει ρόλο εκκαθαριστή δραστικών μορφών οξυγόνου μέσω της αλληλεπίδρασής της είτε με το υπεροξείδιο του υδρογόνου είτε με ρίζες υδροξυλίου.

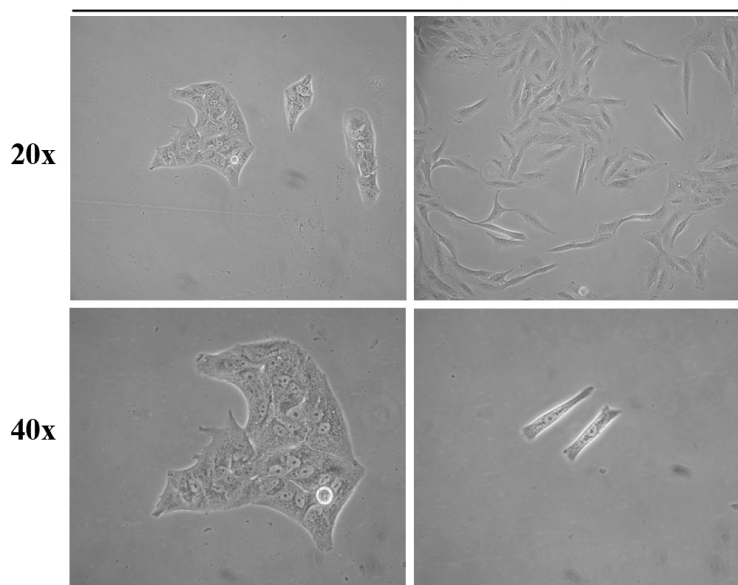
Έτσι λοιπόν, οι κλώνοι A549-HERV-K10*/EGFP-INT cl.2, cl.3 και cl.7 και ο κυτταρικός πληθυσμός HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted καλλιεργήθηκαν για παρατεταμένο χρονικό διάστημα παρουσία 6 και 4 mM NAC, αντίστοιχα, αλλά και απουσία NAC. Παρατηρήθηκε ανάπτυξη των κυττάρων παρουσία NAC, ενώ αντίθετα τα κύτταρα απουσία NAC δεν κατάφεραν να αναπτυχθούν. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι σε κάθε περίπτωση, οι κλώνοι A549-HERV-K10*/EGFP-INT καλλιεργήθηκαν για τουλάχιστον 1 εβδομάδα απουσία NAC πριν από τη μέτρηση συχνότητας ρετρομετάθεσης, προκειμένου να μην επηρεαστούν τα αποτελέσματα.

Επομένως, η NAC φαίνεται πως αναστρέφει την αναστολή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από τα υψηλά επίπεδα ρετρομετάθεσης.

1.11. ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΣΕ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΑΡΟΥΣΙΑΖΟΥΝ ΙΔΙΑΙΤΕΡΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Στη συνέχεια, θελήσαμε να προσδιορίσουμε τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των κυττάρων στα οποία παρατηρούνται υψηλά επίπεδα ρετρομετάθεσης. Στην Εικόνα 38 παρατηρούνται κύτταρα A549 των κλώνων 2 και 7, στους οποίους παρατηρήθηκαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα ρετρομετάθεσης HERV-K10. Τα κύτταρα των δύο κλώνων παρουσιάζουν δυο διακριτούς αντιπροσωπευτικούς κυτταρικούς φαινοτύπους. Συγκεκριμένα, στην πρώτη περίπτωση (Εικ. 39 αριστερά) παρατηρείται η δημιουργία σχηματισμών – κυτταρικών συσσωματωμάτων, που περιβάλλονται από σχετικά επιμηκυσμένα κύτταρα, ενώ στο κέντρο του σχηματισμού τα κύτταρα είναι πιο στρογγυλά και μοιάζουν περισσότερο με τα τυπικά κύτταρα A549. Στη δεύτερη περίπτωση (Εικ. 39 δεξιά) όλα τα κύτταρα είναι ιδιαίτερα επιμηκυσμένα και αναπτύσσονται σε όλη την επιφάνεια καλλιέργειας χωρίς να δημιουργούν συσσωματώματα.

A549-HERV-K10*/EGFP-INT

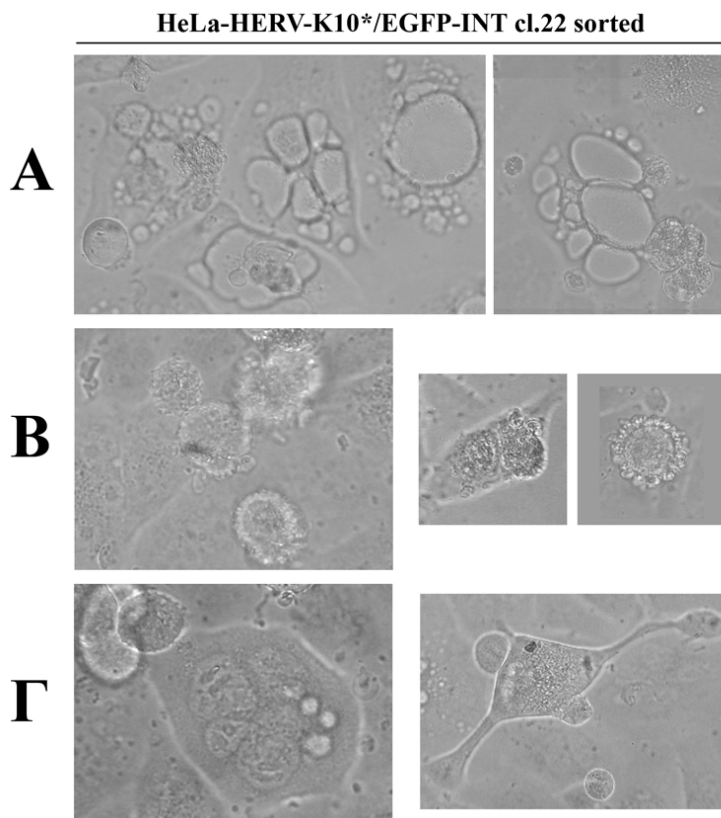


Εικ. 39. Μορφολογία κλώνων A549-HERV-K10*/EGFP-INT.
Χαρακτηριστικά μορφολογικά χαρακτηριστικά κυτταρικών κλώνων A549-HERV-K10*/EGFP-INT σε μεγέθυνση 20x (πάνω) και λεπτομέρεια σε μεγέθυνση 40x (κάτω).

Αξιοσημείωτη είναι επίσης η εικόνα που παρουσίαζαν τα κύτταρα HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted (Εικ. 40). Τα συχνότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι ο σχηματισμός κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα και ο σχηματισμός πολυπύρηνων κυττάρων. Ως προς το σχηματισμό κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα, η έκταση του φαινομένου διέφερε μεταξύ διαφορετικών κυττάρων, καθώς ήταν εντονότερος σε ορισμένα και λιγότερο έντονος σε άλλα. Εξαιρετικό ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης το γεγονός ότι απαντώνται ταυτόχρονα χαρακτηριστικά διαφορετικών τύπων προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός κενотоπίων στο κυτταρόπλασμα αποτελεί χαρακτηριστικό της αυτοφαγίας, ενώ αντίθετα, ο σχηματισμός πολυπύρηνων κυττάρων παρατηρείται κατά τη διάρκεια της μιτωτικής καταστροφής.

Επίσης πολύ συχνά παρατηρούνται στρογγυλοποιημένα επιπλέοντα κύτταρα, μορφολογία χαρακτηριστική κυττάρων που βρίσκονται στη μίτωση, αλλά και κύτταρα που οδηγούνται σε θάνατο. Τέλος, παρατηρήθηκαν πεπλατυσμένα κύτταρα με διογκωμένο πυρήνα τα οποία εμφανίζουν φαινότυπο όμοιο με αυτό της γήρανσης (senescence-like phenotype), ο οποίος αποτελεί χαρακτηριστικό κυττάρων όπου έχουν ενεργοποιηθεί μηχανισμοί απόκρισης σε βλάβη του DNA (DNA damage response).

Συνοψίζοντας, η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης συνοδεύεται από μια σειρά φαινοτυπικών χαρακτηριστικών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου.



Εικ. 40. Μορφολογία κλώνου HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted.
 Χαρακτηριστικά κύτταρα HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted.
 (Α) Σχηματισμός κενотоπιών στο κυτταρόπλασμα. (Β) Επιπλέοντα στρογγυλοποιημένα κύτταρα. Στη μέση: κύτταρο που διπλασιάζεται. (Γ) Αριστερά: πολυπύρρηνο κύτταρο, δεξιά: πεπλατυσμένο κύτταρο με επιμηκυσμένες απολήξεις.

1.12. ΥΨΗΛΑ ΕΠΙΠΕΔΑ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΤΟΥ HERV-K10 ΕΧΟΥΝ ΕΠΙΠΤΩΣΗ ΣΤΗ ΔΟΜΗ ΤΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Μολονότι οι SCE συμβαίνουν φυσιολογικά κατά την αντιγραφή του DNA, γνωρίζουμε ότι η επίδραση παραγόντων επιβλαβών για την ακεραιότητα του γενετικού υλικού μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του αριθμού των SCE. Σε αυτά τα πλαίσια θελήσαμε να εξετάσουμε αν τα υψηλά επίπεδα ρετρομετάθεσης έχουν κάποια επίδραση στον αριθμό των SCE. Για το σκοπό αυτό καλλιεργήσαμε παρουσία BrdU κύτταρα των κλώνων HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.12 στον οποίο δεν ανιχνεύτηκαν γεγονότα ρετρομετάθεσης με FACS, HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 που εμφάνιζε τα υψηλότερα ποσοστά ρετρομετάθεσης και του επιλεγμένου θετικού σε ρετρομετάθεση κυτταρικού πληθυσμού HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT cl.22 sorted. Έγινε μέτρηση των SCE σε 50 μεταφάσεις ανά περίπτωση.

Τα αποτελέσματα ως προς το μέσο όρο γεγονότων SCE ανά μετάφαση δεν παρουσίασαν σημαντική διαφορά μεταξύ των κλώνων. Συγκεκριμένα, στα κύτταρα του cl.12 καταμετρήθηκαν κατά μέσο όρο 16 SCE ανά μετάφαση, ενώ στον cl.22 18 και στα sorted κύτταρα 19. Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση ότι στον cl.22 και στα κύτταρα sorted παρατηρήθηκε μόνο μία μετάφαση με λιγότερες από 16 SCE, δηλαδή μικρότερο αριθμό από το μέσο όρο του cl.12. Ακόμη σημαντικότερη όμως είναι ίσως η παρατήρηση ότι ο αριθμός μεταφάσεων με περισσότερες από 19 SCE, που είναι ο

μέσος αριθμός SCE ανά μετάφαση για τα sorted, είναι διπλάσιος στον cl.22 και τριπλάσιος στα sorted σε σχέση με τον cl.12. Έτσι λοιπόν, η αυξημένη συχνότητα γεγονότων ρετρομετάθεσης HERV-K10 φαίνεται να συσχετίζεται με αύξηση του αριθμού κυττάρων με μεγάλο αριθμό SCE στα χρωμοσώματά τους (Πίν. 29).

<i>Κυτταρικός κλώνος</i>	<i>SCE (M.O.)</i>	<i><16 SCE</i>	<i>>19 SCE</i>	<i>Σύνολο</i>
cl.12	16	3 (6%)	9 (18%)	50 (100%)
cl.22	18	1 (2%)	20 (40%)	50 (100%)
sorted	19	1 (2%)	30 (60%)	50 (100%)

Πίν. 29. Γεγονότα SCE ανά μετάφαση σε κυτταρικούς κλώνους HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT.

Στη συνέχεια θελήσαμε να εκτιμήσουμε κατά πόσο οι πολλαπλές SCE θα μπορούσαν να διαφοροποιούνται μεταξύ των χρωμοσωμάτων των εξεταζομένων κλώνων (Πίν. 30). Σε 8 μεταφάσεις του cl.12 εντοπίστηκε 1 χρωμόσωμα με 5-6 SCE, ενώ ο αντίστοιχος αριθμός μεταφάσεων στον cl.22 έφτασε τις 27 και στον κυτταρικό πληθυσμό sorted τις 22. Επιπλέον, στον cl.22 εντοπίστηκαν 2 μεταφάσεις που έφεραν 2 και 4 χρωμοσώματα με 5-6 SCE, αντίστοιχα, και στα sorted κύτταρα 3 μεταφάσεις με 2, 3 και 4 χρωμοσώματα με 5-6 SCE, αντίστοιχα. Τέλος, στον cl.22 εντοπίστηκε ακόμη 1 μετάφαση που έφερε 1 χρωμόσωμα με 8 SCE και στα sorted 7 χρωμοσώματα διαφορετικών μεταφάσεων που έφεραν 7 ή 8 SCE. Επομένως, φαίνεται πως η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης HERV-K10 συσχετίζεται με αυξημένο αριθμό πολλαπλών SCE στο ίδιο χρωμόσωμα, οι οποίες μπορεί να υπάρχουν ακόμη και σε περισσότερα από 1 χρωμοσώματα της ίδιας μετάφασης.

<i>Κυτταρικός κλώνος</i>	<i>Αριθμός χρωμοσωμάτων με πολλαπλές SCE</i>				<i>Αριθμός πολλαπλών SCE</i>
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	
cl.12	8 (16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	5-6
cl.22	27 (54%)	1 (2%)	0 (0%)	1 (2%)	
sorted	22 (44%)	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	
cl.12	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	>6
cl.22	1 (2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
sorted	7 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Πίν. 30. Πολλαπλές SCE ανά μετάφαση σε κυτταρικούς κλώνους HeLa-HERV-K10*/EGFP-INT.

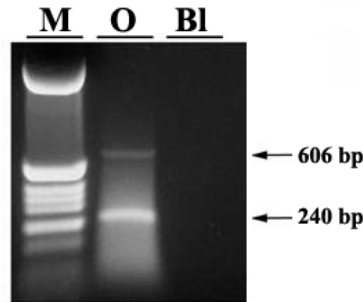
Συνολικά, τα αποτελέσματά μας υποδεικνύουν ότι ο μεγάλος αριθμός γεγονότων ρετρομετάθεσης φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα SCE τόσο στο ίδιο χρωμόσωμα όσο και συνολικά.

1.13. ΕΚΦΡΑΣΗ RNA HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ

Μετά την ανίχνευση έκφρασης σε επίπεδο RNA και ικανότητας ρετρομετάθεσης του στοιχείου HERV-K10 σε καρκινικές κυτταρικές σειρές θελήσαμε να μελετήσουμε

το φαινόμενο της ρετρομετάθεσης του HERV-K10 σε ανώριμα γαμετικά κύτταρα, ένα ακόμη υπομεθυλιωμένο περιβάλλον που αποτελεί παράθυρο ευκαιρίας για την έκφραση του RNA των ενδογενών ρετροϊικών στοιχείων.

Για να μελετήσουμε την πιθανότητα έκφρασης των ρετροτρανσποζονίων HERV-K10 σε ανθρώπινα ωάρια πραγματοποιήσαμε ανάλυση RT-PCR χρησιμοποιώντας RNA από ωάρια στο στάδιο των GV από τα οποία είχε προηγουμένως αφαιρεθεί ο πυρήνας. Μετά από την ανάλυση διαπιστώθηκε η ενίσχυση, άρα και έκφραση σε επίπεδο RNA, τόσο των HERV-K10 (ζώνη 606 bp) όσο και SVA (240 bp) (Εικ. 41).



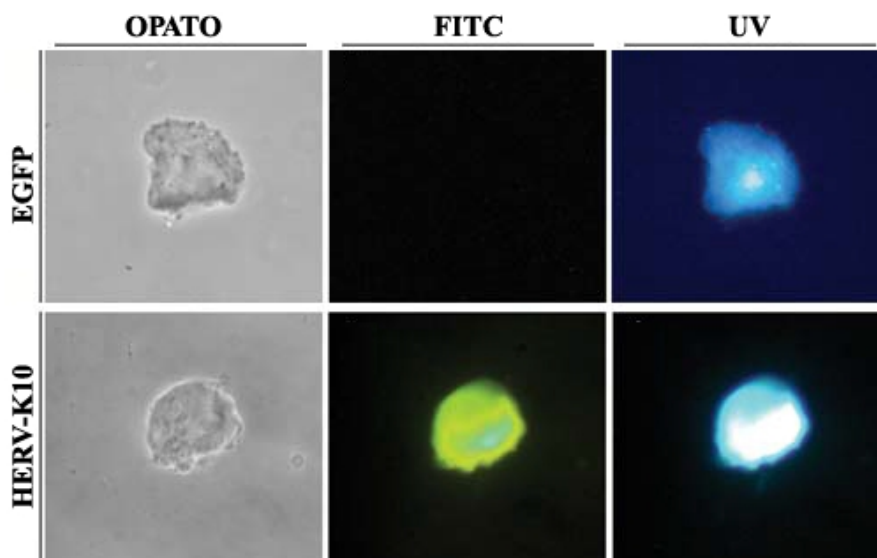
Εικ. 41. Έκφραση HERV-K10 και SVA σε ανώριμες μορφές ανθρώπινων ωαρίων.

Μετά από απομόνωση RNA από GV και μετατροπή του σε cDNA, πραγματοποιήθηκε RT-PCR χρησιμοποιώντας ειδικούς εκκινητές για τα HERV-K10. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1.2% (v/w), οπότε ανιχνεύθηκαν μετάγραφα του ρετρομεταθετού στοιχείου HERV-K10 (ζώνη 606 bp). Εξαιτίας της μεγάλης ομολογίας των SVA με τα HERV-K10, ανιχνεύθηκε επίσης η έκφραση RNA των SVA (ζώνη 240 bp).

M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών pBR322/HinfI, O: αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας cDNA από ωάρια και τους ειδικούς εκκινητές για το HERV-K10, BI: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA.

Για να επιβεβαιώσουμε ότι οι αλληλουχίες HERV-K10 που ανιχνεύθηκαν αντιστοιχούσαν πράγματι σε RNA και δεν αποτελούσαν πιθανή επιμόλυνση από πυρηνικό DNA, πραγματοποιήσαμε ανάλυση RNA-FISH σε ωάρια. Κατασκευάστηκαν ανιχνευτές σημασμένοι με FITC, χρησιμοποιώντας ως εκμαγεία απομονωμένες και κλωνοποιημένες αλληλουχίες του HERV-K10 αλλά και του γονιδίου EGFP ως μάρτυρα. Με μικροσκοπία φθορισμού διαπιστώσαμε την παρουσία μεταγράφων HERV-K10 τόσο στον πυρήνα όσο και στο ωόπλασμα, σε αντίθεση με το μάρτυρα (γονίδιο EGFP) όπου δεν ανιχνεύθηκε κανένα σήμα (Εικ. 42). Μάλιστα, το σήμα φθορισμού για το HERV-K10 ήταν ιδιαίτερα ισχυρό, γεγονός που θα μπορούσε εν μέρει να οφείλεται στην ταυτόχρονη ανίχνευση μεταγράφων του SVA εξαιτίας της μεγάλης ομολογίας τους.

Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν ότι οι αλληλουχίες που μελετήθηκαν ήταν μετάγραφα που πράγματι προέρχονται από το ωόπλασμα, γεγονός που ενισχύει την πρότασή μας ότι υπάρχει έκφραση των συγκεκριμένων ρετροτρανσποζονίων στα ωάρια.



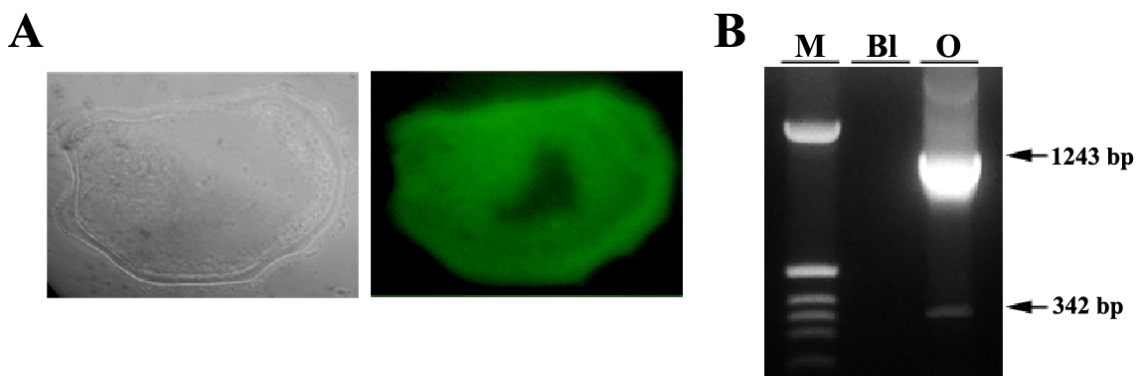
Εικ. 42. RNA-FISH για το HERV-K10 σε ανώριμες μορφές ανθρώπινων ωαρίων. Παρασκευάστηκαν ειδικοί φθορίζοντες ανιχνευτές για τα μετάγραφα του HERV-K10. Μετά από RNA-FISH σε GV, ανιχνεύθηκαν μετάγραφα του HERV-K10. Ως μάρτυρας για την ειδικότητα της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο EGFP, μετάγραφα του οποίου δεν ανιχνεύονται στα GV.

1.14. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΓΕΓΟΝΟΤΩΝ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ ΣΕ ΩΑΡΙΑ

Μετά από την ανίχνευση μεταγράφων HERV-K10 σε ωάρια και δεδομένου ότι η παρουσία μεταγράφων είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης του αντίστοιχου ρετρομεταθετού στοιχείου [390], θελήσαμε να διερευνήσουμε την πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης του HERV-K10 σε ανθρώπινα ωοκύτταρα. Για το λόγο αυτό, εισάγαμε με μικρόνευση το γενετικά τροποποιημένο ρετροτρανσποζόνιο pHERV-K10*/EGFP-INT σε ωάρια. Το κλωνοποιημένο ρετροτρανσποζόνιο εισήχθη σε 30 ωάρια τα οποία παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού μετά από 24 ώρες, οπότε και διαπιστώθηκε έκφραση της EGFP, που υποδηλώνει την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης, στην πλειοψηφία των ωαρίων (Εικ. 43Α). Συγκεκριμένα, από τα 30 ωάρια που χρησιμοποιήθηκαν, τα 25 ήταν θετικά ως προς την έκφραση EGFP (Πίν. 31).

Για να επιβεβαιώσουμε τα γεγονότα ρετρομετάθεσης και σε επίπεδο γονιδιώματος, έγινε ανάλυση PCR ωοκυττάρων στα οποία είχε εισαχθεί το ρετροτρανσποζόνιο (Εικ. 43Β). Πράγματι, διαπιστώθηκαν νέες ενσωματώσεις του στοιχείου στο γονιδίωμα, καθώς, εκτός από το μη ματισμένο προϊόν των 1,243 bp, ανιχνεύθηκε επίσης η διαγνωστική για τη ρετρομετάθεση ζώνη των 342 bp [386].

Συνολικά, τα αποτελέσματα μας αποδεικνύουν ότι πραγματοποιούνται γεγονότα ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 στα ωάρια του ανθρώπου.



Εικ. 43. Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε ωάρια.

(A) Μικροσκοπία φθορισμού για την ανίχνευση της παραγωγής EGFP σε ωάρια που μετά από μικροένεση του pHERV-K10*/EGFP-INT. Τα ωάρια μονιμοποιήθηκαν 24 ώρες μετά από το χειρισμό, παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού και φωτογραφήθηκαν. (B) Ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης σε επίπεδο γονιδιώματος σε ωάρια στα οποία έχει γίνει μικροένεση του pHERV-K10*/EGFP-INT. M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών pBR322/HinfI, BI: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA, O: PCR σε ωάρια με χρήση εκκινητών για το γονίδιο EGFP.

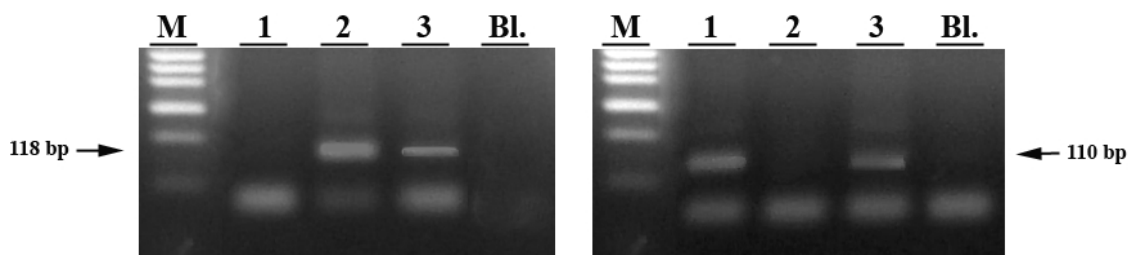
<i>Αριθμός GV στα οποία έγινε μικροένεση</i>	<i>Αριθμός EGFP-θετικών GV</i>	<i>Συχνότητα (%)</i>
30	25	83.3%

Πίν. 31. Ποσοτικοποίηση ωαρίων θετικών σε ρετρομετάθεση HERV-K10.

Μετρήθηκε η συχνότητα θετικών EGFP ωαρίων στα οποία έχει γίνει μικροένεση με HERV-K10*-EGFP-INT.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΤΩΝ HERV-K10 ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Παρά την πλούσια διεθνή βιβλιογραφία σχετικά με τα επίπεδα μεθυλίωσης του DNA και τον τρόπο με τον οποίο αυτά πιθανώς επηρεάζονται από την υπογονιμότητα καθώς και από την εφαρμογή τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, μέχρι σήμερα δεν έχει ξεκαθαρίσει το τοπίο στον τομέα αυτό. Επίσης δεν υπάρχουν καθόλου στοιχεία σχετικά με τα επίπεδα μεθυλίωσης των HERV και γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση σε σχέση με την εφαρμογή σύγχρονων μεθόδων πρόωμης γενετικής ανάλυσης, όπως η ολοένα και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη PGD. Για τους παραπάνω λόγους μελετήσαμε τα πρότυπα μεθυλίωσης του ενδογενούς ρετροϊκού στοιχείου HERV-K10 και των γονιδίων DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση, σε βιοψίες όρχεων και σπερματοζώαρια υπογόνιμων ανδρών, αλλά και χοριακές λάχνες μετά από PGD, χρησιμοποιώντας την προσέγγιση της MS-PCR (Εικ. 44-47).



Εικ. 44. Ενδεικτικό αποτέλεσμα MS-PCR IGF2/H19.

Μετά από απομόνωση DNA από ώριμες και ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων και περιφερικό αίμα υπογόνιμων ανδρών, αλλά και χοριακές λάχνες μετά από PGD ή φυσιολογικές συλλήψεις, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του DNA με NaHSO₃. Ακολούθησε MS-PCR με τους ειδικούς εκκινητές για τη DMR του IGF2/H19 και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (v/w). Αριστερά: μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, δεξιά: μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (100 bp ladder), 1: δείγμα ομόζυγο για το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 2: δείγμα ομόζυγο για το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 3: ετερόζυγο δείγμα, Bl: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA.

2.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΧΟΡΙΑΚΕΣ ΛΑΧΝΕΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ PGD

Είναι γνωστό ότι φυσιολογικά μετά τη γονιμοποίηση πραγματοποιείται επαναπρογραμματισμός του ζυγωτού που οδηγεί σε πλήρη απομεθυλίωση και στη συνέχεια επαναμεθυλίωση του γονιδιώματος, χωρίς όμως να επηρεάζονται τα επιγενετικά σήματα των γονιδίων με αποτύπωση. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η χρήση μεθόδων IVF-PGD επηρεάζει τα φυσιολογικά πρότυπα μεθυλίωσης, μελετήθηκε η μεθυλίωση των γονιδίων με αποτύπωμα DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19, καθώς επίσης και η νησίδα CpG του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10 σε χοριακές λάχνες από κυήσεις που προέκυψαν μετά από PGD και φυσιολογικές συλλήψεις ως μάρτυρες.

Η νησίδα CpG του HERV-K10 ήταν μεθυλιωμένη και στα δύο αλληλόμορφα στη συντριπτική πλειοψηφία (90%) σε 54 από τα 60 δείγματα της ομάδας ελέγχου, όπως αναμενόταν. Όμως υπήρχαν και 6 δείγματα (10%) στα οποία ανιχνεύθηκε τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι το γεγονός ότι παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στα ευρήματα των δειγμάτων PGD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($p = 0.042$). Αναλυτικά, στην ομάδα PGD τα δείγματα που εμφάνιζαν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο αυξήθηκαν κατά 15.7%, φτάνοντας τα 9 από τα 35, ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε αισθητά ο αριθμός των μεθυλιωμένων αλληλομόρφων που ανιχνεύθηκαν μεταξύ των δειγμάτων PGD σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, καθώς σε 26 από τα 35 δείγματα (74.3%) και τα δύο αλληλόμορφα ήταν μεθυλιωμένα (Πίν. 32).

Η ανάλυση με MS-PCR για τη μεθυλίωση της DMR του IGF2/H19 έδειξε ότι σε όλα τα δείγματα PGD και της ομάδας ελέγχου, υπάρχουν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, γεγονός που υποδεικνύει ότι δεν υπάρχει κάποια διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης στη συγκεκριμένη περίπτωση (Πίν. 33).

	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
PGD	26 (74.3%)	0 (0%)	9 (25.7%)	35 (100%)
Μάρτυρας	54 (90%)	0 (0%)	6 (10%)	60 (100%)
p = 0.042				

Πίν. 32. Μελέτη μεθυλίωσης HERV-K10 μετά από PGD. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο ή/και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
PGD	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)	35 (100%)
Μάρτυρας	0 (0%)	0 (0%)	40 (100%)	40 (100%)

Πίν. 33. Μελέτη μεθυλίωσης IGF2/H19 μετά από PGD. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης του CDKN1C (p57^{KIP2}) με MS-PCR σε όλα τα δείγματα PGD καθώς και την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου κατέδειξε την παρουσία μεθυλιωμένου και μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου (Πίν. 34).

	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
PGD	0 (0%)	0 (0%)	35 (100%)	35 (100%)
Μάρτυρας	0 (0%)	0 (0%)	40 (100%)	40 (100%)

Πίν. 34. Μελέτη μεθυλίωσης CDKN1C (p57^{KIP2}) μετά από PGD. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

Μετά από ανάλυση της μεθυλίωσης της DMR του DLK1/MEG3 σε δείγματα PGD και την αντίστοιχη ομάδα ελέγχου διαπιστώσαμε ότι όλα τα δείγματα της ομάδας ελέγχου εμφάνιζαν προϊόν τόσο για το μεθυλιωμένο όσο και για το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, όπως και αναμενόταν. Αντίθετα, στα δείγματα PGD παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή του προτύπου μεθυλίωσης ($p = 0.001$). Έτσι, λοιπόν, ενώ 25 από 35 δείγματα εμφάνισαν το αναμενόμενο πρότυπο, δηλαδή παρουσία τόσο του μεθυλιωμένου όσο και του μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου, υπήρξαν 10 δείγματα στα οποία παρατηρήθηκε διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης. Συγκεκριμένα, 9 από τα 35 δείγματα (25.7%) έφεραν μόνο το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ σε 1 (2.8%) ανιχνεύθηκε μόνο το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο (Πίν. 35). Επομένως, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 σε χοριακές λάχνες μετά από PGD σε σχέση με το μάρτυρα.

	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
PGD	1 (2.9%)	9 (25.7%)	25 (71.4%)	35 (100%)
Μάρτυρας	0 (0%)	0 (0%)	40 (100%)	40 (100%)
p = 0.001				

Πίν. 35. Μελέτη μεθυλίωσης DLK1/MEG3 μετά από PGD. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο ή/και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

Συνολικά, παρατηρήθηκε ταυτόχρονη απώλεια της μεθυλίωσης του HERV-K10 και του DLK1/MEG3 σε 8 από τα 9 δείγματα (88.9%) με απώλεια μεθυλίωσης του DLK1/MEG3, γεγονός που υποδεικνύει μια ισχυρή τάση για ταυτόχρονη απώλεια της μεθυλίωσης στις θέσεις αυτές.

Όπως είναι γνωστό, οι μέθοδοι υποβοηθούμενης αναπαραγωγής χρησιμοποιούνται πολύ συχνά για την αντιμετώπιση της υπογονιμότητας του ανδρικού παράγοντα. Για το λόγο αυτό σε επόμενο βήμα διερευνήθηκε η ύπαρξη πιθανών επιγενετικών σφαλμάτων σε υπογόνιμους άνδρες.

2.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΒΙΟΨΙΕΣ ΟΡΧΕΩΝ ΥΠΟΓΟΝΙΜΩΝ ΑΝΔΡΩΝ

Μελετήθηκε η μεθυλίωση των γονιδίων DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 σε βιοψίες όρχεων υπογόνιμων ανδρών καθώς επίσης και στο περιφερικό αίμα των ιδίων ως μάρτυρας (Πίν. 36). Όπως αναμένεται, στα λεμφοκύτταρα του περιφερικού αίματος τα οποία είναι διαφοροποιημένα διπλοειδή κύτταρα, αναμένεται να ανιχνευθεί τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση.

Η μεθυλίωση του DNA στα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση εγκαθίσταται ταυτόχρονα με την είσοδο των κυττάρων στη μείωση και διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Στις πρόδρομες μορφές των ανώριμων σπερματοζωαρίων τα επιγενετικά σήματα διαγράφονται. Παρόλα αυτά, καθώς εισέρχονται στη μείωση, ξεκινά η σταδιακή επανεγκαθίδρυση των αποτυπωμάτων στα γονίδια με αποτύπωση, ώστε τελικά, με την ολοκλήρωση της μειωτικής διαδικασίας τα ώριμα πλέον διαφοροποιημένα σπερματοζωάρια φέρουν το πατρικό επιγενετικό αποτύπωμα. Έτσι, λοιπόν, στα σπερματοζωάρια από βιοψία όρχεων οι DMR των IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}) και DLK1/MEG3 αναμένεται να είναι μεθυλιωμένες.

Η ανάλυση της μεθυλίωσης των γονιδίων IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}) και DLK1/MEG3 αποκάλυψε την παρουσία του φυσιολογικού προτύπου, δηλαδή την παρουσία μεθυλίωσης τόσο του μεθυλιωμένου όσο και του μη μεθυλιωμένου αλληλομόρφου σε όλα τα δείγματα της ομάδα ελέγχου για τις περιοχές αυτές. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι παρόμοιο ήταν το πρότυπο μεθυλίωσης και στα δείγματα των βιοψιών. Έτσι, λοιπόν σε όλα τα δείγματα ανιχνεύθηκαν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο για τα γονίδια IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}). Υπάρχει, επομένως, προφανής διαταραχή του επιγενετικού προτύπου μεθυλίωσης στις συγκεκριμένες περιοχές (Πίν. 36).

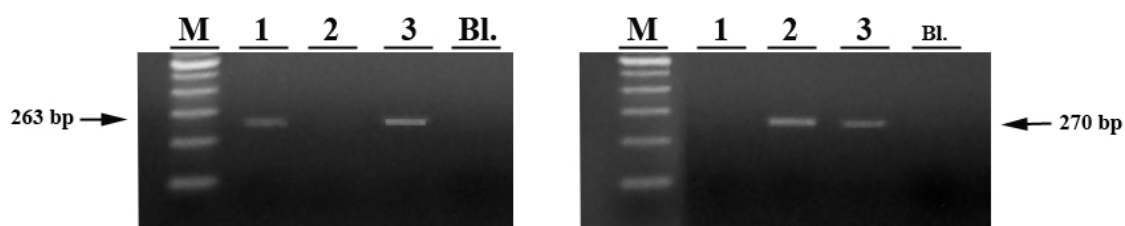
Η ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης της DMR του DLK1/MEG3 αποκάλυψε ότι στα 31 από τα 33 δείγματα που εξετάστηκαν υπήρχαν και τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ σε 2 δείγματα (6%) ανιχνεύθηκε μόνο το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, δηλαδή το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης. Έτσι, λοιπόν, παρατηρούμε και σε αυτήν την περίπτωση διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης, η οποία όμως φαίνεται να είναι μικρότερης έκτασης σε σχέση με εκείνη των γονιδίων IGF2/H19 και CDKN1C (p57^{KIP2}) (Πίν. 36).

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι παρότι η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης σε ανώριμα σπερματοζωάρια που προήλθαν από βιοψίες όρχεων ήταν ιδιαίτερα εκτεταμένη, σε κανένα δείγμα δεν παρατηρήθηκε πλήρης απώλεια του μεθυλιωμένου αλληλομόρφου (Πίν. 36).

		Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
DLK1/MEG3	IGF2/H19				
	Βιοψίες	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	33 (100%)
	Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Βιοψίες	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Βιοψίες	2 (6%)	0 (0%)	31 (94%)	
Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)		
CDKN1C					
	Βιοψίες	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	33 (100%)
	Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Βιοψίες	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)	
	Βιοψίες	2 (6%)	0 (0%)	31 (94%)	
Αίμα	0 (0%)	0 (0%)	33 (100%)		

Πίν. 36. Μελέτη μεθυλίωσης γονιδίων με αποτύπωση σε ανώριμα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο ή/και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

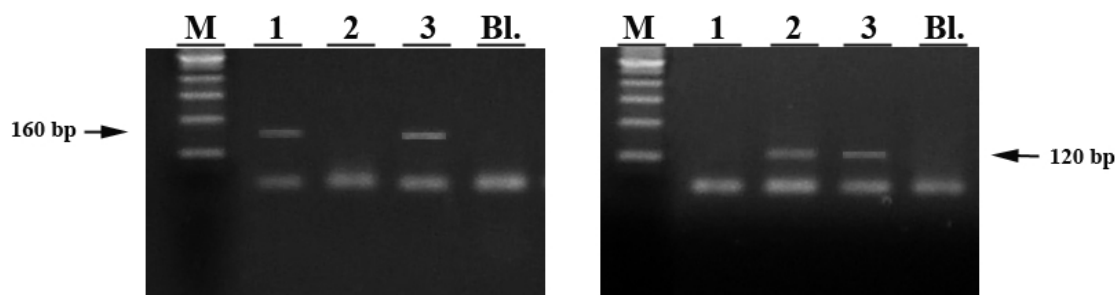
Συνολικά, λοιπόν, παρατηρήθηκε έντονη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης των περιοχών IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}) και DLK1/MEG3 σε βιοψίες όρχεων υπογόνιμων ανδρών.



Εικ. 45. Ενδεικτικό αποτέλεσμα MS-PCR CDKN1C (p57^{KIP2}).

Μετά από απομόνωση DNA από ώριμες και ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων και περιφερικό αίμα υπογόνιμων ανδρών, αλλά και χοριακές λάχνες μετά από PGD ή φυσιολογικές συλλήψεις, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του DNA με NaHSO₃. Ακολούθησε MS-PCR με τους ειδικούς εκκινητές για τη DMR του CDKN1C (p57^{KIP2}) και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (v/w). Αριστερά: μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, δεξιά: μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (100 bp ladder), 1: δείγμα ομόζυγο για το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 2: δείγμα ομόζυγο για το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 3: ετερόζυγο δείγμα, Bl: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA.



Εικ. 46. Ενδεικτικό αποτέλεσμα MS-PCR DLK1/MEG3.

Μετά από απομόνωση DNA από ώριμες και ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων και περιφερικό αίμα υπογόνιμων ανδρών, αλλά και χοριακές λάχνες μετά από PGD ή φυσιολογικές συλλήψεις, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του DNA με NaHSO₃. Ακολούθησε MS-PCR με τους ειδικούς εκκινητές για τη DMR του DLK1/MEG3 και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (v/w). Αριστερά: μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, δεξιά: μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (100 bp ladder), 1: δείγμα ομόζυγο για το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 2: δείγμα ομόζυγο για το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 3: ετερόζυγο δείγμα, Bl: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA.

2.3. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΠΡΟΤΥΠΟΥ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΟΖΩΑΡΙΑ ΥΠΟΓΟΝΙΜΩΝ ΑΝΔΡΩΝ

Τα σπερματοζωάρια είναι απλοειδή κύτταρα, οπότε στο DNA των σπερματοζωαρίων του κάθε ατόμου αναμένεται να υπάρχει ένα αλληλόμορφο για κάθε γονίδιο. Επιπλέον, στα ώριμα γαμετικά κύτταρα έχει πλέον εγκαθιδρυθεί το πρότυπο μεθυλίωσης των διαφοροποιημένων κυττάρων, οπότε φυσιολογικά θα ανέμενε κανείς οι DMR των IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}) και DLK1/MEG3, αλλά και η CpG των HERV-K10 να είναι μεθυλιωμένες.

Μετά από MS-PCR για την αντίστοιχη νησίδα CpG, βρέθηκε ότι οι HERV-K10 ήταν μεθυλιωμένοι στην πλειοψηφία των δειγμάτων σπερματοζωαρίων των υπογόνιμων ανδρών (81.3%) και συγκεκριμένα σε 26 από τα 32 δείγματα. Παρόλα αυτά, στο 15.6% των δειγμάτων (5 δείγματα) ανιχνεύθηκαν τόσο μεθυλιωμένα όσο και μη μεθυλιωμένα αλληλόμορφα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μεταξύ των σπερματοζωαρίων των συγκεκριμένων 5 ανδρών υπήρχαν τόσο σπερματοζωάρια με μεθυλιωμένη τη νησίδα CpG του HERV-K10 όσο και ένα στο οποίο το HERV-K10 ήταν μη μεθυλιωμένο. Δηλαδή, παρατηρείται μια απόκλιση από το αναμενόμενο πρότυπο μεθυλίωσης του HERV-K10 σε σπερματοζωάρια ανδρών με υπογονιμότητα (Πίν. 37).

Ακολούθως, μελετήθηκε η μεθυλίωση της DMR του IGF2/H19. Η πλειοψηφία των δειγμάτων (65.6%) εμφάνισαν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης της DMR, ενώ στο υπόλοιπο 34.4% η DMR ήταν μεθυλιωμένη. Συγκεκριμένα, 13 από τα 32 δείγματα έφεραν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ σε ακόμη 8 ανιχνεύθηκε μόνο το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο. Συνολικά, η μελέτη της DMR του IGF2/H19 σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών αποκάλυψε σοβαρή διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης (Πίν. 37).

Τα αποτελέσματα της μελέτης της μεθυλίωσης του CDKN1C (p57^{KIP2}) έδειξαν ηπιότερη διαταραχή των επιπέδων μεθυλίωσης. Έτσι λοιπόν, περισσότερα από τα μισά δείγματα (17) είχαν το φυσιολογικό, δηλαδή το μεθυλιωμένο, πρότυπο στη συγκεκριμένη περιοχή. Από τα υπόλοιπα 15 δείγματα, στα περισσότερα (9 από τα 32) υπήρχε τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ υπήρξαν και 6 όπου το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο απουσίαζε πλήρως (Πίν. 37).

Τέλος, η μελέτη της DMR του DLK1/MEG3 σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών κατέδειξε διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης σε όλα σχεδόν τα δείγματα, ενώ βρέθηκε ένα μόνο δείγμα όπου όλα τα σπερματοζωάρια έφεραν το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης, δηλαδή όλα τα αλληλόμορφα ήταν μεθυλιωμένα. Τα υπόλοιπα 31 δείγματα παρουσίασαν ίσα σχεδόν ποσοστά σε δύο κατηγορίες. Συγκεκριμένα, τα 15 από τα 32 έφεραν τόσο το μεθυλιωμένο όσο και το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, ενώ υπήρχαν ακόμη 16 (50%) στα οποία απουσίαζε πλήρως το μεθυλιωμένο και ανιχνεύθηκε μόνο το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο. Είναι, λοιπόν, φανερό ότι υπάρχει σημαντική διαταραχή του φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών (Πίν. 37).

	Μεθυλιωμένο	Μη μεθυλιωμένο	Μεθυλιωμένο & μη μεθυλιωμένο	Σύνολο
HERV-K10	26 (81.3%)	1 (3.1%)	5 (15.6%)	32 (100%)
IGF2/H19	11 (34.4%)	8 (25%)	13 (40.6%)	
CDKN1C (p57 ^{KIP2})	17 (53.1%)	6 (18.8%)	9 (28.1%)	
DLK1/MEG3	1 (3.1%)	16 (50%)	15 (46.9%)	

Πίν. 37. Μελέτη μεθυλίωσης ρετροτρανσποζονιακών αλληλουχιών και γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση σε ώριμα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών. Ανιχνεύθηκαν το μεθυλιωμένο ή/και μη μεθυλιωμένο μετά από MS-PCR. Δίνεται ο αριθμός δειγμάτων ανά περίπτωση και το αντίστοιχο ποσοστό σε παρένθεση.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα της μελέτης των τεσσάρων διακριτών γενετικών τόπων συνολικά, μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι τα δείγματα μοιράζονται ισόποσα σχεδόν σε τέσσερις κατηγορίες, δηλαδή δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του αριθμού των δειγμάτων που φέρουν διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης είτε μόνο σε μία, ή σε δύο, τρεις, ακόμη και στις τέσσερις γενετικές θέσεις που ελέγχθηκαν. Αντίθετα, μόνο ένας από τους υπογόνιμους άνδρες έφερε το φυσιολογικό πρότυπο μεθυλίωσης για τα τρία γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση αλλά και το ρετρομεταθετό στοιχείο HERV-K10 (Πίν. 38).

Γενετικές θέσεις με διαταραχή μεθυλίωσης	0	1	2	3	4	Σύνολο
Δείγματα	1 (3.1%)	9 (28.1%)	7 (21.9%)	10 (31.3%)	5 (15.6%)	32 (100%)

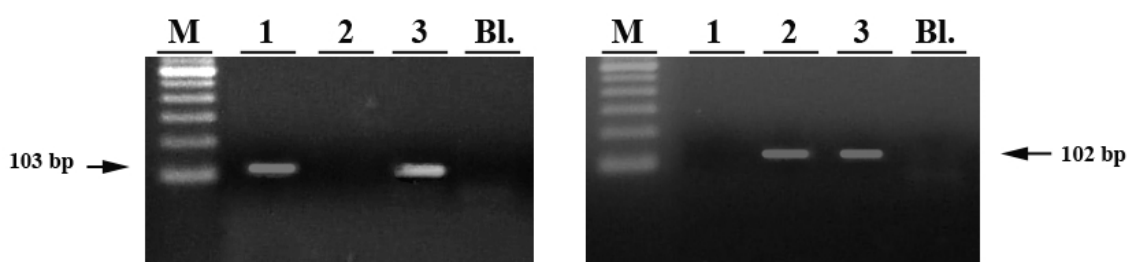
Πίν. 38. Ταυτόχρονη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης σε πολλαπλές γενετικές θέσεις σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών.

Εξετάζοντας, όμως τον αριθμό των υπογόνιμων ανδρών στους οποίους απουσίαζε πλήρως το φυσιολογικό μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, παρατηρούμε ότι η πλειοψηφία αυτών (40.6%) έφερε το ένα έστω μεθυλιωμένο αλληλόμορφο. Από την άλλη, κανένας δεν εμφάνισε πλήρη απώλεια και των τεσσάρων αποτυπωμάτων, ενώ οι σοβαρότερες μορφές διαταραχής των προτύπων μεθυλίωσης διαπιστώθηκαν σε 4 άνδρες από τους οποίους απουσίαζε πλήρως το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο σε τρεις από τις τέσσερις θέσεις που μελετήθηκαν (Πίν. 39).

Γενετικές θέσεις με πλήρη απώλεια μεθυλίωσης	0	1	2	3	4	Σύνολο
Δείγματα	13 (40.6%)	11 (34.4%)	4 (12.5%)	4 (12.5%)	0 (0%)	32 (100%)

Πίν. 39. Ταυτόχρονη πλήρης απώλεια μεθυλίωσης σε πολλαπλές γενετικές θέσεις σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών.

Συνολικά, λοιπόν, η σοβαρότητα της διαταραχής του προτύπου μεθυλίωσης που παρατηρήθηκε σε DNA από σπέρμα υπογόνιμων ανδρών φαίνεται να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών ατόμων.



Εικ. 47. Ενδεικτικό αποτέλεσμα MS-PCR HERV-K10.

Μετά από απομόνωση DNA από ώριμες μορφές σπερματοζωαρίων και χοριακές λάχνες μετά από PGD ή φυσιολογικές συλλήψεις, πραγματοποιήθηκε τροποποίηση του DNA με NaHSO₃. Ακολούθησε MS-PCR με τους ειδικούς εκκινητές για τη νησίδα CpG του HERV-K10 και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (v/w). Αριστερά: μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, δεξιά: μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

M: δείκτης γνωστών μοριακών βαρών (100 bp ladder), 1: δείγμα ομόζυγο για το μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 2: δείγμα ομόζυγο για το μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο, 3: ετερόζυγο δείγμα, Bl: τυφλό, αντίδραση χωρίς DNA.

3. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΠΑΝΑΛΑΜΒΑΝΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η DMR μεταξύ των γονιδίων DLK1 και MEG3 τη μεθυλίωση της οποίας μελετήσαμε περιλαμβάνει αλληλουχίες τόσο της ενδιάμεσης περιοχής μεταξύ των δύο γονιδίων όσο και του γονιδίου MEG3 [368]. Για το λόγο αυτό προσδιορίσαμε το είδος και το ποσοστό των μεταθετών στοιχείων που περιλαμβάνονται στην περιοχή 90 Kb μεταξύ των γονιδίων DLK1 και MEG3, καθώς και σε αυτή καθεαυτή την αλληλουχία του γονιδίου MEG3. Μετά από έλεγχο που πραγματοποιήθηκε με το ελεύθερο διαδικτυακό πρόγραμμα RepeatMasker, διαπιστώθηκε ότι η συστοιχία γονιδίων DLK1/MEG3 χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε ρετροτρανσποζόνια. Συγκεκριμένα, στην περιοχή μεγέθους 90 Kb μεταξύ των γονιδίων DLK1 και MEG3 ανιχνεύθηκε σχεδόν το ίδιο ποσοστό LINE και SINE, δηλαδή 16.29% και 16.87%, αντίστοιχα (Πιν. 40A). Στην αλληλουχία του MEG3 τα LTR ρετροτρανσποζόνια αντιπροσωπεύουν το 10.33% της συνολικής αλληλουχίας, ενώ τα ρετροτρανσποζόνια εμφανίζονται σε χαμηλότερο ποσοστό σε σχέση με την ενδιάμεση περιοχή και φτάνουν το 4.36% για τα LINE και το 6.2% για τα SINE (Πιν. 40B).

Με αντίστοιχο τρόπο, βρέθηκε ότι τα γονίδια CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 φέρουν χαμηλό φορτίο σε μεταθετά στοιχεία, όπου τα συνολικά διάσπαρτα επαναλαμβανόμενα στοιχεία φτάνουν μόλις το 10.48% (Πιν. 40Γ) και 12.40%, αντίστοιχα ενώ στην αλληλουχία του δεν ανιχνεύθηκαν μεταθετά στοιχεία (Πιν. 40Δ).

Συνολικά, λοιπόν, η αλληλουχία DLK1/MEG3 περιλαμβάνει πλειάδα ρετρομεταθετών στοιχείων, ένα μικρό μόνο ποσοστό των γονιδίων CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 αντιστοιχεί σε ρετροτρανσποζονιακές αλληλουχίες.

A

Μεταθετά στοιχεία		Αριθμός επαναλήψεων	Ποσοστό αλληλουχίας
SINE	<i>i.</i> MIR	15	16.87%
	Alu Sx	15	
	Alu Sc	1	
	<i>ii.</i> Alu	4	
	Alu Jb	7	
	Alu Jr	2	
	Alu Jo	2	
	Alu S2	2	
	AluSg	2	
	AluY	6	
	Alu FLAM-A	5	
Alu FLAM-C	1		
LINE	LINE-1	12	16.29%
	LINE-2	6	
LTR ρετροτρανσποζόνια	ERV1-E	7	10.33%
	ERV1-MaLR	6	
	ERV1-MLT2	1	
	ERV3-16A3I	3	
	MLT2D ERV1	2	
	MLT1G	1	
	MLT1K	1	
	LTR16C	1	
	LTR33	2	
	MER34	1	
DNA τρανσποζόνια	hAT-Tip100	2	3.89%
	hAT-Charlie	9	
	TcMar-Trigger	6	
Σύνολο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών			47.39%

B

Μεταθετά στοιχεία		Αριθμός επαναλήψεων	Ποσοστό αλληλουχίας	
SINE	<i>i.</i> MIR	13	6.2%	
	<i>ii.</i> Alu	Alu Sx		2
		Alu Sg		1
		Alu FLAM-A		1
LINE	LINE-1	5	4.36%	
	LINE-2	6		
	LINE-3	2		
DNA τρανσποζόνια	hAT-Charlie	2	0.72%	
Σύνολο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών			11.28%	

Γ

Μεταθετά στοιχεία		Αριθμός επαναλήψεων	Ποσοστό αλληλουχίας
SINE	<i>i.</i> MIR	4	7.98%
	<i>ii.</i> Alu	Alu Jb	
LINE	L3/CR1	1	0.82%
LTR ρετροτρανσποζόνια	ERVL-MaLR	1	1.69%
Σύνολο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών			10.48%

Δ

Μεταθετά στοιχεία		Αριθμός επαναλήψεων	Ποσοστό αλληλουχίας	
SINE	<i>i.</i> MIR	1	4.09%	
	<i>ii.</i> Alu	Alu Jo		1
		Alu Sg		1
		Alu Y		1
LTR ρετροτρανσποζόνια	ERVL	1	7.98%	
	ERVL-MaLR	3		
	LTR-ERV1	1		
DNA τρανσποζόνια	MER121	1	0.33%	
Σύνολο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών			12.40%	

Πίν. 40. Ανίχνευση επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα RepeatMasker.

(Α) Αποτελέσματα ανάλυσης της αλληλουχίας μεγέθους 90Kb της ενδιάμεσης περιοχής μεταξύ των γονιδίων DLK1 και MEG3 με το διαδικτυακό πρόγραμμα Repeatmasker ως προς το περιεχόμενό της σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (NCBI Ref.Seq.: NT_026437.12 chr14: 101,201,467-101,292,445). (Β) Αποτελέσματα ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου MEG3 με το διαδικτυακό πρόγραμμα Repeatmasker ως προς το περιεχόμενό της σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (NCBI Ref.Seq.: NG_016853.1). (Γ) Αποτελέσματα ανάλυσης της αλληλουχίας του γονιδίου CDKN1C (p57^{KIP2}) με το διαδικτυακό πρόγραμμα Repeatmasker ως προς το περιεχόμενό της σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (NCBI Ref.Seq.: NG_008022.1). (Δ) Αποτελέσματα ανάλυσης της αλληλουχίας της περιοχής IGF2/H19 με το διαδικτυακό πρόγραμμα Repeatmasker ως προς το περιεχόμενό της σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (GenBank: AF125183.1 chr11: 2,003,438-2,029,171).

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. ΜΕΛΕΤΗ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗΣ

1.1. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΙΚΕΣ ΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΣΕΙΡΕΣ ΣΕ ΥΨΗΛΗ ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ

Η μελέτη της οικογένειας HERV-K παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς πρόκειται για την εξελικτικά νεότερη οικογένεια ενδογενών ρετροϊών [391] και αποτελεί μια από τις επικρατέστερες υποψήφιες οικογένειες που πιθανώς περιλαμβάνει δυνητικά ικανά προς ρετρομετάθεση ρετροτρανσποζόνια.

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας θελήσαμε να δημιουργήσουμε ένα σταθερό κυτταρικό μοντέλο για τη μελέτη του φαινομένου της ρετρομετάθεσης HERV-K10. Δεδομένου ότι έχει παρατηρηθεί η παραγωγή ιοσωματίων HERV-K σε κυτταρικές σειρές που προέρχονται από τερατοκαρκίνωμα και μελάνωμα [96, 392, 393], καθώς επίσης και έκφραση των HERV-K10 σε καρκινικά κύτταρα [370], διερευνήσαμε την πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης σε καρκινικές κυτταρικές σειρές.

Αποδείξαμε την έκφραση RNA των HERV-K10 σε υψηλά επίπεδα σε τρεις καρκινικές κυτταρικές σειρές, HeLa, A549 και H1299 (Εικ. 34). Επιπλέον διαπιστώθηκε για πρώτη φορά η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης, συμπεράσμα το οποίο βασίστηκε σε δύο βασικά ευρήματα, δηλαδή την παραγωγή της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP σε κυτταρικό επίπεδο (Εικ. 28), καθώς και την ενσωμάτωση νέων αντιγράφων HERV-K10 σε επίπεδο γονιδιώματος (Εικ. 29).

Επομένως, στις καρκινικές σειρές είναι ενεργές οι μηχανές μεταγραφής, αντίστροφης μεταγραφής, μετάφρασης και ματίσματος, όπως προκύπτει από τη δομή του ανασυνδυασμένου στοιχείου που χρησιμοποιήθηκε και τη λογική ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης. Οι μηχανές αυτές μπορούν μάλιστα να δράσουν ακόμη και στην περίπτωση ελλειμματικών σε αντίστροφη μεταγραφή ρετροτρανσποζονίων.

Η ανίχνευση γεγονότων ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊκού στοιχείου HERV-K10 για πρώτη φορά μας ώθησε να μελετήσουμε πως μεταβάλλεται η συχνότητα ρετρομετάθεσης των στοιχείων HERV-K10, οπότε και μετρήθηκαν συχνότητες που κυμαίνονταν από χαμηλά 0.5% μέχρι και υψηλά επίπεδα που ξεπερνούσαν το 38%, ανάλογα με τον κλώνο και την κυτταρική σειρά (Εικ. 31, 32). Μάλιστα, αξίζει να σημειωθεί ότι λαμβάνοντας υπόψη την φυσική συχνότητα ρετρομετάθεσης που έχει υπολογιστεί ότι είναι 1×10^{-6} γεγονότα ρετρομετάθεσης ανά κύτταρο και ανά κυτταρική γενεά, οι τιμές αυτές αντιστοιχούν σε 5,000 μέχρι και πάνω από 380,000 φορές υψηλότερη συχνότητα σε σχέση με τη φυσική. Τα αποτελέσματα αυτά προέκυψαν από μέτρηση με κυτταρομετρία ροής και αντανακλούν πραγματικά γεγονότα ρετρομετάθεσης HERV-K10, καθώς όπως έχει ήδη εξηγηθεί, το ανασυνδυασμένο HERV μπορεί να παράξει EGFP μόνο μετά από ένα γεγονός ρετρομετάθεσης (Εικ. 27).

Βρέθηκε σημαντική απόκλιση των τιμών συχνότητας ρετρομετάθεσης μεταξύ των τριών διαφορετικών κυτταρικών σειρών αλλά και μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών κλώνων που απομονώθηκαν και μελετήθηκαν. Οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι πιθανό να αντανακλούν διαφορές στη φύση και την προέλευση της κάθε κυτταρικής σειράς ή/και σε παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και ανίχνευση της EGFP. Έτσι, θα μπορούσε να έχει γίνει ενσωμάτωση των νέων αντιγράφων HERV σε περιοχές που ρυθμίζονται από αρνητικά ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία καταστέλλουν την έκφρασή τους. Επίσης, είναι πιθανή η επιγενετική αποσιώπηση των νέων στοιχείων μετά από την ένθεσή τους στο γονιδίωμα, ιδιαίτερα δε μετά από παρατεταμένη παραμονή των κυτταρικών κλώνων σε καλλιέργεια. Το φαινόμενο

αυτό θα μπορούσε να συμβάλλει ιδιαίτερα στους απομονωμένους κλώνους όπου μέχρι την απομόνωση και το χειρισμό τους μεσολαβεί μεγάλο χρονικό διάστημα, λόγω της επιλογής με αντιβιοτικό και της καλλιέργειας για την ανάπτυξη ικανού αριθμού κυττάρων που έχει προηγηθεί. Ακόμη, δε μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα να έχουν προκύψει μεταλλάξεις κατά την αντιγραφή του στοιχείου οι οποίες καθιστούν το νέο αντίγραφο ανενεργό. Τέλος, η EGFP είναι η ίδια τοξική όταν εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα. Επομένως, ο συνδυασμός υψηλής συχνότητας ρετρομετάθεσης και υψηλών επιπέδων έκφρασης της πρωτεΐνης μπορεί να οδηγήσουν σε αυξημένα φαινόμενα κυτταροτοξικότητας, που θα έχει ως επακόλουθο την αδυναμία επιβίωσης των συγκεκριμένων κυττάρων. Έτσι λοιπόν, είναι πολύ πιθανό να μην έχουν καταμετρηθεί γεγονότα ρετρομετάθεσης που συνέβησαν ή/και να μην έχουν συνυπολογιστεί κύτταρα θετικά σε ρετρομετάθεση τα οποία έχουν πιθανώς οδηγηθεί σε κυτταρικό θάνατο, καθώς η μέτρηση της συχνότητας γίνεται βάσει των επιπέδων φθορισμού των ζωντανών κυττάρων. Συνολικά, οι συχνότερες ρετρομετάθεσης που μετρήθηκαν είναι πολύ πιθανό να είναι πολύ μικρότερες από τις πραγματικές.

1.2 ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΕΣ ΜΕΤΑΓΡΑΦΑΣΕΣ

Η παρουσία ειδικών μεταγραφημάτων HERV-K10 αποτελεί στοιχείο απαραίτητο για την ολοκλήρωση της ρετρομετάθεσης. Μάλιστα, τα επίπεδα έκφρασης των HERV-K10 είναι αντίστοιχα των συχνοτήτων ρετρομετάθεσης που ανιχνεύθηκαν στις συγκεκριμένες κυτταρικές σειρές, δηλαδή A549>HeLa>H1299 (Εικ. 34). Για να ολοκληρωθεί ένα γεγονός ρετρομετάθεσης θα πρέπει να πραγματοποιηθεί αντίστροφη μεταγραφή των μεταγραφημάτων αυτών. Επομένως, η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης των HERV-K10 αντικατοπτρίζει την έκφραση ενεργών αντίστροφων μεταγραφασών, καθώς η συμμετοχή των συγκεκριμένων ενζύμων είναι κρίσιμης σημασίας για τη ρετρομετάθεση. Η έκφραση αντίστροφων μεταγραφασών που συμμετέχουν στο φαινόμενο επιβεβαιώθηκε από την παρατήρηση ότι υπό την επίδραση ετραβιρίνης, αναστολέα των RTασών, σημειώνεται ταυτόχρονη μείωση της συχνότητας γεγονότων ρετρομετάθεσης, η οποία μάλιστα φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αναστολέα (Εικ. 35). Επομένως, πολύ υψηλά επίπεδα ρετρομετάθεσης είναι δυνατό να επιτευχθούν μόνο παρουσία υψηλών επιπέδων ενεργής μορφής του ενζύμου.

Γονίδια που κωδικοποιούν για αντίστροφες μεταγραφάσες εκφράζονται συνεχώς σε διαφορετικά αλλά ανιχνεύσιμα επίπεδα σε αρκετούς φυσιολογικούς ιστούς [394]. Όπως είναι γνωστό, πολλοί HERV φέρουν λειτουργικά γονίδια pol που κωδικοποιούν για αντίστροφη μεταγραφή και μάλιστα έχει αναφερθεί έκφρασή τους σε διάφορους ιστούς [395]. Το γεγονός αυτό συμβαδίζει με την ανίχνευση έκφρασης αντίστροφης μεταγραφάσης ειδικής για τα HERV-K10 σε επίπεδο RNA στις τρεις κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν (Εικ. 36). Τα επίπεδα έκφρασης της RTάσης ήταν χαμηλότερα σε σχέση με την έκφραση των μεταγραφημάτων HERV, παρόλα αυτά αρκετά υψηλά, ικανά για την παραγωγή ενεργόγυτας αντίστροφης μεταγραφάσης που κατέλυσε την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης.

Δεδομένου ότι το ανασυνδυασμένο ρετρομεταθετό στοιχείο που κατασκευάσαμε και χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα μελέτη δεν έφερε αλληλουχίες του γονιδίου της αντίστροφης μεταγραφάσης του HERV-K10, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα μέταγραφα που ανιχνεύθηκαν παράγονται από ενδογενή στοιχεία των κυττάρων.

Αντίστοιχα, πιστεύουμε ότι πιθανότατα είναι η ίδια αντίστροφη μεταγραφάση που συμμετέχει στη ρετρομετάθεση των HERV-K10 στις ανώριμες μορφές ωαρίων. Μάλιστα, η RTάση θα μπορούσε να έχει επιπλέον χρησιμότητα και ιδιαίτερο ρόλο σε επόμενα στάδια, κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, σε αντιστοιχία με σχετικές παρατηρήσεις που έχουν αναφερθεί για RTάσες άλλων LTR ρτροτρανσποζονίων [396].

Γενικότερα, ο ρόλος των αντίστροφων μεταγραφασών στα κύτταρα όπου εκφράζονται είναι ιδιαίτερα σημαντικός, καθώς συμμετέχουν σε σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως **α)** η γένεση, εκδήλωση και μη μενδελική κληρονομήση νέων γενετικών χαρακτηριστικών, **β)** η πρώιμη εμβρυονική ανάπτυξη και **γ)** ο πολλαπλασιασμός μετασηματισμένων κυττάρων και η ανάπτυξη όγκων [397].

Συνολικά, η αναγνώριση γεγονότων ρετρομετάθεσης τόσο σε ανώριμα ωάρια όσο και σε καρκινικά κύτταρα, είναι συμβατή με τη θεώρηση ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης συμβαίνουν πολύ συχνότερα σε μη διαφοροποιημένα και μετασηματισμένα κύτταρα, αλλά σε πολύ χαμηλά επίπεδα ή και καθόλου σε ιστούς που βρίσκονται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης [397].

1.3. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Από τα αποτελέσματα μας προκύπτει ότι η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης των HERV-K10 συνοδεύεται από αναστολή του διπλασιασμού πολλών απομονωμένων κυτταρικών κλώνων και μάλιστα η ένταση του φαινομένου ήταν ανάλογη των επιπέδων ρετρομετάθεσης. Παρόλα αυτά, το φαινόμενο φαίνεται να αναστρέφεται παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα, που έρχεται σε συμφωνία με ανάλογη παλαιότερη παρατήρηση στο μυ. Συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ο βασικός ρόλος του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από δραστικές μορφές οξυγόνου στις επαγόμενες από ρετρομετάθεση διαταραχές του κυτταρικού κύκλου [389]. Επομένως, θα μπορούσε να υποστηριχθεί μια πιθανή εμπλοκή του μιτοχονδρίου στη σχετιζόμενη με τη ρετρομετάθεση των HERV-K10 αναστολή του κυτταρικού διπλασιασμού.

1.4. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΥΚΛΟΥ

Η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου μετά από βλάβες του DNA ρυθμίζεται από κάποια χαρακτηριστικά σημεία ελέγχου. Στην G1 γίνεται έλεγχος του DNA πριν από τη μεταγραφή του, ενώ στη G2 πραγματοποιείται ένας δεύτερος έλεγχος πριν το κύτταρο εισέλθει στη μίτωση. Έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο p53, το οποίο φέρει μεταλλάξεις στην πλειοψηφία των καρκινικών κυττάρων, συμμετέχει ενεργά στη μηχανή του σημείου ελέγχου G2. Ως απόκριση στη δράση παραγόντων επιβλαβών για την ακεραιότητα του DNA, στα καρκινικά κύτταρα με μεταλλαγμένη p53 παρακάμπτεται το σημείο ελέγχου G1 και επάγεται μιτωτική καταστροφή. Κατά τη διαδικασία της μιτωτικής καταστροφής πολυπύρηννα κύτταρα εισέρχονται στη μίτωση όπου και σταματά η πρόοδος του κυτταρικού κύκλου. Τις περισσότερες φορές μετά τη μετάφραση οδηγούνται τελικά σε άμεση απόπτωση [398].

Έχει πρόσφατα αποδειχθεί ότι η ρετρομετάθεση του VL30 μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικό θάνατο εξαρτώμενο από p53 [389]. Παρόλα αυτά, σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας, η ρετρομετάθεση του HERV-K10 δε φαίνεται να προκαλεί

κυτταρικό θάνατο, αλλά μιτωτική καταστροφή, όπως έχει παρατηρηθεί και μετά από την επίδραση άλλων παραγόντων που προκαλούν βλάβες στο DNA [399]. Αξιοσημείωτη είναι μάλιστα η παρατήρησή μας ότι αυξανόμενης της συχνότητας ρετρομετάθεσης σε κάποιον κυτταρικό πληθυσμό, δηλαδή όσο αυξάνεται ο αριθμός των κυττάρων ενός πληθυσμού στα οποία συμβαίνουν γεγονότα ρετρομετάθεσης, αυξάνεται και ο αριθμός των κυττάρων που συσσωρεύονται στη φάση G2/M του κυτταρικού κύκλου (Εικ. 37).

1.5. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ HeLa

Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 συνοδεύτηκε από διαταραχή του κυτταρικού κύκλου με μιτωτική καταστροφή και μεταβολή του κυτταρικού φαινοτύπου σε κύτταρα HeLa. Σε απομονωμένα κύτταρα HeLa θετικά για ρετρομετάθεση (Εικ. 38) παρατηρήθηκαν ταυτόχρονα χαρακτηριστικά διαφορετικών τύπων προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (Εικ. 40). Είναι γνωστό ότι παράγοντες επιβλαβείς για το DNA επάγουν μορφολογικές αλλαγές χαρακτηριστικές της γήρανσης [400, 401] αλλά και της μιτωτικής καταστροφής [402, 403].

Ο φαινότυπος της γήρανσης και η πολυπλοειδία έχουν συσχετιστεί με τη μιτωτική καταστροφή, η οποία θα μπορούσε να αποτελεί το πρωταρχικό βήμα για την έναρξη της αναστροφής της πολυπλοειδίας και της διαφυγής των κυττάρων από τη πορεία θανάτου [404]. Πολλά πολυπλοειδή κύτταρα επιβιώνουν για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα ως μη πολλαπλασιαζόμενα γιγαντιαία κύτταρα με έναν ή δύο πυρήνες τα οποία έχουν φαινότυπο γήρανσης [405, 406]. Τα κύτταρα αυτά έχουν μεταγενέστερα τη δυνατότητα σχηματισμού αποικιών. Επομένως, υπάρχει κάποιο μονοπάτι το οποίο φαίνεται να αποτελείται από πολλά βήματα, το οποίο περιλαμβάνει αρχικά πολλαπλασιασμό του DNA που οδηγεί σε πολυπλοειδία κι έπειτα αναστροφή της πολυπλοειδίας και κλωνογενή διαφυγή των κυττάρων [407]. Τέτοια γεγονότα θα μπορούσαν πιθανώς να εξηγήσουν την επιβίωση των κυτταρικών κλώνων παρά τα υψηλότερα ποσοστά ρετρομετάθεσης.

1.6. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΣ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΣ ΣΕ ΚΥΤΤΑΡΑ A549

Αποδείξαμε ότι η ρετρομετάθεση των στοιχείων HERV-K10 συμβαίνει σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα σε κύτταρα A549 και μάλιστα συνοδεύεται από ιδιαίτερα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των κυττάρων (Εικ. 39). Συγκεκριμένα, σε κλώνους με πολύ υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης παρατηρήθηκε η επικράτηση ενός πιο επιμηκυμένου φαινοτύπου σε σχέση με τα κύτταρα μάρτυρα. Επομένως, η ρετρομετάθεση των HERV-K10 συμβάλλει στη μετατροπή της κλασικής επιθηλιακής μορφολογίας προς ένα περισσότερο μεσεγχυματικού τύπου φαινότυπο. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε ίσως να οφείλεται στην επιθηλιακή-μεσεγχυματική μετάπτωση (epithelial to mesenchymal transition, EMT). Πρόκειται για μια διαδικασία κατά την οποία τα επιθηλιακά κύτταρα αλλάζουν φαινότυπο και αποκτούν ιδιότητες μεσεγχύματος μέσω της απώλειας διακυτταρικών συνδέσεων και ενίσχυσης της κυτταρικής κινητικότητας και χαρακτηρίζει τόσο την εμβρυογένεση [408] όσο και την καρκινογένεση [409]. Είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται πιθανή συσχέτιση μεταξύ της ρετρομετάθεσης και της EMT σε ανθρώπινα κύτταρα.

Συμπερασματικά, αξιοσημείωτη είναι η παρατήρησή μας ότι, εκτός από τα διαφορετικά επίπεδα ρετρομετάθεσης, μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών σειρών που μελετήθηκαν υπήρχαν επίσης διαφορετικές φαινοτυπικές εκδηλώσεις του φαινομένου. Έτσι **α)** στα κύτταρα A549 σημειώθηκαν υψηλότερα επίπεδα ρετρομετάθεσης και ενδείξεις EMT, **β)** στα HeLa σημειώθηκαν χαμηλότερα επίπεδα ρετρομετάθεσης και ενδείξεις μιτωτικής καταστροφής, ενώ, τέλος, **γ)** στα H1299 οι συχνότητες ρετρομετάθεσης κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα και δε σημειώθηκαν σημαντικές φαινοτυπικές διαφοροποιήσεις σε σχέση με τα κύτταρα του μάρτυρα. Οι διαφορές αυτές παραμένουν, παρά το γεγονός ότι όλες οι κυτταρικές σειρές που μελετήθηκαν είναι καρκινικές και επιθηλιακού τύπου, ακόμη περισσότερο δε ότι τόσο τα A549 όσο και τα H1299 προέρχονται από κύτταρα πνεύμονα. Παρόλα αυτά, θα πρέπει να σημειωθεί μια σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών κυτταρικών σειρών που αφορά στην έκφραση της ογκοκατασταλτικής πρωτεΐνης p53. Συγκεκριμένα, **α)** τα A549 εκφράζουν αγρίου τύπου p53 [410], **β)** τα HeLa εκφράζουν πολύ χαμηλά επίπεδα λειτουργικής πρωτεΐνης p53, εξαιτίας της μόλυνσης από τον ιό 16 του παπλώματος, ο οποίος κωδικοποιεί για την ογκοπρωτεΐνη E6 η οποία συμμετέχει στην αποικοδόμηση της p53 [411] και **γ)** τα H1299 δεν φέρουν το γονίδιο της p53 (p53 null), εξαιτίας ομοζυγωτικής διαγραφής του [412]. Επομένως, η ογκοκατασταλτική πρωτεΐνη p53 πιθανώς συμμετέχει στο μηχανισμό ρύθμισης της ρετρομετάθεσης του ενδογενούς ρετροϊού HERV-K10.

1.7. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΚΑΙ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΒΛΑΒΕΣ

Η ποικιλομορφία του ανθρώπινου γονιδιώματος είναι πραγματικά αξιοθαύμαστη και προέρχεται κυρίως από πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου (Single nucleotide polymorphisms, SNP) και πολυμορφισμούς αριθμού αντιγράφων (Copy number variations, CNV). Ενός άλλου τύπου ποικιλομορφία του γονιδιώματος, η οποία προέρχεται αυτήν τη φορά από δομικές ανακατατάξεις, μπορεί να προκληθεί από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που υπάρχουν στο γονιδίωμα σε πολλά αντίγραφα και τα οποία συμβάλλουν σημαντικά στο σχηματισμό δομικών πολυμορφισμών [413-416]. Βέβαια, η πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότων ανασυνδυασμού λόγω ρετρομετάθεσης των HERV είναι σχετικά μικρή εξαιτίας του σχετικά μικρού αριθμού τους στο γονιδίωμα [63, 417, 418]. Επιπλέον, οι HERV βρίσκονται κατά κύριο λόγο σε ετεροχρωματινικές περιοχές και περιοχές όπου δεν υπάρχουν πολλά γονίδια [18, 99]. Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι ανιχνεύθηκαν ρετρομεταθετικά ενεργά στοιχεία HERV-K10, τα οποία μάλιστα ήταν ικανά να μετατεθούν σε ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα, μας ώθησε να ελέγξουμε την πιθανή επίδραση των στοιχείων αυτών σε επίπεδο χρωμοσωμάτων. Εξαιτίας τεχνικών δυσκολιών δεν καταφέραμε να εντοπίσουμε διαφορές στην κατανομή των HERV-K10 στα χρωμοσώματα μεταξύ κλώνων όπου μετρήθηκαν διαφορετικές συχνότητες ρετρομετάθεσης (Εικ. 30). Αντίθετα, τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν ότι μεγάλος αριθμός γεγονότων ρετρομετάθεσης που οδηγεί σε συσσώρευση κυττάρων στη G2/M φαίνεται να συσχετίζεται με αυξημένη συχνότητα SCE τόσο στο ίδιο χρωμόσωμα όσο και συνολικά (Πιν. 29, 30). Τα βασικά φαινοτυπικά χαρακτηριστικά της μιτωτικής καταστροφής, όπως ο σχηματισμός πολυπλοειδών κυττάρων [458], φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα δευτερογενών χρωμοσωμικών βλαβών που προκύπτουν μετά από τον εντοπισμό και την επιδιόρθωση των πρωτογενών βλαβών του DNA [419].

Συνολικά, φαίνεται πως είναι δυνατό να συμβούν γεγονότα ρετρομετάθεσης και μάλιστα σε ιδιαίτερα υψηλές συχνότητες. Τα γεγονότα αυτά, όταν συμβαίνουν σε μεγάλη συχνότητα, έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε κυτταρικό αλλά και χρωμοσωμικό επίπεδο.

1.8. ΕΚΦΡΑΣΗ RNA HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ

Τα ώριμα ωοκύτταρα χαρακτηρίζονται από υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης, τα οποία οφείλονται στην απόλυτα ρυθμιζόμενη έκφραση και δράση μεθυλοτρανσφερασών [420]. Ένα παράθυρο ευκαιρίας για τη μεταγραφική ενεργότητα εμφανίζεται κατά την κυτταρική ανάπτυξη, οπότε φυσιολογικά υπάρχει μια περιορισμένη έκφραση των ρετροτρανσποζονιακών πρωτεϊνών στα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα. Κατά την ωρίμανση του ωοκυττάρου, μεταγράφεται μεγάλος αριθμός γονιδίων και παράγονται mRNA τα οποία είτε μεταφράζονται άμεσα ή αποθηκεύονται στο ωόπλασμα υπό μορφή σταθερών μεταγράφων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν αργότερα στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης [421]. Μάλιστα, σημαντικό ποσοστό του συνόλου των μητρικών mRNA αντιστοιχεί σε μετάγραφα μεταθετών στοιχείων και χιμαιρικά μετάγραφα μεταθετών στοιχείων με γονίδια του ξενιστή [422].

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε την έκφραση του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 σε επίπεδο RNA σε ανώριμες μορφές ωοκυττάρων στο στάδιο των βλαστικών κυστιδίων (GV) και αποδείξαμε την ύπαρξη μεταγράφων στο ωόπλασμα. Συγκεκριμένα, αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι τα ενεργά αυτά ρετρομεταθετά στοιχεία, τα οποία είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στην εκδήλωση νοσημάτων στον άνθρωπο, εκφράζονται σε μεταγραφικό επίπεδο στο ανθρώπινο ωάριο και μάλιστα σε υψηλά επίπεδα. Η έκφραση σε επίπεδο RNA υποστηρίζεται από την ανίχνευση ειδικών μεταγράφων μέσω RT-PCR (Εικ. 41) αλλά και από την ανάλυση με RNA-FISH (Εικ. 42), μέσω της οποίας ανιχνεύθηκε ισχυρό σήμα σε μονήρη ωοκύτταρα.

Η έκφραση ρετροτρανσποζονίων έχει αναφερθεί τόσο στους γαμέτες όσο και σε πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του ζυγωτού στον μυ αλλά και πιο πρόσφατα στον άνθρωπο [370, 422-425]. Μάλιστα, στο ίδιο στάδιο διαφοροποίησης των ωαρίων εκφράζονται επίσης τα L1, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα σε σχέση με τα HERV-K10 [370].

Η μεταγραφική ενεργότητα των HERV-K ρυθμίζεται άμεσα από τη μεθυλίωση των νησίδων CpG [222]. Αντίστροφα, η υπομεθυλίωσή τους μπορεί να οδηγήσει σε επανενεργοποίηση και μπορεί να προκαλέσει κάποιες μορφές καρκίνου [92]. Ακόμη, πολλές οικογένειες HERV είναι ενεργές στον πλακούντα [426]. Όπως είναι, λοιπόν, λογικό θα πρέπει να υπάρχουν και επιπλέον μηχανισμοί ρύθμισης, οι οποίοι αποτρέπουν τη ρετρομετάθεση ακόμη και όταν πραγματοποιείται η μεταγραφή ορισμένων ακέραιων ρετροτρανσποζονίων [427].

Πιστεύουμε ότι η έκφραση ρετροτρανσποζονιακού RNA στα ανθρώπινα ωάρια οφείλεται κυρίως στην παροδική υπομεθυλίωση του γονιδιώματος [420], καθώς στα σωματικά κύτταρα η έκφραση των ρετροτρανσποζονίων καταστέλλεται από τη μεθυλίωση [105]. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης HERV-K10 σε σχέση με αυτά των L1 μπορεί να οφείλονται στα διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσής τους, καθώς έχει βρεθεί διαφορά στα επίπεδα μεθυλίωσης των HERV-K μεταξύ διαφορετικών αντιγράφων και διαφορετικών κυτταρικών σειρών [222]. Μάλιστα, τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης των εξελικτικά νεότερων HERV-K10 συνάδουν με αντίστοιχα

ευρήματα σε ωάρια μυών, σύμφωνα με τα οποία εξελικτικά νεότερα LTR ρετροτρανσποζόνια εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα [428]. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν ότι η έκφραση εξελικτικά νεότερων LTR ρετροτρανσποζονίων σε υψηλά επίπεδα πιθανώς αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό των ωαρίων των θηλαστικών. Από την άλλη, έχει βρεθεί υψηλότερη έκφραση RNA των L1 σε σχέση με αυτή των HERV-K10 και των SVA σε διαφορετικούς τύπους σωματικών κυττάρων, γεγονός που μάλλον υποδεικνύει την ύπαρξη ενός διαφορετικού προτύπου έκφρασης στα σωματικά κύτταρα [370].

Συνολικά, τα παραπάνω ευρήματα μάλλον υποστηρίζουν την ύπαρξη ενός δικτύου αλληλεπιδρώντων εκφραζόμενων ρετροτρανσποζονίων, όπου η έκφραση του κάθε ρετροτρανσποζονίου επηρεάζει την έκφραση των υπολοίπων μελών του δικτύου [429]. Ως προς τη βιολογική σημασία της έκφρασης ρετροτρανσποζονίων, πιστεύουμε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης του RNA των HERV-K10 μπορεί να αφορά σε πρωτεΐνες του φακέλου που συμβάλλουν στην επίτευξη της ανοσοκαταστολής που είναι απαραίτητη για τη σύνδεση ωαρίου σπερματοζωαρίου και την επακόλουθη σύντηξη κατά τη γονιμοποίηση [430]. Εναλλακτικά, η έκφραση των HERV-K10 και των SVA, δεδομένης της ομολογίας που εμφανίζουν στην αλληλουχία τους, είναι πιθανό να συμβάλλει στην αυτο- ή αλληλο-καταστολή μέσω ενός αποσιωπητικού μηχανισμού παρόμοιου με αυτόν που έχει αποδειχτεί ότι δρα στην περίπτωση των ρετροτρανσποζονίων Ty1 [431]. Τέλος, έχει προταθεί ότι η έκφραση ρετροτρανσποζονίων θα μπορούσε να οδηγεί στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης κατά τη μετάβαση από το ωάριο στο στάδιο του προεμφυτευτικού εμβρύου [422].

1.9. ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΣΗ HERV-K10 ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΩΑΡΙΑ

Μετά από την ανίχνευση μεταγράφων HERV-K10 σε ωάρια και δεδομένου ότι η παρουσία μεταγράφων είναι απαραίτητη για την πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης του αντίστοιχου στοιχείου, διερευνήσαμε την πιθανότητα πραγματοποίησης γεγονότων ρετρομετάθεσης του HERV-K10 σε ανθρώπινα ωοκύτταρα. Αποδείξαμε ότι συμβαίνουν γεγονότα ρετρομετάθεσης του HERV-K10, συμπέρασμα που βασίστηκε στην ανίχνευση αφενός EGFP-φθορίζοντων κυττάρων και αφετέρου νέων ενσωματώσεων στο γονιδίωμα (Εικ. 43). Μάλιστα, τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα (Πιν. 31).

Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν ότι οι μηχανές μεταγραφής, αντίστροφης μεταγραφής και μετάφρασης των ρετροτρανσποζονίων καθώς επίσης και η μηχανή ματίσματος είναι ενεργές στο ωοκύτταρο. Μάλιστα, είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν γεγονότα ρετρομετάθεσης ακόμη και στην περίπτωση μη αυτόνομων (ελλειμματικών σε αντίστροφη μεταγραφή) ρετροτρανσποζονίων, ενώ έχουν ανιχνευθεί γεγονότα ρετρομετάθεσης ακόμη και μη ανθρώπινων ρετροτρανσποζονίων [370].

Πιστεύουμε ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης που οδηγούν στην εμφάνιση νοσημάτων θα πρέπει να οφείλονται σε γεγονότα που διαφεύγουν των μηχανισμών ελέγχου της ρετρομετάθεσης. Από την άλλη, τα ελεγχόμενα γεγονότα ρετρομετάθεσης μπορεί να αποδειχτούν ωφέλιμα για το ωοκύτταρο και συμβάλλουν:

- α)** στην παραγωγή αντι-νοσηματικών μεταγράφων [432] τα οποία συμμετέχουν στην αποικοδόμηση mRNA μέσω RNAi και οδηγούν τελικά σε μεθυλίωση [433] και

β) πιθανώς στην αποσιώπηση ρετροτρανσποζονίων ή/και την αναδιαμόρφωση του γονιδιώματος στο στάδιο MII της ωρίμανσης του ωοκυττάρου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η έκφραση ενός δικτύου ρετροτρανσποζονιακών RNA καθώς και η πραγματοποίηση γεγονότων ρετρομετάθεσης θα μπορούσαν να είναι ουσιώδους σημασίας για την ωρίμανση των ωοκυττάρων και τη γονιμοποίηση.

2. ΜΕΛΕΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ

2.1. ΔΙΑΤΑΡΑΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ PGD

Αποδείξαμε για πρώτη φορά ότι μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης του HERV-K10 σε χοριακές λάχνες μετά από IVF και PGD συσχετίζεται με αλλαγές των προτύπων μεθυλίωσης της συστοιχίας γονιδίων DLK1/MEG3, η οποία περιλαμβάνει πολλές αλληλουχίες που προέρχονται από ρετροτρανσποζόνια. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν το ρόλο των HERV και των ρετρομεταθετών στοιχείων γενικότερα στην εγκαθίδρυση των αποτυπωμάτων, όταν αυτά αποτελούν δομικά συστατικά του περιβάλλοντος γονιδιώματος. Τα στοιχεία που υποστηρίζουν τα συμπεράσματά μας προέκυψαν από δύο βασικά ευρήματα που αφορούν στο πρότυπο μεθυλίωσης του HERV-K10 από τη μία και γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση από την άλλη.

Αρχικά λοιπόν, βρήκαμε αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του HERV-K10 σε εμβρυϊκούς ιστούς μετά από φυσιολογικές συλλήψεις (Πίν. 32), γεγονός που είναι συμβατό με την τρέχουσα θεώρηση ότι οι ενδογενείς ρετροϊοί είναι αδρανοποιημένοι κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, πόσο μάλλον δε σε διαφοροποιημένους ιστούς [434]. Μη αναμενόμενη ήταν η ανίχνευση τόσο του μεθυλιωμένου όσο και του μη μεθυλιωμένου αλληλόμορφου σε μικρό ποσοστό δειγμάτων (10%), που θα μπορούσε έστω και εν μέρει να οφείλεται σε διαφορές στα επίπεδα μεθυλίωσης των LTR μεταξύ διαφορετικών ατόμων, όπως ισχύει για LTR ρετροτρανσποζόνια των τρωκτικών [435]. Επομένως, τα μη μεθυλιωμένα στοιχεία HERV-K10 που ανιχνεύθηκαν στην ομάδα ελέγχου πιθανότατα είναι αποτέλεσμα εγγενών ή/και εξωγενών παραγόντων, που οδηγούν σε χαλάρωση του επιγενετικού ελέγχου. Η διαταραχή του επιγενετικού προτύπου του HERV-K10 που παρατηρείται στην ομάδα PGD θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα στρες που έχει προκληθεί είτε από την ίδια τη διαδικασία της PGD ή από την επίδραση άλλων παραγόντων σε προεμφυτευτικό στάδιο ή/και μετά από την εμφύτευση.

Στο επίπεδο των γαμετών, η ορμονική υπερενεργοποίηση των ωοθηκών, μια κοινή πρακτική που χρησιμοποιείται για την επαγωγή πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας στις ART [348], οδηγεί στην παραγωγή οιστραδιόλης στο αίμα σε επίπεδα πολύ υψηλότερα από τα φυσιολογικά [436], τα οποία ως γνωστόν ενεργοποιούν την έκφραση των HERV-K [437]. Επιπλέον, η ορμονική υπερδιέγερση των ωοθηκών με γοναδοτροπίνες θα μπορούσε να προκαλέσει πρόωρη απελευθέρωση ανώριμων ωοκυττάρων στα οποία δεν έχει ολοκληρωθεί η εγκαθίδρυση των αποτυπωμάτων [438, 439]. Έτσι λοιπόν, σε ορισμένες περιπτώσεις πραγματοποιείται *in vitro* ωρίμανση των ωοκυττάρων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για γονιμοποίηση με ART, γεγονός που θα μπορούσε να συνιστά επιπλέον παράγοντα κινδύνου [334]. Δεδομένου ότι αποδείξαμε ότι τα HERV-K10 είναι ενεργά σε ανώριμα ωοκύτταρα στον άνθρωπο [370], οπότε πιθανότατα και μη μεθυλιωμένα, η διαδικασία αυτή θα

μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της επανεγκαθίδρυσης των προτύπων μεθυλίωσης που συμβαίνει στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης του ωοκυττάρου. Η ποιότητα του DNA των γαμετών θα μπορούσε επίσης να βρίσκεται σε άμεση συσχέτιση με την εγκαθίδρυση της μεθυλίωσης, αφού όπως έχει αναφερθεί, παρατηρούνται μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης LTR ρετροτρανσποζονίων σε έμβρυα μετά από ICSI με σπερματοζωάρια τα οποία έφεραν κακής ποιότητα κατακερματισμένο DNA [440].

Επιπλέον, δε θα πρέπει να ξεχνάει κανείς ότι οι ART και η PGD είναι ιδιαίτερα παρεμβατικές μέθοδοι και προϋποθέτουν παρατεταμένη έκθεση των γαμετών και του πρώιμου εμβρύου σε *in vitro* συνθήκες [441, 442]. Επομένως, θα μπορούσαν με τη σειρά τους να συμβάλλουν σε πιθανούς κινδύνους που σχετίζονται με την εμβρυονική ανάπτυξη μετά από την εμφύτευση. Η PGD δεν εφαρμόζεται αρκετά χρόνια ώστε να μπορούν να εκτιμηθούν πιθανοί κίνδυνοι που προκύπτουν από την εφαρμογή της. Επιπλέον, έχει αναφερθεί τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση σε προεμφυτευτικά έμβρυα στον άνθρωπο εξαιτίας της επίδρασης στρεσογόνων παραγόντων [443]. Μάλιστα, ένα από τα σημαντικότερα γονίδια που επηρεάζονται είναι το Rb με το σηματοδοτικό μονοπάτι του οποίου σχετίζεται η έκφραση των HERV-K [444]. Επομένως, η επιγενετική απορρύθμιση του HERV-K10 θα μπορούσε να οφείλεται σε μεταβολή της έκφρασης του Rb. Από την άλλη, οι ROS που υπάρχουν στα θρεπτικά μέσα καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται στις ART θα μπορούσαν να επηρεάζουν την ποιότητα είτε των γαμετών είτε του εμβρύου προεμφυτευτικά [445]. Η παρουσία των ROS θα μπορούσε να οδηγήσει σε ενεργοποίηση των HERV-K10, μιας και το οξειδωτικό στρες προκαλεί ορισμένες φορές υπομεθυλίωση συγκεκριμένων ενδογενών ρετροϊών [390].

Μετά την εμφύτευση, η επίδραση στρεσογόνων παραγόντων του περιβάλλοντος θα μπορούσε να επηρεάσει με διαφορετικό τρόπο τον επιγενετικό έλεγχο του κάθε ατόμου, διαταράσσοντας τα επιγενετικά πρότυπα και οδηγώντας πιθανώς στην εμφάνιση ασθενειών [446].

Συνολικά λοιπόν, στρεσογόνες συνθήκες πριν και μετά την εμφύτευση θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μη φυσιολογική ενεργοποίηση των HERV-K10 που θα μπορούσε με τη σειρά της να οδηγήσει σε απορρύθμιση της μεθυλίωσης παρακείμενων αλληλουχιών.

Αναφορικά με τα πρότυπα μεθυλίωσης των CDN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 (Πιν. 33, 34), που χαρακτηρίζονται από χαμηλό ρετροτρανσποζονιακό φορτίο, παρατηρήσαμε ότι αυτά δεν επηρεάστηκαν στην ομάδα PGD, εύρημα που συνάδει με παλαιότερες παρατηρήσεις σε παιδιά που γεννήθηκαν μετά από IVF και ICSI [447, 448]. Αντίθετα, ένα σημαντικό εύρημα της μελέτης μας ήταν η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης DLK1/MEG3 μετά από PGD (Πίν. 35). Η παρατήρηση αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία αν αναλογιστεί κανείς ότι η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 στο έμβρυο μπορεί πολλές φορές να προκαλέσει αυτόματες αποβολές [449]. Όπως διαπιστώσαμε, πρόκειται για περιοχή του γονιδιώματος η οποία διαθέτει πλήθος αλληλουχιών ρετροτρανσποζονιακής προέλευσης. Έχει προταθεί η εγκαθίδρυση αποτυπώματος σε ένα γονίδιο εξαρτάται από δύο βασικά *cis*-δρώντα στοιχεία: **α)** την παρουσία μια DMR, η οποία αποτελεί απαραίτητη αλλά όχι ικανή συνθήκη και **β)** το περιβάλλον γονιδίωμα [450].

Σε παλαιότερη μελέτη έχει αποδειχθεί ότι τα επίπεδα μεθυλίωσης LTR ρετροτρανσποζονίων κατά την προεμφυτευτική ανάπτυξη είναι αντίστοιχα αυτών των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση [451]. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι για τη

μεθυλίωση κατά τη γαμετογένεση αλλά και για τη διατήρηση της μεθυλίωσης μετά από τη γονιμοποίηση τόσο των DMR γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση όσο και των ρετροτρανσποζονίων απαιτείται η δράση των ίδιων μεθυλοτρανσφερασών [234, 452]. Μάλιστα, έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η γονιδιωματική αποτύπωση μέσω DMR πιθανώς προέκυψε από την αποσιώπηση των ρετροτρανσποζονίων μέσω μεθυλίωσης του DNA [235]. Τέλος, πρόσφατα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η ίδια η ανάπτυξη ρυθμίζεται από τη χρονική και χωρική έκφραση και καταστολή των ρετρομεταθετών στοιχείων, και ότι ορισμένα κυτταρικά γονίδια τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στα στάδια αυτά συρρυθμίζονται με τους ενδογενείς ρετροϊούς και άλλες αλληλουχίες που προέρχονται από αυτούς [434].

Βάσει των παραπάνω, πιστεύουμε ότι αφενός τα επίπεδα μεθυλίωσης του HERV-K10 και αφετέρου οι αλληλουχίες ρετροτρανσποζονιακής προέλευσης που περιέχονται στο περιβάλλον γονιδίωμα της DMR του DLK1/MEG3 αποτελούν κρίσιμες παραμέτρους που συμβάλλουν στη ρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Αυτό θα μπορούσε να συμβαίνει μέσω: **α)** επιστράτευσης των DNMT από το HERV-K10 και **β)** δομικής αναδιαμόρφωσης της αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος που προκαλείται από τα ρετροτρανσποζόνια και η οποία υποβοηθά τη δράση των DNMT.

Επομένως, προτείνουμε ότι η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 στην ομάδα PGD αποτελεί το συνδυαστικό αποτέλεσμα της επιγενετικής απορρύθμισης του HERV-K10 που προκαλείται από το στρες και της παρουσίας μεγάλου αριθμού αλληλουχιών προερχόμενων από ρετρομεταθετά στοιχεία στη συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος.

2.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Στην πολυσύνθετη διαδικασία της παραγωγής και της ωρίμανσης του σπέρματος συμμετέχει ενεργά πλειάδα γενετικών και επιγενετικών παραγόντων. Οι παράγοντες αυτοί συμβάλλουν στο σχηματισμό του ώριμου σπέρματος που έχει την ικανότητα να γονιμοποιήσει ένα ωοκύτταρο και να συνεισφέρει στο σχηματισμό ενός υγιούς εμβρύου. Επιπλοκές σε κάποιους από αυτούς τους ρυθμιστικούς μηχανισμούς που δρουν κατά την ωρίμανση του σπέρματος, θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε υπογονιμότητα.

Μελετήσαμε τη μεθυλίωση DNA σε DMR γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση σε ανώριμα σπερματοζωάρια από βιοψίες όρχεων και ώριμα σπερματοζωάρια από σπερματικό υγρό υπογόνιμων ανδρών, καθώς επίσης και τα επίπεδα μεθυλίωσης του ρετρομεταθετού στοιχείου HERV-K10 στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών. Η μεθυλίωση του DNA στα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση εγκαθίσταται πριν από την είσοδο των κυττάρων στη μείωση και διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης τους [453]. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την επιδιδυμίδα συμβαίνουν περαιτέρω αλλαγές στη μεθυλίωση, αν και οι αλλαγές αυτές περιορίζονται σε γονίδια που δεν υπόκεινται σε αποτύπωση [229]. Ενώ, λοιπόν, η μεθυλίωση των γονιδίων που δεν υπόκεινται σε αποτύπωση είναι πιθανό να διαφέρει μεταξύ των σπερματοζωαρίων που προέρχονται από τους όρχεις και το σπερματικό υγρό, έχει αποδειχθεί ότι σε γόνιμους άνδρες η μεθυλίωση των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση δε διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών πληθυσμών [453, 454].

2.2.1. Διαταραχή της μεθυλίωσης σε ανώριμα σπερματοζώαρια

Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης μπορούν εύκολα να συσσωρευθούν σφάλματα τα οποία στη συνέχεια πιθανότατα θα επηρεάσουν την ορθή ολοκλήρωση της διαδικασίας [441]. Μελετώντας ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων υπογόνιμων ανδρών που προέρχονται από βιοψίες όρχεων, αποδείξαμε ότι παρατηρούνται διαταραχές των προτύπων μεθυλίωσης τριών γονιδίων με πατρικό αποτύπωμα. Τα αποτελέσματά μας καταδεικνύουν τους πιθανούς κινδύνους χρήσης τέτοιων κυττάρων για τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (π.χ. ICSI), εξαιτίας της μεγάλης έκτασης του φαινομένου.

Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης στο DLK1/MEG3 (Πίν. 36). Σε πρόσφατη μελέτη δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή της μεθυλίωσης της συγκεκριμένης DMR σε σπερματοζώαρια που προέρχονταν από βιοψίες όρχεων υπογόνιμων ανδρών [455]. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά σε άνδρες με αποφρακτική αζωοσπερμία, η οποία φαίνεται να συσχετίζεται εντονότερα με διαταραχές της μεθυλίωσης άλλων περιοχών. Συνολικότερα, λοιπόν, ίσως το είδος της αζωοσπερμίας που οδηγεί στην αναγκαιότητα χρησιμοποίησης σπερματοζωαρίων από βιοψία όρχεων προκειμένου να προχωρήσει το ζευγάρι σε ART σχετίζεται με τη διαταραχή μεθυλίωσης του συγκεκριμένων γονιδίων και αλληλουχιών κάθε φορά.

Η καθολική διαταραχή της μεθυλίωσης του IGF2/H19 που παρατηρήθηκε (Πίν. 36) έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες θεωρίες περί συσχέτισης μεταξύ ύπαρξης επιγενετικών σφαλμάτων στο γενετικό υλικό των σπερματοζωαρίων και διαταραγμένης σπερματογένεσης [456]. Τα αποτελέσματα αυτά μάλιστα υπογραμμίζουν ότι η μεθυλίωση της συγκεκριμένης περιοχής είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε μεταβολές στα ανώριμα σπερματοζώαρια, σε συμφωνία με πρόσφατη μελέτη [455]. Η διαταραχή της μεθυλίωσης του CDKN1C (p57^{KIP2}) (Πίν. 36) θα μπορούσε να συσχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση υπογονιμότητα στους άνδρες, καθώς έχει βρεθεί ότι η έκφραση της p57^{KIP2} πιθανώς συμμετέχει στη ρύθμιση της προόδου της μείωσης των πρώιμων σπερματοκυττάρων καθώς και της διαφοροποίησης των σπερματίδων [457].

Συνολικά, εμφανίζεται σημαντική διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης γονιδίων με πατρικό αποτύπωμα σε ανώριμες μορφές σπερματοζωαρίων που προέρχονται από βιοψίες υπογόνιμων ανδρών. Αν και παλαιότερα έχει αναφερθεί ότι σπερματογόνια υπογόνιμων ανδρών δεν εμφάνιζαν αυξημένα σφάλματα αποτύπωσης σε σχέση με τους άνδρες με φυσιολογικό σπέρμα [454], τείνει πλέον να επικρατήσει η άποψη ότι όντως υπάρχει διαταραχή της μεθυλίωσης σε σπερματοζώαρια υπογόνιμων ανδρών. Η διαταραχή αυτή είναι πιθανό να σχετίζεται με διαταραχές της σπερματογένεσης [458], αλλά πιθανώς και με τη συγκεκριμένη φύση της αζωοσπερμίας, εξαιτίας της οποίας δημιουργείται ένα διαφορετικό κάθε φορά δυσμενές μικροπεριβάλλον για την φυσιολογική εγκαθίδρυση των αποτυπωμάτων στον όρχι [455].

2.2.2. Διαταραχή της μεθυλίωσης σε ώριμα σπερματοζώαρια

Αποδείξαμε ότι η ταυτόχρονη διαταραχή των επιγενετικών προτύπων – συγκεκριμένα δε η μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης – διαφορετικών γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση, καθώς επίσης και του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10, πιθανότατα συσχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα, καθώς συνεπάγονται κακή

ποιότητα του σπέρματος. Τα αποτελέσματά μας αναδεικνύουν τη σημασία της εγκαθίδρυσης ορθών επιγενετικών σημάτων στους ώριμους γαμέτες προκειμένου να επιτευχθεί η σωστή λειτουργία τους. Τα συμπεράσματα αυτά βασίστηκαν στη μελέτη του προτύπου μεθυλίωσης αφενός μεν του ενδογενούς ρετροϊκού στοιχείου HERV-K10, αφετέρου δε γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιακή αποτύπωση και φέρουν πατρικό αποτύπωμα.

Αναλυτικά, βρήκαμε αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης του HERV-K10 σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών (Πίν. 37), γεγονός που είναι συμβατό με την τρέχουσα θεώρηση ότι οι ενδογενείς ρετροϊοί είναι αδρανοποιημένοι σε διαφοροποιημένα κύτταρα και ιστούς [434]. Παρόλα αυτά, υπήρξε ένα ποσοστό 18.7%, όπου ανιχνεύθηκε ένα έστω μη μεθυλιωμένο αλληλόμορφο.

Η μείωση της σπερματογένεσης, άρα και η υπογονιμότητα εξαιτίας μικρού αριθμού σπερματοζωαρίων στο σπερματικό υγρό, θα μπορούσε να έχει προκληθεί από καταστροφή του ορχικού ιστού που σχετίζεται με αύξηση των ελεύθερων μορφών οξυγόνου (Reactive oxygen species, ROS) [459]. Συνεπώς, η παρατηρούμενη υπομεθυλίωση του HERV-K10, καθώς και η πιθανή επακόλουθη ενεργοποίησή τους, θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία ROS, καθώς, όπως είναι γνωστό, το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει υπομεθυλίωση συγκεκριμένων ενδογενών ρετροϊών [460].

Αναφορικά με τα πρότυπα μεθυλίωσης των γονιδίων με αποτύπωση IGF2/H19, CDKN1C (p57^{KIP2}) και DLK1/MEG3 που μελετήθηκαν, φαίνεται πως υπάρχει συσχέτιση της διαταραχής της αποτύπωσής τους με την υπογονιμότητα. Όμως, η αποτύπωση των διαφορετικών γονιδίων φαίνεται να επηρεάζεται σε διαφορετικό βαθμό. Συγκεκριμένα, μικρότερη διαταραχή ανιχνεύθηκε στα πρότυπα μεθυλίωσης του CDKN1C (p57^{KIP2}), ενώ σημαντικά διαταραγμένη ήταν η μεθυλίωση του IGF2/H19 και σχεδόν καθολική η διαταραχή της μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 (Πίν. 37).

Αν και μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν στοιχεία σχετικά με τα επίπεδα μεθυλίωσης του CDKN1C (p57^{KIP2}), τα αποτελέσματά μας υποδηλώνουν ότι η διατήρηση του φυσιολογικού προτύπου μεθυλίωσής του σε ώριμα σπερματοζωάρια πιθανώς συσχετίζεται με την ποιότητα του σπέρματος, αλλά δε φαίνεται να αποτελεί τον καθοριστικό παράγοντα. Αντίθετα, η απώλεια της μεθυλίωσης των δύο άλλων γονιδίων που μελετήθηκαν, φαίνεται πως συσχετίζονται άμεσα και ισχυρά με κακή ποιότητα του σπέρματος. Η εκτεταμένη απώλεια της μεθυλίωσης του IGF2/H19 που παρατηρήθηκε συμφωνεί με προηγούμενες αναφορές οι οποίες πρότειναν τη χρήση της μεθυλίωσης της συγκεκριμένης περιοχής ως δείκτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών του σπέρματος [458]. Τέλος, η διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης του DLK1/MEG3 που παρατηρήθηκε σε όλα σχεδόν τα δείγματα σπερματοζωαρίων υπογόνιμων ανδρών, εκτός ενός, είναι εύρημα που συνάδει με προηγούμενη αναφορά σε άνδρες με ήπια και βαριάς μορφής oligospermia [461].

Η απώλεια της μεθυλίωσης στα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση στο σπέρμα έχει συσχετιστεί με μεταλλάξεις στα γονίδια Dnmt3a και Dnmt3l [462, 463], παρόλα αυτά δεν έχουν ανιχνευθεί μεταλλάξεις σε αυτά τα γονίδια σε υπογόνιμους άνδρες με διαταραχές της αποτύπωσης [328]. Εναλλακτικά, η διαταραχή αυτή θα μπορούσε να οφείλεται στη δράση των ROS που πιθανώς υπάρχουν στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών [459], και οι οποίες προκαλούν καταστροφή του DNA [464]. Ακολούθως, τα παραπροϊόντα της καταστροφής του DNA παρεμποδίζουν τη μεθυλίωσή του, παρεμβαίνοντας στη σωστή λειτουργία των μεθυλοτρανσφερασών και οδηγώντας

τελικά σε υπομεθυλίωση του DNA [465].

Τέλος, παρατηρήσαμε το ποσοστό των αλληλουχιών μιας περιοχής που προέρχονται από μεταθετά στοιχεία, συσχετίζεται με το ποσοστό των δειγμάτων που εμφάνισαν διαταραχή στις περιοχές αυτές. Έτσι λοιπόν, περιοχές με περισσότερες αλληλουχίες που προέρχονται από μεταθετά στοιχεία εμφανίζουν μεγαλύτερο ποσοστό διαταραχής μεταξύ των δειγμάτων, δηλαδή DLK1/MEG3>IGF2/H19>CDN1C (p57^{KIP2}). Επομένως, φαίνεται να υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ της περιεκτικότητας της αλληλουχίας σε μεταθετά στοιχεία και της εγκαθίδρυσης των φυσιολογικών προτύπων μεθυλίωσης σε γονίδια με αποτύπωση στα σποερματοζωάρια.

Συμπερασματικά, η σοβαρότητα της διαταραχής του προτύπου μεθυλίωσης που παρατηρήθηκε σε DNA από σπέρμα υπογόνιμων ανδρών φαίνεται να ποικίλει μεταξύ διαφορετικών ατόμων, γεγονός που αντικατοπτρίζεται στις διαφορές μεταξύ του αριθμού ή/και του είδους των γενετικών τόπων που επηρεάζονται κάθε φορά. Επίσης, υποστηρίζεται όλο και περισσότερο η άποψη ότι διαταραχές της μεθυλίωσης γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση φαίνεται να σχετίζονται με την κακή ποιότητα του σπέρματος [466], άρα και με συγκεκριμένο εύρος τιμών συγκέντρωσης, φυσιολογικής μορφολογίας και κινητικότητας του κάθε σπέρματος. Επομένως, σύμφωνα με τα ευρήματά μας, η ταυτόχρονη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης των γονιδίων DLK1/MEG3 και IGF2/H19 θα μπορούσαν πιθανώς να αποτελέσουν δείκτη της ποιότητας του σπέρματος. Τέλος, η περιεκτικότητα του περιβάλλοντος γονιδιώματος γονιδίων με αποτύπωση φαίνεται να αποτελεί κρίσιμη παράμετρο της ρύθμισης της γονιδιωματικής αποτύπωσης.

Συνήθως, στο σπερματικό υγρό των ανδρών, πόσο μάλλον των υπογόνιμων ανδρών, υπάρχει ένας ετερογενής πληθυσμός σπερματοζωαρίων. Ορισμένα από αυτά καλύπτουν όλες τις απαιτήσεις για τη γονιμοποίηση και την ομαλή ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης, ενώ κάποια άλλα είναι ικανά να οδηγήσουν σε γονιμοποίηση, παρόλα αυτά τα έμβρυα που προκύπτουν είναι πολλές φορές μη φυσιολογικά έως και εντελώς δυσλειτουργικά και δεν μπορούν να ολοκληρώσουν την κύηση. Έχει, μάλιστα, αναφερθεί ότι η διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης του σπέρματος μπορεί να έχει αντίκτυπο στη μορφολογία των εμβρύων, όπως επίσης και στο ρυθμό επίτευξης ή/και την έκβαση εγκυμοσύνης [466, 467]. Η μη φυσιολογική μεθυλίωση στο σπέρμα γονιδίων που υπόκεινται σε γονιδιωματική αποτύπωση είναι πιθανό αφενός να σχετίζεται με ανδρική υπογονιμότητα και αφετέρου να μεταβιβάζεται στους απογόνους μέσω της χρησιμοποίησης ICSI και να επηρεάσει την έκβαση της εγκυμοσύνης [209, 328]. Επιπλέον, δεδομένου ότι όλο και περισσότερα ζευγάρια με υπογονιμότητα του ανδρικού παράγοντα καταφεύγουν σε ART, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι οι ολιγοζωοσπερμικοί άνδρες πιθανώς έχουν υψηλότερο κίνδυνο μεταβίβασης των επιγενετικών σφαλμάτων στα παιδιά τους [461]. Αυτό θα μπορούσε να σημαίνει είτε μεταβίβαση της υπογονιμότητας στους απογόνους είτε, ακόμη σοβαρότερα, στην εμφάνιση κάποιου επιγενετικού συνδρόμου.

2.3. ΣΥΝΟΛΙΚΑ ΓΙΑ ΤΙΣ ART

Οι ART και η PGD είναι ιδιαίτερα παρεμβατικές μέθοδοι και παρακάμπτουν πολλούς φραγμούς που ισχύουν στη φυσιολογική διαδικασία σύλληψης. Μάλιστα,

πραγματοποιούνται σε μια χρονική περίοδο κρίσιμη για την εγκαθίδρυση των προτύπων μεθυλίωσης του DNA, επομένως είναι πιθανό να σχετίζονται με επιγενετικούς κινδύνους και να έχουν αντίκτυπο στην υγεία των παιδιών αργότερα στην ενήλικη ζωή [348]. Κάποιες από τις διαδικασίες που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, η κλασική IVF, η ICSI, η κρυοσυντήρηση γαμετών και εμβρύων, η εμβρυομεταφορά σε διάφορα στάδια ανάπτυξης του εμβρύου, η PGD. Μέχρι σήμερα δεν έχει αποδειχθεί η άμεση σύνδεσή τους με την εμφάνιση επιγενετικών διαταραχών [341, 447, 468], παρόλα αυτά ολοένα και περισσότερες αναφορές υπογραμμίζουν τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης επιγενετικών συνδρόμων εξαιτίας της χρήσης τους [334, 346, 469-471]. Ο ακριβής μηχανισμός παραμένει αδιευκρίνιστος.

Είναι γνωστό ότι οι HERV επηρεάζονται από στρεσογόνα ερεθίσματα και η απορρύθμισή τους έχει συσχετιστεί με πολυπαραγοντικά νοσήματα, όπως για παράδειγμα καρκίνος ή αυτοάνοσα νοσήματα [42, 254, 460]. Επιπλέον, τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση αποτελούν πιθανούς στόχους επιγενετικών σφαλμάτων που επάγονται από στρες και τα οποία μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες [472]. Είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι σε τέτοιου είδους μεταβολές είναι πιθανό να εμπλέκονται δίκτυα γονιδίων [446]. Πιστεύουμε ότι οι HERV, δρώντας αφενός μεν σε γενετικό αφετέρου δε σε επιγενετικό επίπεδο, θα μπορούσαν να είναι σημαντικά συστατικά τέτοιων δικτύων τα οποία ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Μετά από τη επίδραση στρεσογόνων παραγόντων, η απορύθμιση των HERV θα μπορούσε να προκαλέσει **α)** επαγωγή της αστάθειας του γονιδιώματος και **β)** αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, ιδιαίτερα δε στην περίπτωση των γονιδίων με επιγενετική αποτύπωση, που μπορεί να εξηγήσει τη σύνθετη φύση των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Υπό το φως των ευρημάτων μας, είναι δελεαστικό να προτείνουμε την πιθανή μελλοντική χρήση του HERV-K10 και των γονιδίων που υπόκεινται σε αποτύπωση ως δεικτών για τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή ως προγνωστικών παραγόντων για τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι ο επιγενετικός έλεγχος των HERV-K10 και το ρετροτρανσποζονιακό φορτίο του περιβάλλοντος γονιδιώματος αποτελούν σημαντικούς παράγοντες για τον καθορισμό των θέσεων όπου θα γίνει εγκαθίδρυση του γονιδιωματικού αποτυπώματος, γεγονός που αναδεικνύει τόσο το λειτουργικό (ποιοτικό) όσο και το δομικό (ποσοτικό) ρόλο των ρετροτρανσποζονίων στη ρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης. Παρόλα αυτά, μιας και δεν έχει ξεκαθαριστεί ακόμη το τοπίο, δε θα πρέπει να ξεχνάμε ότι είναι πιθανό οι διαταραχές της μεθυλίωσης να προϋπάρχουν στους γαμέτες υπογόνιμων ζευγαριών, οπότε πιθανές αλλαγές των αναμενόμενων προτύπων μεθυλίωσης δε θα πρέπει να αποδίδονται αποκλειστικά στη χρησιμοποίηση μεθόδων ART [456].

3. ΣΥΝΟΛΙΚΗ ΑΠΟΤΙΜΗΣΗ

Σήμερα, υπάρχουν πλέον στοιχεία που υποδεικνύουν και σε ορισμένες περιπτώσεις αποδεικνύουν ότι η παρουσία ρετρομεταθετών στοιχείων στο ανθρώπινο γονιδίωμα χρησιμοποιείται για την οργάνωση του γονιδιώματος σε ενεργές και ανενεργές περιοχές, το διαχωρισμό λειτουργικών περιοχών μιας χρωματινικής

περιοχής, την κατεύθυνση της μεταγραφής και τη ρύθμιση της σταθερότητας των μεταγράφων, καθώς και την ανταπόκριση σε στρεσογόνα ερεθίσματα. Αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA και τη δομή της χρωματίνης σε αλληλουχίες του γονιδιώματος που περιλαμβάνουν ρετρομεταθετά στοιχεία μπορούν να επηρεάσουν πλειάδα κυτταρικών λειτουργιών. Δεν είναι προς το παρόν γνωστό σε ποιο βαθμό επηρεάζουν οι αλλαγές στη μεθυλίωση των ρετροτρανσποζονίων τη γονιδιακή έκφραση υπό φυσιολογικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, είναι ξεκάθαρο ότι τέτοιες αλλαγές συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία μιας μεγάλης γκάμας νοσημάτων του ανθρώπου.

Συνολικά, λοιπόν, τα ρετρομεταθετά στοιχεία τείνουν πλέον να αντιμετωπίζονται όχι ως «άχρηστο» συστατικό του DNA ενός οργανισμού, όπως χαρακτηριζόταν για πολλά χρόνια, αλλά, ως στοιχεία κλειδιά που συμμετέχουν σε βασικές βιολογικές διεργασίες.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Σε αντίθεση με την τρέχουσα θεώρηση, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι ο ενδογενής ρετροϊός HERV-K10 δύναται να ρετρομετατεθεί, ακόμη και όταν είναι ελλειμματικός.
- Τα καρκινικά και αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα αποτελούν ευνοϊκό κυτταρικό περιβάλλον για τη γένεση γεγονότων ρετρομετάθεσης, καθώς οι μηχανές μεταγραφής, αντίστροφης μεταγραφής και μετάφρασης των ρετροτρανσποζονίων καθώς επίσης και η μηχανή ματίσματος είναι ενεργές.
- Η συχνότητα ρετρομεταθέσεων σε καρκινικά κύτταρα ανέρχεται σε ασυνήθιστα υψηλά επίπεδα που σε ορισμένες περιπτώσεις ξεπερνούν το 38%.
- Η συχνότητα ρετρομετάθεσης ποικίλει μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται σε ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της κάθε κυτταρικής σειράς.
- Η αντίστροφη μεταγραφή των HERV-K10 μάλλον πραγματοποιείται μέσω της ειδικής για τα HERV-K10 RTάσης που παράγεται από τα ενδογενή στοιχεία.
- Η υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης σχετίζεται με αναστολή του διπλασιασμού, φαινόμενο που αντιστρέφεται παρουσία αντιοξειδωτικού παράγοντα.
- Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε υψηλά επίπεδα συνοδεύεται από διαταραχή του κυτταρικού κύκλου με χαρακτηριστικά μιτωτικής καταστροφής, αυξημένη συχνότητα χρωμοσωμικών θραύσεων και μεταβολή του κυτταρικού φαινοτύπου σε κύτταρα HeLa.
- Η ρετρομετάθεση των HERV-K10 σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα συνοδεύεται από εμφάνιση μεσεγχυματικής μορφολογίας σε κύτταρα A549.
- Η μεταβολή του προτύπου μεθυλίωσης του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 συσχετίζεται με διαταραχή της αποτύπωσης του γονιδίου DLK1/MEG3.
- Ο επιγενετικός έλεγχος του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 και η περιεκτικότητα ενός γονιδίου με αποτύπωση σε αλληλουχίες που προέρχονται από μεταθετά στοιχεία αποτελούν σημαντικές παραμέτρους ρύθμισης της εγκαθίδρυσης των αποτυπωμάτων.
- Οι τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ως παρεμβατικές μέθοδοι, μπορεί να αποτελούν στρεσογόνο παράγοντα οδηγώντας στην απώλεια του επιγενετικού ελέγχου των ρετροτρανσποζονίων και των γονιδίων με αποτύπωση.
- Η ανδρική υπογονιμότητα σχετίζεται με σημαντική διαταραχή του προτύπου μεθυλίωσης γονιδίων με πατρικό αποτύπωμα.
- Η ταυτόχρονη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης των γονιδίων DLK1/MEG3 και IGF2/H19 θα μπορούσαν πιθανώς να αποτελέσουν δείκτη της ποιότητας του σπέρματος.
- Τα ρετροτρανσποζόνια φαίνεται να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης.
- Το ρετροτρανσποζόνιο HERV-K10 και τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για τη βελτίωση των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ή ως προγνωστικοί παράγοντες για τον κίνδυνο εμφάνισης διαταραχών γονιδιωματικής αποτύπωσης.
- Τα ανθρώπινα LTR ρετροτρανσποζόνια, ως ρετρομεταθετικά ενεργό υποσύνολο του γονιδιώματος, μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε βασικές βιολογικές διεργασίες.

III. ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ

A. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ενδογενείς ρετροϊοί HERV θεωρούνται απομεινάρια ρετροϊκών μολύνσεων, που κατέστησαν ενδογενή κατά την εξέλιξη. Αν και αποτελούν το 8.3% του ανθρώπινου γονιδιώματος, θεωρούνται μη ικανοί προς ρετρομετάθεση λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων στο γονιδίωμά τους. Η οικογένεια HERV-K, μοναδική μεταξύ των HERV που φέρει λειτουργικά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης για τα γονίδια gag, prt, pol και env, αποτελεί την εξελικτικά νεότερη και τα μέλη της εκφράζονται σε λεμφοκύτταρα, καρκινικά και γαμετικά κύτταρα. Η έκφρασή τους είναι αυστηρά ελεγχόμενη και η αποσιώπησή τους πραγματοποιείται κυρίως μέσω μεθυλίωσης DNA. Έχει προταθεί ότι η γονιδιωματική αποτύπωση, η επιλεκτική έκφραση ορισμένων γονιδίων από το ένα μόνο αλληλόμορφο ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση, ανέκλυψε ως υποπροϊόν της μεθυλίωσης του DNA, ώστε να αποσιωπάται εξωγενές DNA όπως τα ρετροτρανσποζόνια.

Μελετήσαμε την ικανότητα έκφρασης RNA και ρετρομετάθεσης του ρετροϊκού στελέχους HERV-K10 σε καρκινικά κύτταρα HeLa, A549 και H1299 και σε ανθρώπινα ωοκύτταρα. Ανιχνεύσαμε την έκφραση του RNA του HERV-K10 σε υψηλά επίπεδα και ακολούθως, κατασκευάσαμε ανασυνδυασμένους ελλειμματικούς ρετροϊούς HERV-K10 (pHERV-K10*/EGFP-INT και pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT) σημασμένους με ειδική κασέτα ανίχνευσης της ρετρομετάθεσης που βασίζεται στην έκφραση της φθορισμογόνου πρωτεΐνης EGFP. Μετά από διαμόλυνση καρκινικών κυτταρικών σειρών με τις ανασυνδυασμένες κατασκευές αλλά και μικρόνεση αυτών σε άωρα ανθρώπινα ωοκύτταρα, ανιχνεύσαμε γεγονότα ρετρομετάθεσης, μέσω EGFP-θετικών κυττάρων με μικροσκοπία UV. Τα γεγονότα πιστοποιήθηκαν σε επίπεδο γονιδιώματος με ανάλυση PCR, ενώ επιπλέον η συχνότητα ρετρομεταθέσεων μετρήθηκε με FACS και ευρέθηκε σε υψηλά επίπεδα ως και 38.3%. Υψηλή συχνότητα ρετρομετάθεσης συσχετίζεται με **α)** φαινοτυπικές αλλαγές των κυττάρων τα οποία μπορεί να προσομοιάζουν πλέον με μεσεγχυματικά, όπως στην περίπτωση των A549, να είναι πεπλατυσμένα ή επιπλέοντα στρογγυλοποιημένα ή ακόμη να παρουσιάζουν διαταραχές όπως μεγάλα κενोटόπια ή πολλαπλούς πυρήνες, στην περίπτωση των HeLa, **β)** διαταραχές του κυτταρικού κύκλου με συσσώρευση κυττάρων στη G2/M και **γ)** πολλαπλές θραύσεις στα χρωμοσώματα που πιστοποιούνται από το μεγάλο αριθμό SCE. Αποδείξαμε ότι τα γεγονότα ρετρομετάθεσης συμβαίνουν χάρη στη δράση αντίστροφης μεταγραφάσης ειδικής για τα HERV-K10, η οποία μάλλον κωδικοποιείται από ενδογενή στοιχεία των κυττάρων. Μάλιστα, με αναστολή των αντίστροφων μεταγραφασών, μειώνεται αισθητά η συχνότητα των γεγονότων ρετρομετάθεσης που συμβαίνουν.

Σε αντίθεση με την τρέχουσα θεώρηση, τα αποτελέσματά μας αποδεικνύουν για πρώτη φορά ότι ο ενδογενής ρετροϊός HERV-K10 είναι ρετρομεταθετικά ενεργός, ακόμα και ελλειμματικός, και ότι τα καρκινικά και αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα αποτελούν ευνοϊκό κυτταρικό περιβάλλον για τη γένεση γεγονότων ρετρομετάθεσης.

Σε επόμενο στάδιο, μελετήσαμε με ειδική για τη μεθυλίωση PCR (MS-PCR) το πρότυπο μεθυλίωσης DNA του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 και των γονιδίων με αποτύπωση DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19 σε δύο ομάδες του πληθυσμού **α)** σε παιδιά που γεννήθηκαν μετά από *in vitro* γονιμοποίηση (IVF) και προεμφυτευτική γενετική διάγνωση (PGD), καθώς και παιδιά που προήλθαν από φυσιολογική σύλληψη ως μάρτυρες, χρησιμοποιώντας δείγματα χοριακών λαχνών και **β)** υπογόνιμους άνδρες και συγκεκριμένα σε δείγματα **i)** βιοψιών όρχεων και περιφερικού αίματος, ως μάρτυρες και **ii)** σπέρματος.

Στην περίπτωση των παιδιών που γεννήθηκαν μετά από PGD, η ανάλυση της

μεθυλίωσης του HERV-K10 έδειξε ότι τα δείγματα-μάρτυρες ήταν στην πλειοψηφία τους μεθυλιωμένα, όπως αναμενόταν, ενώ στα δείγματα PGD διαπιστώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μεθυλίωσης. Αναφορικά με τα γονίδια που υπόκεινται σε αποτύπωση, βρέθηκε το φυσιολογικό πρότυπο στους μάρτυρες σε όλες τις περιπτώσεις, αλλά και στην ομάδα PGD για τα γονίδια CDKN1C (p57^{KIP2}) και IGF2/H19. Αντίθετα, στην περίπτωση του DLK1/MEG3 βρέθηκε στατιστικά σημαντική αλλαγή των προτύπων μεθυλίωσης σε σύγκριση με το μάρτυρα.

Στην περίπτωση των υπογόνιμων ανδρών, σε δείγματα από βιοψίες όρχεων βρέθηκε εκτεταμένη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης γονιδίων με πατρικό αποτύπωμα, η οποία ήταν εντονότερη για τα γονίδια IGF2/H19 και CDKN1C (p57^{KIP2}) σε σχέση με το DLK1/MEG3, ενώ τα πρότυπα μεθυλίωσης ήταν φυσιολογικά στο περιφερικό αίμα, όπως και αναμενόταν. Στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών διαπιστώθηκε ήπια διαταραχή της μεθυλίωσης των HERV-K10, ενώ στα γονίδια με αποτύπωση που μελετήθηκαν οι διαταραχές ήταν εντονότερες στο DLK1/MEG3, λιγότερο έντονες στο IGF2/H19 και ακόμη ηπιότερες στο CDKN1C (p57^{KIP2}).

Η ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των υπό μελέτη γονιδίων με αποτύπωση χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής κατέδειξε ότι το DLK1/MEG3 φέρει υψηλότερη περιεκτικότητα σε μεταθετά στοιχεία, το IGF2/H19 χαμηλότερη και το CDKN1C (p57^{KIP2}) ακόμη χαμηλότερη.

Σημαντική διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης γονιδίων με πατρικό αποτύπωμα φαίνεται να συσχετίζεται με σοβαρής μορφής υπογονιμότητα, ενώ η ταυτόχρονη διαταραχή των προτύπων μεθυλίωσης των γονιδίων DLK1/MEG3 και IGF2/H19 θα μπορούσαν πιθανώς να αποτελέσουν δείκτη της ποιότητας του σπέρματος. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας, φαίνεται ότι η μεταβολή των προτύπων μεθυλίωσης του ρετροτρανσποζονίου HERV-K10 θα μπορούσε να συσχετιστεί με εκείνη γονιδίων με γονιδιωματική αποτύπωση που βρίσκονται σε περιοχές πλούσιες σε μεταθετά στοιχεία.

Συνολικά, συζητείται ο ρόλος αφενός των ρετροτρανσποζονίων και αφετέρου της υπογονιμότητας και της επίδρασης στρεσογόνων ερεθισμάτων στη ρύθμιση της γονιδιωματικής αποτύπωσης.

B. ABSTRACT

Ph.D. THESIS
CHROMOSOMAL ABERRATIONS, EPIGENETIC FACTORS AND
RETROTRANSPOSITION MECHANISMS

HERV retrotransposons are considered as "relics" of retroviral infections, which have undergone endogenization during evolution. Although they constitute 8.3% of the human genome, they are considered to be unable to retrotranspose due to accumulation of mutations in their genome. HERV-K family, unique among HERVs bearing functional open reading frames for gag, prt, pol and env genes, is the evolutionary youngest family and its members are expressed in lymphocytes, cancer and germ cells. Their expression is tightly controlled and mainly silenced by DNA methylation. Genomic imprinting (GI) by DNA methylation is an epigenetic mechanism that results in mono-allelic expression of imprinted genes. According to a hypothesis, GI is considered as an evolutionary host defense system mechanism for silencing exogenous DNA, such as retrotransposons.

We have studied the RNA expression levels and retrotransposition potential of HERV-K10 member in cancer cell lines (HeLa, A549 and H1299) and immature human oocytes. We have detected high levels of expressed HERV-K10 RNA. Subsequently, truncated recombinant HERV-K10 retroviruses (pHERV-K10*/EGFP-INT and pHERV-K10-PPT**/EGFP-INT), tagged with an enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene-based retrotransposition cassette, were constructed and used for the detection of retrotransposition events.

Cancer cell lines were transfected and immature human oocytes (Germinal Vesicles) were microinjected with the recombinant construct. In both cases we detected retrotransposition events by UV microscopy, through EGFP-positive cells, further confirmed in the genome by PCR analysis. Using FACS, measured retrotransposition frequency was found at high levels up to 38.3%. High retrotransposition levels are related to **a)** phenotypic changes of the cells (mesenchymal phenotype in A549 cells, widened or round floating cells, or other disorders such as bearing sizable vacuoles or multiple nuclei in HeLa cells), **b)** cell cycle disturbance with cease of cells in G2/M phase and **c)** multiple chromosomal breaks, as evidenced by increased SCE numbers. We have also shown that retrotransposition events take place due to the expression of a HERV-K10-specific reverse transcriptase (RT) encoded by endogenous elements. Indeed, retrotransposition frequency has been significantly diminished using RT-inhibitors.

In contrast to the current viewpoint, our findings demonstrate for the first time that endogenous retrovirus HERV-K10 is retrotransposition-competent, even if truncated/mutated, and that cancer and developing germ cells provide a cellular environment favorable for generation of retrotransposition events.

Next, we have studied DNA methylation patterns of HERV-K10 retrotransposon and DLK1/MEG3, CDKN1C (p57^{KIP2}) and IGF2/H19 imprinted genes using methylation-specific PCR (MS-PCR) in two population groups: **a)** children conceived after *in vitro* fertilization (IVF) and preimplantation genetic diagnosis (PGD) as well as matched naturally conceived (NC) controls, using chorionic villi samples and **b)** infertile men and more specifically samples from **i)** testis biopsies and peripheral

blood as controls and **ii**) sperm samples.

In the PGD group, HERV-K10 analysis revealed methylation in the majority of control samples, as expected. In contrast, a statistically significant alteration of HERV-K10 methylation pattern was detected in PGD samples compared to controls. MS-PCR analysis of DLK1/MEG3 showed that PGD samples demonstrated a statistically significant altered methylation pattern compared to controls, while CDKN1C (p57^{KIP2}) and IGF2/H19 showed no differences.

As far as infertile men are concerned, aberrant methylation patterns were found in the paternally imprinted genes tested in biopsy samples, which were more profound in the case of IGF2/H19 and CDKN1C (p57^{KIP2}) than in DLK1/MEG3. Methylation patterns were normal for all three imprinted genes in peripheral blood samples, as expected. In sperm samples from infertile men, there has been observed a mild aberration of HERV-K10, while the severity of the aberration in the case of imprinted genes tested was as follows: DLK1/MEG3>IGF2/H19>CDKN1C (p57^{KIP2}). Nucleotide sequence analysis of the imprinted genes studied using bioinformatics uncovered high content in transposable element derived sequences in the case of DLK1/MEG3, quite low for IGF2/H19 and even lower for CDKN1C (p57^{KIP2}).

Consequently, profound aberration of the methylation patterns of paternally imprinted genes are possibly associated with severe infertility. What is more, simultaneous aberration of DLK1/MEG3 and IGF2/H19 could probably be used as sperm quality marker. Furthermore, our results suggest that altered HERV-K10 methylation is correlated to imprinting alterations in a retrotransposon-rich genomic region, and that retrotransposons may play a role in the regulation of imprinting. In total, **a**) the role of retrotransposons in and **b**) the effect of infertility and stressful stimuli, such as IVF and PGD, on GI regulation are being discussed.

IV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Strasburger E. Zellbildung und Zellteilung. Fischer 1880.
2. Fleming W. Zellsubstanz, Kern – und Zellteilung. Vogel 1882.
3. Strasburger E. Ueber den Theilungsvorgang der Zellkerne und das Verhältniss der Kerntheilung zur Zelltheilung. Archiv Mikroskop Anat 1882;20:476-590.
4. Waldeyer W. Uber Karyokinese und ihre Beziehungen in den Befruchtungsvorgängen. Archiv Mikroskop Anat 1888;32:1-122.
5. Sutton WS. The chromosomes in heredity. Biologic Bull Mar Biol Lab 1902;4:231-248.
6. Johannsen W. Elemente der Exakten Erblchkeitslehre. Fischer 1909.
7. Morgan TH. Chromosomes and heredity. Am Natural 1910;44:449-496 .
8. Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956;42:1-16.
9. Ford CE, Hamerton JL. The chromosomes of man. Nature 1956;178:1020-1023.
10. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. C R Acad Sci 1959;248:1721-1722.
11. Caspersson T, Linsten J, Zech L. The nature of structural X chromosome aberrations in Turner's Syndrome as revealed by quinacrine mustard fluorescence analysis. Hereditas 1970;60:287-291.
12. Latt SA. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. Science 1974;185:74-76.
13. Schneider EL, Chaillet JR, Tice RR. In vivo BudR labelling of mammalian chromosomes. Exp Cell Res 1976;100:396-399.
14. Dutrillaux B. Obtention simultanee de plusieurs marquages chromosomiques sur les memes preparations, apres traitement par le BrdU. Humangenetik 1975;30:297-306.
15. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. Science 1976;191:1268-1270.
16. SanMiguel P, Tikhonov A, Jin YK, *et al.* Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. Science 1996;274(5288):765-768.
17. Kidwell MG. Transposable elements and the evolution of the genome size in eukaryotes. Genetica 2002;115(1):49-63.
18. Lander ES, Linton LM, Birren B, *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409:860-921.
19. Orgel LE, Crick FH. Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 1980;284:604-607.
20. Brosius J. RNAs from all categories generate retrosequences that may be exapted as novel genes or regulatory elements. Gene 1999;238:115-134.
21. Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. Science 2004;303:1626-1632.
22. Bohne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, *et al.* Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. Chrom Res 2008;16:203-215.
23. McClintock B. The origin and behavior of mutable loci in maize. PNAS 1950;36:344-355.
24. McClintock B. Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 1956;21:197-216.
25. Bie'mont C, Vieira C. Genetics: junk DNA as an evolutionary force. Nature 2006;443:521-524.
26. Mizuuchi K. Transposition recombination: michanistic insights from studies of mu and other elements. Annu Rev Biochem 1992;61:1011-1051.

27. Smit SF, Riggs AD. Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1443-1448.
28. Luan DD, Korman MH, Jakubczak JL, *et al.* Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* 1993;72:595-605.
29. Whitcomb JM, Hughes SH. Retroviral reverse transcription and integration: progress and problems. *Annu Rev Cell Biol* 1992;8:275-306.
30. Reznikoff WS. Tn5 as a model for understanding DNA transposition. *Mol Microbiol* 2003;47:1199-1206.
31. Döring HP, Tillmann E, Starlinger P. DNA sequence of the maize transposable element Dissociation. *Nature* 1984;307:127-130.
32. Engels WR. P elements in *Drosophila*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;204:103-123.
33. Kunze R. The maize transposable element activator (Ac). *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;204:161-194.
34. Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:725-774.
35. van Luenen HG, Colloms SD, Plasterk RH. The mechanism of transposition of Tc3 in *C. Elegans*. *Cell* 1994;7984:293-301.
36. Deininger PL, Batzer MA. Mammalian retroelements. *Genome Res* 2002;12:1455-1465.
37. Kurth R, Bannert N. Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer* 2010;126:306-314.
38. Rowold DJ, Herrera RJ. Alu elements and the human genome. *Genetica* 2000;108(1):57-72.
39. Ostertag EM, Kazazian HH Jr. Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Ann Rev Genet* 2001;35:501-538.
40. Ostertag EM, Goodier JL, Zhang Y, *et al.* SVA elements are nonautonomous retrotransposons that cause disease in humans. *Am J Hum Genet* 2003;73:1444-1451.
41. Babushok DV, Kazazian HH Jr. Progress in understanding the biology of the human mutagen LINE-1. *Hum Mutat* 2007;28(6):527-539.
42. Goodier JD, Kazazian HH Jr. Retrotransposons revisited: The restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 2008;135:23-35.
43. Swergold D. Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Mol Cell Biol* 1990;10:6718-6729.
44. Moran JV, Holmes SE, Naas TP, *et al.* High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* 1996;87:917-927.
45. Kolosha VO, Martin SL. In vitro properties of the first ORF protein from mouse LINE-1 support its role in ribonucleoprotein particle formation during retrotransposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:10155-10160.
46. Kolosha VO, Martin SL. High-affinity, non-sequence-specific RNA binding by the open reading frame 1 (ORF1) protein from long interspersed nuclear element 1 (LINE-1). *J Biol Chem* 2003;278:8112-8117.
47. Martin SL. The ORF1 protein encoded by LINE-1: structure and function during L1 retrotransposition. *J Biomed Biotechnol* 2006;1:45621.
48. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH Jr, *et al.* Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* 1996;87:905-916.

49. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH Jr, *et al.* Reverse transcriptase encoded by a human transposable element. *Science* 1991;254:1800-1810.
50. Fanning T, Singer M. The LINE-1 DNA sequences in four mammalian orders predict proteins that conserve homologies to retrovirus proteins. *Nucleic Acids Res* 1987;15(5):2251-2260.
51. Cost GJ, Feng Q, Jacquier A, *et al.* Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* 2002;21:5899-5910.
52. Dombroski BA, Feng Q, Mathias SL, *et al.* An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1994;14(7):4485-4492.
53. Piskareva O, Schmatchenko V. DNA polymerization by the reverse transcriptase of the human L1 retrotransposon on its own template in vitro. *FEBS Lett* 2006;580(2):661-668.
54. Ding W, Lin L, Chen B, *et al.* L1 elements, processed pseudogenes and retrogenes in mammalian genomes. *IUBMB Life* 2006;58(12):677-685.
55. Weiner AM. SINES and LINES: The art of biting the hand that feeds you. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14(3):343-350.
56. Deininger PL, Moran JV, Batzer MA, *et al.* Mobile elements and mammalian genome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:651-658.
57. Versteeg R, van Schaik BD, van Batenburg MF, *et al.* The human transcriptome map reveals extremes in gene density, intron length, GC content, and repeat pattern for domains of highly and weakly expressed genes. *Genome Res* 2003;13:1998-2004.
58. Ono M, Kawakami M, Takezawa T. A novel human nonviral retroposon derived from an endogenous retrovirus. *Nucleic Acids Res* 1987;15:8725-8737.
59. Shen L, Wu LC, Salioglu S, *et al.* Structure and genetics of the partially duplicated gene RP located immediately upstream of the complement C4A and the C4B genes in the HLA class III region: molecular cloning, exon-intron structure, composite retroposon, and breakpoint of gene duplication. *J Biol Chem* 1994;269:8466-8476.
60. Wang H, Xing J, Grover D, *et al.* SVA elements: a hominid-specific retroposon family. *J Mol Biol* 2005;354(4):994-1007.
61. Hancks DC, Ewing AD, Chen JE, *et al.* Exon-trapping mediated by the human retrotransposon SVA. *Genome Res* 2009;19:1983-1991.
62. Hancks DC, Kazazian HH Jr. SVA retrotransposons: Evolution and genetic instability. *Semin Canc Biol* 2010;20:234-245.
63. de Parseval N, Heidmann T. Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes. *Cytogenet Genome Res* 2005;110:318-332.
64. Malik HS, Eickbush TH. Phylogenetic analysis of ribonuclease H domains suggests a late, chimeric origin of LTR retrotransposable elements and retroviruses. *Genome Res* 2001;11:1187-1197.
65. Pelisson A, Mejlumian L, Robert V, *et al.* *Drosophila* germline invasion by the endogenous retrovirus gypsy: involvement of the viral env gene. *Insect Biochem Mol Biol* 2002;32(10):1249-1256.
66. Curcio MJ, Garfinkel DJ. Heterogeneous functional Ty1 elements are abundant in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics* 1994;136(4):1245-1259.
67. Smit AF. Interspersed repeats and other mementos of transposable elements in mammalian genomes. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:657-663.

68. Jurka J. Repbase update: a database and an electronic journal of repetitive elements. *Trends Genet* 2000;16:418-420.
69. Lyntch C, Tristem M. A co-opted gypsy-type LTR-retrotransposon is conserved in the genomes of humans, sheep, mice and rats. *Curr Biol* 2003;13:1518-1523.
70. Herniou E, Martin J, Miller K, *et al.* Retroviral diversity and distribution in vertebrates. *J Virol* 1998;72:5955-5966.
71. Mayer J, Meese E. Human endogenous retroviruses in the primate lineage and their influence on host genomes. *Cytogenet Genome Res* 2005;110:448-456.
72. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77(12):7415-7419.
73. Martin MA, Bryan T, Rasheed S, *et al.* Identification and cloning of endogenous retroviral sequences present in human DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:4892-4896.
74. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(2):14572-14579.
75. Bannert N, Kurth R. The evolutionary dynamics of human endogenous retroviral families. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006;7:149-173.
76. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, *et al.* Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. *J Virol* 1986;60(2):589-598.
77. Larsson E, Kato N, Cohen M. Human endogenous proviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;148:115-132.
78. Gifford R, Tristem M. The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 2003;26:291-315.
79. Paces J, Pavlicek A, Zika R, *et al.* HERVd: the human endogenous retroviruses database: update. *Nucleic Acids Res* 2004;32:D50.
80. Dangel AW, Baker BJ, Mendoza AR, *et al.* Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* 1995;42:41-52.
81. Costas J, Naveira H. Evolutionary history of the human endogenous retrovirus family ERV9. *Mol Biol Evol* 2000;17:320-330.
82. Andersson ML, Lindeskog M, Medstrand P, *et al.* Diversity of human endogenous retrovirus class II-like sequences. *J Gen Virol* 1999;80:255-160.
83. Medstrand P, Blomberg J. Characterization of novel reverse transcriptase encoding human endogenous retroviral sequences similar to type A and type B retroviruses: differential transcription in normal human tissues. *J Virol* 1993;67:6778-6787.
84. Lavie L, Medstrand P, Schempp W, *et al.* Human endogenous retrovirus family HERVK(HML-5): status, evolution, and reconstruction of an ancient betaretrovirus in the human genome. *J Virol* 2004;78:8788-8798.
85. Turner G, Barbulescu M, Su M, *et al.* Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 2001;11(19):1531-1535.
86. Lebedev YB, Belonovitch OS, Zybroya NV, *et al.* Differences in HERV-K LTR insertions in orthologous loci of humans and great apes. *Gene* 2000;247(1-2):265-277.

87. Buzdin A, Ustyugova S, Khodosevich K, *et al.* Human-specific subfamilies of HERV-K (HML-2) long terminal repeats: three master genes were active simultaneously during branching of hominoid lineages. *Genomics* 2003;81(2):149-156.
88. Callahan R, Drohan W, Tronick S, *et al.* Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:5503-5507.
89. Bannert N, Kurth R. Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(2):14572-14579.
90. Löwer R, Löwer J, Kurth R. The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5177-5184.
91. Tönjes RR, Löwer R, Boller K, *et al.* HERV-K: the biologically most active human endogenous retrovirus family. *J AIDS Hum Retrovirol* 1996;13:261-267.
92. Florl AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, *et al.* DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Canc* 1999;80(9):1312-1321.
93. Woolven-Allen J, Redding J, Burt A, *et al.* Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2): implications for present day activity. *J Virol* 2005;79:12507-12514.
94. Depil S, Roche C, Dussart P, *et al.* Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukaemia patients. *Leukaemia* 2002;16:254-259.
95. Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, *et al.* Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 2003;22:1528-1535.
96. Buscher K, Trefzer U, Hofmann M, *et al.* Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* 2005;65:4172-4180.
97. Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, *et al.* Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins on ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007;120(1):81-90.
98. Brodsky I, Foley B, Haines D, *et al.* Expression of HERV-K proviruses in human leukocytes. *Blood* 1993;81:2369-2374.
99. Medstrand P, van de Lagemaat LN, Mager DL. Retroelement distributions in the human genome: variations associated with age and proximity to genes. *Genome Res* 2002;12(10):1483-1495.
100. Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, *et al.* A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome Res* 2002;12:543-554.
101. Brady T, Lee YN, Ronen K, *et al.* Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. *Genes Dev* 2009;23(5):633-6342.
102. Brookfield JF. Selection on Alu sequences? *Curr Biol* 2001;11:R900-R901.
103. Levy A, Schwartz S, Ast G. Large-scale discovery of insertion hotspots and preferential integration sites of human transposed elements. *Nucleic Acids Res* 2010;38(5):1515-1530.
104. Meese E, Gottert E, Zang KD, *et al.* Human endogenous retroviral element k10 (HERV-K10): chromosomal localization by somatic hybrid mapping and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1996;72:40-42.

105. Schulz WA, Steinhoff C, Florl AR. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;310:211-250.
106. ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature. (Schaffer LG, Slovak ML, Cambell LJ, eds) Karger 2009.
107. Denver Conference. A proposed standard system of nomenclature of human mitotic chromosomes. *Lancet* 1960;i:1063-1065.
108. Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, *et al.* Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960;20:613-616.
109. Gooldchild NL, Freeman JD, Mager DL. Spliced HERV-H endogenous retroviral sequences in human genomic DNA: evidence for amplification via retrotransposition. *Virology* 1995;206:164-173.
110. Baban S, Freeman JD, Mager DL. Transcripts from a novel KRAB zinc finger gene contain spliced Alu and endogenous retroviral segments. *Genomics* 1996;33:463-472.
111. Jamain S, Girondot M, Leroy P, *et al.* Transduction of the human gene FAM8A1 by endogenous retrovirus during primate evolution. *J Virol* 2007;81:9437-9442.
112. Hughes JF, Coffin JM. Evidence for genomic rearrangements mediated by human endogenous retroviruses during primate evolution. *Nat Genet* 2001;29(4):487-489.
113. Kapitonov VV, Jurka J. RAG1 core and V(D)J recombination signal sequences derived from Transib transposons. *PloS Biol* 2005;3(6):e181.
114. Brandt J, Schrauth S, Veith AM, *et al.* Transposable elements as a source of genetic innovation: expression and evolution of a family of retrotransposon-derived neogenes in mammals. *Gene* 2005;345(1):101-111.
115. Xing J, Wang H, Belancio VP, *et al.* Emergence of primate genes by retrotransposon-mediated sequence transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(47):17608-17613.
116. van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, *et al.* Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trend Genet* 2003;19(10):530-536.
117. Laurent AM, Puechberty J, Prades C, *et al.* Site-specific retrotransposition of L1 elements within human alphoid satellite sequences. *Genomics* 1997;46:127-132.
118. Turker MS. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. *Oncogene* 2002;21:5388-5393.
119. Bailey JA, Carrel L, Chakravarti A, *et al.* Molecular evidence for a relationship between LINE-1 elements and X chromosome inactivation: the Lyon repeat hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:6634-6639.
120. Hansen RS. X inactivation-specific methylation of LINE-1 elements by DNMT3B: implications for the Lyon repeat hypothesis. *Hum Mol Genet* 2003;12:2559-2567.
121. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, *et al.* Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 2000;9:2563-2572.
122. Sun C, Skaletsky H, Rozen S, *et al.* Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Hum Mol Genet* 2000;9:2291-2296.
123. Xing J, Zhang Y, Han K, *et al.* Mobile elements create structural variation: analysis of a complete human genome. *Genome Res* 2009;19(9):1516-1526.

124. Teng SC, Kim B, Gabriel A. Retrotransposon reverse-transcriptase-mediated repair of chromosomal breaks. *Nature* 1996;383(6601):641-644.
125. Eickbush TH. Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science* 1997;277(5328):911-912.
126. Thornburg BG, Gotea V, Malakowski W. Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals. *Gene* 2006;365:104-110 .
127. Jordan IK, Rogozin IB, Glazko GV, *et al.* Origin of a substantial fraction of human regulatory sequences from transposable elements. *Trends Genet* 2003;19(2):68-72.
128. Ting CN, Rosenberg MP, Snow CM, *et al.* Endogenous retroviral sequences are required for tissue-specific expression of a human salivary amylase gene. *Genes Dev* 1992;6:1457-1465.
129. Sverdlov ED. Perpetually mobile footprints of ancient infections in human genome. *FEBS Lett* 1998;428:1-6.
130. Ling J, Pi W, Bollag R, *et al.* The solitary long terminal repeats of ERV-9 endogenous retrovirus are conserved during primate evolution and possess enhancer activities in embryonic and hematopoietic cells. *J Virol* 2002;76:2410-2423.
131. Medstrand P, Landry JR, Mager DL. Long terminal repeats are used as alternative promoters for the endothelin B receptor and apolipoprotein C-I genes in humans. *J Biol Chem* 2001;276:1896-1903.
132. Landry JR, Rouhi A, Medstrand P, *et al.* The Opitz syndrome gene *Mid1* is transcribed from a human endogenous retroviral promoter. *Mol Biol Evol* 2002;19(11):1934-1942.
133. Feuchter A, Mager D. Functional heterogeneity of a large family of human LTR-like promoters and enhancers. *Nucleic Acids Res* 1990;18:1261-1270.
134. Domansky AN, Kopantzev EP, Snezhkov EV, *et al.* Solitary HERV-K LTRs possess bi-directional promoter activity and contain a negative regulatory element in the U5 region. *FEBS Lett* 2000;472:191-195.
135. Kato N, Pfeifer-Ohlsson S, Kato M, *et al.* Tissue-specific expression of human provirus ERV3 mRNA in human placenta: two of the three ERV3 mRNAs contain human cellular sequences. *J Virol* 1987;61:2182-2191.
136. Feuchter-Murthy AE, Freeman JD, Mager DL. Splicing of a human endogenous retrovirus to a novel phospholipase A2 related gene. *Nucleic Acids Res* 1993;21:135-143.
137. Kapitonov VV, Jurka J. The long terminal repeat of an endogenous retrovirus induces alternative splicing and encodes an additional carboxy-terminal sequence in the human leptin receptor. *J Mol Evol* 1999;48:248-251.
138. Hughes DC. Alternative splicing of the human VEGFR-3/FLT4 gene as a consequence of an integrated human endogenous retrovirus. *J Mol Evol* 2001;53:77-79.
139. Mager DL, Hunter DG, Schertzer M, *et al.* Endogenous retroviruses provide the primary polyadenylation signal for two new human genes (HHLA2 and HHLA3). *Genomics* 1999;59:255-263.
140. Baust C, Seifarth W, Germaier H, *et al.* HERV-K-T4D-Related long terminal repeats mediate polyadenylation of cellular transcripts. *Genomics* 2000;66:98-103.
141. Hewitt SM, Fraizer GC, Saunders GF. Transcriptional silencer of the Wilms' tumor gene *WT1* contains an Alu repeat. *J Biol Chem* 1995;270:17908-17912.

142. Wilson MJ, Torkar M, Haude A, *et al.* Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ILT gene families. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4778-4783.
143. Kidwell MG, Lisch D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(15):7704-7711.
144. Juang SH, Huang J, Li Y, *et al.* Molecular cloning and sequencing of a 58-kDa membrane- and micro-filament-associated protein from ascites tumor cell microvilli with sequence similarities to retroviral Gag proteins. *J Biol Chem* 1994;269:15067-15075.
145. Harris JM, McIntosh EM, Muscat GE. Structure/function analysis of a dUTPase: catalytic mechanism of a potential chemotherapeutic target. *J Mol Biol* 1999;288(2):275-287.
146. Mueller-Lantzsch N, Sauter M, Weiskircher A, *et al.* Human endogenous retroviral element K10 (HERV-K10) encodes a full-length gag homologous 73-kDa protein and a functional protease. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993;9:343-350.
147. Berkhout B, Jebbink M, Zsiros J. Identification of an active reverse transcriptase enzyme encoded by a human endogenous HERV-K retrovirus. *J Virol* 1999;73:2365-2375.
148. Kitamura Y, Ayukawa T, Ishikawa T, *et al.* Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J Virol* 1996;70:3302-3306.
149. Blikstad V, Benachenhou F, Speber GO, *et al.* Evolution of human endogenous retroviral sequences: a conceptual account. *Cell Mol Sci* 2008;65:3348-3365.
150. Ruebner M, Strissel PL, Langbein M, *et al.* Impaired cell fusion and differentiation in placentae from patients with intrauterine growth restriction correlate with reduced levels of HERV envelope genes. *J Mol Med* 2010;88(11):1143-1156.
151. Schulte AM, Lai S, Kurtz A, *et al.* Human trophoblast and choriocarcinoma expression of the growth factor pleiotrophin attributable to germ-line insertion of an endogenous retrovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14759-14764.
152. Melder DC, Pankratz VS, Federspiel MJ. Evolutionary pressure of a receptor competitor selects different subgroup a avian leukosis virus escape variants with altered receptor interactions. *J Virol* 2003;77(19):10504-10514.
153. Ponferrada VG, Mauck BS, Wooley DP. The envelope glycoprotein of human endogenous retrovirus HERV-W induces cellular resistance to spleen necrosis virus. *Arch Virol* 2003;148(4):659-675.
154. Spencer TE, Mura M, Gray CA, *et al.* Receptor usage and fetal expression of ovine endogenous betaretroviruses: implications for coevolution of endogenous and exogenous retroviruses. *J Virol* 2003;77(1):749-753.
155. Li E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 2002;3:662-673.
156. Bernstein BE, Kamal M, Lindblad-Toh K, *et al.* Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 2005;120:169-181.
157. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, *et al.* A bivalent chromatin structure marks key development in embryonic stem cells. *Cell* 2006;125:315-326.
158. Carrell DT, Hammound SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2010;16(1):37-47.
159. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 2007;447:433-440.

160. Bartolomei MS, Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 1997;31:493-525.
161. Hornstra IK, Yang TP. High resolution methylation analysis of the human HPRT gene 5' region on the active and inactive X chromosomes: correlation with binding sites for transcriptional factors. *Mol Cell Biol* 1994;14:1419-1430.
162. Jones KL. Smith's recognizable patterns of human malformation. 6th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company 2006;1-954.
163. Chen T, Hevi S, Gay F, *et al.* Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 2007;39:391-396.
164. Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;249:101-118.
165. Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat* 2010;192:261-274.
166. Maunakea AK, Cjepelev I, Zhao K. Epigenome mapping in normal and disease states. *Circ Res* 2010;107:327-339.
167. Levenson JM, Roth TL, Lubin FD, *et al.* Evidence that DNA (cytosine-5) methyltransferase regulates synaptic plasticity in the hippocampus. *J Biol Chem* 2006;281:15763-15773.
168. Santos-Redoucas CB, Pimentel MMG. Implications of abnormal epigenetic patterns for human diseases. *Eur J Hum Genet* 2007;15:10-17.
169. Maison C, Bailly D, Peters AH, *et al.* High-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. *Nat Genet* 2002;30:329-334.
170. Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature* 2002;415:810-813.
171. Anver P, Heard E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* 2001;2:59-67.
172. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc Natl Acad Sci* 2004;101:2999-3004.
173. Aigner A. MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(5):445-457.
174. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, *et al.* Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res* 2009;104:1184-1191.
175. Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(1):87-95.
176. Gabory A, Jammes H, Dandolo L. The H19 locus: role of an imprinted non-coding RNA in growth and development. *Bioessays* 2010;32:473-480.
177. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010;31(1):37-49.
178. Orlando V. Polycomb, epigenomes and control of cell identity. *Cell* 2003;112:599-606.
179. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, *et al.* histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 2002;16:2893-2905.

- 180.** Nakamura T, Mori T, Tada S, *et al.* ALL-1 is a histone methyltransferase that assembles a supercomplex of proteins involved in transcriptional regulation. *Mol Cell* 2002;10:1119-1128.
- 181.** Fleissner E, Borek E. Studies on the enzymatic methylation of soluble RNA. I. Methylation of the s-RNA polymer. *Biochemistry* 1963;2:1093-1100.
- 182.** Scarano E. DNA methylation. *Nature* 1973;246:539.
- 183.** Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, *et al.* DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease. *J Cell Physiol* 2005;204(1):21-35.
- 184.** Baniushin BF. Methylation of adenine residues in DNA of eukaryotes. *Mol Biol (Mosk)* 2005;39(4):557-566.
- 185.** Vanyushin BF. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Moscow)* 2005;70(5):488-499.
- 186.** Gromova ES, Khoroshaev AV. Prokaryotic DNA methyltransferases: the structure and the mechanism of interaction with DNA. *Mol Biol (Mosk)* 2003;37(2):300-314.
- 187.** Buryanov Y, Shevchuk T. The use of prokaryotic DNA methyltransferases as experimental and analytical tools in modern biology. *Anal Biochem* 2005;338(1):1-11.
- 188.** Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000;9(16):2395-2402.
- 189.** Weintraub H. Assembly and propagation of repressed and depressed chromosomal states. *Cell* 1985;42:705-711.
- 190.** Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol* 2001;195(1):97-110.
- 191.** Costancia M, Pickard B, Kesley G, *et al.* Imprinting mechanisms. *Genome Res* 1998;8:881-900.
- 192.** Herman J, Graff J, Myohanen S, *et al.* Methylation specific PCR. A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
- 193.** Siedlecki P, Zielenkiewicz P. Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol* 2006;53(2):245-256.
- 194.** Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, *et al.* Methylated DNA and MECP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998;19:187-191.
- 195.** Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci* 2006;31:306-308.
- 196.** Karetka MS, Botello ZM, Ennis JJ, *et al.* Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *J Biol Chem* 2006;281(36):25893-25902.
- 197.** Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. *Mut Res/Fundam Mol Mech Mutagen* 2008;647:30-38.
- 198.** James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, *et al.* Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factor for Down syndrome. *Am J Clin Nutr* 1999;70:495-501.
- 199.** McGrath J, Solter D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 1984;37:179-183.
- 200.** Surani MA, Barton SC, Norris ML. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 1984;308:548-550.

- 201.** Engel E. A fascination with chromosome rescue in uniparental disomy: Mendelian recessive outlaws and imprinting copyrights infringements. *Eur J Hum Genet* 2006;14(11):1158-1169.
- 202.** Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy updated. *J Med Genet* 2008;45(9):545-556.
- 203.** Hoffmann K, Helle R. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metabol* 2011;25:77-100.
- 204.** Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003;25(6):577-588.
- 205.** Walter J, Paulsen M. Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:101-110.
- 206.** Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, *et al.* The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* 1991;349:84-87.
- 207.** Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 1991;351:153-155.
- 208.** DeChiara TM, Robertson EJ, Efstratiadis A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 1991;64:849-859.
- 209.** Kanber D, Buiting K, Zeschnick M, *et al.* Low frequency of imprinting defects in ICSI children born small for gestational age. *Eur J Hum Genet* 2009;17(1):22-29.
- 210.** Luedi PP, Dietrich FS, Weidman JR, *et al.* Computational and experimental identification of novel human imprinted genes. *Genome Res* 2007;17(12):1723-1730.
- 211.** Horsthemke B, Ludwig M. Assisted reproduction: the epigenetic perspective. *Hum Reprod Update* 2005;11(5):473-482.
- 212.** Reik W, Santos F, Dean W. Mammalian epigenomics: reprogramming the genome for development and therapy. *Theriology* 2003;59:21-32.
- 213.** Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):597-610.
- 214.** Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001;293:1089-1093.
- 215.** Geuns E, Temmerman ND, Hilver P, *et al.* Methylation analysis of the intergenic differentially methylated region of DLK1-GTL2 in human. *Eur J Hum Genet* 2007;15:352-361.
- 216.** Neumann B, Kubicka P, Barlow DP. Characteristics of imprinted genes. *Nat Genet* 1995;9:12-13.
- 217.** Barlow DP. Methylation and imprinting: From host defense to gene regulation? *Science* 1993;260:309-310.
- 218.** Wutz A, Smrzka OW, Schweifer N, *et al.* Imprinted expression of the Igf2r gene depends on an intronic CpG island. *Nature* 1997;389:745-749.
- 219.** Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 1997;13(8):335-340.
- 220.** Kondo Y, Issa JP. Enrichment for histone H3 lysine 9 methylation at Alu repeats in human cells. *J Biol Chem* 2003;278:27658-27662.
- 221.** Groff SP. Retrovirus restriction factors. *Mol Cell* 2004;16:849-859.
- 222.** Lavie L, Kitova M, Maldener E, *et al.* CpG methylation directly regulates transcriptional activity of the human endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2). *J Virol* 2005;79:876-883.

- 223.** Matouskova M, Blazkova J, Pajer P, *et al.* CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues. *Exp Cell Res* 2006;312:1011-1020.
- 224.** Reiss D, Zhang Y, Mager DL. Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta. *Nucleic Acids Res* 2007;35(14):4743-4754.
- 225.** Maksakova IA, Mager DL, Reiss D. Keeping active endogenous retroviral-like elements in check: the epigenetic perspective. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3329-3347.
- 226.** Rossant J. Immortal germ cells? *Curr Biol* 1993;3:47-49.
- 227.** Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, *et al.* Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 2007;134:2627-2638.
- 228.** Oakes CC, La Salle S, Smiraglia DJ, *et al.* A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:228-233.
- 229.** Ariel M, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* 1994;7(1):59-63.
- 230.** Weber M, Hellmann I, Stadler MB, *et al.* Distribution, silencing and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007;39:457-466.
- 231.** Farthing CR, Ficz G, Ng RK, *et al.* Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PloS Genet* 2008;4:e1000116.
- 232.** Boyer LA, Lee TI, Cole MF, *et al.* Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005;122:947-956.
- 233.** Allen E, Horvath S, Tong F, *et al.* High concentrations of long interspersed nuclear element sequence distinguish monoallelically expressed genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9940-9945.
- 234.** Walter J, Hutter B, Khare T, *et al.* Repetitive elements in imprinted genes. *Cytogenet Genome Res* 2006;113:109-115.
- 235.** Suzuki S, Ono R, Narita T, *et al.* Retrotransposon silencing by DNA methylation can drive mammalian genome imprinting. *PloS Genet* 2007;3:e55.
- 236.** Hajkova P, Erhardt S, Lane N, *et al.* Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002;117:15-23.
- 237.** Lees-Murdock DJ, De Felici M, Walsh CP. Methylation dynamics of repetitive DNA elements in the mouse germ cell lineage. *Genomics* 2003;82:230-237.
- 238.** Kato Y, Kaneda M, Hata K, *et al.* Role of Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum Mol Genet* 2007;16:2272-2280.
- 239.** van der Heijden GW, Bortvin A. Transient relaxation of transposon silencing at the onset of mammalian meiosis. *Epigenetics* 2009;4(2):76-79.
- 240.** Lucifero D, Mann MRW, Bartolomei MS, *et al.* Gene-specific timing and epigenetic memory in oocyte imprinting. *Hum Mol Genet* 2004;13:839-849.
- 241.** Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Rev Genet* 2008;9:129-140.
- 242.** Kato Y, Rideout WM 3rd, Hilton K, *et al.* Developmental potential of mouse primordial germ cells. *Development* 1999;126:1823-1832.

243. Mayer W, Niveleau A, Walter J, *et al.* Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 2000;403:501-502.
244. Oswald J, Engemann S, Lane N, *et al.* Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 2000;10:475-478.
245. Reik W, Walter J. Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nature Genet* 2001;27:255-256.
246. Reik W, Santos F, Mitsuya K, *et al.* Epigenetic assymetry in the mammalian zygote and early embryo: Relationship to lineage commitment? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2003;358:1403-1409.
247. Santos F, Dean W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction* 2004;127:643-651.
248. Morgan HD, Santos F, Green K, *et al.* Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005;14(1):R47-R58.
249. Okano M, Bell DW, Haber DA, *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999;99(3):247-257.
250. Fulka H, Mrazek M, Tepla O, *et al.* DNA methylation pattern in human zygotes and developing embryos. *Reproduction* 2004;128(6):703-708.
251. Lane N, Dean W, Erhardt S, *et al.* Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 2003;35:88-93.
252. Esnault C, Heidmann O, Delebecque F, *et al.* APOBEC3G cytidine deaminase inhibits retrotransposition of endogenous retroviruses. *Nature* 2005;433(7024):430-433.
253. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 2007;8(4):272-285.
254. Cordaux R, Batzer MA. The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 2009;10:691-703.
255. Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, *et al.* An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 1998;394:388-392.
256. Rohrer J, Minegishi Y, Richter D, *et al.* Unusual mutations in Btk: an insertion, a duplication, an inversion, and four large deletions. *Clin Immunol* 1999;90:28-37.
257. Legoix P, Sarkissian HD, Cazes L, *et al.* Molecular characterization of germline NF2 gene rearrangements. *Genomics* 2000;65:62-66.
258. Wilund KR, Yi M, Campagna F, *et al.* Molecular mechanisms of autosomal recessive hypercholesterolemia. *Hum Mol Genet* 2002;11:3019-3030.
259. Kazazian HH Jr, Wong C, Youssoufian H, *et al.* Haemophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man. *Nature* 1988;332(6160):164-166.
260. Wallace MR, Andersen LB, Saulino AM, *et al.* A de novo Alu insertion results in neurofibromatosis type 1. *Nature* 1991;353(6347):864-866.
261. Miki Y, Nishisho I, Horii A, *et al.* Disruption of the APC gene by a retrotransposal insertion of L1 sequence in a colon cancer. *Cancer Res* 1992;52(3):643-645.
262. Morse B, Rotherg PG, South VJ, *et al.* Insertional mutagenesis of the myc locus by a LINE-1 sequence in a human breast carcinoma. *Nature* 1988;333(6168):87-90.
263. Szpakowski S, Sun X, Lage J, *et al.* Loss of epigenetic silencing in tumors preferentially affects primate-specific retroelements. *2009;448(2):151-167.*

264. Ruprecht K, Mayer J, Sauter M, *et al.* Endogenous retroviruses and cancer. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(21):3366-3382.
265. Ryan FR. A n alternative approach to medical genetics based on modern evolutionary biology. Part 3: HERVs in diseases. *J R Soc Med* 2009;102:415-424.
266. Ryan FR. A n alternative approach to medical genetics based on modern evolutionary biology. Part 4: HERVs in cancer. *J R Soc Med* 2009;102:474-480.
267. Balada E, Ordi-Ros J, Tarre MV. Molecular mechanisms mediated by human Endogenous retroviruses (HERVs) in autoimmunity. *Rev Med Virol* 2009;19:273-286.
268. Conrad B, Weissmahr RN, Böni J, *et al.* A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 1997;90(2):303-313.
269. Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, *et al.* Interferon alpha induced endogenous superantigen: a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 2001;15(4):591-601.
270. Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, *et al.* Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 2001;15:579-589
271. Marguerat S, Wang WY, Todd JA, *et al.* Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes* 2004;53(3):852-854.
272. Sekigawa I, Ogasawara H, Naito T, *et al.* Systematic lupus erythematosus and human endogenous retroviruses. *Mod Rheumatol* 2003;13:107-113.
273. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, *et al.* Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation. *Virology* 2001;287(2):321-332.
274. Lafon M, Jouvin-Marche E, Marche PN, *et al.* Human viral superantigens: to be or not to be transactivated? *Trends Immunol* 2002;23:238-239.
275. Ejtehadi HD, Freimanis GL, Ali HA, *et al.* The potential role of human endogenous retrovirus K10 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: a preliminary study. *Ann Rheum Dis* 2006;65(5):612-616.
276. Reynier F, Verjat T, Turrel F, *et al.* Increase in human endogenous retrovirus HERV-K (HML-2) viral load in active rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 2009;70:295-299.
277. Yolken RH, Karlsson H, Yee F, *et al.* Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Rev* 2000;31(2-3):193-199.
278. Otowa T, Tochigi M, Rogers M, *et al.* Insertional polymorphism of endogenous retrovirus HERV-K115 in schizophrenia. *Neurosci Lett* 2006;408(3):226-229.
279. Kim H-S, Ahn K, Kim D-S. Quantitative expression of the HERV-W env gene in human tissues. *Arch Virol* 2008;153:1587-1591.
280. Schröder J, Nellåker C, Bottmer C, *et al.* Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia. *Genes Brain Behav* 2008;7:103-112.
281. Foerster J, Nolte I, Junge J, *et al.* Haplotype sharing analysis identifies a retroviral dUTPase as candidate susceptibility gene for psoriasis. *J Invest Derm* 2005;124:99-102.
282. Garry RF, Fermin CD, Hart DJ, *et al.* Detection of a human intracisternal A-type retroviral particle antigenically related to HIV. *Science* 1990;250(4984):1127-1129.

- 283.** Herbst H, Sauter M, Mueller-Lantsch N. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *Am J Pathol* 1996;149:1727-1735.
- 284.** Muster T, Walterberger A, Graussauer A, *et al.* An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* 2003;63:8735-8741.
- 285.** Karlsson H, Bachmann S, Schröder J, *et al.* Retroviral RNA identified in the cerebrospinal fluids and brains of individuals with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(8):4634-4639.
- 286.** Christensen T. Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 2005;15:179-211.
- 287.** Allen ND, Norris ML, Surani MA. Epigenetic control of transgene expression and imprinting by genotype specific modifiers. *Cell* 1990;61:853-861.
- 288.** Jaenish R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003;33:245-254.
- 289.** Amor DJ, Halliday J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. *Hum Reprod* 2008;23(12):2826-2834.
- 290.** Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet* 2009;26:477-486.
- 291.** Urdinguio RG, Saez-Mut JV, Esteller M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes and therapies. *Lancet Neurol* 2009;8:1056-1072.
- 292.** Horstemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C (Semin Med Genet)* 2010;154C:321-328.
- 293.** Horstemke B. Mechanisms of imprint dysregulation. *Am J Med Genet C, Semin Med Genet* 2010;154C(3):321-328.
- 294.** Wiedemann HR. Complex malformatif familial avec hernie ombilicale et macroglossie – un “syndrome nouveau”? *J Genet Hum* 1964;13:223.
- 295.** Beckwith JB. Macroglossia, Omphalocele, adrenal cytomegaly, gigantism, and hyperplastic visceromegaly. *Birth Defects* 1969;5(2):188.
- 296.** Silver HK, Kiyasu W, George J, *et al.* Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 1953;12:368-376.
- 297.** Russell A. A syndrome of intra-uterin dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proc R Soc Med* 1954;47:1040-1044.
- 298.** Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, *et al.* Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 2001;38:810-819.
- 299.** Eggermann T, Meyer E, Odermann C, *et al.* Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? *J Med Genet* 2005;42:e26.
- 300.** Smith AC, Choufani S, Ferreira JC, *et al.* Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res* 2007;61(5):43R-47R.
- 301.** Viville M, Surani MA. Toward unraveling the Igf2/H19 imprinted domain. *Bioessays* 1995;17(10):835-838.
- 302.** Eggermann T, Eggermann K, Schonherr N. Growth retardation versus overgrowth: Silver-Russell syndrome is genetically opposite to Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 2008;24(4):195-204.

- 303.** Blik J, Verde G, Callaway J, *et al.* Hypomethylation at multiple maternally methylated imprinted regions including PLAGL1 and GNAS loci in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2009;17(5):611-619.
- 304.** Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* 2000; 405:482-485.
- 305.** Arney KL. H19 and Igf2 – enhancing the confusion? *Trend Genet* 2003;19:17-23.
- 306.** Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, *et al.* Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res* 2000;10:1711-1718.
- 307.** Wang JC, Passage MB, Yen PH, *et al.* Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 Robertsonian translocation carrier. *Am J Hum Genet* 1991;48(6):1069-1074.
- 308.** Temple IK, Cockwell A, Hassold T, *et al.* Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet* 1991;28(8):511-514.
- 309.** Berends MJ, Hordijk R, Scheffer H, *et al.* Two cases of maternal uniparental disomy 14 with a phenotype overlapping with the Prader-Willi phenotype. *Am J Med Genet* 1999;84(1):76-79.
- 310.** Falk MJ, Curtis CA, Bass NE, *et al.* Maternal uniparental disomy chromosome 14: case report and literature review. *Pediatr Neurol* 2005;32(2):116-120.
- 311.** Tuna M, Knuutila S, Mills GB. Uniparental disomy in cancer. *Trends Mol Med* 2009;15:120-128.
- 312.** Ogata T, Kagami M, Ferguson-Smith AC. Molecular mechanisms regulating phenotypic outcome in paternal and maternal uniparental disomy for chromosome 14. *Epigenetics* 2008;3:181-187.
- 313.** Temple K, Shrubbs V, Lever M, *et al.* Isolated imprinting mutation of the DLK1/GTL2 locus associated with a clinical presentation of maternal uniparental disomy of chromosome 14. *J Med Genet* 2007;44:637-640.
- 314.** Cotter PD, Kaffe S, McCurdy LD, *et al.* Paternal uniparental disomy for chromosome 14: a case report and review. *Am J Med Genet* 1997;70(1):74-79.
- 315.** Zhou Y, Zhong Y, Wang Y, *et al.* Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem* 2007;282:24731-24742.
- 316.** Matzuk MM, Lamb DJ. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 2008;14(11):1197-1213.
- 317.** Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:341-347.
- 318.** 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):269-274.
- 319.** Meschede D, Horst J. The molecular genetics of male infertility. *Mol Hum Reprod* 1997;3:419-430.
- 320.** Seshagiri PB. Molecular insights into the causes of male infertility. *J Biosci* 2001;26:429-435.
- 321.** Carrell DT, Emery BR, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007;13:313-327.
- 322.** O’Flynn O’Brien KL, Varghese AC, Agarwa A. The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril* 2010;93:1-12.
- 323.** Nanassy L, Carrell DT. Paternal effects on early embryogenesis. *J Exp Clin Assist Reprod* 2008;5:2.

- 324.** Marques CJ, Carvalho F, Sousa M, *et al.* Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004;363:1700-1702.
- 325.** Bowdin S, Allen C, Kirby G, *et al.* A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007;22:3237-3240.
- 326.** Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, *et al.* Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances: a Dutch study. *Hum Reprod* 2007;22:2476-2480.
- 327.** Marques CJ, Costa P, Vaz B, *et al.* Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2008;14:67-74.
- 328.** Kobayashi H, Hiura H, John RM, *et al.* DNA methylation errors at imprinted loci after assisted conception originate in the parental sperm. *Eur J Hum Genet* 2009;17(12):1582-1591.
- 329.** Hammound S, Purwar J, Pflueger C, *et al.* Alterations in sperm DNA methylation patterns at imprinted loci in two classes of infertility. *Fertil Steril* 2010;94(5):1728-1733.
- 330.** Houshdaran S, Cortessis VK, Siegmund K, *et al.* Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS One* 2007;2:e1289.
- 331.** Buiting K, Gross S, Lich C, *et al.* Epimutations in Prader-Willi and Angelman syndromes: a molecular study of 136 patients with imprinting defect. *Am J Hum Genet* 2003;72:571-577.
- 332.** Kamagi M, Nagai T, Flukami M, *et al.* Silver-Russell syndrome in a girl born after in vitro fertilization: partial hypermethylation at the differentially methylated region PEG1/MEST. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:131-136.
- 333.** Cohen ME. The 'brave baby' and the law: fashioning remedies for the victims of in vitro fertilization. *Am J Law Med* 1987;4:319-336.
- 334.** Grace KS, Sinclair KD. Assisted reproductive technology, epigenetics, and long-term health: a developmental time bomb still ticking. *Semin Reprod Med* 2009;27(5):409-416.
- 335.** Sutcliffe AG, Ludwif M. Outcome of assisted reproduction. *Lancet* 2007;370:351-359.
- 336.** Allen C, Bowdin S, Harrison RF, *et al.* Pregnancy and perinatal outcomes after assisted reproduction: a comparative study. *Int J Med Sci* 2008;177:233-241.
- 337.** Karla SK, Molinaro TA. The association of in vitro fertilization and perinatal morbidity. *Semin Reprod Med* 2008;26:423-435.
- 338.** Reefhuis J, Honein MA, Schieve LA, *et al.* Assisted reproductive technology and major structural birth defects in the United States. *Hum Reprod* 2009;24:360-366.
- 339.** Steel AJ, Sutcliffe A. Long-term health implications for children conceived by IVF/ICSI. *Hum Fertil (Camb)* 2009;12:21-27.
- 340.** Cutfield WS, Hofman PL, Mitchell M, *et al.* Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatr Res* 2007;61:68R-75R.
- 341.** Lim D, Bowdin SC, Tee L, *et al.* Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod* 2009;24:741-747.
- 342.** Manipalviratn S, DeChermey A, Segars J. Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil Steril* 2009;91:305-315.

- 343.** DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Bechwith-Wiedemann Syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003;72:156-160.
- 344.** Gosden R, Trasler J, Lucifero D, *et al.* Rare congenital disorders, imprinted genes, and assisted reproductive technology. *Lancet* 2003;361:1975-1977.
- 345.** Maher ER. Imprinting and assisted reproductive technology. *Hum Mol Genet* 2005;14:R133-R138.
- 346.** Market-Velker BA, Zhang L, Magri LS, *et al.* Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Hum Mol Genet* 2010;19(1):36-51.
- 347.** Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, *et al.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *New Engl J Med* 2008;359(1):61-73.
- 348.** Kanaka-Gantenbein C, Sakka S, Chrousos GP. Assisted reproduction and its neuroendocrine impact on the offspring. *Prog Brain Res* 2010;182:161-174.
- 349.** Laprise SL. Implications of epigenetics and genomic imprinting in assisted reproductive technologies. *Mol Reprod Dev* 2009;76:1006-1018.
- 350.** Braude P, Pickering S, Flinter F, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet* 2002;3(12):941-953.
- 351.** Basille C, Frydman R, El Aly A, *et al.* Preimplantation genetic diagnosis: State of the art. *Eur J Obst Gynecol Reprod Biol* 2009;145:9-13.
- 352.** Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, *et al.* Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent in situ hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril* 1996;66(1):126-129.
- 353.** Hardy K, Martin KL, Leese HJ, *et al.* Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. *Hum Reprod* 1990;5(6):708-714.
- 354.** Goossens V, Harton G, Moutou C, *et al.* ESHRE preimplantation genetic diagnosis consortium: Data collection VIII: Cycles from January to December 2005 with pregnancy follow up to October 2006. *Hum Reprod* 2008;23(12):2629-2645.
- 355.** Dokras A, Sargent IL, Ross C, *et al.* Trophectoderm biopsy in human blastocysts. *Hum Reprod* 1990;5(7):821-825.
- 356.** Handyside AH, Pattinson JK, Penketh RJ, *et al.* Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989;1(8634):347-349.
- 357.** Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, *et al.* Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 2004;82:292-294.
- 358.** Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn* 2010;30:682-695.
- 359.** Hansen M, Bower C, Milne E, *et al.* Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review. *Hum Reprod* 2005;20:328-338.
- 360.** Liebaers I, Desmyttere S, Verpoest W, *et al.* Report on a consecutive series of 581 children born after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2010;25:275-282.
- 361.** Simpson JL. Children born after preimplantation genetic diagnosis show no increase in congenital anomalies. *Hum Reprod* 2010;25:6-8.
- 362.** Shapiro R, Weigras JM. Bisulfite-Catalyzed transamination of cytosine and cytidine. *Biochem Biophys Commun* 1970;40(4):839-843.

- 363.** Hayatsu H, Wataya Y, Kazushige K. The addition of Sodium Bisulfite to uracil and cytosine. *J Am Chem Soc* 1970;92(3):724-726.
- 364.** Frommer M, McDonald C, Millar DS, *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(5):1827-1831.
- 365.** Bartlett JMS, Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* 2003;226:3-6.
- 366.** Poon L, Leung T, Lau T, *et al.* Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem* 2002;48:35-41.
- 367.** Li Y, Nagai H, Ohno T, *et al.* Aberrant DNA methylation p57KIP2 gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype. *Blood* 2002;100:2572-2577.
- 368.** Murphy S, Wylie A, Coveler K, *et al.* Epigenetic detection of human chromosome 14 uniparental disomy. *Hum Mut* 2003;22:92-97.
- 369.** Noutsopoulos D, Vartholomatos G, Kolaitis N, *et al.* SV40 large T antigen up-regulates the retrotransposition frequency of viral-like 30 elements. *J Mol Biol* 2006;361:450-461.
- 370.** Georgiou I, Noutsopoulos D, Dimitriadou E, *et al.* Retrotransposon RNA expression and evidence for retrotransposition events in human oocytes. *Hum Mol Genet* 2009;18(7):1221-1228.
- 371.** Jouvenot Y, Poirier F, Jami J, *et al.* Biallelic transcription of Igf2 and H19 in individual cells suggests a post-transcriptional contribution to genomic imprinting. *Curr Biol* 1999;9:1199-1202.
- 372.** Pellestor F, Andreo B, Arnal F, *et al.* Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod* 2002;17:2134-2145.
- 373.** Taylor JH. Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 1958;43:515-529.
- 374.** Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:3395-3399.
- 375.** Perry P, Wolff S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 1974;251:156-158.
- 376.** Stoilov L, Wojcik A, Giri AK, *et al.* SCE formation after exposure of CHO cells prelabelled with BrdU or biotindUTP to various DNA-damaging agents. *Mutagenesis* 2002;17:399-403.
- 377.** Pinkel D, Thompson LH, Gray JW, *et al.* Measurement of sister chromatid exchanges at very low bromodeoxyuridine substitution levels using a monoclonal antibody in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 1985;45:5795-5798.
- 378.** Zhao JH, Tohda H, Oikawa A. Camptothecin-induced sister-chromatid exchange dependent on the presence of bromodeoxyuridine and the phase of the cell cycle. *Mutat Res* 1992;282:49-54.
- 379.** Dillehay LE, Thompson LH, Carrano AV. DNA-strand breaks associated with halogenated pyrimidine incorporation. *Mutat Res* 1984;131:129-136.
- 380.** Pietrzykowska I, Krych M, Shugar D. Induction of SOS functions in *Escherichia coli* by lesions resulting from incorporation of 5-bromouracil into DNA. *Mutat Res* 1983;111:119-133.

- 381.** Perry P, Evans HJ. Cytological detection of mutagenic carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975;258:121-125.
- 382.** Abe S, Sasaki M. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J Natl Cancer Inst* 1977;58:1635-1641.
- 383.** Ishii Y, Bender MA. Effects of inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells. *Mutat Res* 1980;79:19-32.
- 384.** Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, *et al.* Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks. *Mol Cell Biol* 2005;25:7158-7169.
- 385.** Shigekawa K, Dower WJ. Electroporation of eucaryotes and prokaryotes: a general approach to introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* 1988;6:742-751.
- 386.** Ostertag EM, Prak ET, DeBerardinis RJ, *et al.* Determination of L1 retrotransposition kinetics in cultured cells. *Nucleic Acids Res* 2000;28(6):1418-1423.
- 387.** Bloor DJ, Metcalfe AD, Rutherford A, *et al.* Expression of cell adhesion molecules during human preimplantation embryo development. *Mol Hum Reprod* 2002;8(3):237-245.
- 388.** Yin DX, Schimke RT. BCL-2 expression delays drug-induced apoptosis but does not increase clonogenic survival after drug treatment in HeLa cells. *Cancer Res* 1995;55(21):4922-4928.
- 389.** Noutsopoulos D, Markopoulos G, Vartholomatos G, *et al.* VL30 retrotransposition signals activation of caspase independent and p53-dependent death pathway associated with mitochondrial and lysosomal damage. *Cell Res* 2010;20(5):553-556.
- 390.** Boeke JD, Garfinkel DJ, Styles CA, *et al.* Ty elements transpose through an RNA intermediate. *Cell* 1985;40:491-500.
- 391.** Belshaw R, Dawson AL, Woolven-Allen J, *et al.* Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family. HERV-K(HML2): implications for present-day activity. *J Virol* 2005;79:12507-12514.
- 392.** Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, *et al.* Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4480-4484.
- 393.** Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchi P, *et al.* The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* 2009;315(5):849-862.
- 394.** Seifarth W, Frank O, Zeilfender U, *et al.* Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J Virol* 2005;79:341-352.
- 395.** Johnston JB, Silva C, Holden J, *et al.* Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* 2001;50:434-442.
- 396.** Beraldi R, Pittoggi C, Sciamanna I, *et al.* Expression of LINE-1 retroposons is essential for murine preimplantation development. *Mol Reprod Dev* 2006;73:279-287.
- 397.** Spadafora C. A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes. *Syst Biol Repod Med* 2008;54:11-21.

398. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001;20:1803-1815.
399. Rello-Varona S, Gamez A, Moreno V, *et al.* Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38:2183-2195.
400. Schmitt CA, Fridman JS, Yang M, *et al.* A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* 2002;109:335-346.
401. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, *et al.* DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2002;62:1876-1883.
402. Erenpreisa J, Cragg MS. Mitotic death, a mechanism of survival? A review. *Cancer Cell Int* 2001;1:1.
403. Nitta M, Kobayashi O, Honda S, *et al.* Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents. *Oncogene* 2004;23:6548-6558.
404. Erenpreisa J, Kalejs M, Ianzini F, *et al.* Segregation of genomes in polyploid tumour cells following mitotic catastrophe. *Cell Biol Int* 2005;29:1005-1011.
405. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Update* 2001;4:303-313.
406. Eom YW, Kim MA, Park SS, *et al.* Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005;24:4765-4777.
407. Puig PE, Guilly MN, Bouchot A, *et al.* Tumor cells can escape DNA-damaging cisplatin through DNA endoreduplication and reversible polyploidy. *Cell Biol Int* 2008;32(9):1031-1043.
408. Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233:706-720.
409. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 2007;39(3):305-318.
410. Lehman TA, Bennett WP, Metcalf RA, *et al.* p53 mutations, ras mutations, and p53-heat shock protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991;51(15):4090-4096.
411. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63(6):1129-1136.
412. Mitsudomi T, Steinberg SM, Nau MM, *et al.* p53 gene mutations in non-small-cell lung cancer lines and their correlation with the presence of ras mutations and clinical features. *Oncogene* 1992;7:171-180.
413. Beck CR, Colier P, Macfarlane C, *et al.* LINE-1 retrotransposition activity in human genomes. *Cell* 2010;141(7):1159-1170.
414. Ewing AD, Kazazian HH Jr. High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. *Genome Res* 2010;20(9):1262-1270.
415. Huang CR, Schneider AM, Lu Y, *et al.* Mobile interspersed repeats are major structural variants in the human genome. *Cell* 2010;141(7):1171-1182.
416. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, *et al.* Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 2010;141(7):1253-1261.
417. Stoye JP. Endogenous retroviruses: still active after all these years? *Curr Biol* 2001;11:R914-916.

418. Romano CM, Ramalho RF, Zanotto PM. Tempo and mode of ERV-K evolution in human and chimpanzee genomes. *Arch Virol* 2006;151:2215-2228.
419. Ianzini F, Mackey MA. Delayed DNA damage associated with mitotic catastrophe following X-irradiation of HeLa S3 cells. *Mutagenesis* 1998;13:337-344.
420. Lucifero D, La Salle S, Bourc'his D, *et al.* Coordinate regulation of DNA methyltransferase expression during oogenesis. *BMC Dev Biol* 2007;7:36.
421. Andreu-Vieyra C, Lin YN, Matzuk MM. Mining the oocyte transcriptome. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:136-143.
422. Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, *et al.* Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 2004;7(4):597-606.
423. Ostertag EM, DeBerardinis RJ, Goodier JL, *et al.* A mouse model of human L1 retrotransposition. *Nat Genet* 2002;32(4):655-660.
424. Evsikov AV, de Vries WN, Peaston AE, *et al.* Systems biology of the 2-cell mouse embryo. *Cytogenet Genome Res* 2004;105(2-4):240-250.
425. van den Hurk JA, Meij IC, Seleme MC, *et al.* L1 retrotransposition can occur early in human embryonic development. *Hum Mol Genet* 2007;16(13):1587-1592.
426. Okahara G, Matsubara S, Oda T, *et al.* Expression analyses of human endogenous retroviruses (HERVs): tissue-specific and developmental stage-dependent expression of HERVs. *Genomics* 2004;84:982-990.
427. Han JS, Szak ST, Boeke JD. Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes. *Nature* 2004;429:268-274.
428. Evsikov AV, Graber JH, Brockman JM, *et al.* Cracking the egg: molecular dynamics and evolutionary aspects of the transition from the fully grown oocyte to embryo. *Genes Dev* 2006;20:2713-2727.
429. Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, *et al.* Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene* 2007;26:4226-4233.
430. Nilsson BO, Jin M, Andersson AC, *et al.* Expression of envelope proteins of endogenous C-type retrovirus on the surface of mouse and human oocytes at fertilization. *Virus Genes* 1999;18:115-120.
431. Jiang YW. Transcriptional cosuppression of yeast Ty1 retrotransposons. *Genes Dev* 2002;16:467-478.
432. Puschendorf M, Stein P, Oakeley EJ, *et al.* Abundant transcripts from retrotransposons are unstable in fully grown mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347:36-43.
433. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-251.
434. Rowe HM, Trono D. Dynamic control of endogenous retroviruses during development. *Virology* 2011;411:273-287.
435. Waterland RA, Jirtle RL. Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 2003;23:5293-5300.
436. Santos MA, Kuijk EW, Macklon NS. The impact of ovarian stimulation for IVF on the developing embryo. *Reproduction* 2010;139:23-34.
437. Ono M, Kawakami M, Ushikubo H. Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast cancer cell line T47D. *J Virol* 1987;61:2059-2062.
438. Shi W, Haaf T. Aberrant methylation pattern at the two cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 2002;63:329-334.

439. Borghol N, Lornage J, Blachere T, *et al.* Epigenetic status of the H19 locus in human oocytes following in vitro maturation. *Genomics* 2006;87:417-426.
440. Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, *et al.* Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol Reprod* 2008;78:761-772.
441. Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, *et al.* Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 2006;8:643-673.
442. Neelanjana M, Sabaratnam A. Malignant conditions in children born after assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol Surv* 2008;63:669-676.
443. Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, *et al.* Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2005;84:343-355.
444. Li Z, Sheng T, Wan X, *et al.* Expression of HERV-K correlates with status of MEK-ERK and p16INK4A-CDK4 pathways in melanoma cells. *Cancer Invest* 2010;28:1031-1037.
445. Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* 2005;11:641-650.
446. Szyf M. Early life, the epigenome and human health. *Acta Paediatr* 2009;98:1082-1084.
447. Tierling S, Souren NY, Gries J, *et al.* Assisted reproductive technologies do not enhance the variability of DNA methylation imprints in human. *J Med Genet* 2010;47:371-376.
448. Li L, Wang L, Le F, *et al.* Evaluation of DNA methylation status at differentially methylated regions in IVF-conceived newborn twins. *Fertil Steril* 2011;95:1975-1979.
449. Schneider E, Pliushch G, El Hajj N, *et al.* Spatial, temporal and interindividual epigenetic variation of functionally important DNA methylation patterns. *Nucleic Acids Res* 2010;38:3880-3890.
450. Reinhart B, Eljanne M, Chaillet JR. Shared role for differentially methylated domains of imprinted genes. *Mol Cell Biol* 2002;22:2089-2098.
451. Howlett SK, Reik W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. *Development* 1991;113:119-127.
452. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003;69:1109-1117.
453. Kerjean A, Dupont JM, Vasseur C, *et al.* Establishment of the paternal methylation imprint of the human H19 and MEST/PEG1 genes during spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 2000;9(14):2183-2187.
454. Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, *et al.* Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006;12(6):407-411.
455. Minor A, Chow V, Ma S. Aberrant DNA methylation at imprinted genes in testicular sperm retrieved from men with obstructive azoospermia and undergoing vasectomy reversal. *Reproduction* 2011;141(6):749-757.
456. Marques CJ, Francisco T, Sousa S, *et al.* Methylation defects of imprinted genes in human testicular spermatozoa. *Fertil Steril* 2010;94(2):585-594.
457. Kim ST, Park NC, Yi LS, *et al.* Expression of p57KIP2 in germ cells and Leydig cells in human testis. *Arch Androl* 2006;52(6):463-469.

458. Boissonnas CC, Abdalaoui HE, Haelewyn V, *et al.* Specific epigenetic alterations of IGF2-H19 locus in spermatozoa from infertile men. *Eur J Hum Genet* 2010;18:73-80.
459. Aydos K, Kupeli B, Soygur T, *et al.* Analysis of the relationship between histologic alterations and the generation of reactive oxygen species in vasectomized rat testes. *Urology* 1998;51:510-515.
460. Cho K, Lee YK, Greenhalgh DG. Endogenous retroviruses in systemic response to stress signals. *Shock* 2008;30:105-116.
461. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, *et al.* Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007;16:2542-2551.
462. Kaneda M, Okano M, Hata K, *et al.* Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 2004;429:900-903.
463. Yaman R, Grandjean V. Timing of entry of meiosis depends on a mark generated by DNA methyltransferase3a in testis. *Molecul Reprod Dev* 2006;73:390-397.
464. Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, *et al.* Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008;266:6-11.
465. Turk PW, Laayoun A, Smith SS, *et al.* DNA adduct 8-hydroxyl-20-deoxyguanosine (8-hydroxyguanine) affects function of human DNA methyltransferase. *Carcinogenesis* 1995;16:1253-1255.
466. El Hajj N, Zechner U, Schneider E, *et al.* Methylation status of imprinted genes and repetitive elements in sperm DNA from infertile males. *Sex Dev* 2011;5(2):60-69.
467. Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, *et al.* Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005;20:768-773.
468. Gomes MV, Huber J, Ferriani RA, *et al.* Abnormal methylation at the KvDMR1 imprinting control region in clinically normal children conceived by assisted reproductive technologies. *Mol Hum Reprod* 2009;15:471-477.
469. Chang AS, Moley KH, Wangler M, *et al.* Association between Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproductive technology: a case series of 19 patients. *Fertil Steril* 2005;83(2):349-354.
470. Ludwig M, Katalinic A, Gross S, *et al.* Increased prevalence of imprinting defects in patients with Angelman syndrome born to subfertile couples. *J Med Genet* 2005;42(4):289-291.
471. Lawrence LT, Moley KH. Epigenetics and assisted reproductive technologies: human imprinting syndromes. *Semin Reprod Med* 2008;26:143-152.
472. Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007;8:253-262.