

Η επίδραση των επιγενετικών μηχανισμών στην ποιότητα του σπέρματος

Λέανδρος Λάζαρος

Μοριακός Γενετιστής-Κλινικός Εμβρυολόγος, PhD



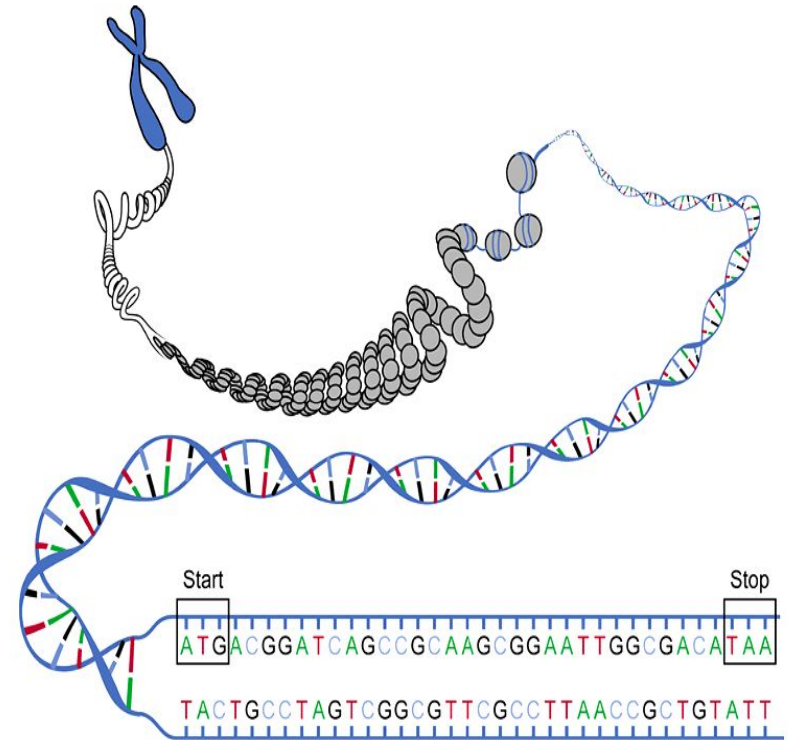
Genesis Genoma Lab

Γενετική Διάγνωση
Κλινική Γενετική
Έρευνα

Μετά την

- ανακάλυψη των χρωμοσωμάτων ως φορέων κληρονομικών φαινοτυπικών χαρακτηριστικών,
- διαλεύκανση της δομής του DNA,
- αποκρυπτογράφηση του γενετικού κώδικα

το ερευνητικό ενδιαφέρον των επιστημόνων στράφηκε στον τομέα της επιγενετικής.



Επιγενετική είναι η μελέτη κληρονομήσιμων αλλαγών στην έκφραση των γονιδίων, οι οποίες δεν συνοδεύονται από αλλαγές στην αλληλουχία του DNA.

Ιστορική αναδρομή

Ο όρος “**επιγένεση**” πρωτοαναφέρθηκε την εποχή του Αριστοτέλη.

Ο σημαντικός ρόλος της “επιγένεσης” αμφισβητήθηκε έντονα τον 17^ο με 18^ο αιώνα εξαιτίας της εμφάνισης της “**θεωρίας του προσχηματισμού**”, σύμφωνα με την οποία η ανάπτυξη των οργανισμών συνίσταται στην αύξηση μιας προϋπάρχουσας μικρογραφίας τους.

Το 1759 δημοσιεύθηκε η διατριβή του Caspar Wolff με τίτλο “**θεωρία της γένεσης**”, στην οποία αναπτύσσεται για πρώτη φορά εμπειριστατωμένα η θεωρία της “**επιγένεσης**”.

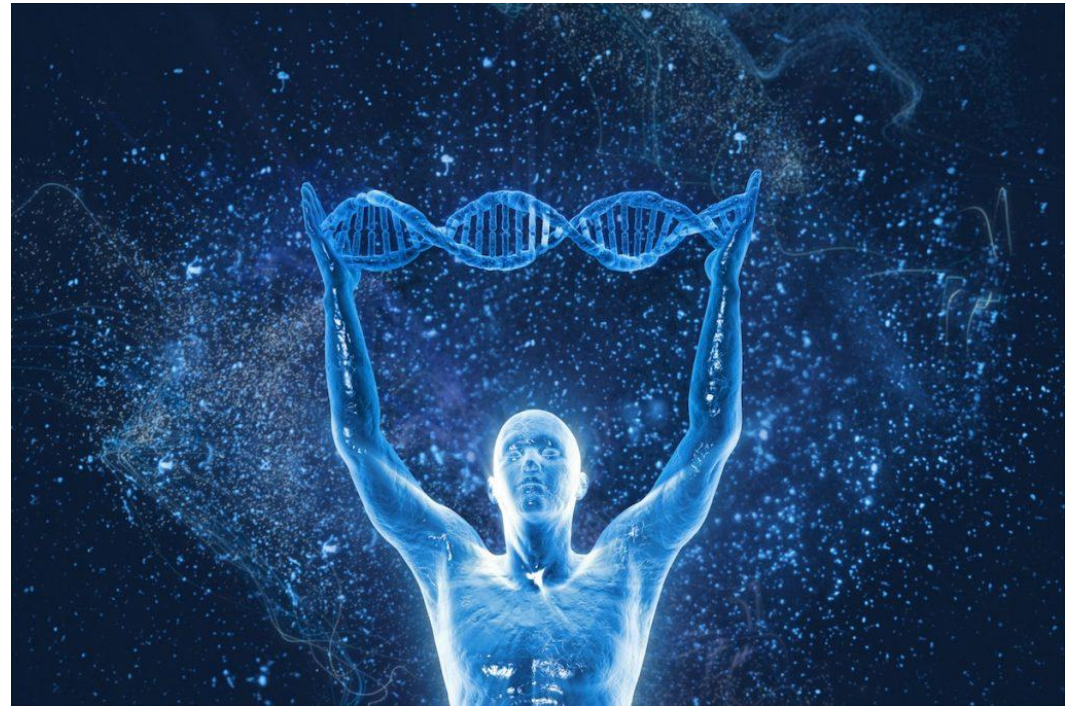
Ο όρος “**επιγενετική**” εισήχθη το 1941 από τον Conrad Waddington για να εξηγήσει τις **επιπτώσεις της γονιδιακής δράσης και έκφρασης στον φαινότυπο**.



Conrad Waddington
(1905 – 1975)

Επιγενετικοί μηχανισμοί

- ❖ Η μεθυλίωση του DNA
- ❖ Η αναδιοργάνωση της πυρηνικής χρωματίνης
- ❖ Οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών
- ❖ Η δράση των πυρηνικών μορίων RNA



Επιγενετική

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις **αναπτυξιακές διαδικασίες**, στην εμφάνιση του **καρκίνου** και στους μοριακούς μηχανισμούς της **γήρανσης**.

Πρόσφατες ερευνητικές εργασίες έχουν υποστηρίξει τη **συσχέτιση των περιβαλλοντικών παραγόντων και του τρόπου ζωής με τις τροποποιήσεις του επιγενώματος** και την εμφάνιση **παθολογικών καταστάσεων**.

Ιδιαίτερη βαρύτητα έχει δοθεί τα τελευταία χρόνια στην επίδραση των επιγενετικών μηχανισμών στην **ποιότητα των γαμετών**, στην **αναπαραγωγική διαδικασία** και κατ' επέκταση στην **εμβρυϊκή ανάπτυξη**.



Σπερματογένεση

Το ώριμο σπερματοζώαριο:

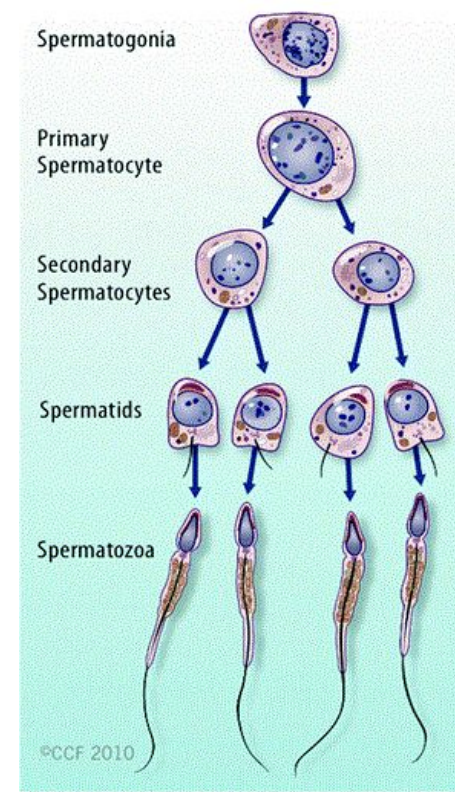
- είναι ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο κύτταρο με κύρια χαρακτηριστικά την ουρά και τον ιδιαίτερα συμπυκνωμένο πυρήνα.
- αποκτά την τελική του δομή μέσω της μείωσης και της σπερμιογένεσης.

Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής, τα σπερματικά σωληνάρια των όρχεων καταλαμβάνονται από αδιαφοροποίητα διπλοειδή κύτταρα που ονομάζονται **σπερματογόνια τύπου A**.

Κατά την έναρξη της εφηβείας τα **σπερματογόνια** διαφοροποιούνται σε **σπερματοκύτταρα τύπου I**, τα οποία υποβάλλονται σε δύο μειωτικές διαιρέσεις για την παραγωγή των **σπερματίδων**.

Οι **σπερματίδες** έχουν **σφαιρικό σχήμα** και **ενεργές μεταγραφικές και μεταφραστικές ιδιότητες** στον πυρήνα τους.

Οι **σπερματίδες** μετατρέπονται μέσω της διαδικασίας της σπερμιογένεσης σε **μαστιγοφόρα κύτταρα**, τα **σπερματοζώαρια**, τα οποία διαθέτουν **συμπυκνωμένο, ανενεργό πυρήνα**.



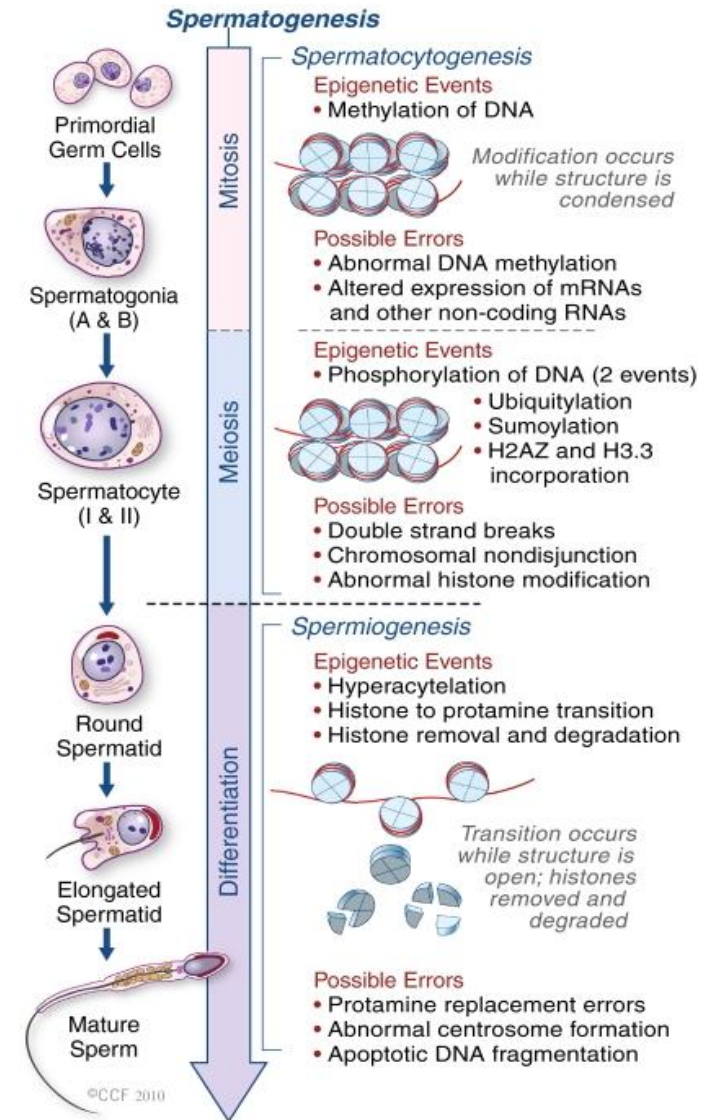
Σπερματογένεση & επιγενετικοί μηχανισμοί

□ Ο επιγενετικός προγραμματισμός των σπερματοζωαρίων αρχίζει από το στάδιο των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, όπου παρατηρείται αξιοσημείωτη διαγραφή των επιγενετικών πληροφοριών.

□ Στη διάρκεια της μετα-μειωτικής ωρίμανσης των αρρένων γεννητικών κυττάρων, παρατηρείται αναδιοργάνωση των πυρήνων με ταυτόχρονη συμπύκνωση του γονιδιώματός τους.

Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται από:

- ✓ μεθυλίωση του DNA
- ✓ ακετυλίωση των ιστονών
- ✓ αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες.

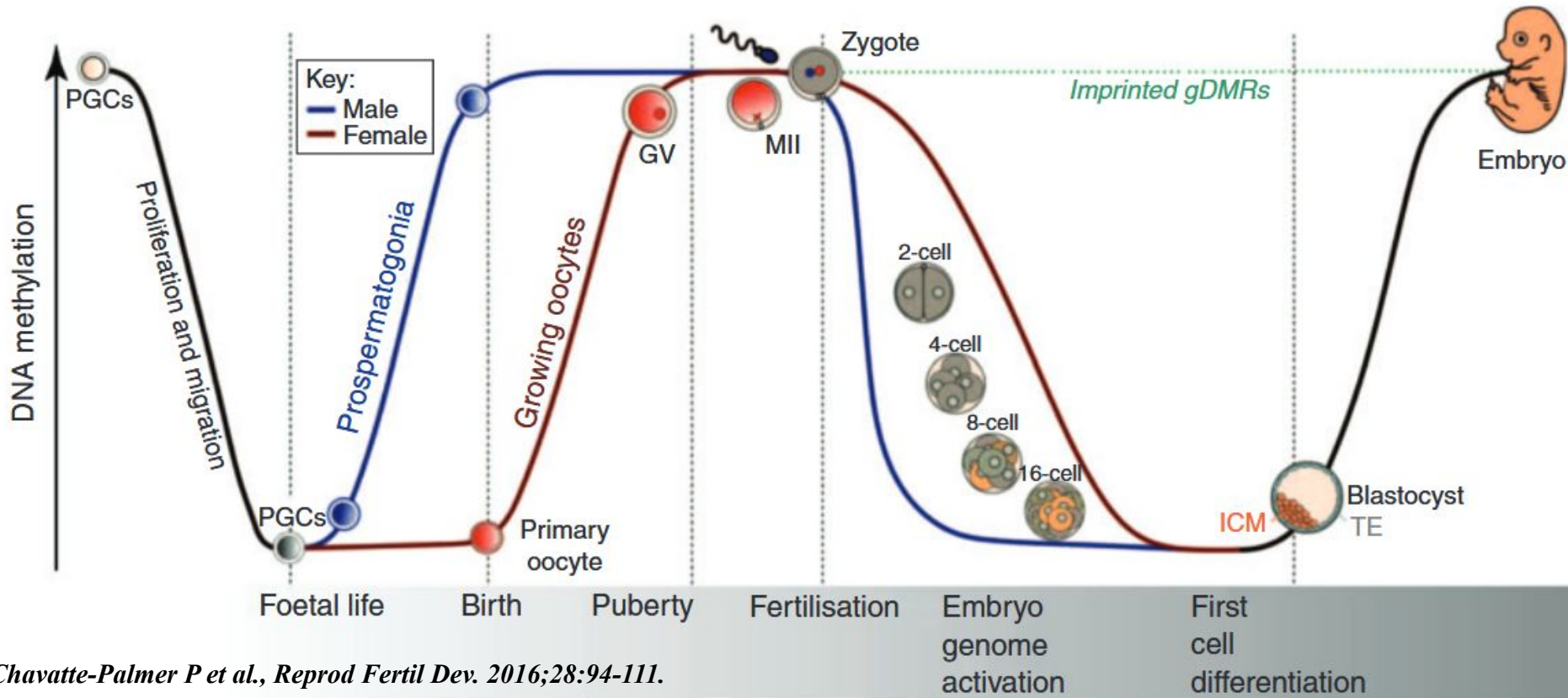


Οι επιγενετικές πληροφορίες είναι ζωτικής σημασίας για την καλή λειτουργία του γονιδιώματος των σπερματοζωαρίων, ενώ οποιαδήποτε αλλαγή στις προαναφερθείσες διεργασίες μπορεί να επηρεάσει τη λειτουργικότητα και τη γονιμοποιητική τους ικανότητα.

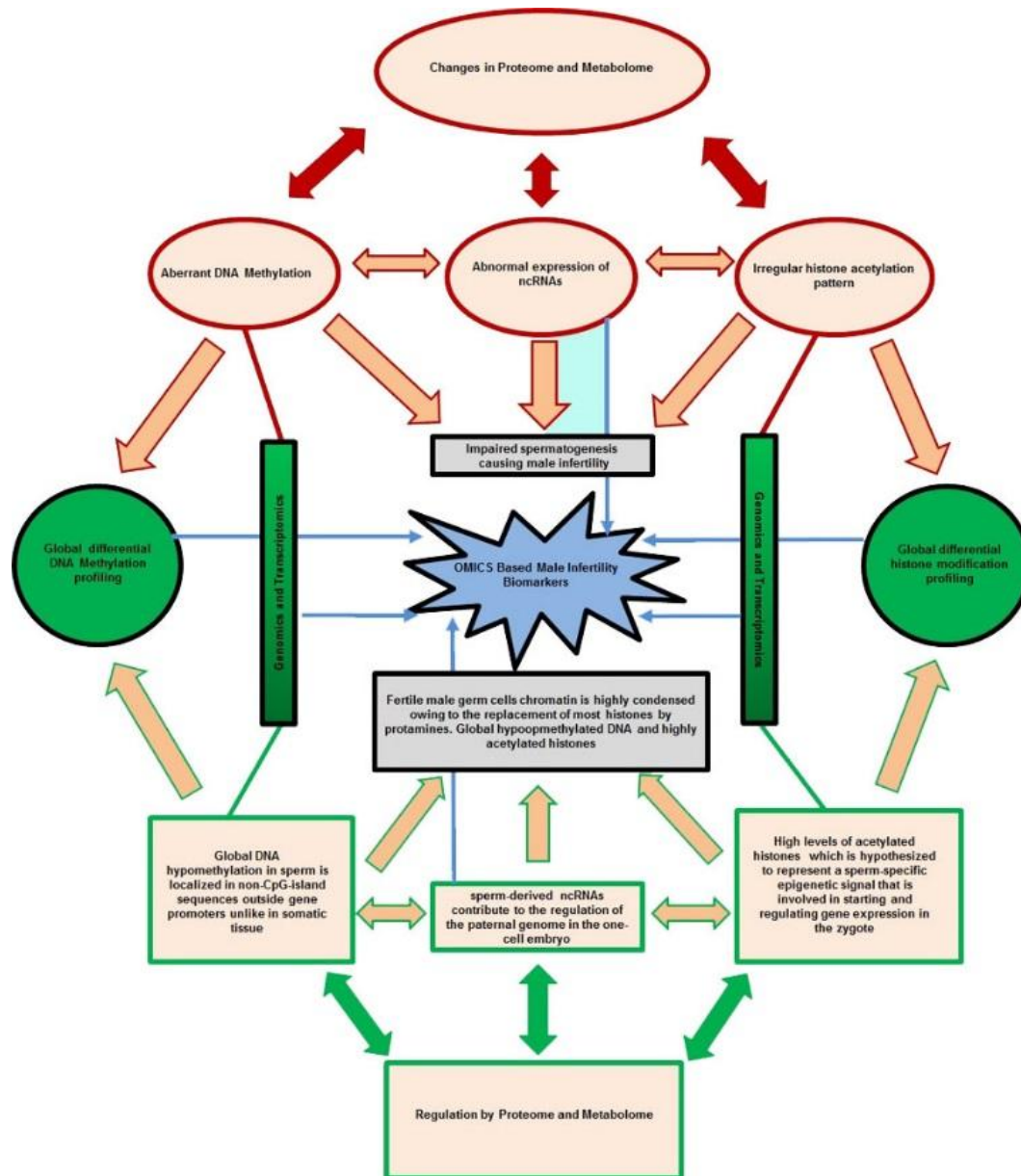
Εμβρυογένεση & επιγενετικοί μηχανισμοί

Μετά τη γονιμοποίηση παρατηρείται αποσυμπύκνωση του πατρικού προπυρήνα, η οποία ακολουθεί έναν **επιγενετικό επαναπρογραμματισμό** με:

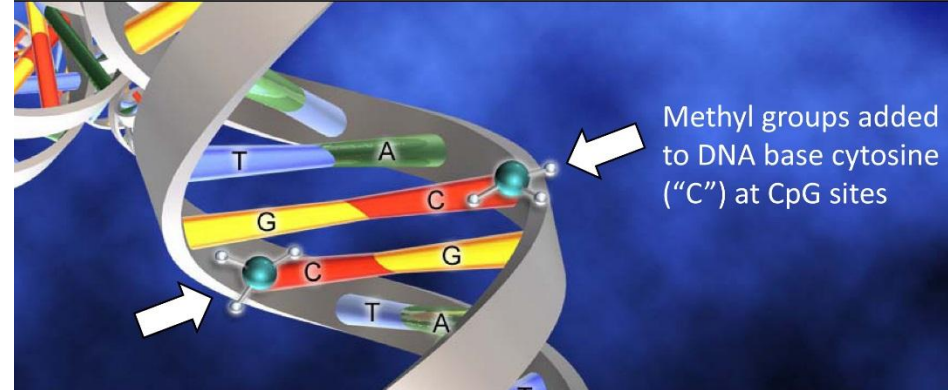
- ✓ απομεθυλίωση του DNA,
- ✓ αντικατάσταση των πρωταμινών από ιστόνες,
- ✓ τροποποιήσεις των ιστονών που συμβάλλουν στην ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος και στην εμβρυϊκή ανάπτυξη.



Επιγενετικές τροποποιήσεις & ποιότητα του σπέρματος

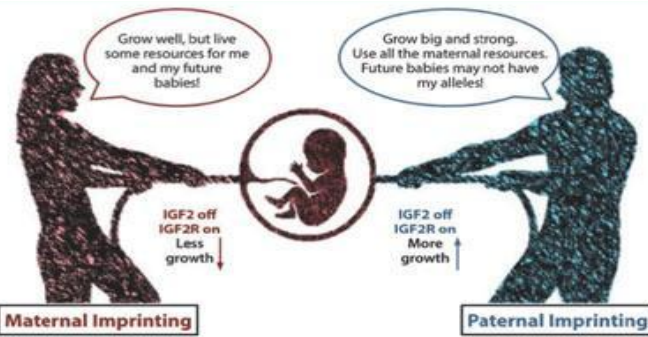


Μεθυλίωση του DNA



- Η **μεθυλίωση του DNA** είναι ένας δυναμικός μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, ο οποίος παρατηρείται σε **δινουκλεοτίδια** που αποτελούνται από **κυτοσίνη** και **γουανίνη (CpG)**.
- Αυτά τα δινουκλεοτίδια εντοπίζονται στις **διαφορικά μεθυλιωμένες περιοχές (DMRs)**, οι οποίες συχνά εδράζονται κοντά στις **ρυθμιστικές περιοχές των γονιδίων**, όπως στην περιοχή των υποκινητών.
- Η **υπερμεθυλίωση καταστέλλει τη γονιδιακή έκφραση** διότι οι μεθυλομάδες παρεμποδίζουν τη δράση των μεταγραφικών παραγόντων και των DNA πολυμερασών, ενώ αντίθετα η **υπομεθυλίωση διευκολύνει τη γονιδιακή έκφραση**.
- Ο όρος **“μεθυλίωση του DNA”** περιλαμβάνει τη γενικότερη μεθυλίωση του DNA, τη μεθυλίωση των **αποτυπωμένων και μη αποτυπωμένων γονιδίων**, καθώς και την

Γονιδιωματική αποτύπωση



□ Ενώ στην πλειοψηφία τους τα **γονιδιακά αλληλόμορφα** εκφράζονται **ισότιμα**, σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται **επιλεκτική ή αποκλειστική έκφραση του ενός αλληλομόρφου**, ανάλογα με τη γονεϊκή προέλευση.

□ Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται **γονιδιωματική αποτύπωση** και επιτελείται μέσω **επιγενετικών μηχανισμών**.

□ Η αποτύπωση είναι μία **δυναμική διαδικασία**, δηλαδή τα μητρικής προέλευσης γονίδια που είναι αποτυπωμένα σε ένα άρρεν άτομο και επομένως δεν εκφράζονται, θα εκφραστούν σε όσους άρρενες απογόνους του τα κληρονομήσουν.

□ Στους γαμέτες **το αποτύπωμα διαγράφεται και επανιδρύεται** σύμφωνα με το φύλο του ατόμου:

✓ στα **σπερματοζωάρια** εγκαθίσταται ένα **πατρικό αποτύπωμα** κατά τη σπερματογένεση,

✓ στα **ωάρια** εγκαθίσταται ένα **μητρικό αποτύπωμα** κατά τη ωογένεση.

Γονιδιωματική αποτύπωση

□ Η **επιγενετική σήμανση** πολλών αποτυπωμένων γονιδίων επιτυγχάνεται με **μεθυλίωση του DNA** στις διαφορεικά μεθυλιωμένες περιοχές (**DMRs**). Τα δινοκλεοτίδια CpG των DMRs είναι μεθυλιωμένα μόνο στο ένα αλληλόμορφο.

□ Οι **DMRs** διακρίνονται σε:

- ✓ **πρωτογενείς**, όπου η **μεθυλίωση επιτελείται κατά τη γαμετογένεση** και παραμένει καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης,
- ✓ **δευτερογενείς**, όπου η **μεθυλίωση επιτελείται μετά τη γονιμοποίηση**, στα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

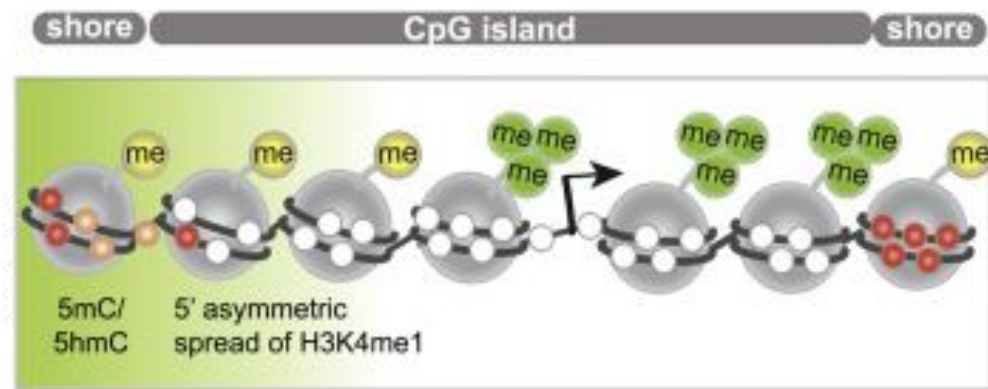
□ Μεταξύ των πρωτογενών DMRs υπάρχουν οι **περιοχές ελέγχου της γονιδιωματικής αποτύπωσης** (imprinting control region, ICR) που ελέγχουν την **εγκαθίδρυση** και τη **διατήρησή της**¹⁻³.

□ Στα **αποτυπωμένα γονίδια** έχουν παρατηρηθεί **αυξημένα ποσοστά μεθυλίωσης** της ιστόνης **H3**^{4,5}.

- ✓ στη **λυσίνη 4** στο ενεργό αλληλόμορφο,
- ✓ στη **λυσίνη 9** στο ανενεργό αλληλόμορφο.

1. Horsthemke & Ludwig. Hum Reprod Update. 2005
2. Reik *et al.* Science. 2001
3. Robertson. Nat Rev Genet. 2005
4. Delaval *et al.* EMBO. 2007
5. Yu TH *et al.* Hum Mol Genet. 2004

Μεθυλίωση του DNA & Νησίδες CpG



Οι νησίδες CpG είναι περιοχές του γονιδιώματος μεγέθους >200 ζευγών βάσεων, με ποσοστό CG>50% και περιεχόμενο σε διουκλεοτίδια CpG τουλάχιστον 60% του αναμενόμενου.

Αντίθετα, στο υπόλοιπο γονιδίωμα παρατηρείται αισθητά μειωμένη συχνότητα διουκλεοτιδίων CpG

(~1%)

Τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA στις ρυθμιστικές περιοχές είναι συνήθως σταθερά, αλλά *de novo* αλλαγές μπορεί να συμβούν κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αποτρέποντας την επανέκφρασή τους.

Η μεθυλίωση των θέσεων CpG στον υποκινητή ενός γονιδίου μπορεί να καταστείλει την γονιδιακή έκφραση:

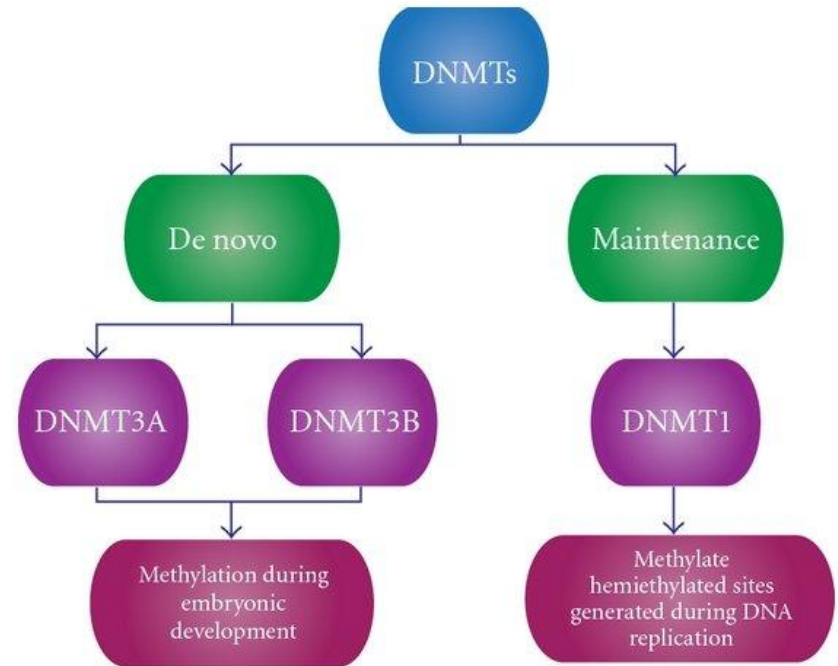
- ✓ Οι νησίδες CpG των υποκινητών “σημαντικών γονιδίων”, όπως τα γονίδια διαχείρισης (housekeeping genes), είναι ως επί το πλείστον μη μεθυλιωμένες.
- ✓ Οι νησίδες CpG των υποκινητών ή των ρυθμιστικών περιοχών των μεταθετών στοιχείων είναι μεθυλιωμένες, γεγονός που αναστέλλει την αντιγραφή τους.

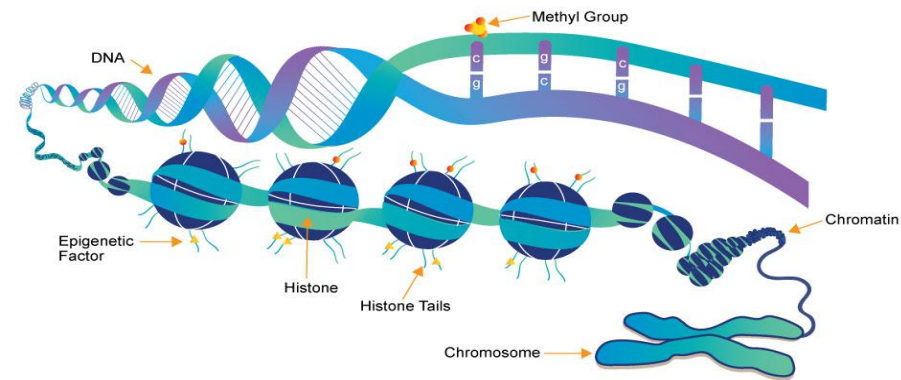
DNA-μεθυλοτρανσφεράσες

- Η διαδικασία της μεθυλίωσης ρυθμίζεται από τις DNA-μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs).
- Η DNMT1 εξασφαλίζει τη διατήρηση της μεθυλίωσης, ενώ οι DNMT3A, DNMT3B και DNMT3L καταλύουν τις επί μέρους διεργασίες στα γεννητικά κύτταρα.
- Η δραστηριότητά τους είναι **απαραίτητη** για την **ολοκλήρωση της σπερματογένεσης**:

✓ Η απουσία λειτουργικής DNMT3A προκαλεί σοβαρές διαταραχές στη σπερματογένεση λόγω απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων και συνδέεται με την απώλεια μεθυλίωσης των πατρικών αποτυπωμένων γονιδίων.

✓ Η απουσία λειτουργικής DNMT3L προκαλεί διακοπή της μείωσης στο στάδιο των σπερματοκυττάρων λόγω





Μεθυλίωση του DNA & Σπέρμα

ρων ακολουθεί ένα σταθερό πρότυπο:

- ✓ παρατηρείται **απομεθυλίωση του DNA** μεταξύ της 8^{ης} και 13^{ης} ημέρας μετά την γονιμοποίηση στα **αρχέγονα γεννητικά κύτταρα** του αναπτυσσόμενου εμβρύου, διαγράφοντας τους μεθυλιωτικούς δείκτες.
- ✓ παρατηρείται **επαναμεθυλίωση του DNA** μετά τη 15^η ημέρα, διαδικασία που ολοκληρώνεται στα **σπερματοκύτταρα στο στάδιο του παχυτενίου**, δηλαδή μεταγεννητικά και πριν την έναρξη της μείωσης.

Η προαναφερθείσα διαδικασία διαγραφής εντάσσεται στα πλαίσια της **γονιδιωματικής αποτύπωσης**, μέσω της οποίας ρυθμίζεται η έκφραση των γονιδιακών αλληλομόρφων ανάλογα με την **γονεϊκή προέλευση**.

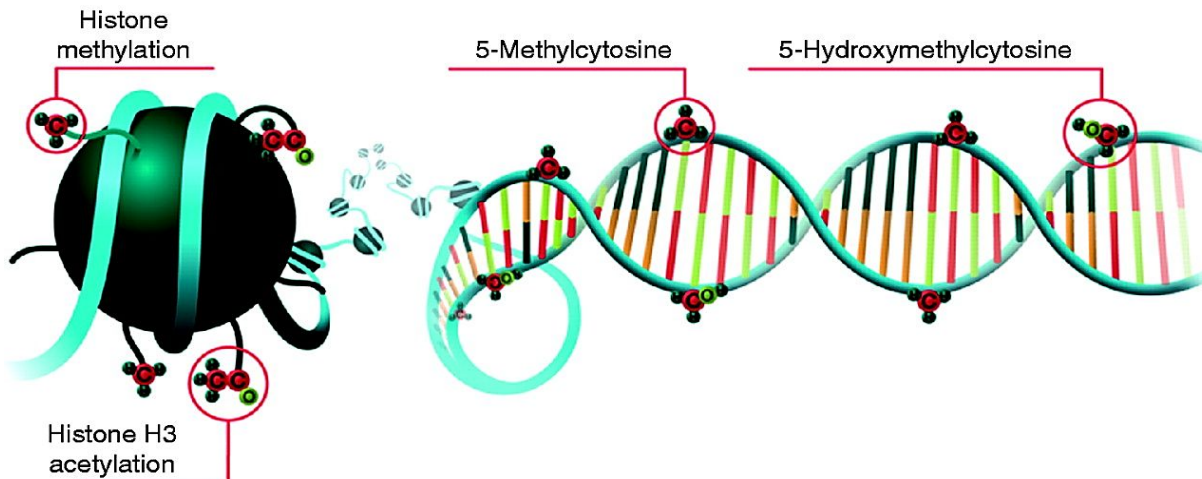
Τα **συγκεκριμένα πρότυπα επαναμεθυλίωσης** των σπερματογόνιων και των σπερματοκυττάρων τύπου I διασφαλίζουν τη φορεία του **σωστού πατρικού αποτυπώματος**.

Μεθυλίωση του DNA & Σπέρμα

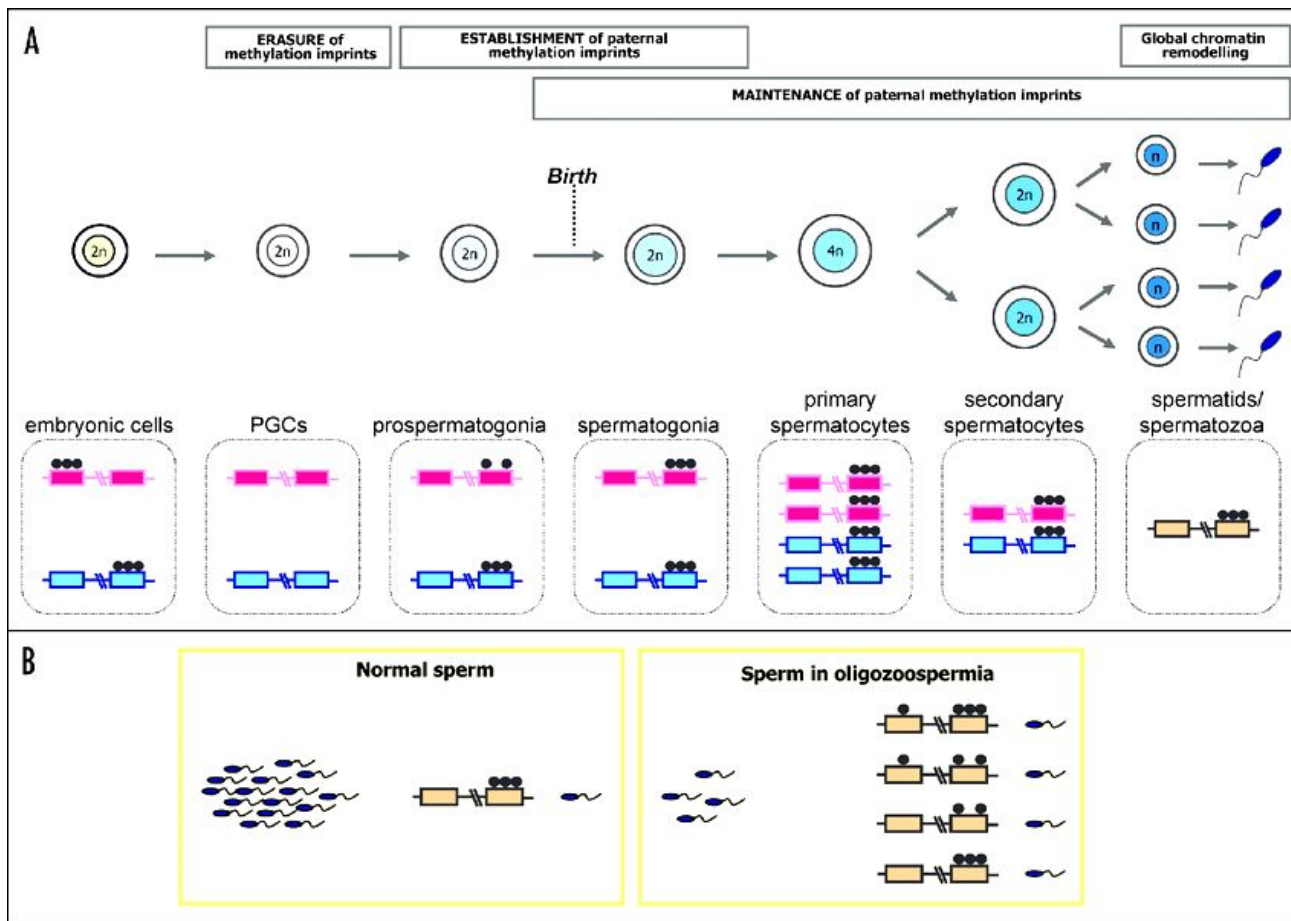
Η μελέτη της μεθυλίωσης του DNA των σπερματοζωαρίων κατά την εκσπερμάτιση απέδειξε ότι τα **υψηλά επίπεδα γενικής μεθυλίωσης** συνδέονται με **υψηλά ποσοστά κήσεων**, γεγονός που συσχέτισε τις **διαταραχές της μεθυλίωσης του σπέρματος** με την **υπογονιμότητα**¹.

Παράλληλα προτάθηκε η **παρουσία υψηλών επιπέδων μεθυλίωσης των αποτυπωμένων και μη γονιδίων**, καθώς και των **μεταθετών στοιχείων**, σε δείγματα σπέρματος **χαμηλής ποιότητας**.

Τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης των τελευταίων δειγμάτων οφείλονταν στην **ατελή διαγραφή των μεθυλιωτικών δεικτών** κατά την **απομεθυλίωση** και όχι στη **de novo μεθυλίωση** κατά τον **επιγενετικό επαναπρογραμματισμό**².



1. Benchaib *et al.* Hum Reprod. 2005;20:768–73.
2. Houshdaran *et al.* PLoS One 2007;2:e1289.



A. Μεθυλίωση των περιοχών που ελέγχουν την αποτύπωση (imprinting control regions, ICRs) κατά τη σπερματογένεση.

B. Το προφίλ μεθυλίωσης των ICRs στους φυσιολογικούς και ολιγοσπερμικούς άνδρες. Οι πατρικές ICRs παρουσιάζουν μειωμένη μεθυλίωση στους ολιγοσπερμικούς άνδρες, ενώ οι μητρικές πολύ υψηλότερα επίπεδα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς άνδρες.

Μεθυλίωση του DNA & Σπέρμα

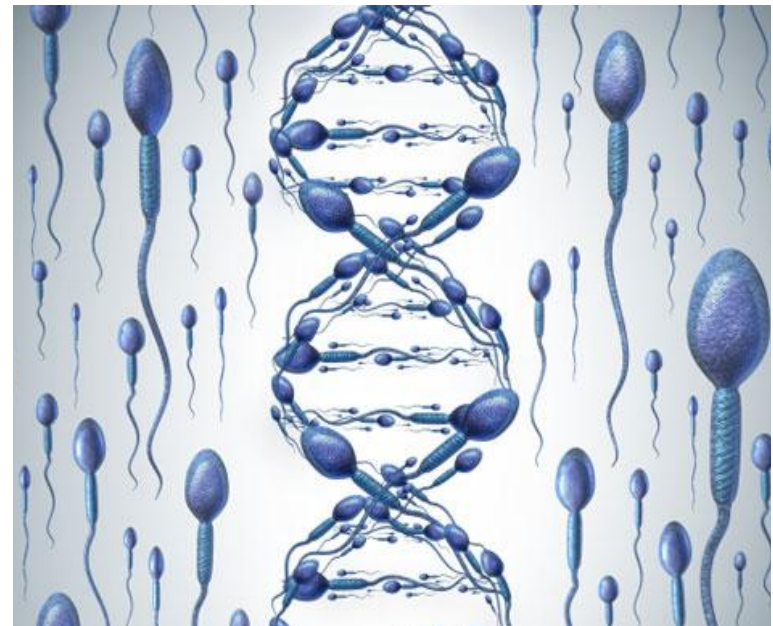
Η μη φυσιολογική μεθυλίωση των αποτυπωμένων περιοχών των σπερματοζωαρίων έχει συσχετισθεί και με τα αυξημένα ποσοστά αυτόματων αποβολών μετά από εφαρμογή ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

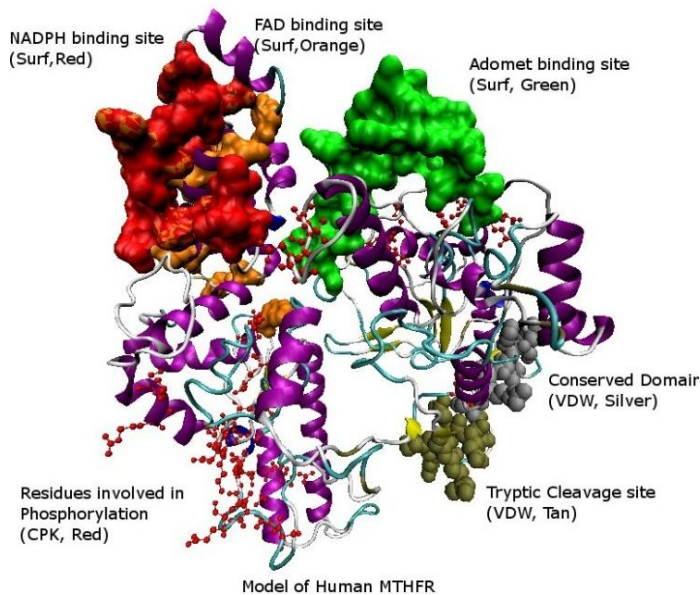
Στις ανωτέρω περιπτώσεις, τόσο στα σπερματοζωάρια, όσο και στα προϊόντα αποβολής ανιχνεύθηκαν τα ίδια σφάλματα στη μεθυλίωση των αποτυπωμένων περιοχών.

Όλες οι σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν την υπόθεση ότι τα πρότυπα μεθυλίωσης των αποτυπωμένων και μη γονιδίων των σπερματοζωαρίων είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική λειτουργία τους, τη διατήρηση της γονιμοποιητικής ικανότητας και την ανάπτυξη φυσιολογικών εμβρύων.

Kobayashi *et al.* Hum Mol Genet 2007;16:2542–51.

Kobayashi *et al.* Eur J Hum Genet 2009;17:1582–91.





Μεθυλίωση του DNA & Σπέρμα

Στα πλαίσια της μελέτης του προφίλ μεθυλίωσης των υποκινητών γονιδίων που εμπλέκονται στη διαδικασία της σπερματογένεσης, δόθηκε ιδιαίτερη βαρύτητα στον υποκινητή του γονιδίου *MTHFR* (methylene tetrahydrofolate reductase), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη βιοδιαθεσιμότητα της μεθειονίνης.

Η μεθειονίνη μπορεί να μετατραπεί σε *S*-αδενοσυλμεθειονίνη, η οποία αποτελεί δότη μεθυλίου για πολλά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του DNA.

Υπερμεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου *MTHFR* ανιχνεύθηκε στο 53% των ανδρών με μη-αποφρακτική αζωοσπερμία¹ (βιοψία όρχεων), καθώς και σε κάποιες περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας².

1. Khazamipour *et al.* Hum Reprod 2009;24:2361–4.

2. Wu *et al.* PLoS One 2010;5:e13884.

Μεθυλίωση του DNA & Εξωγενείς παράγοντες

Η μεθυλίωση του DNA των σπερματοζωαρίων βρέθηκε να επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, καθώς και από τον τρόπο ζωής του ατόμου.

Για παράδειγμα, η απώλεια βάρους μετά από βαριατρική επέμβαση φαίνεται ότι προκαλεί μεταβολές στο προφίλ μεθυλίωσης των σπερματοζωαρίων των παχύσαρκων ανδρών.

Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μεταβολή της μεθυλίωσης **1509** γονιδίων μία εβδομάδα μετά την επέμβαση και **3910** γονιδίων ένα χρόνο μετά την επέμβαση, αποδεικνύοντας ότι η απώλεια βάρους επηρεάζει το επιγένομα των σπερματοζωαρίων.

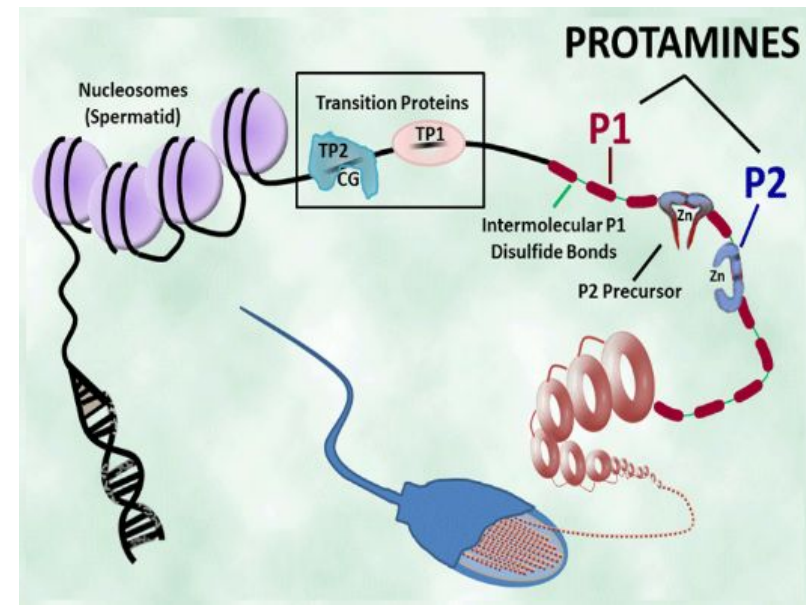
Γίνεται κατανοητό ότι **αλλαγές στο προφίλ μεθυλίωσης** των σπερματοζωαρίων μπορεί να συμβούν ακόμα και στα **τελευταία στάδια της σπερματογένεσης**, γεγονός που ενισχύεται από την παρουσία μεθυλοτρανσφερασών στο ώριμο σπέρμα.



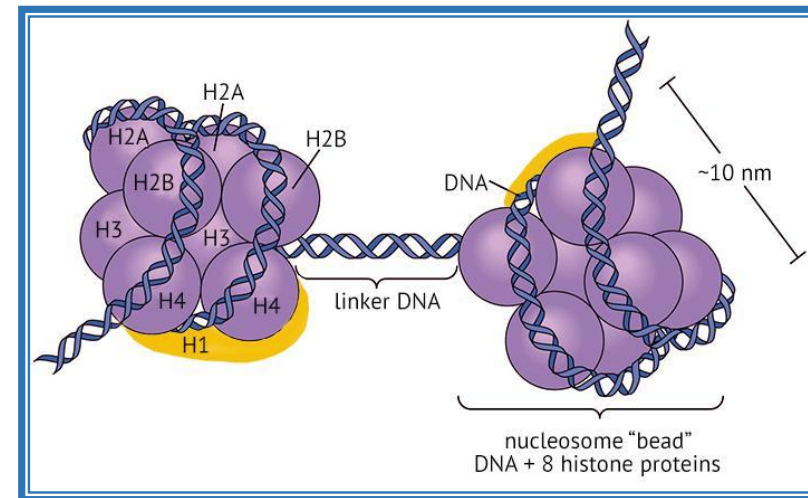
Μελλοντικές μελέτες θα αποδείξουν το πώς οι παράγοντες αυτοί μπορεί να επηρεάσουν το μεταβολικό προφίλ των επόμενων γενεών.

Αναδιοργάνωση της πυρηνικής χρωματίνης

- ❖ Η **συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης** των σπερματοζωαρίων είναι μία **κρίσιμη διαδικασία** που στοχεύει στην αποθήκευση μίας τεράστιας ποσότητας DNA σε ένα πολύ μικρό κύτταρο.
- ❖ Η **γονιμοποίηση** περιλαμβάνει μία σειρά διεργασιών, όπως η **μετακίνηση των σπερματοζωαρίων** στο θήλυ αναπαραγωγικό σύστημα, η **προσκόλλησή** τους στη **διάφανη ζώνη (zona pellucida)**, η επιτυχής **διάτρησής** της και η **συνένωση των προπυρήνων** του ωαρίου και σπερματοζωαρίου.
- ❖ Για την ολοκλήρωση όλων αυτών των φάσεων, απαιτείται ένας **ρυθμιστικός μηχανισμός** που ελέγχει την αντικατάσταση του 85-95% των **ιστονών** της χρωματίνης από **πρωταμίνες**.



Πώς επιτυγχάνεται η συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης κατά τη σπερματογένεση;

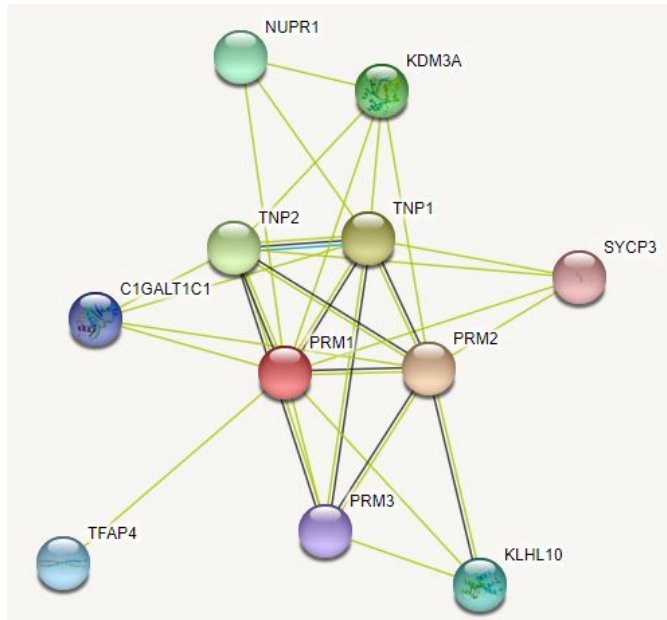


- ❖ Στις πρώιμες σπερματίδες, το DNA είναι οργανωμένο σε **νουκλεοσώματα**, δηλαδή σε **οκταμερή ιστονών** (H2A, H2B, H3 και H4) περιτυλιγμένα από DNA.
- ❖ Η αύξηση της συμπύκνωσης της πυρηνικής χρωματίνης επιτυγχάνεται με **αντικατάσταση** μεγάλου αριθμού **ιστονών**, αρχικά από τις **μεταβατικές πρωτεΐνες** (TNP1 & TNP2) και στη συνέχεια από τις **πρωταμίνες** (P1 & P2).
- ❖ Μεταξύ των **πρωταμινών** σχηματίζονται **ισχυροί δισουλφιδικοί δεσμοί**, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία δακτυλιοειδών δομών.
- ❖ Η τελική συμπύκνωση της χρωματίνης είναι **6-20 φορές μεγαλύτερη** από την αντίστοιχη που παρατηρείται όταν το DNA είναι συνδεδεμένο με ιστόνες.
- ❖ Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας παρατηρείται **παύση της πυρηνικής δραστηριότητας** και μόνο μετάγραφα προερχόμενα από τις πρώιμες σπερματίδες (mRNAs, siRNAs) είναι παρόντα στον πυρήνα.

Πρωταμίνες

Οι πρωταμίνες είναι μικρές πρωτεΐνες, πλούσιες σε αργινίνη, οι οποίες **συντίθενται στα μεταγενέστερα στάδια της σπερματογένεσης** και εντοπίζονται στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων.

Οι πρωταμίνες, **αυξάνοντας τη συμπύκνωση της πυρηνικής χρωματίνης** και επομένως του πυρήνα των σπερματοζωαρίων, **διευκολύνουν την κινητικότητα** τους και **προστατεύουν το γονιδιώμά τους** από τις οξειδωτικές επιδράσεις του θήλεος αναπαραγωγικού συστήματος.



Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες απέδειξαν ότι η **μειωμένη περιεκτικότητα της χρωματίνης σε πρωταμίνες** μπορεί να επηρεάσει τις **επιγενετικές πληροφορίες που μεταφέρονται μέσω του πατρικού DNA στους απογόνους¹**, καθιστώντας την **δείκτη πρόβλεψης της έκβασης της ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής²**.

1. Francis *et al.* Hum Fertil (Camb) 2014;17:80-9.

2. Marchiani *et al.* Sci Rep 2017;7:15122.

Πρωταμίνες & Ανδρική Υπογονιμότητα

- ❖ Τα χαμηλά επίπεδα πρωταμινών και η μη φυσιολογική αναλογία P1/P2 προκαλούν αύξηση του κατακερματισμού του DNA, αποδεικνύοντας ότι οι διαταραχές της συμπύκνωσης καθιστούν τη χρωματίνη ευάλωτη σε βλάβες του DNA και στο οξειδωτικό στρες¹⁻³.
- ❖ Η αναλογία των πρωταμινών P1/P2 είναι συνήθως σταθερή στους γόνιμους άνδρες, αλλά παρουσιάζει μεγάλες διακυμάνσεις στους υπογόνιμους άνδρες^{4,5}.
- ❖ Η υποέκφραση οποιασδήποτε από τις δύο πρωταμίνες έχει συνδεθεί άμεσα με την ανδρική υπογονιμότητα και την χαμηλή ποιότητα των εμβρύων που προκύπτουν μετά την εφαρμογή ιατρικώς υποβοηθούμενης αναπαραγωγής^{6,7}.

- ❖ Η μελέτη σπερματοζωαρίων ποντικών έχει αποδείξει ότι τα χαμηλά επίπεδα πρωταμίνης P2 συνοδεύονται από υψηλά επίπεδα κατακερματισμού του DNA και

1. Torregrosa *et al.* Hum Reprod. 2006;21(8):2084–9.

2. Torregrosa *et al.* Hum Reprod. 2006;21(8):2084–9.

3. Belokopytova *et al.* Mol Reprod Dev. 1993;34(1):53–7.

4. Rousseaux *et al.* Syst Biol Reprod Med. 2011;57(1-2):50–3.

5. Aoki *et al.* J Androl 2005;26:741–8.

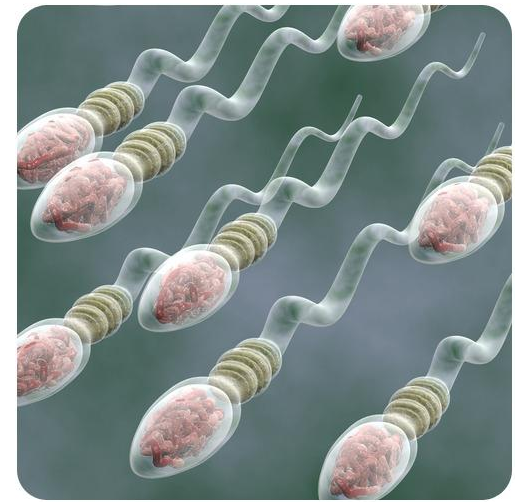
6. Aoki VW *et al.* J Androl 2006;27:890–8.

7. Aoki *et al.* Fertil Steril 2006;86:1408–15.

8. Cho *et al.* Biol Reprod 2003;69:211–7.

Πρωταμίνες & Ανδρική Υπογονιμότητα

- ❖ Η αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες δεν είναι ποτέ πλήρης, ακόμα και στα φυσιολογικά δείγματα σπέρματος.
- ❖ Το 5-15% του γονιδιώματος παραμένει δεσμευμένο στα νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούνται από κανονικές και τροποποιημένες ιστόνες¹.
- ❖ Το προαναφερθέν ποσοστό είναι ιδιαίτερα αυξημένο σε περιπτώσεις προβληματικής αντικατάστασης των ιστονών από πρωταμίνες.
- ❖ Τα χαμηλά επίπεδα πρωταμινών και τα υψηλά ποσοστά ιστονών και μεταβατικών πρωτεϊνών στο σπέρμα έχουν συσχετισθεί με την ανδρική υπογονιμότητα και τη χαμηλή γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων².



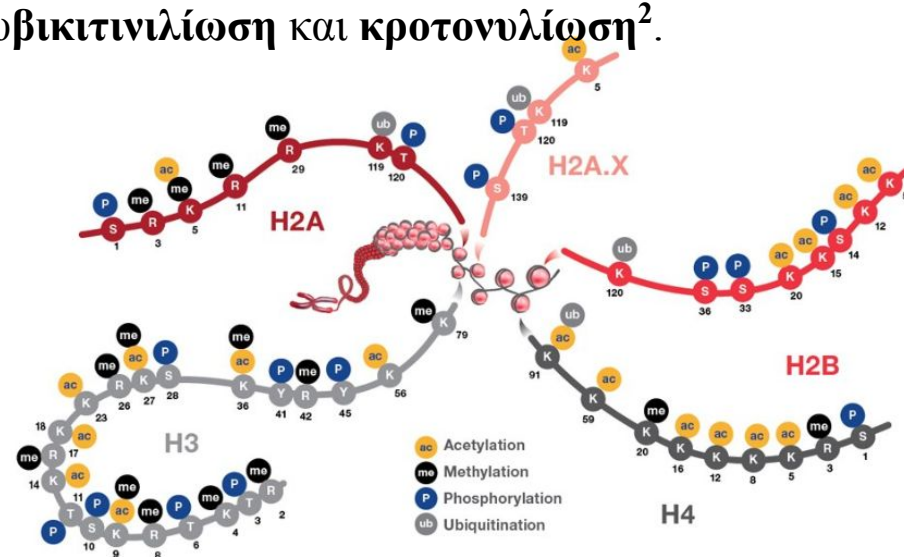
1. Tanphaichitr et al. *Exp Cell Res* 1978;117:347–56.
2. Zhang et al. *J Androl* 2006;27:414–20.

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

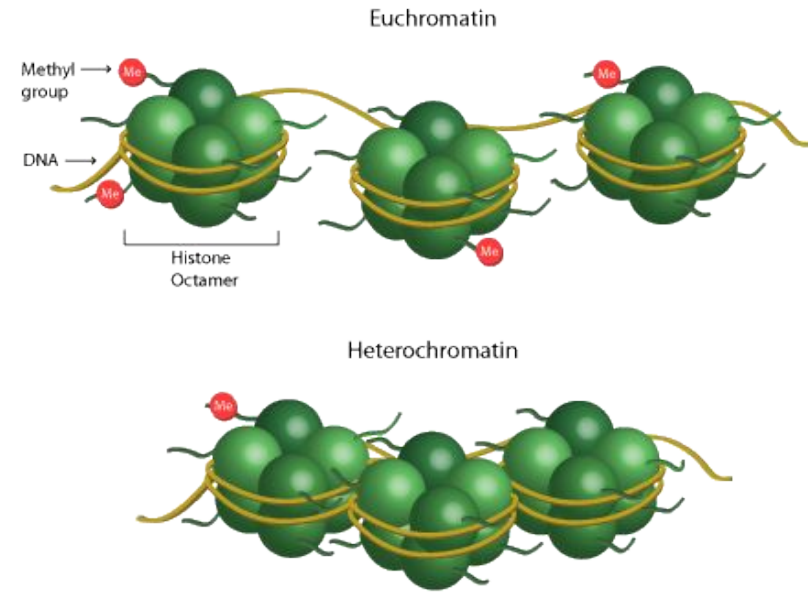
- Οι ιστόνες που παραμένουν στη χρωματίνη μετά την πρωταμίνωση συμβάλλουν ενεργά στη διαμόρφωση του **επιγενετικού προφίλ των σπερματοζωαρίων**.
- Οποιαδήποτε **χημική τροποποίησή** τους μπορεί να μεταβάλει δραστικά την **ικανότητα δέσμευσης του DNA**, ευνοώντας τη δράση μεταγραφικών παραγόντων και επομένως την **ενεργοποίηση ή την αποσιώπηση γονιδίων¹**.
- Αυτές οι χημικές τροποποιήσεις, οι οποίες συμβαίνουν κυρίως σε υπολείμματα **λυσίνης ή σερίνης** που εδράζονται στην αμινοτελική ουρά των ιστονών, διακρίνονται σε **μεθυλίωση, ακετυλίωση, φωσφορυλίωση, ουβικιτινιλίωση και κροτονυλίωση²**.
- Οι ανωτέρω μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών διαδραματίζουν **καθοριστικό ρόλο στην σπερματογένεση**.

1. Usachenko *et al.* Genetica 1999;106:103-15.

2. Carrell DT. Fertil Steril 2012;97:267-74.

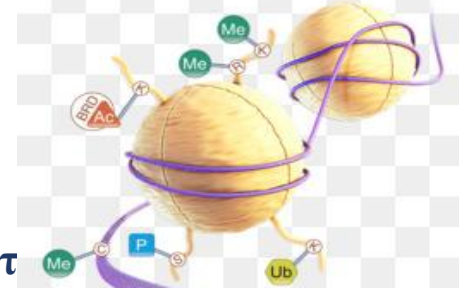


Μεθυλίωση των ιστονών



- Η μεθυλίωση των υπολειμμάτων λυσίνης των ιστονών **H3** και **H4** μπορεί να προκαλέσει είτε γονιδιακή ενεργοποίηση, είτε γονιδιακή καταστολή.
- Η μεθυλίωση του 4^{ου} υπολείμματος λυσίνης της ιστόνης H3 (**H3K4**) σχετίζεται με τη γονιδιακή έκφραση, ενώ η μεθυλίωση του 9^{ου} και του 27^{ου} υπολείμματος λυσίνης (**H3K9 & H3K27**, αντίστοιχα) συνδέεται με τη γονιδιακή αποσιώπηση.
- Οι μόνο-, δι- και τρι-μεθυλιωτικές τροποποιήσεις των H3K4, H3K9 και H3K27 είναι απαραίτητες για τη διαδικασία της σπερματογένεσης.

Μεθυλίωση των ιστονών



□ Μεθυλίωση του H3K4

Τα υψηλότερα επίπεδα παρατηρούνται στο **στάδιο των σπερματ** είναι απαραίτητα για να ξεκινήσει η **διαφοροποίηση προς σπερματοκύτταρα**, ενώ ελαττώνονται αισθητά κατά τη μείωση.

□ Μεθυλίωση των H3K9 και H3K27

Αυξάνεται κατά τη **μείωση**, ενώ στο τέλος της **απομακρύνεται** η μεθυλίωση του **H3K9** ώστε να ξεκινήσει η **σπερμιογένεση**.

□ Οι **μεθυλοτρανσφεράσες** και οι **απομεθυλάσες** των ιστονών είναι αντίστοιχα υπεύθυνες για την **εγκαθίδρυση** και **απομάκρυνση** της μεθυλίωσης.

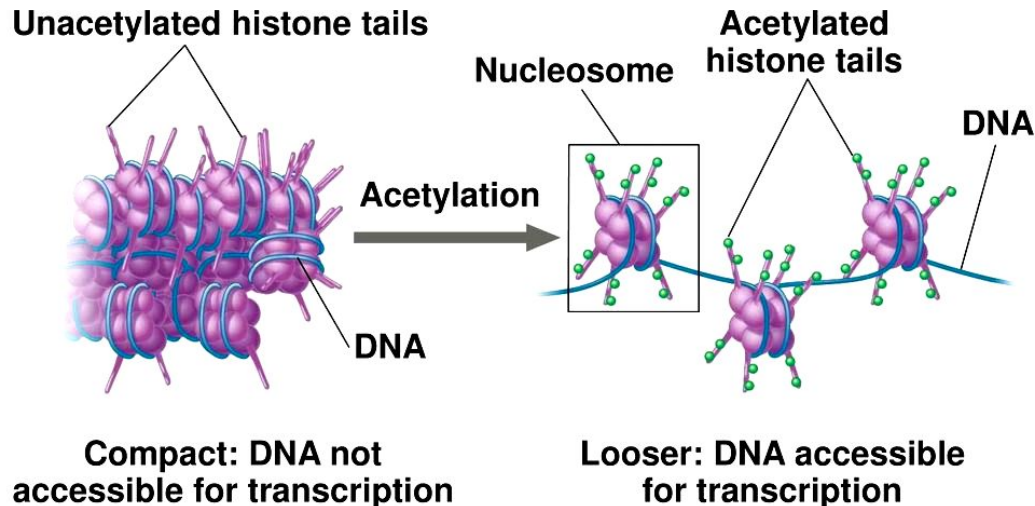
□ Η μελέτη ποντικών έχει αποδείξει ότι η **μειωμένη δράση** της **μεθυλοτρανσφεράσης Mll2** στη θέση **H3K4** προκαλεί **αναστολή** στη **διαδικασία της διαφοροποίησης**, γεγονός που συνοδεύεται από **δραματική μείωση του αριθμού των σπερματοκυττάρων** λόγω αυξημένης απόπτωσης.

Ακετυλίωση των ιστονών

Η ενεργοποίηση των γονιδίων συνδέεται συνήθως με την ακετυλίωση που λαμβάνει χώρα σε υπολείμματα λυσίνης, κυρίως των ιστονών H3 και H4.

Οι ακετυλοτρανσφεράσες και οι δεακετυλάσες των ιστονών είναι αντίστοιχα υπεύθυνες για την εγκαθίδρυση και απομάκρυνση της ακετυλίωσης.

Η ακετυλίωση μειώνει τη συμπύκνωση της χρωματίνης και την καθιστά δεκτική σε παράγοντες μεταγραφής, ενώ η αποακετυλίωση οδηγεί σε αποσιώπηση των γονιδίων.



Jenuwein & Allis. Science 2001;293: 1074–80.

Ακετυλίωση των ιστονών

Η ακετυλίωση των υπολειμμάτων λυσίνης των ιστονών H3 και H4 είναι ιδιαίτερα υψηλή στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα, αλλά απομακρύνεται κατά τη διάρκεια της μείωσης.

Επανακετυλίωση της ιστόνης H4 παρατηρείται στο στάδιο των επιμηκυμένων σπερματίδων, όπου αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για την αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες¹.

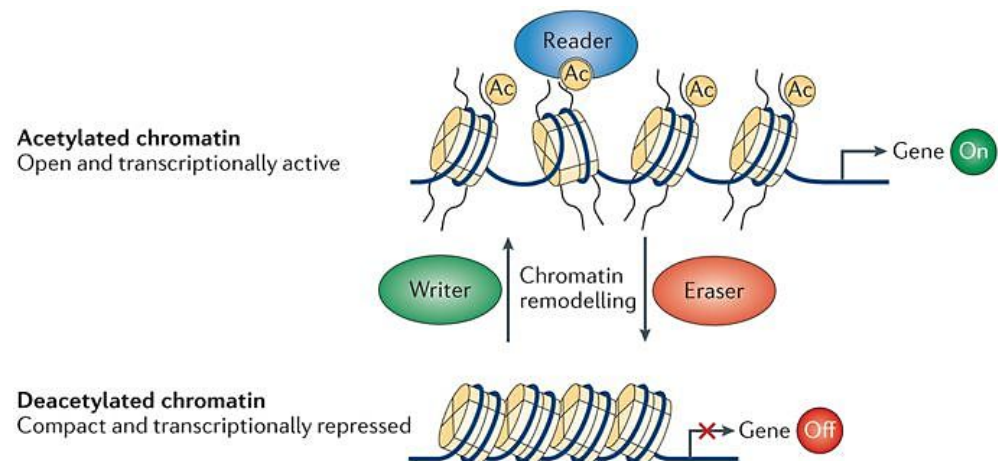
Η υπερακετυλίωση των ιστονών προκαλεί χαλάρωση της χρωματινικής δομής, η οποία επιτρέπει το διαχωρισμό των κλώνων του DNA μέσω της δράσης του ενζύμου τοποϊσομεράση.

Η πειραματική χορήγηση ενός αναστολέα των δεακετυλασών στα ποντίκια οδήγησε σε σημαντική μείωση του αριθμού των σπερματοκυττάρων & σπερματίδων και σε σοβαρή υπογονιμότητα^{2,3}.

1. Hazzouri *et al.* Eur J Cell Biol 2000;79:950–60.

2. Fenic *et al.* J Androl 2004;25:811–8.

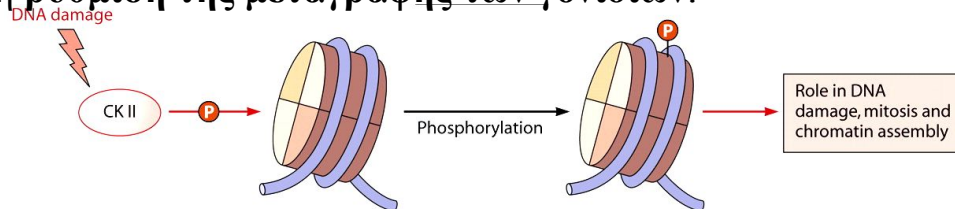
3. Fenic I, *et al.* J Androl 2008;29:172–85.



Άλλες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών

Η φωσφορυλίωση:

- ✓ των υπολειμμάτων σερίνης συνιστά απαραίτητη προϋπόθεση για την αντικατάσταση των ιστονών από τις μεταβατικές πρωτεΐνες και τις πρωταμίνες.
- ✓ συνδέεται με την ενεργοποίηση των γονιδίων μέσω της ρύθμισης της χρωματινικής προσβασιμότητας σε παράγοντες μεταγραφής.
- ✓ κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης είναι απαραίτητη για τη φυσιολογική δομή και λειτουργία του σπερματοζωαρίου.
- ✓ εμπλέκεται στην επιδιόρθωση των θραυσμάτων διπλής έλικας, στην οργάνωση της πυρηνικής χρωματίνης και στη ρύθμιση της μεταγραφής των γονιδίων.



Η ουβικιτινιλίωση είναι άλλη μία τροποποίηση των υπολειμμάτων λυσίνης των ιστονών, η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει τη γονιδιακή έκφραση¹.

Η κροτονυλίωση, δηλαδή η προσθήκη μιας ομάδας κροτονυλίου στα υπολείμματα λυσίνης των ιστονών, σηματοδοτεί τα φυλετικά χρωμοσώματα και προσδίδει αντίσταση στους καταστολείς της μεταγραφής^{2,3}.

1. Glaser *et al.* Epigenetics Chromatin 2009;2:5
2. Tan *et al.* Cell 2011;146:1016–28.
3. Montellier *et al.* Bioessays 2012;34:187–93.

Μόρια RNA των σπερματοζωαρίων

Λόγω της υψηλής συμπύκνωσης της χρωματίνης κατά την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης, επικρατούσε η αντίληψη ότι το RNA των σπερματοζωαρίων είναι αδύνατο να μεταγράφεται από το πυρηνικό τους DNA και ότι μάλλον αποτελεί κατάλοιπο της σπερματογένεσης¹.

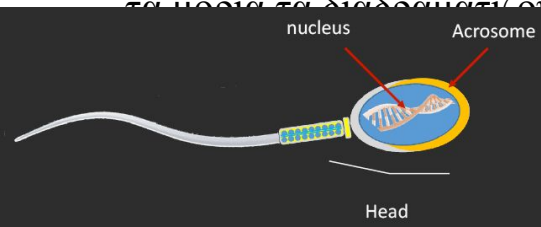
Θεωρώντας λοιπόν ότι ο πυρήνας των ώριμων σπερματοζωαρίων είναι ανενεργός υπήρχε η πεποίθηση ότι:

- ✓ τα **μετάγραφα** τους δεν παίζουν κανένα ρόλο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη,
- ✓ μόνο τα **μητρικά μετάγραφα** εμπλέκονται στην προαναφερθείσα διαδικασία.

Ωστόσο, σύγχρονες μελέτες υποστηρίζουν την παρουσία μεταγραφικής δραστηριότητας στους πυρήνες των σπερματοζωαρίων, επιτρέποντας τη μεταγραφή των αποτυπωμένων γονιδίων που εδράζονται σε χρωματινικές περιοχές που έχουν υψηλά ποσοστά μη μεθυλιωμένων ιστονών².

Η ανακάλυψη μορίων RNA στα **άρρενα αναπαραγωγικά κύτταρα πολλών οργανισμών**^{3,4}, ενδυναμώνει την πεποίθηση ότι μάλλον αποτελεί ένα **διατηρημένο χαρακτηριστικό** τους και ότι αυτά τα μόρια θα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην **εμβρυογένεση**⁵.

1. Yan W *et al.* Biol Reprod 2008;78:896-902.
2. Vibranovski *et al.* Genetics 2010;186:431-3.
3. Fischer *et al.* Proc Biol Sci 2012;279:2636-44.
4. Bourc'his *et al.* Science 2010;330:617-22.
5. Hosken Trends Ecol Evol 2014;29:451-5.



Μόρια RNA των σπερματοζωαρίων

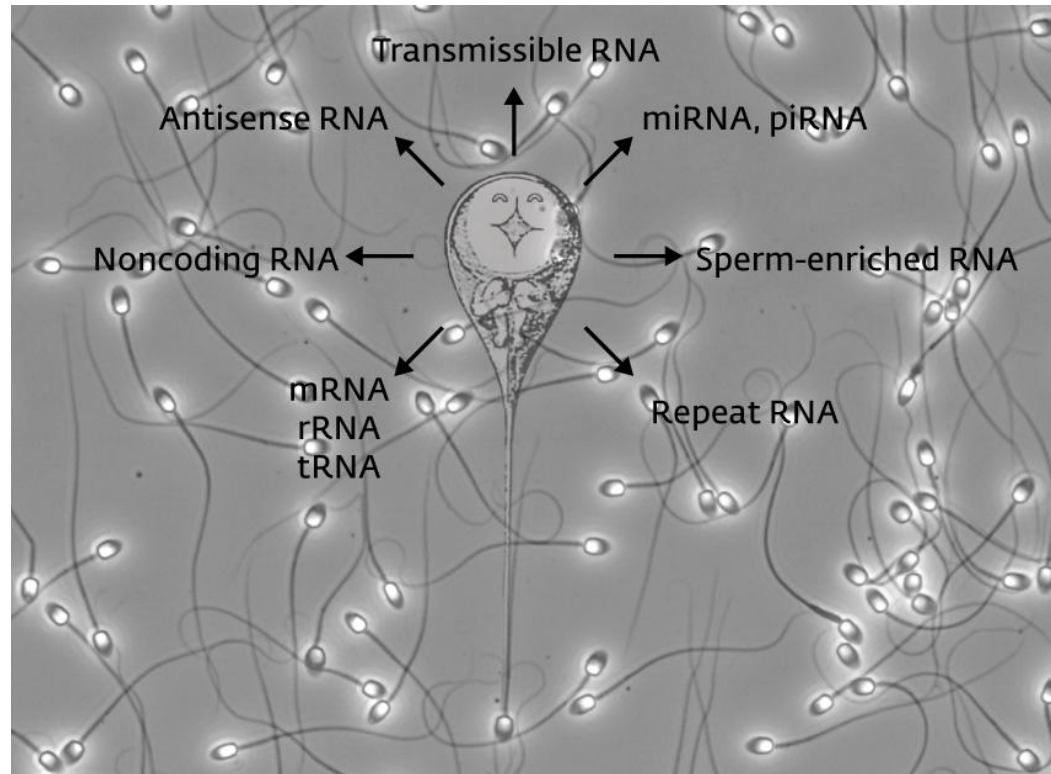
Το σπερματοζωάριο φέρει **μεγάλο αριθμό διαφορετικών RNA¹**, τα οποία:

- ✓ είτε **κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη (mRNA)**,
- ✓ είτε **εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης παρεμβαίνοντας στην μετάφραση των mRNA μέσω διαφόρων μηχανισμών (micro-RNA, small interfering RNA, antisense RNA, piwi-interacting RNA και lncRNA).**

Όσον αφορά τα **μόρια mRNA**, περισσότερα από **4.000 διαφορετικά** έχουν ανιχνευθεί στα **ανθρώπινα σπερματοζωάρια²**.

1. Dadoune. *Microsc Res Tech* 2009;72:536-51.

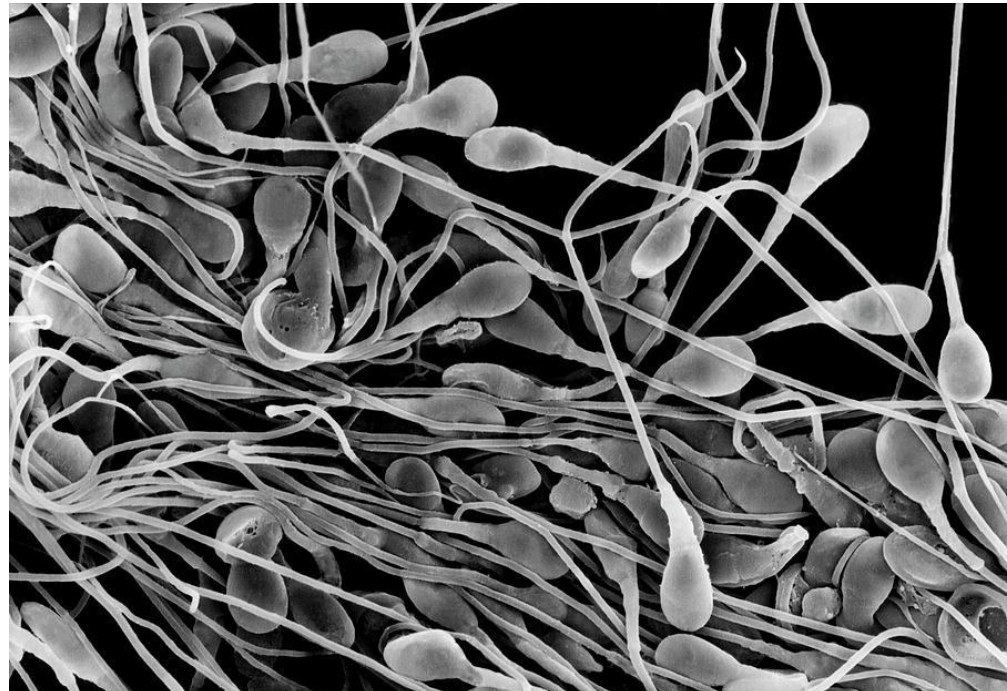
2. Zhao *et al.* *Hum Reprod* 2006;21:1583-90.



Ο ρόλος των μορίων RNA των σπερματοζωαρίων

Με βάση τα διαθέσιμα στοιχεία από ερευνητικές μελέτες σε ανθρώπους και σε ζώα μπορούν να υποτεθούν τρεις κύριοι ρόλοι:

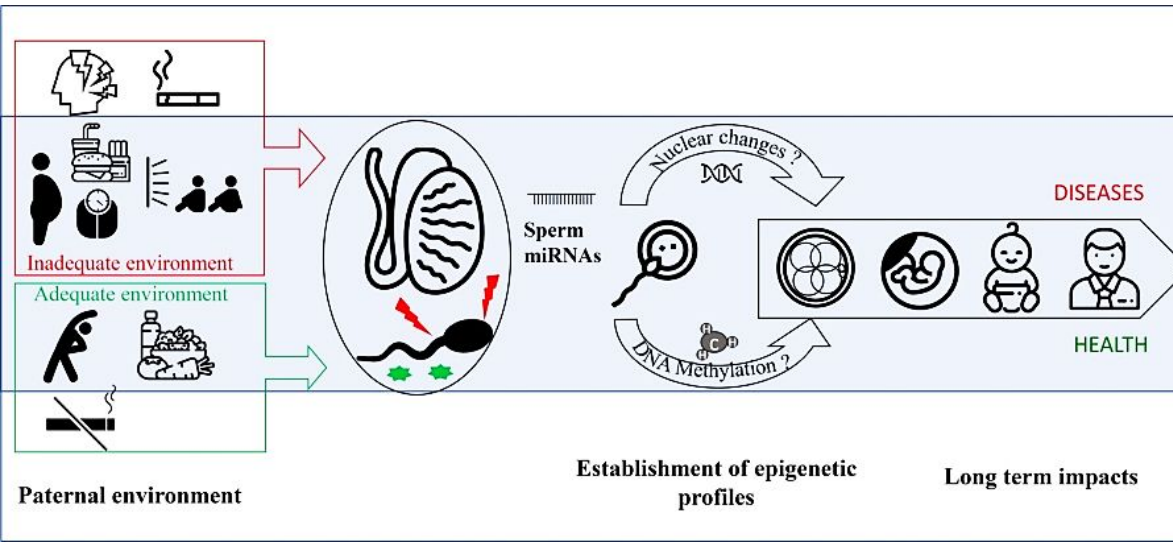
- ❖ η μεταφορά πατρικών φαινοτυπικών στοιχείων,
- ❖ η ωρίμανση των σπερματοζωαρίων,
- ❖ η ανάπτυξη των εμβρύων.



Μεταφορά πατρικών φαινοτυπικών στοιχείων

Η σύγκριση του **επιγενετικού προφίλ** των σπερματοζωαρίων φυσιολογικών και **παχύσαρκων ανδρών** αποκάλυψε σημαντικές διαφορές στην έκφραση των **non-coding RNAs**, υποδηλώνοντας ότι τα συγκεκριμένα μόρια μπορεί να λειτουργήσουν ως **ευαίσθητος δείκτης της περιβαλλοντικής έκθεσης**¹.

Δεδομένου ότι τα RNA των σπερματοζωαρίων είναι ικανά να επηρεάσουν την εμβρυϊκή γονιδιακή έκφραση², θα μπορούσε να υποτεθεί ότι το **διαφοροποιημένο RNA προφίλ των σπερματοζωαρίων των παχύσαρκων ανδρών** είναι η **αιτία κληρονόμησης της παχυσαρκίας** στους απογόνους τους¹.



1. Donkin *et al.* Cell Metab 2016;23:369- 78.
2. Chen *et al.* Nat Rev Genet 2016;17:733-43.

Ωρίμανση των σπερματοζωαρίων

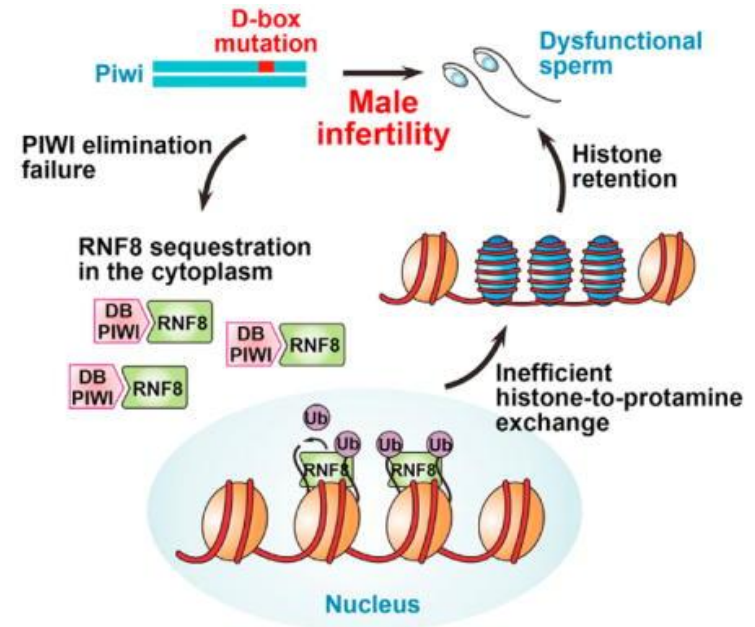
Τα Piwi-interacting RNA (piRNA):

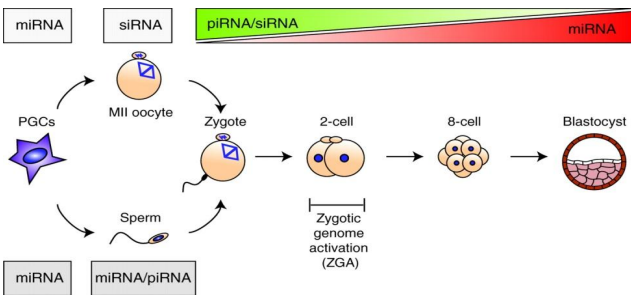
- αποτελούνται από 30 νουκλεοτίδια και δεν κωδικοποιούν κάποια πρωτεΐνη.
- εμπλέκονται στη διαδικασία ωρίμανσης των αρρένων γαμετών¹.
- αλληλεπιδρώντας με τις πρωτεΐνες Piwi συμμετέχουν στη σίγαση των μεταθετών στοιχείων, διαδικασία που

προστατεύει το γενετικό υλικό των αρρένων γαμετών². Οι πρωτεΐνες Piwi φαίνεται ότι επηρεάζουν την αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες κατά τη διάρκεια της σπερμιόγνεσης ανεξάρτητα από τη δράση των piRNA.

Συγκεκριμένα, η παρουσία μεταλλάξεων στα γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες Piwi σε αζωοσπερμικούς άνδρες φάνηκε να παρεμποδίζει την ουβικιτινίωση των ιστονών και την πρωταμίνωση της χρωματίνης³.

Παρότι απαιτούνται επιπλέον μελέτες για την εξαγωγή ασφαλούς συμπεράσματος, η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών Piwi με τα μόρια piRNA φαίνεται να επηρεάζει την ωρίμανση και τη λειτουργικότητα των αρρένων γαμετών.





Εμβρυϊκή ανάπτυξη

Τα **RNA των σπερματοζωαρίων** που μεταφέρονται στα ωάρια μέσω της γονιμοποίησης φαίνεται να επηρεάζουν την **ανάπτυξη των εμβρύων**.

Σε μία πρόσφατη μελέτη πραγματοποιήθηκε **επώαση σπερματοζωαρίων ποντικού με RNάση**, η οποία **μείωσε κατά 90% το περιεχόμενο τους σε RNA**.

Η χρήση των σπερματοζωαρίων αυτών στη διαδικασία της **μικρογονιμοποίησης (ICSI)** προκάλεσε **αξιοσημείωτη μείωση του ποσοστού των βλαστοκύστεων** που συνήθως παρατηρείται ($P < 0.01$).

Το **βάρος των απογόνων ήταν αξιοσημείωτα μικρότερο** δύο εβδομάδες μετά τη γέννηση σε σύγκριση με τους απογόνους της ομάδας ελέγχου ($P < 0.05$).

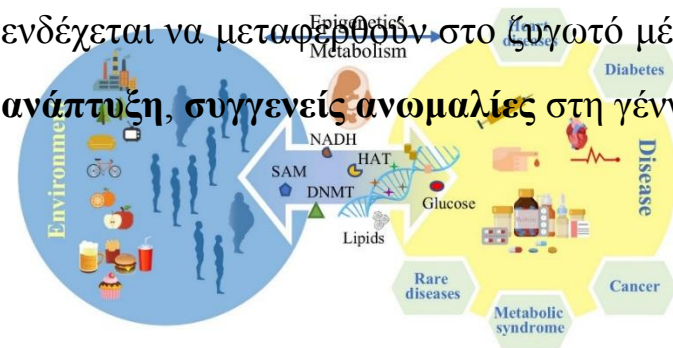
Guo et al. Oncotarget 2017;8:67394-405.

Τα μόρια RNA των σπερματοζωαρίων φαίνεται να εμπλέκονται σε διάφορες σημαντικές λειτουργίες.

Ο ακριβής ρόλος τους στην ανθρώπινη αναπαραγωγή και στην επακόλουθη εμβρυϊκή ανάπτυξη θα πρέπει να διασαφηνιστεί μέσω μελλοντικών μελετών.

Εξωγενείς παράγοντες & Επιγενετικές τροποποιήσεις των σπερματοζωαρίων

- Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, ο σύγχρονος τρόπος ζωής (κάπνισμα, διατροφή, αλκοόλ, στρες, καθιστική ζωή) και διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες (τοξικές ουσίες, ιονίζουσα ακτινοβολία, ατμοσφαιρική ρύπανση) αποτελούν πιθανές αιτίες επιγενετικών τροποποιήσεων¹⁻³.
- Μελέτες σε πειραματόζωα επιβεβαίωσαν τις αρνητικές επιδράσεις κάποιων εξωγενών παραγόντων στους επιγενετικούς μηχανισμούς και κατ' επέκταση στη σπερματογένεση, στην εμβρυογένεση και στην υγεία των απογόνων⁴⁻⁸.
- Η αυξημένη αναπαραγωγική ηλικία των αρρένων ατόμων προτάθηκε ως πιθανή αιτία επιγενετικών τροποποιήσεων στα σπερματοζωάρια, συσχετιζόμενων με υψηλά ποσοστά νευροψυχιατρικών διαταραχών στους απογόνους, όπως αυτισμό, διπολική διαταραχή και σχιζοφρένεια⁹.
- Οι επιγενετικές τροποποιήσεις που μπορεί να επιφέρουν στα σπερματοζωάρια οι εξωγενείς παράγοντες, ενδέχεται να μεταφερθούν στο ζυγωτό μέσω της γονιμοποίησης προκαλώντας διαταραχές στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, συγγενείς ανωμαλίες στη γέννηση ή νοσήματα οξείας εμφάνισης στην ενήλικη ζωή.



1. Alegria-Torres *et al.*, 2011

2. Wei *et al.*, 2014

3. Soubry *et al.*, 2014

4. Anway *et al.*, 2006

5. Guerrero-Bosagna *et al.*, 2012

6. Dubrova *et al.*, 2000

7. Jirtle & Skinner, 2007

8. Fullston *et al.*, 2013

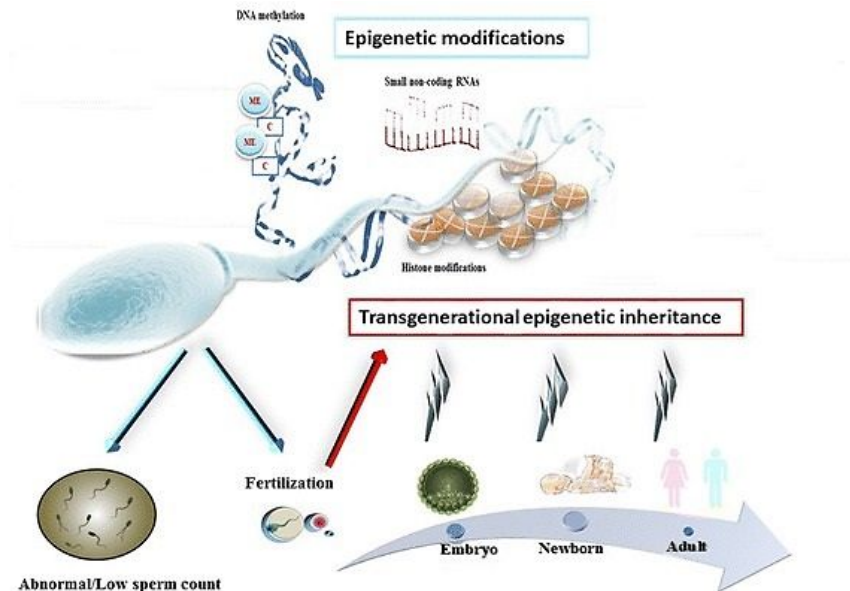
9. Jenkins *et al.*, 2014

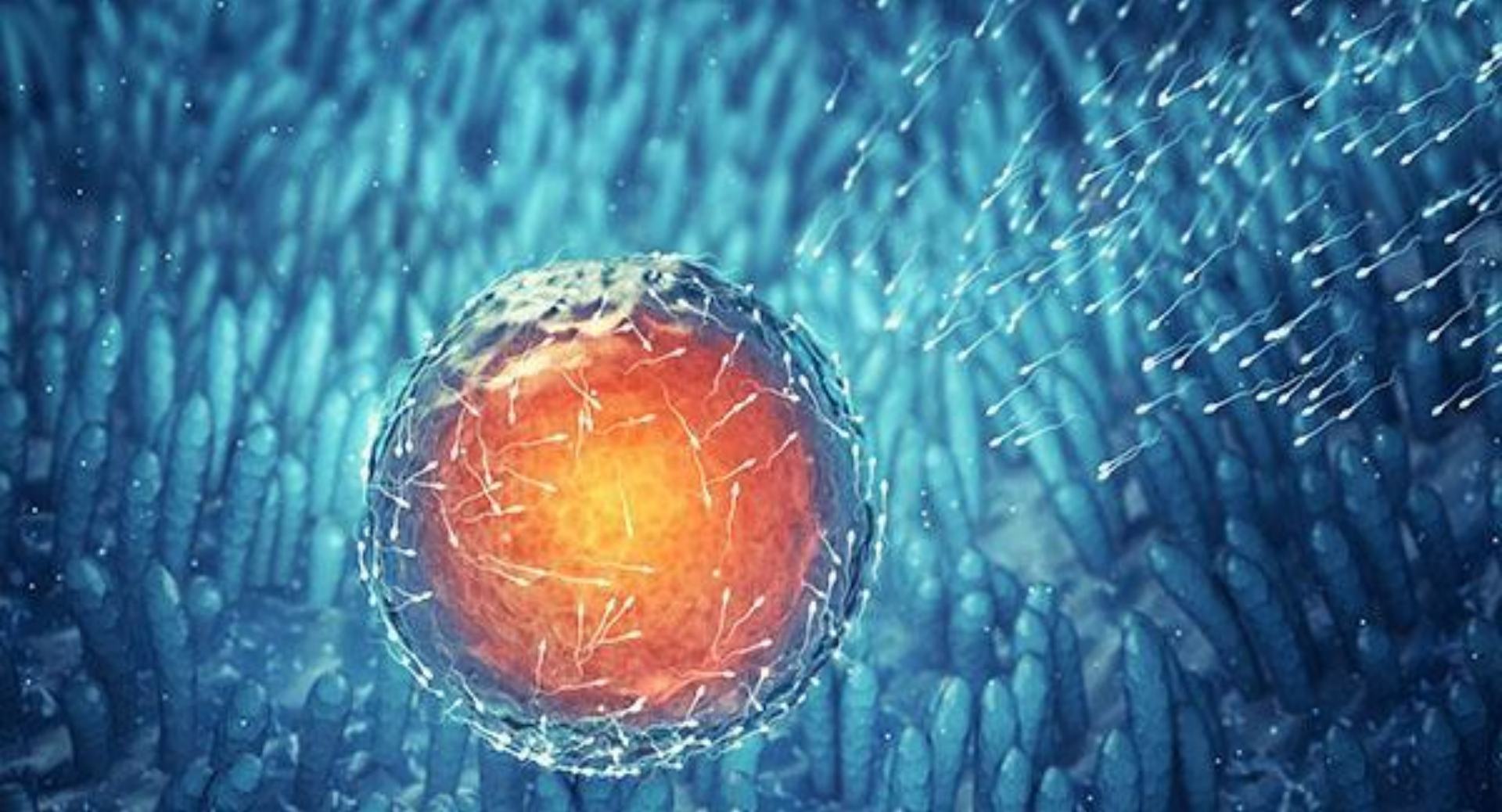
10. Stuppia *et al.*, 2015

Συμπεράσματα

Λαμβάνοντας υπόψη τα προαναφερθέντα, γίνεται αντιληπτό ότι:

- Οι **επιγενετικοί μηχανισμοί** εμπλέκονται ενεργά στη **σπερματογένεση** και επηρεάζουν άμεσα τη **λειτουργικότητα** των σπερματοζωαρίων.
- Τα **σπερματοζωάρια** των **υπογόνιμων ανδρών** χαρακτηρίζονται από **παρεκκλίνουσα μεθυλίωση** του γενετικού τους υλικού, συμπεριλαμβανομένων των **αποτυπωμένων** και των **αναπτυξιακών γονιδίων**, **ατελή πρωταμίνωση της χρωματίνης**, **τροποποιημένες ουρές ιστονών** και **μειωμένα επίπεδα μη κωδικοποιόντων μορίων RNA** στον πυρήνα τους.
- Δεδομένου ότι το **επιγενετικό προφίλ** των σπερματοζωαρίων **κληρονομείται στους απογόνους**, το σύνολο των επιγενετικών αλλαγών μπορεί να έχει επιπτώσεις στο **σηματισμό** και στην **ανάπτυξη των εμβρύων**, καθώς και στην **υγεία των απογόνων**.





Σας ευχαριστώ