



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ-ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΣΥΜΒΟΛΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ»

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΘΕΟΔΩΡΟΥ ΜΑΡΙΑ

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΟΣ ΤΙΤΛΟΣ: ΜΑΙΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, Αν. Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας, Επιβλέπων
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας, Μέλος
ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, Επίκουρη Καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας, Μέλος**

ΛΑΡΙΣΑ, 2020



**UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
FACULTY OF MEDICINE**



**POSTGRADUATE MASTER PROGRAM
“HUMAN GENETICS –GENETIC COUNSELING”**

**MASTER’S THESIS
«EPIGENETICS IN SPERM»**

NAME: THEODOROU MARIA

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δεδομένα από ανεξάρτητα εργαστήρια έχουν δείξει ότι τα πατρικά χαρακτηριστικά που αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια των διαφόρων περιβαλλοντικών εκθέσεων, συμπεριλαμβανομένης μιας δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και με χαμηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, του ψυχικού στρες, της χρήσης καπνού, της ευαισθησίας στις οσμές, της έκθεσης σε χημικές ουσίες και της ευαισθησίας στην ακτινοβολία, μπορούν πράγματι να κληρονομηθούν στον απόγονο μέσω της πατρικής γαμετικής γραμμής, με μη Μεντελικό τρόπο, υποστηρίζοντας έτσι την ιδέα ότι ορισμένες εμπειρίες της ζωής και περιβαλλοντικές επιρροές μπορούν να «απομνημονευθούν» στο σπέρμα ως επιγενετικές πληροφορίες. Η επιγενετική διαγενεακή κληρονομικότητα, αφορά στη μετάδοση αυτών των επιγενετικών πληροφοριών, μέσω των γαμετών, στους απογόνους. Επιπλέον, πρόσφατα έχει προταθεί ότι η ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα πιθανά να οφείλεται στην επίδραση των επιγενετικών μηχανισμών.

Συγκεκριμένα, τα ανώμαλα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA στο σπέρμα έχουν συσχετιστεί με ανώμαλες παραμέτρους του σπέρματος, με χαμηλή συχνότητα γονιμοποίησης και με μειωμένα ποσοστά επιτυχούς ανάπτυξης των εμβρύων. Επιπλέον, πρόσφατες αναφορές έδειξαν ότι το ανθρώπινο σπέρμα μπορεί να είναι επιγενετικά ετερογενές και τα ανώμαλα επίπεδα της μεθυλίωσης του DNA στο σπέρμα των στέρων ανδρών έχουν σαν συνέπεια την παρουσία του σπέρματος με διαφορετική επιγενετική ποιότητα.

Σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα, τα σπερματοζώαρια φιλοξενούν μια πολύ ξεχωριστή δομή και οργάνωση της χρωματίνης. Το DNA στο σπέρμα συνδέεται με πρωταμίνες, οι οποίες αντικαθιστούν τη συντριπτική πλειονότητα των ιστονών και επιτρέπουν μια δομή συσκευασίας του DNA έξι φορές πιο πυκνή. Η χρωματίνη του σπέρματος τροποποιείται επιγενετικά σε διάφορα χρονικά σημεία καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του, γεγονός που επιτρέπει την προσθήκη περιβαλλοντικών τροποποιήσεων που μπορούν να επηρεάσουν τόσο τη γονιμότητα των ανδρών, αλλά και να περάσουν από τους γονείς στους απογόνους, με την εμφάνιση των αντίστοιχων φαινοτύπων.

Τέλος, η σημασία του πατρικού RNA αποκαλύφθηκε όταν έγινε αντιληπτό ότι έχει την ικανότητα να επηρεάζει την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. Το ώριμο σπέρμα περιέχει πλήθος μη κωδικοποιητικών RNAs, που κατευθύνουν τη μεθυλίωση του

DNA και τις τροποποιήσεις των ιστονών σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους και δημιουργούν ειδικά σημεία, τα οποία είναι ικανά να ανακεφαλαιώσουν τον πατρικό φαινότυπο.

Ωστόσο, πολλοί ερευνητές έχουν προτείνει ποικίλους τρόπους, σύμφωνα με τους οποίους καθίσταται εφικτή η αποτροπή των επιγενετικών μηχανισμών και των αποτελεσμάτων που επιφέρουν τόσο στην γονιμότητα των ανδρών, όσο και στους φαινοτύπους των απογόνων.

Λέξεις- Κλειδιά: επιγενετική σπέρματος, μεθυλίωση και σπέρμα, RNAs σπέρματος, ιστόνες και σπέρμα, θεραπεία και επιγενετική σπέρματος.

ABSTRACT

Data from independent laboratories have shown that the paternal characteristics acquired during various environmental exposures, including a high-fat and low-protein diet, mental stress, tobacco use, odor sensitivity, exposure to chemicals and radiation sensitivity, can actually be inherited to the offspring through the paternal gamete line in a non-Mendelian way, thus supporting the idea that certain life experiences and environmental influences can be "memorized" in the sperm as epigenetic information. Epigenetic intergenerational heredity refers to the transmission of epigenetic information, through gametes to offspring. In addition, it has recently been suggested that unexplained male infertility may be because of epigenetic mechanisms.

Abnormal levels of DNA methylation at sperm have been associated with abnormal sperm parameters, low fertilization rates and reduced embryonic development. Results of various studies support the idea that the deviant methylation of DNA in the imprinted genes is due to the appearance of the epigenetic mosaic in the sperm. In addition, recent reports have shown that human sperm may be epigenetically heterogeneous and abnormal levels of DNA methylation in the sperm of infertile men result in the presence of sperm of different epigenetic quality.

Compared to somatic cells, sperm hosts a very distinct structure and organization of chromatin. The DNA in the sperm binds to protamines, which replace most histones and allow a DNA packaging structure six times denser. Sperm chromatin is epigenetically modified at various points, throughout its development, which allows the addition of environmental modifications that can affect both male fertility and pass from parents to offspring, with the appearance of corresponding phenotypes.

Finally, the importance of paternal RNAs was revealed when it was realized that they can affect the early embryonic development. Mature sperm contain several non-coding RNAs, which guide a sequence that directs DNA methylation and histone modifications at specific sites, so as to create specific sites that can recapitulate the paternal phenotype.

However, many researchers have suggested a variety of ways in which it is possible to prevent epigenetic mechanisms and the effects they have on both male fertility and offspring phenotypes

Keywords: sperm epigenetics, methylation and sperm, sperm RNAs, histones and sperm, therapy and epigenetics and sperm

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα γαμετικά κύτταρα κατέχουν μια μοναδική θέση στη βιολογία, καθώς μεταδίδουν τις γενετικές και τις επιγενετικές πληροφορίες από τους γονείς στους απογόνους σε σεξουαλικά αναπαραγωγικούς οργανισμούς. Ενώ το DNA περιέχει την πρωτογενή γενετική αλληλουχία, οι χημικές τροποποιήσεις στο DNA και τις ιστόνες παίζουν καταλυτικό ρόλο στον τρόπο με τον οποίο οργανώνεται το DNA στον πυρήνα και στο κατά πόσον ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται συγκεκριμένα γονίδια. Έχει καταστεί σαφές ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις, όπως η μεθυλίωση του DNA, η τροποποίηση των ιστονών και τα RNAs στο σπέρμα, είναι κληρονομικές, διασφαλίζοντας ότι η γονιδιακή ταυτότητα μεταδίδεται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής διαίρεσης. Ωστόσο, ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν και μεταβάλλουν την έκφραση των γονιδίων στους απογόνους αποτελεί αμφιλεγόμενο ζήτημα.

Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών έχει δείξει ότι οι επιπτώσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων στην πρώιμη εμβρυϊκή ζωή δεν περιορίζονται στην πρώτη γενιά, αλλά μπορεί να μεταδοθούν και σε επόμενες, μέσω ενός μη-γονιδιωματικού μηχανισμού. Έχουν προταθεί αρκετοί πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους μια αρχική περιβαλλοντική πρόκληση μπορεί να οδηγήσει σε επιγενετικές αλλοιώσεις με επιπτώσεις στη γονιδιακή έκφραση σε ιστούς στόχους και οι οποίες ενδέχεται να επηρεάσουν άμεσα μη εκτεθειμένους απογόνους. Αυτές οι επιγενετικές πληροφορίες είναι εξαιρετικά σημαντικές για την ερμηνεία του DNA, κατά την ανάπτυξη του εμβρύου και στην ενήλικη ζωή, αφού ασκεί επιρροή στην προδιαγραφή των κυττάρων, στα φαινοτυπικά αποτελέσματα και στην υγεία των ενηλίκων.

Από την άλλη πλευρά, η υπογονιμότητα είναι μια πολυπαραγοντική ασθένεια που αφορά το 50% των ανδρών. Ωστόσο, ένα μεγάλο ποσοστό ανδρών διαγιγνώσκεται με ιδιοπαθή στειρότητα λόγω της έλλειψης γνωστού αιτιολογικού παράγοντα. Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός πως οι επιγενετικές τροποποιήσεις, κατά την περίοδο πριν τη γονιμοποίηση, έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στην αιτιολογία της ανδρικής ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και της στειρότητας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η παρουσίαση της συμβολής των επιγενετικών παραγόντων στη λειτουργικότητα του σπέρματος, με άμεσο στόχο την κατανόηση του βαθμού επιρροής τους στην αναπαραγωγή και την

υγεία των απογόνων, αλλά και τη διατύπωση προβληματισμών που χρήζουν περαιτέρω έρευνα και ανάλυση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ.....	9
1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ.....	9
1.2 ΔΙΑΓΕΝΕΑΚΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ.....	11
1.3 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ.....	18
2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA.....	18
2.1a ΓΕΝΙΚΑ.....	18
2.1b Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ.....	20
2.1c ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ.....	25
2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	27
2.2a ΓΕΝΙΚΑ.....	27
2.2b ΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ.....	29
2.2c ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ.....	33
2.3 ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs.....	35
2.3a ΓΕΝΙΚΑ.....	35
2.3b ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΜΒΟΛΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	40
3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ.....	40
3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ	57
3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ	67
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ	79
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ

1.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

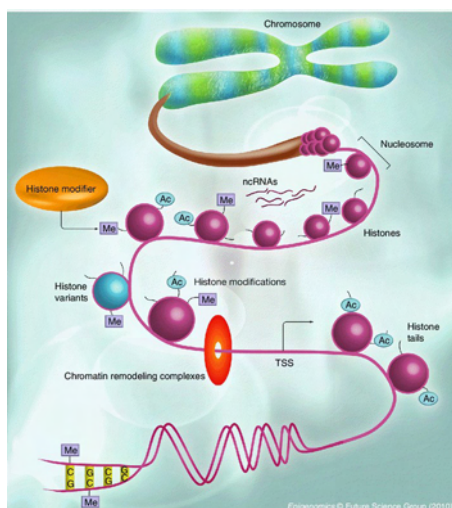
Ένα φαινόμενο ονομάζεται επιγενετικό όταν επιφέρει κληρονομήσιμες αλλαγές, τις περισσότερες φορές αντιστρεπτές, στη λειτουργία του γονιδιωματικού DNA χωρίς να μεταβάλλει την αλληλουχία του. (Νικολάου και Χουβαρδός 2015) Γι' αυτό, ο Conrad Waddington περιγράφει την επιγενετική ως «διαδικασία ανάπτυξης του φαινοτύπου από τον γονότυπο». (Ornellas et al. 2017) Η επιγένεση, από φιλοσοφικής πλευράς, αναφέρεται σε καταστάσεις αλλαγής, όπου κάποια στοιχεία αλλάζουν και κάποια παραμένουν ίδια. Αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό από την ετυμολογία της λέξης, «γένεση επί», που σημαίνει γένεση επάνω σε κάτι ή μετά από κάτι. Επιπλέον, στην επιγένεση αναφερόμαστε στα «επί» μιας «γέννησης», δηλαδή της γέννησης του «φαινοτύπου». (Ζαφρανάς και Ζαφρανάς 2015)

Ο Adrian Bird, που μελέτησε πρώτος το επιγενετικό φαινόμενο της μεθυλίωσης του DNA, φέρεται να είπε: «Η επιγενετική είναι ένας πολύ χρήσιμος όρος όταν δεν ξέρει κανείς τι συμβαίνει!». Επεκτείνοντας τα όρια του κλασσικού ορισμού θα μπορούσαμε να τολμήσουμε μια γενικευμένη άποψη για τα επιγενετικά φαινόμενα ως εξής: «Επιγενετικά είναι τα φαινόμενα που τροποποιούν το λειτουργικό δυναμικό του γονιδιώματος ενός οργανισμού χωρίς να μεταβάλλουν την πρωτοταγή του αλληλουχία». (Νικολάου και Χουβαρδός 2015)

Στις παραπάνω διατυπώσεις συνηγορεί και αυτή του Robin Holliday, ήδη από το 1990, ο οποίος όρισε την επιγένεση ως «τη μελέτη των αλλαγών στη λειτουργία του γενετικού υλικού, οι οποίες συμβαίνουν χωρίς να προκαλείται αλλαγή στην ακολουθία των βάσεων του DNA». Οι Akhtar και Cavalli, το 2005, αναφέρουν πως «Όλα τα κύτταρα ενός ατόμου συμμετέχουν στην ίδια γραμμή νουκλεοτιδίων του DNA, δηλαδή στο γένωμα, διαφορετικοί όμως τύποι κυττάρων χαρακτηρίζονται από την παρουσία διαφορετικών τύπων χρωματίνης, η οποία είναι το επιγένωμα, το οποίο καθορίζει τις λειτουργίες κάθε τύπου κυττάρων και επιτρέπει τη διατήρηση της μνήμης αυτών των λειτουργιών». Σ' αυτόν τον ορισμό, κάτι μένει αμετάβλητο, το γένωμα, και κάτι μεταβάλλεται, το επιγένωμα. Αυτή η διατύπωση φανερώνει το τι πραγματικά γίνεται από βιολογική άποψη. (Ζαφρανάς και Ζαφρανάς 2015)

Η επιγενετική αποτελεί μέρος του μηχανισμού που ελέγχει την φυσιολογική ανάπτυξη, από τα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα έως τη δημιουργία περισσότερων

από διακοσίων διαφορετικών τύπων κυττάρων που ορίζουν τον ενήλικο οργανισμό. (Barouki et al. 2018) Περιλαμβάνει κληρονομικούς, ρυθμιστικούς μηχανισμούς έκφρασης των γονιδίων, που προκαλούνται κυρίως από τις τροποποιήσεις της πυρηνικής χρωματίνης και δεν σχετίζονται με την αλληλουχία κωδικοποίησης του DNA, αλλά συμπληρώνουν τις πληροφορίες του γενετικού κώδικα. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012; M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Έτσι, ο επιγενετικός προγραμματισμός καθορίζει την τύχη των κυττάρων, με αποτέλεσμα τα βλαστικά κύτταρα και τα παράγωγά τους να μοιράζονται πανομοιότυπα γενετικά υλικά, αλλά να φέρουν διαφορετικούς επιγενετικούς μηχανισμούς, υπεύθυνους για τη διαφορεική έκφραση των γονιδίων, τις διακριτές κυτταρικές δραστηριότητες και τις βιολογικές τους λειτουργίες. (Barouki et al. 2018; Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012; M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011)



Εικόνα 1: Οι επιγενετικοί μηχανισμοί. (Lim, Shannon, and Hardy 2010)

Οι επιγενετικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν την τροποποίηση των ιστονών, τη μεθυλίωση του DNA, τα μη κωδικοποιητικά RNAs και την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης (εικόνα 1). (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012) Αυτά τα επιγενετικά σήματα είναι ικανά όχι μόνο να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση, αλλά και να μεταδοθούν στο έμβρυο μετά τη γονιμοποίηση. (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018) Οι επιγενετικοί μηχανισμοί, στο επίπεδο των γαμετικών κυττάρων, διασφαλίζουν το στάδιο της μείωσης και τον τερματισμό της προγραμματισμένης διαφοροποίησης κατά την γαμετογένεση, διατηρούν τις επιγενετικές πληροφορίες στους γαμέτες για την επόμενη γενιά και διαγράφουν τα λανθασμένα κληρονομικά πρότυπα πριν από την έναρξη της επόμενης γενιάς. (M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Συνολικά, έχει φανεί ότι η λειτουργία του σπέρματος, η εμβρυογένεση, ακόμη και η πρόιμη ανάπτυξη, πιθανότατα απαιτούν κάποιο επίπεδο ομαλότητας στο επιγένομα του σπέρματος. (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018)

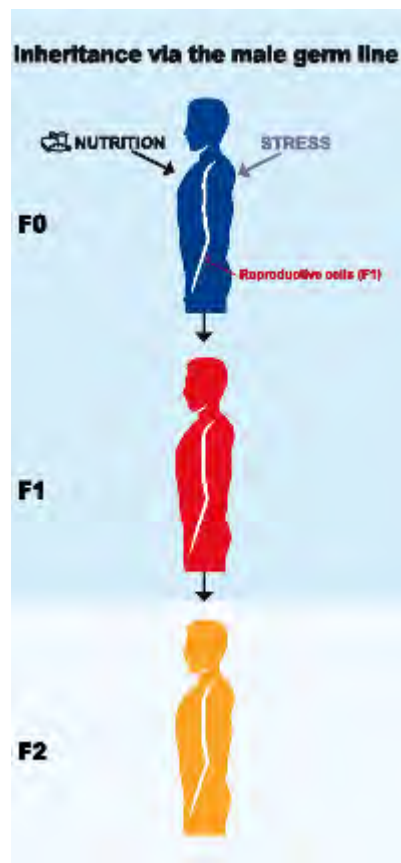
Όταν ο Waddington μίλησε για την επιγένεση, ο ρόλος των γονιδίων και οι επιδράσεις επ' αυτών δεν ήταν ακόμη καλά διευκρινισμένα. (Ζαφρανάς και Ζαφρανάς 2015) Λόγω του ρόλου του επιγονιδιώματος στη γονιδιακή ρύθμιση, κάθε

κύτταρο του σώματος έχει ένα ξεχωριστό επιγενετικό προφίλ που συνδέεται στενά με τη λειτουργία κάθε συγκεκριμένου κυττάρου. Το ανθρώπινο σπέρμα δεν αποτελεί εξαίρεση σε αυτό, και στην πραγματικότητα αντιπροσωπεύει ένα από τα καλύτερα παραδείγματα ενός μοναδικού κυτταρικού τύπου με ένα εξαιρετικά εξειδικευμένο επιγονιδίωμα, κατάλληλο για να οδηγήσει τις μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές ιδιότητες αυτού του μοναδικού κυτταρικού τύπου. (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018)

Ενώ, οι γενετικές μεταβολές της γαμετικής γραμμής παραμένουν αμετάβλητες σε όλα τα κύτταρα του σώματος, η επιγενετική τροποποίηση χαρακτηρίζεται από δυναμικότητα και ποικίλλει μεταξύ των ιστών ως απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που κατευθύνουν τη διαφοροποίηση των ιστών κατά την ανάπτυξη και των κινδύνων που προκαλούν μια προσαρμοστική απόκριση των κυττάρων. (Ornellas et al. 2017) Τέλος, οι επιγενετικές τροποποιήσεις συνήθως διαγράφονται στη γαμετική γραμμή. Η ελλιπής διαγραφή είναι γνωστό ότι οδηγεί σε επιγενετική κληρονομικότητα. (M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011)

1.2 ΔΙΑΓΕΝΕΑΚΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

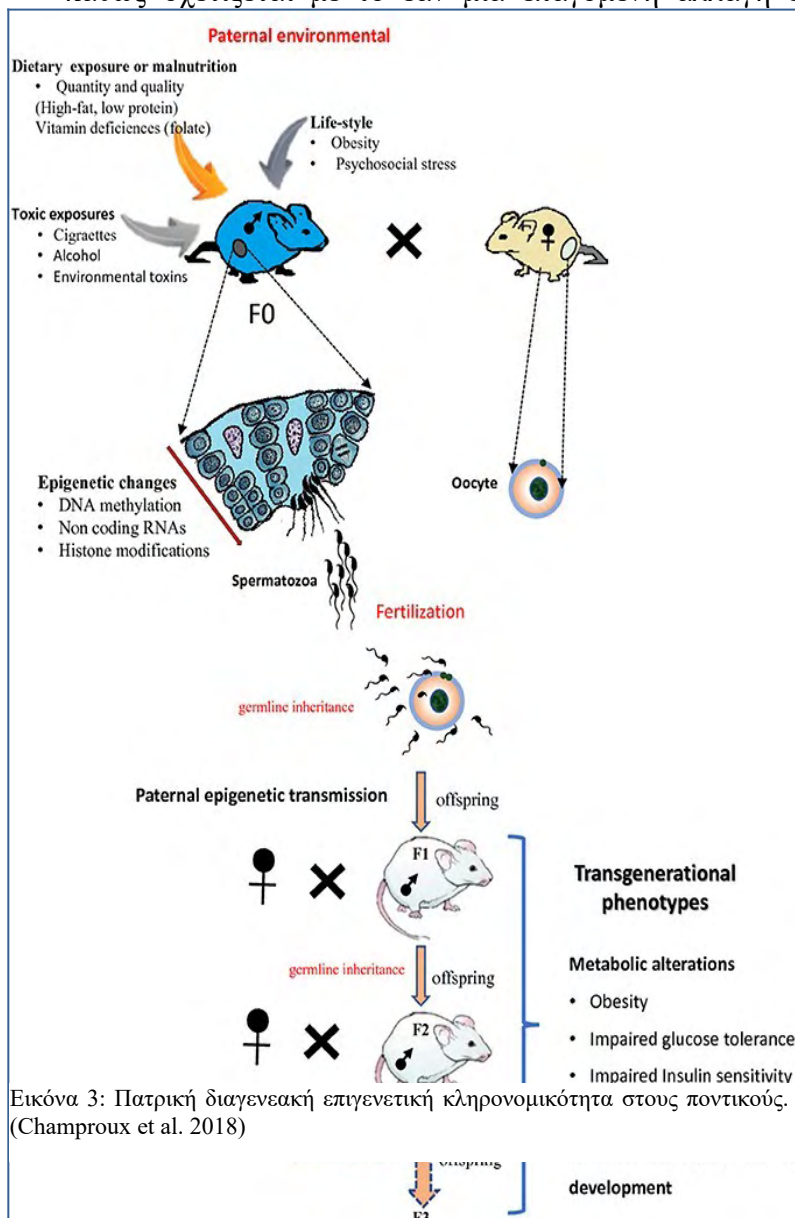
Η διαγενεακή επιγενετική κληρονομικότητα που προκαλείται από περιβαλλοντικούς παράγοντες ορίζεται ως η μετάδοση των γενετικών τροποποιημένων πληροφοριών μεταξύ των γενεών χωρίς την παρουσία των συνεχιζόμενων άμεσων εκθέσεων στους παράγοντες αυτούς (εικόνα 2). (Ho et al. 2017) Οι επιγενετικές αλλαγές στη βλαστική γραμμή ενδέχεται να οδηγήσουν σε διαγενεακές ή διαγενετικές επιπτώσεις στους απογόνους και η κατανόησή τους είναι απαραίτητη, έτσι ώστε να προσδιοριστούν οι επιγενετικές τροποποιήσεις των γεννητικών κυττάρων. (K. Gapp and Bohacek 2018) Οι μελέτες επικεντρώνονται στην πατρική κληρονομικότητα, καθώς έχει αποδειχθεί από πολλές



Εικόνα 2: Η πατρική διαγενεακή κληρονομικότητα. (Epigenetic Inheritance 2012)

ομάδες ότι το μεθυλιωμένο σπέρμα μπορεί να διαταραχθεί από περιβαλλοντικές επιδράσεις. (Stewart, Veselovska, and Kelsey 2016)

Σχεδόν κάθε ανασκόπηση διερευνά τη σημασία της διαφοροποίησης της κληρονομικότητας μεταξύ των γενεών και των διαγενεών στο επίπεδο της γαμετικής σειράς, γεγονός που βασίζεται στο κατά πόσον η μετάδοση των επιδράσεων παρατηρείται στον άμεσο απόγονο, του οποίου τα γεννητικά κύτταρα έχουν εκτεθεί άμεσα, ή στην επόμενη γενιά, ακόμη και γενεές. Αυτή η διάκριση είναι σημαντική καθώς σχετίζεται με το εάν μια επαγόμενη αλλαγή είναι παροδική ή μπορεί να



Εικόνα 3: Πατρική διαγενεακή επιγενετική κληρονομικότητα στους ποντικούς. (Champroux et al. 2018)

πολλαπλασιαστεί διαγενετικά στους απογόνους κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης. (K. Gapp and Bohacek 2018)

Η κληρονομικότητα επιδρά στις γενιές όταν ένας περιβαλλοντικός παράγοντας μεταδίδεται από τον γονέα (γενιά F0) στους απογόνους του (γενιά F1). Στην περίπτωση της περιγεννητικής έκθεσης, τα γεννητικά κύτταρα του εκτεθειμένου εμβρύου (F1) δημιουργούν τη γενιά F2. Επομένως, οι επιδράσεις που μεταδίδονται από το έμβryo F1 στον απόγονο

F2 θεωρούνται κληρονομικές, καθώς και οι δυο γενιές F0 και F1 εκτέθηκαν άμεσα στον περιβαλλοντικό παράγοντα. Επίσης, όταν εκτίθενται οι γαμέτες του γονέα F0 σε έναν παράγοντα, οι επιδράσεις που ανιχνεύονται στη γενιά F2 μπορούν να θεωρηθούν διαγενεακές. Παρομοίως, οι επιδράσεις που μεταδίδονται περιγεννητικά στο έμβryo

F1 και εντοπίζονται στη γενιά F3, θεωρούνται διαγενετικές. Είναι σημαντικό ότι αυτά τα αποτελέσματα πρέπει να επιβιώσουν από τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό στην F1 ή F2 γαμετική γραμμή, αντίστοιχα, για να μεταδοθούν διαγενετικά. (Jarred, Bildsoe, and Western 2018)

Η πρώτη απόδειξη για την υποστήριξη της επιγενετικής κληρονομικότητας της γαμετικής σειράς στα θηλαστικά δόθηκε από την ομάδα της Emma Whitelaw με τη χρήση μοντέλων ποντικών. Σύμφωνα με τους ερευνητές οι επιγενετικές μεταβολές στα ποντικά δείχνουν μεταβλητή δραστηριότητα των γονιδίων συσχετιζόμενη με τροποποιημένα επιγενετικά προφίλ που έχουν την ικανότητα, είτε να παρακάμψουν τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό στη γαμετική σειρά, είτε να αποκατασταθούν μετά την απομεθυλίωση, μεταφέροντας έτσι ένα επιγενετικό σήμα και συγκεκριμένους φαινοτύπους στους απογόνους τους (εικόνα 3). (K. Gapp and Bohacek 2018; Jodar et al. 2013)

Πιο συγκεκριμένα, ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν στην επιγενετική διαγενεακή κληρονομικότητα του φαινοτύπου της νόσου που προκαλείται από βινκλοζολίνη και σχετίζεται με ενδοκρινικές διαταραχές, σε αρουραίους, έχει αυξηθεί εκθετικά κατά την τελευταία δεκαετία. (Barouki et al. 2018) Για παράδειγμα, το 2005, οι Skinner et al. δημοσίευσαν την πρώτη σαφή ένδειξη ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας μπορεί να οδηγήσει σε σταθερές, κληρονομικές αλλαγές σε αρκετές επόμενες γενιές στους αρουραίους. (K. Gapp and Bohacek 2018) Επίσης, παρατήρησαν ανωμαλίες στον προστάτη, συμπεριλαμβανομένης της επιθηλιακής υπερπλασίας, της αδενικής ατροφίας και της προστατίτιδας, σε αρουραίους και ποντικά F3 ή F4 γενιάς, μετά από έκθεση του γονέα σε βινκλοζολίνη. (Ho et al. 2017)

Παρόμοια φαίνεται να είναι τα ευρήματα και στους ανθρώπους, αφού αναφέρθηκε ότι μετά από έκθεση των ανδρών, παρατηρήθηκαν σε κύτταρα Sertoli των γενεών F3 ή F4, ανεπιθύμητες διαγενετικές επιδράσεις στα αρσενικά γεννητικά κύτταρα, σχετικά με τις λειτουργίες των όρχεων και τη γονιμότητα των ανδρών, συνοδευόμενες από επιγενετική τροποποίηση και μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης. Τέλος, οι διαγενετικές επιδράσεις παρατηρήθηκαν στο σπέρμα και στους όρχεις σε ζωικά μοντέλα μετά από προγονική έκθεση σε μείγματα φυτοφαρμάκων περμεθρίνης και εντομοαπωθητικών. (Ho et al. 2017)

Αναδρομικές επιδημιολογικές μελέτες προσφέρουν στοιχεία που συνδέουν την έκθεση στο στρες, κατά τη διάρκεια της ζωής των ανδρών, με τον κίνδυνο της

εμφάνισης μιας νόσου στις επόμενες γενιές. Οι πρώτοι ισχυρισμοί για τις γενετικές και τις διαγενεακές επιπτώσεις μέσω της γενεαλογίας των ανδρών υποβλήθηκαν από μελέτες που ασχολήθηκαν με τον λοιμό της Σουηδίας το 1836. Αυτές οι μελέτες φανέρωσαν συσχετισμούς μεταξύ της προσφοράς της τροφής, κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας των αρρένων, και των αποτελεσμάτων της υγείας, συμπεριλαμβανομένων του κινδύνου για την εμφάνιση μιας ασθένειας και της μακροζωίας, στους γιους και τα εγγόνια τους. Περαιτέρω μελέτες κοόρτης σχετικά με τους επιζώντες του Ολοκαυτώματος και των ενηλίκων απογόνων τους, διαπίστωσαν αυξημένο επιπολασμό των νευροψυχιατρικών διαταραχών, όπως κατάθλιψη και διαταραχή μετατραυματικού στρες, και μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης. Αυτά τα αποτελέσματα υποστηρίζουν ότι το τραυματικό στρες προάγει διαρκείς επιδράσεις μέσω της πατρικής γαμετικής σειράς, καθώς πολλά από αυτά τα παιδιά γεννήθηκαν δεκαετίες μετά το Ολοκαύτωμα. (Chan, Nugent, and Bale 2018)

Ταυτόχρονα, πολλές μελέτες σε ζώα και σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι οι άρρενες μπορούν να περάσουν τους φαινοτύπους ή τα χαρακτηριστικά τους, που αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια της ζωής τους λόγω των διατροφικών αλλαγών, της έκθεσης σε χημικά, του στρες ή του ψυχικού τραύματος, στους απογόνους τους. Για παράδειγμα, οι απόγονοι της πρώτης και της δεύτερης γενιάς από αρσενικά ποντίκια που εκτέθηκαν σε οσμή φόβου πριν από τη σύλληψη, εμφάνισαν αυξημένη συμπεριφορική ευαισθησία στη συγκεκριμένη οσμή και όχι σε άλλες. Ακόμη, οι απόγονοι των αρσενικών ποντικών που εμφανίζουν ενισχυμένη ηπατική απόκριση, σχετικά με την επούλωση ενός τραύματος, παρουσιάζουν παρόμοια ικανότητα. Αναφορικά με τη διατροφή, η παχυσαρκία και οι μεταβολικές διαταραχές που προκαλούνται από δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορούν να κληρονομηθούν στον απόγονο, τόσο σε ποντίκια όσο και σε ανθρώπους. (Barouki et al. 2018) Επιπρόσθετα, μια μελέτη έδειξε ότι η έκθεση της εγκύου στη αλκοόλη μεταβάλλει τη μεθυλίωση του γονιδίου της προαπιομελανοκορτινης στο σπέρμα. Είναι ενδιαφέρον ότι αυτή η αλλοίωση κληρονομείται μόνο μέσω της πατρικής γαμετικής σειράς σε πολλές γενιές. (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018)

Δεδομένου ότι η κληρονομικότητα των φαινοτύπων δεν ακολουθεί τον Μεντελικό Νόμο, οι επιγενετικές αλλοιώσεις είναι οι πιο πιθανές αιτίες των φαινοτύπων, με απαραίτητη προϋπόθεση, η μετάδοση των επιγενετικών αλλοιώσεων από τον πατέρα στον απόγονο να μεσολαβείται από το σπέρμα. Πράγματι, οι αλλαγές στα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA του σπέρματος, οι διατηρούμενες ιστόνες, τα

μικρά μη κωδικοποιά RNA και πιθανώς, η τρισδιάστατη δομή της χρωματίνης, οφείλονται για την επιγενετική διαγενετική κληρονομικότητα. (Barouki et al. 2018; K. Gapp and Bohacek 2018)

Ειδικότερα, καθώς τα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA και των τροποποιήσεων των ιστονών διαδίδονται μέσω του χρόνου και του χώρου σε ολόκληρο τον οργανισμό, παρέχουν έναν δυναμικό μηχανισμό μνήμης. Η εμβρυική ζωή είναι μια περίοδος εκτεταμένου επιγενετικού προγραμματισμού και ο οργανισμός είναι πιο ευαίσθητος στις περιβαλλοντικές επιρροές. Σαν αποτέλεσμα, η έκθεση σε περιβαλλοντικούς παράγοντες μπορεί να επηρεάσει τον επιγενετικό προγραμματισμό και να οδηγήσει σε δια βίου, μόνιμες αλλαγές στο πρότυπο της γονιδιακής έκφρασης, μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα τον μεταβαλλόμενο αριθμό κυττάρων, της μεταβολικής δραστηριότητας τους και της διαφοροποίησης των γενεών. Σε αυτό το πλαίσιο, το επιγονιδίωμα χρησιμεύει ως διαμεσολαβητής μεταξύ των γονιδίων, του περιβάλλοντος και των αναπτυξιακών αποτελεσμάτων. (Barouki et al. 2018)

Η ποικιλομορφία των επιγενετικών αποκρίσεων στις περιβαλλοντικές επιρροές εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως ο χρόνος και ο τύπος του ερεθίσματος, συμπεριλαμβανομένων των περιβαλλοντικών τοξινών, των ρύπων, των ενδοκρινικών διαταραχών, της ιονίζουσας ακτινοβολίας, του καπνίσματος και της διατροφής. Ωστόσο, παράγοντες αποτελούν και η μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των μεταβολών της μεθυλίωσης του DNA, οι βιοπληροφορικές παράμετροι και το σημείο συλλογής του σπέρματος (επιδιδυμίδες έναντι εκσπερμάτωσης).

Οι κληρονομικές επιγενετικές βλάβες πραγματοποιούνται:

1. κατά τη διάρκεια της μετανάστευσης των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στην κορυφογραμμή των γεννητικών οργάνων (πριν από την 6^η εβδομάδα της ανάπτυξης του μελλοντικού πατέρα κατά την περίοδο της κύησής του), όταν εμφανίζεται επιγενετική διαγραφή γενωμικού τύπου,

2. πριν από την εφηβεία, από τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (ή γονοκύτταρα) έως την διαμόρφωση των σπερματογόνιων, κατά τη διάρκεια της οποίας καθιερώνονται ευρέως τα προφίλ της μεθυλίωσης,

3. κατά τη διάρκεια κάθε αναπαραγωγικού κύκλου, από το σπερματογόνο στο σπερματοκύτταρο και τέλος στο σπερματοζώαριο, όταν η μεθυλίωση του DNA πρέπει να καθοριστεί πλήρως και

4. στο ζυγωτό, όταν τα αποκτηθέντα σήματα της μεθυλίωσης πρέπει να αντέξουν τον μετα-ζυγωτικό επιγενετικό επαναπρογραμματισμό σε συγκεκριμένες περιοχές, όπως τα αποτυπωμένα γονίδια. (Βαχτσεβάνου Α 2020)

Αρχικά, όταν ένα ωοκύτταρο συνδέεται με το DNA του ώριμου σπέρματος, αυτό είναι μεθυλιωμένο και δεσμεύεται από πρωταμίνες, τροποποιημένες ιστόνες και μεταγραφικούς παράγοντες. Η γονιμοποίηση ξεκινά με τη δέσμευση της κεφαλής του σπέρματος στο ωοκύτταρο. Στη συνέχεια, ενώ το ωοκύτταρο ολοκληρώνει τη μειωτική φάση II, ο πυρήνας του σπέρματος υφίσταται αρκετές αλλαγές. Αναλυτικότερα, η χρωματίνη του προετοιμάζεται για, μεταγενέστερη επεξεργασία του πυρήνα και μεταγραφή με δύο τρόπους: ο πρώτος είναι μέσω της αντικατάστασης των πρωταμινών με ιστόνες και ο δεύτερος μέσω της ενεργού απομεθυλίωσης. Έπειτα, η αποσυμπύκνωση του πυρήνα του σπέρματος συμβαίνει 45-60 λεπτά μετά τη γονιμοποίηση, με τρόπο κατά τον οποίο οι δισουλφιδικοί δεσμοί επιτρέπουν στις πρωταμίνες να προσκολληθούν στο DNA του σπέρματος και αποσυντίθενται κατά την έκθεσή τους στα χημικά που προέρχονται από τα ωοκύτταρα, όπως η γλουταθειόνη. (Gold, Jung, and Corces 2018)

Η πατρική χρωματίνη, στη συνέχεια, τροφοδοτείται με τροποποιημένες ιστόνες, οι οποίες περιέχονται στα ωοκύτταρα πριν από τη γονιμοποίηση. Έχει φανεί ότι η παρουσία των ιστονών H3K4me1 και H3K4me3 στο ώριμο σπέρμα και στο πρώιμο έμβryo μπορεί να προέρχονται και να διατηρούνται από μέρους του πατέρα κατά τη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυογένεση. (Gold, Jung, and Corces 2018) Οι επιγενετικές αλλαγές της πρώιμης ζωής παραμένουν σε ιστούς με μακρά ημιζωή, όπως νευρώνες ή βλαστοκύτταρα, ενώ τα κύτταρα με συνεχή και γρήγορο χρόνο εναλλαγής μπορεί να απομακρύνουν γρήγορα τυχόν επιγενετικές τροποποιήσεις. Ως εκ τούτου, ο ιστός στόχος μπορεί να καθορίσει εάν μια επιγενετική αλλαγή είναι μόνιμη και μεταδοτική ή παροδική μέσω της συνεχούς εναλλαγής της γονιδιακής έκφρασης, διασφαλίζοντας την επιγενετική κληρονομικότητα. (Barouki et al. 2018)

Παρ' όλα αυτά, αμφισβητείται εάν η επιγενετική παραλλαγή προκαλεί γενετική μεταβολή ή το αντίστροφο. Μια μελέτη με αντικείμενο διερεύνησης τη σχέση μεταξύ της γενετικής παραλλαγής και της μεθυλίωσης του DNA, απέδειξε την έκφραση ενός αλληλόμορφου γονιδίου εκτός των αποτυπωμένων περιοχών. Ακόμη, τα αποτελέσματα των ερευνών σε μια οικογένεια τριών γενεών, καθώς και μη συγγενών ατόμων, αποκάλυψαν ότι οι μονονουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί συνδέονται με διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης, που σχετίζονται με την έκφραση του ίδιου

γονιδίου. Παραδόξως, κατά την εξέταση των επιδράσεων της μεθυλίωσης του DNA στον γονότυπο, οι γενετικές παραλλαγές φαίνεται να έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο από το αποτύπωμα. (Donkin and Barrès 2018)

Είναι πιθανό ότι άλλες φαινοτυπικές αποκρίσεις, για παράδειγμα χαρακτηριστικά συμπεριφοράς, επηρεάζονται διαφορετικά από τις διάφορες περιβαλλοντικές εκθέσεις. Η επέκταση της ομάδας των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών στους απογόνους σε διαγενεακές μελέτες, με παράλληλη περιγραφή του επιγενετικού αποτυπώματος στο σπερματοζώαριο, θα επιτρέψει τον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ συγκεκριμένων επιγενετικών αλλαγών στο σπέρμα και της μεταβίβασης στον απόγονο. (Donkin and Barrès 2018)

1.3 ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Η υπογονιμότητα ορίζεται ως η αδυναμία γονιμοποίησης μετά από, τουλάχιστον, 12 μήνες σεξουαλικών επαφών χωρίς τη χρήση αντισύλληψης. Η υπογονιμότητα επηρεάζει έως και το 15% των ζευγαριών με την ανδρική πλευρά να αφορά το 50% των στείρων ζευγαριών. Σύμφωνα με τη δημοσίευση του 2012 από την Ευρωπαϊκή Ένωση Κατευθυντήριων Οδηγιών για την Ανδρική Υπογονιμότητα, το 30% των στείρων ανδρών πάσχουν από ιδιοπαθή υπογονιμότητα. (Agarwal et al. 2015; Zegers-Hochschild et al. 2017)

Η κύρια αιτία της ανδρικής στειρότητας είναι οι ανατομικές ανωμαλίες, οι διαταραχές της γαμετογένεσης, οι ενδοκρinoπάθειες, τα ανοσολογικά προβλήματα και η περιφερική τοξικότητα. Επομένως, οι στείροι άνδρες μπορεί να εμφανίζουν φαινοτυπικές ανωμαλίες ή ανωμαλίες στο σπέρμα. Οι φαινοτυπικές ανωμαλίες περιλαμβάνουν το σύνδρομο Klinefelter, τις συγγενείς και αγγειακές διαταραχές, το σύνδρομο Kalman, τον κρυπτορχιδισμό, τον υποσπαδία και το σύνδρομο ανδρογενούς κατάθλιψης. Από την άλλη πλευρά, η στειρότητα με μη φυσιολογικές παραμέτρους του σπέρματος θεωρείται ως ιδιοπαθής στειρότητα. (Pouresmaeili 2019)

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες πιστεύεται ότι προκαλούν ένα μεγάλο ποσοστό της ανδρικής υπογονιμότητας, αφού υπάρχουν ευαίσθητες περιόδους, κατά τις οποίες, η έκθεση σ' αυτούς ενδέχεται να έχει μακροχρόνια επίδραση στους γαμέτες. Οι κοινοί περιβαλλοντικοί παράγοντες περιλαμβάνουν τις χημικές ουσίες, τα βαρέα μέταλλα, τα βιομηχανικά απόβλητα και ο τρόπος ζωής, όπως η διατροφή, η άσκηση και το άγχος. (Trasler, Hales, and Robaire 1986, 1987) Τα αποτελέσματα διάφορων

μελετών δείχνουν ότι η βλάβη του DNA που προκαλείται, για παράδειγμα, από το οξειδωτικό στρες υποβοηθά την ανώμαλη μεθυλίωση του DNA και προκαλεί επιγενετική αστάθεια κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης και της εμβρυογένεσης που μεταβάλλει το πρότυπο της έκφρασης πολλών γονιδίων. (Pouresmaeili 2019)

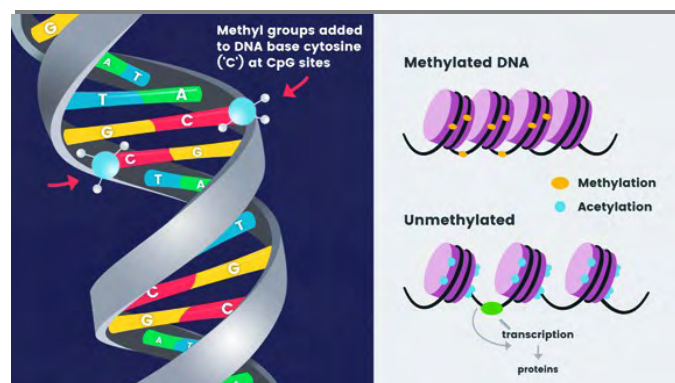
Ωστόσο, η εφαρμογή των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οδήγησε στην παρατήρηση ότι οι φυσιολογικές παράμετροι του σπέρματος δεν έχουν την ικανότητα να προκαλέσουν εγκυμοσύνη σε μια υγιή γυναίκα. Για το λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί αρκετές μελέτες σχετικά με τη λειτουργική ικανότητα του σπέρματος και τις βιο-λειτουργικές του παραμέτρους. Ωστόσο, η αξιολόγηση αυτών των μεταβλητών δεν επαρκεί για να εντοπίσει τις αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας. Για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός, οι μοριακοί βιολόγοι μελέτησαν την επιγενετική προέλευση της ανδρικής υπογονιμότητας. (Giacone et al. 2019)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

2.1 ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

2.1a ΓΕΝΙΚΑ

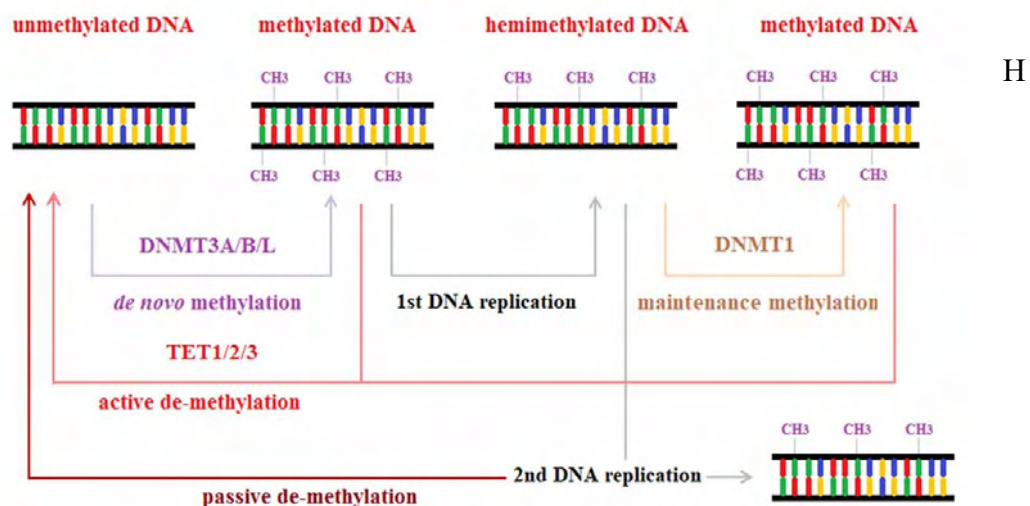
Η πιο καλά μελετημένη επιγενετική τροποποίηση στο DNA είναι η μεθυλίωση των καταλοίπων της κυτοσίνης σε νησίδες CpG (εικόνα 4), γονιδιωματικές περιοχές μήκους άνω των 1.000 ζευγών βάσεων. Οι νησίδες CpG διατηρούνται μη μεθυλιωμένες, εκτός από τα γονίδια της αποτύπωσης και το ανενεργό χρωμόσωμα X. (Ornellas et al. 2017) Η γονιδιωματική αποτύπωση αντιπροσωπεύει ένα είδος μονο-αλληλικής έκφρασης, που υπαγορεύεται αυστηρά από τη γονική προέλευση του γονιδίου. (Farhadova, Gomez-Velazquez, and Feil 2019) Η μεθυλίωση των πλούσιων σε CpG περιοχών του DNA, γενικά, παρέχει σταθερή αποσιώπηση της γονιδιακής έκφρασης, ενώ οι μη μεθυλιωμένες περιοχές CpG έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν παράγοντες της μεταγραφής, γεγονός που οδηγεί στη μεταγραφή ενός γονιδίου. (Ho et al. 2017; Schagdarsurengin, Paradowska,



Εικόνα 4: Η μεθυλίωση του DNA στις CpG νησίδες. (Y. Li et al. 2019)

and Steger 2012) Η σηματοδότηση της μεθυλίωσης συμβάλλει στην αποτροπή της παρεκκλίνουσας μεταγραφής του γονιδιώματος. Καθορίζεται από τις μεθυλτρανσφεράσες (DNMTs) του DNA, με τη χρήση τριών διαφορετικών ισοενζύμων και τα ένζυμα της απομεθυλίωσης, όπως το Ten Eleven Translocation (TET), καθώς και τη γλυκοσυλάση DNA της θυμίνης (TDG) και του επιδιορθωτικού μηχανισμού μέσω εκτομής βάσης του DNA (BER). (Donkin and Barrès 2018; Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018; M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011)

Το DNMT1 είναι, κυρίως, υπεύθυνο για τη διατήρηση της μεθυλίωσης των CpG περιοχών, ενώ τα DNMT3A, 3B και 3L ρυθμίζουν, συγκεκριμένα, τη διαδικασία της μεθυλίωσης στα γαμετικά κύτταρα. Τα DNMT3A και DNMT3B δημιουργούν de novo DNA μεθυλίωση, η οποία είναι καταλυτική στην ανάπτυξη των εμβρύων και των ιστών, καθώς και στη διαφοροποίηση των κυττάρων, ενώ το DNMT3L στερείται τέτοιας καταλυτικής δραστηριότητας και ενεργεί ως συμπαραγοντας του DNMT3A (εικόνα 5). (Suetake et al. 2004)



μεθυλίωση του DNA ελέγχει πολυάριθμες κυτταρικές διεργασίες,

Εικόνα 5: Τα ένζυμα της μεθυλίωσης και οι διάφορες φάσεις της. (Lacal and Ventura 2018)

συμπεριλαμβανομένης της διαφοροποίησης των κυττάρων και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης, συμμετέχει στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης μέσω της αποσιώπησης των τρανσποζονίων και των ενδογενών ρετροϊκών αλληλουχιών, της απενεργοποίησης των χρωμοσωμάτων X, της συμπύκνωσης της χρωματίνης, των τροποποιήσεων των ιστονών και της αποτύπωσης του γονιδιώματος. (Donkin and Barrès 2018; Ornellas et al. 2017) Κατά την αντιγραφή του DNA, το πρότυπο της μεθυλίωσης του γονικού κυττάρου

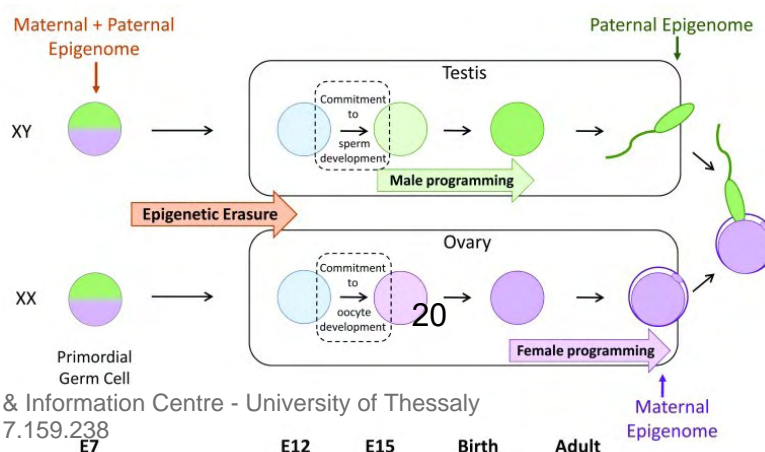
αντιγράφεται στον θυγατρικό κλώνο DNA, επιτρέποντας την κληρονομικότητα του προτύπου αυτού. (Inbar-Feigenberg et al. 2013)

2.1b Η ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Τα κύτταρα του σπέρματος εμφανίζουν μεθυλίωση σε CpG περιοχές σε ποσοστό 25% και βρίσκονται είτε εντός γνωστών γονιδίων, είτε μεταξύ των γονιδίων. Το πρότυπο της μεθυλίωσης ορισμένων γονιδίων μπορεί να ποικίλλει, καθώς τα γαμετικά κύτταρα περνούν από τα διάφορα στάδια της σπερματογένεσης. (M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Μεθυλίωση παρατηρείται, ακόμη, και σε CpA νησίδες, με τη μεθυλίωση σ' αυτή την περίπτωση να συσσωρεύεται εντός και γύρω από τις αλληλουχίες του τραπεζοειδούς B1 SINE σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης των ποντικών. (Donkin and Barrès 2018; Βαχτσεβάνου Α 2020)

Εξίσου σημαντική, με τη μεθυλίωση στο γονιδίωμα του σπέρματος, είναι η απουσία αυτής της τροποποίησης από συγκεκριμένες αλληλουχίες. Οι τοποθεσίες του σπέρματος που απομεθυλιώνονται είναι περιοχές με υψηλή πυκνότητα CpG δινουκλεοτιδίων που βρίσκονται, κυρίως, κοντά σε υποκινητές. (Gold, Jung, and Corces 2018) Επιπλέον, οι ενσωματωθείσες με επιγενετικές διαδικασίες νέες εμβόλιμες εγγραφές, κατά τη διαδικασία της γονιμοποίησης, προστατεύονται από την απομεθυλίωση. Οι εγγραφές αυτές, όπως ο IGF2, είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα. (Μοίρας 2011)

Είναι σημαντικό το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των θηλαστικών, τα πρώιμα κύτταρα των γαμετικών σειρών υπόκεινται σε σχεδόν καθολική διαγραφή της μεθυλίωσης του DNA, μια διαδικασία εκκαθάρισης, ακολουθούμενη από τον επαναπρογραμματισμό των μοτίβων της μεθυλίωσης του DNA σε δύο φάσεις και με ειδικό τρόπο για κάθε φύλο, που πιστεύεται ότι διαγράφει την κυτταρική μνήμη και επιτρέπει την ανάπτυξη (εικόνα 6). (Βαχτσεβάνου Α 2020; Donkin and Barrès 2018)



Κατά την πρώτη φάση της επαναμεθυλίωσης, οι πρωταμίνες του σπέρματος ανταλλάσσονται με μητρικά νουκλεοσώματα σε μια διαδικασία που ονομάζεται επαναπρογραμματισμός προ-εμφύτευσης. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει εκτεταμένες επιγενετικές τροποποιήσεις του σπερματοζωικού γονιδιώματος μέσα στα ωοκύτταρα και στη συνέχεια προσδίδει ακεραιότητα στο ζυγωτό. Το δεύτερο βήμα, που ονομάζεται επαναπρογραμματισμός σπέρματος, βοηθά στη δημιουργία των επιγενετικών υπογραφών του φύλου στο ζυγωτό. (Colaco and Sakkas 2018) Τα μοτίβα της μεθυλίωσης του DNA σε όλο το γονιδίωμα αποκαθίστανται κατά τη

Εικόνα 6: Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός αρχέγονων γαμετικών κυττάρων. (Jarred, Bildsoe, and Western 2018)

διάρκεια της προφάσης I, στο στάδιο των σπερματογονίων τύπου A και στα σπερματοκύτταρα πριν από τη διαίρεση των κυττάρων. Η μεθυλίωση του DNA λαμβάνει χώρα με συγκεκριμένο τρόπο και ολοκληρώνεται πριν τον τερματισμό του σταδίου των σπερματοκυττάρων του παχυτενίου. (C. C. Oakes et al. 2007)

Οι Gkountela et al. αναφέρουν ότι η συνολική απομεθυλίωση του DNA, και ο επαναπρογραμματισμός της αποτύπωσης και της τροποποίησης των ιστονών, πραγματοποιείται ξεχωριστά στα ανθρώπινα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα και τα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA καθιερώνονται σε μεγάλο βαθμό στα σπερματογόνια μέσω της απομεθυλίωσης και της de novo μεθυλίωσης. Ωστόσο, σε μοντέλα ποντικών αυτές οι διαδικασίες εμφανίζονται συγχρόνως και πολύ νωρίτερα. (Davis et al. 2000; Obata and Kono 2002; Saitou, Kagiwada, and Kurimoto 2012)

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και μεταναστεύουν προς τις γεννητικές κορυφογραμμές, όπου αποικίζουν, πριν από το σχηματισμό των γονάδων. Κατά τη διάρκεια και μετά τη μετανάστευση, υφίστανται καθολικές επιγενετικές αλλαγές. (M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Αν και τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα έχουν σωματική μεθυλίωση, σ' αυτή τη φάση υφίστανται εκτεταμένη απομεθυλίωση του DNA με διαφασικό τρόπο. Η μείωση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA από περίπου 70% στα πρόδρομα βλαστικά κύτταρα σε 14% στα αρσενικά αρχέγονα γεννητικά κύτταρα ακολουθείται από περαιτέρω απομεθυλίωση που πλησιάζει το 8%, καθώς τα γεννητικά κύτταρα αποικίζουν τις αναπτυσσόμενες γονάδες, περίπου την 7^η εβδομάδα της εμβρυϊκής ανάπτυξης.

(Donkin and Barrès 2018; Jarred, Bildsoe, and Western 2018; Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012)

Οι de novo DNA μεθυλτρανσφεράσες αποσιωπούνται κατά τη διάρκεια αυτού του χρονικού διαστήματος, καθώς τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα επανακτούν την ακεραιότητά τους στο δρόμο προς την κορυφογραμμή των γεννητικών οργάνων. Αυτή η αποσιώπηση διευκολύνει την απομεθυλίωση του DNA. Αν και η απώλεια της μεθυλίωσης του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα φαίνεται να ξεκινά κατά τη μετανάστευση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων, συμβαίνει, κυρίως, μετά τον αποικισμό των γεννητικών κορυφών και επηρεάζει περίπου το 80-90% του γονιδιώματος. (Kota and Feil 2010)

Η απομεθυλίωση του DNA είναι πιθανό να συμβεί τόσο με παθητικούς όσο και με ενεργούς μηχανισμούς. Ενώ η παθητική απώλεια συνεπάγεται τη σταδιακή αραίωση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης κατά την αντιγραφή, εφόσον δεν υφίσταται η δράση της DNMT1, η ενεργή απομεθυλίωση περιλαμβάνει τη μετατροπή της 5-μεθυλκυτοσίνης σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη από ένζυμα, τα λεγόμενα TET1 και TET2 και την επακόλουθη ενεργοποίηση του μηχανισμού επιδιόρθωσης του DNA μέσω εκτομής βάσης. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι το TET1 απαιτείται για την ενεργοποίηση των γονιδίων της ανάπτυξης των γεννητικών κυττάρων κατά τον επαναπρογραμματισμό, υποδεικνύοντας ότι η απομεθυλίωση του DNA σε συγκεκριμένα γονίδια είναι σημαντική για την ανάπτυξη των φύλων. (Jarred, Bildsoe, and Western 2018) Η παρουσία της 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνης καταδεικνύει τις περιοχές των υποκινητών των γονιδίων που εμφανίζουν αυξημένη μεταγραφή, επιβεβαιώνοντας το ρόλο της στη μακροπρόθεσμη και βραχυπρόθεσμη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. (Ornellas et al. 2017)

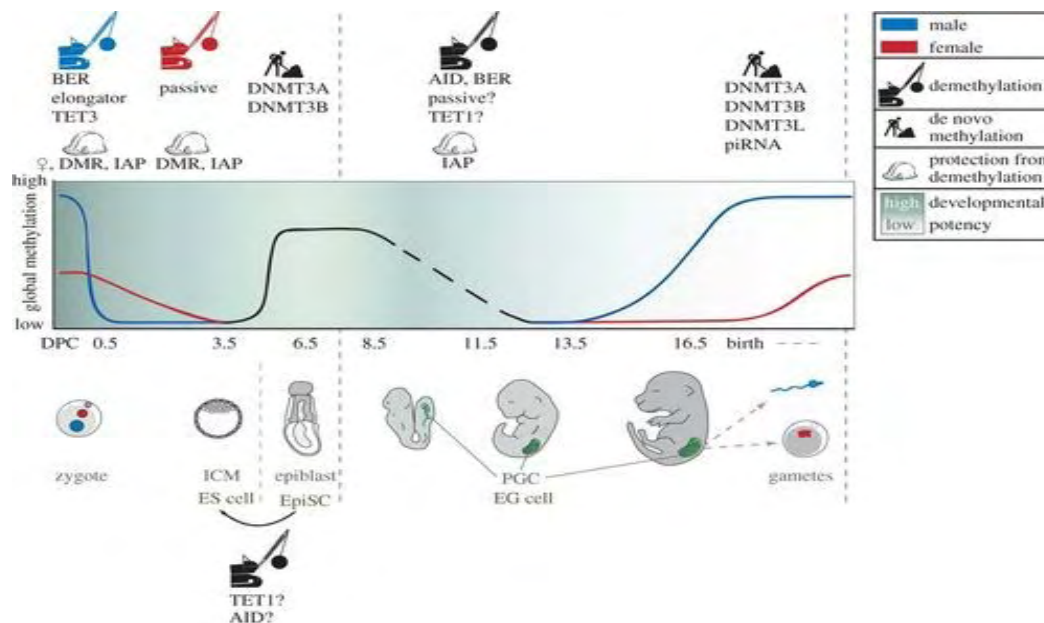
Στη συνέχεια, ακολουθεί η de novo μεθυλίωση του DNA σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων, με τα συνολικά επίπεδα της μεθυλίωσης στις CpG περιοχές να αγγίζουν το 90% στα ποντίκια και το 70% σε πλήρως ώριμα ανθρώπινα σπερματοζωάρια. (Donkin and Barrès 2018) Έπειτα, οι αρσενικοί γαμέτες βιώνουν μια πολλαπλασιαστική έκρηξη πριν εισέλθουν στη μείωση και ξεκινούν τη διαδικασία σχηματισμού του σπέρματος. Επομένως, το ώριμο μεθυλιωμένο σπέρμα, είναι προϊόν συντήρησης της μεθυλίωσης του DNA. Ωστόσο, στην αρσενική βλαστική γραμμή, η de novo μεθυλίωση ξεκινά στα γονοκύτταρα, ενώ τα αρσενικά μεθυλιωμένα γαμετικά κύτταρα διαμορφώνονται πλήρως πριν από τη γέννηση. (Stewart, Veselovska, and Kelsey 2016)

Εντούτοις, η μεθυλίωση στο σπέρμα βρίσκεται στο χαμηλότερο επίπεδο σε σύγκριση με τα σωματικά κύτταρα, για παράδειγμα στον θύμο αδένα και τον εγκέφαλο, τα οποία εμφανίζουν 15-20% περισσότερη μεθυλίωση. Τα ώριμα σπερματοζωάρια είναι, επομένως, «υπομεθυλωμένα κύτταρα», με επίπεδα μεθυλίωσης συγκρίσιμα με αυτά στα καρκινικά κύτταρα. (Donkin and Barrès 2018) Οι Undraga Schagdarsurengin et al., έπειτα από ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος, αποκάλυψαν ότι ο ιστός των όρχεων έχει οκτώ φορές περισσότερους υπομεθυλωμένους τόπους από οποιονδήποτε άλλο σωματικό ιστό. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012)

Στο άρθρο τους οι Gold et al., αναφέρουν ότι υπάρχει αυξημένη πυκνότητα των υπομεθυλωμένων υποκινητών εντός των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των γεννητικών κυττάρων στους απογόνους. (Gold, Jung, and Corces 2018) Ωστόσο, ενώ οι υπομεθυλωμένες περιοχές των υποκινητών στο σπέρμα συνδέονται με ιστόνες, οι υπομεθυλωμένοι υποκινητές συνδέονται με μεταγραφικούς παράγοντες, όπως OCT4, SOX2 και KLF4, σε ανθρώπινα εμβρυϊκά γαμετικά κύτταρα. (Hammoud et al. 2009; W. Reik, Dean, and Walter 2001) Η συσχέτιση των ιστονών με την υπομεθυλίωση των περιοχών που είναι σημαντικές για την ανάπτυξη εξασφαλίζει τη μεταγραφική ικανότητα και την ενεργοποίηση του πατρικού γονιδίου κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη. (Boyer et al. 2005) Τελικά, ο επαναπρογραμματισμός στη γαμετική γραμμή επιτρέπει την επιλογή του σπέρματος που περιέχει τις πατρικές πληροφορίες που συμπληρώνουν τη γονιμοποίηση και υποστηρίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη των απογόνων. Συμπληρωματικά, διευκολύνει την επαναφορά των επιγενετικών σφαλμάτων που, πιθανόν, έχουν συσσωρευτεί στη βλαστική γραμμή, εμποδίζοντας τη μετάδοση αυτών των αλλαγμένων επιγενετικών καταστάσεων στους απογόνους. (Jarred, Bildsoe, and Western 2018)

Αρκετές μελέτες επιβεβαίωσαν ότι τα μοτίβα της πατρικής μεθυλίωσης διατηρούνται στα πρώτα εμβρυϊκά στάδια, υποδηλώνοντας ότι αυτή η μεθυλίωση συνεχίζει να παίζει ρυθμιστικό ρόλο κατά την ανάπτυξη του εμβρύου. Φαίνεται ότι η καθολική μεθυλίωση στο σπέρμα του πατέρα μπορεί να παίζει ρόλο στην καθοδήγηση τη μεταγραφής στο πρώιμο έμβρυο. (Gold, Jung, and Corces 2018)

Η ιδέα της μεθυλίωσης του DNA ως φορέα επιγενετικής μνήμης παραμένει εξαιρετικά συζητήσιμη. Πράγματι, πολλά από τα δεδομένα που έχουν δημοσιευτεί ήταν αντιφατικά και θεωρείται ότι οι μεταλλαγές που προκύπτουν λόγω της μεθυλίωσης του DNA δεν μπορούν να απομνημονευθούν στη γαμετική γραμμή λόγω των δύο κυμάτων επαναπρογραμματισμού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (εικόνα 7). (Barouki et al. 2018)



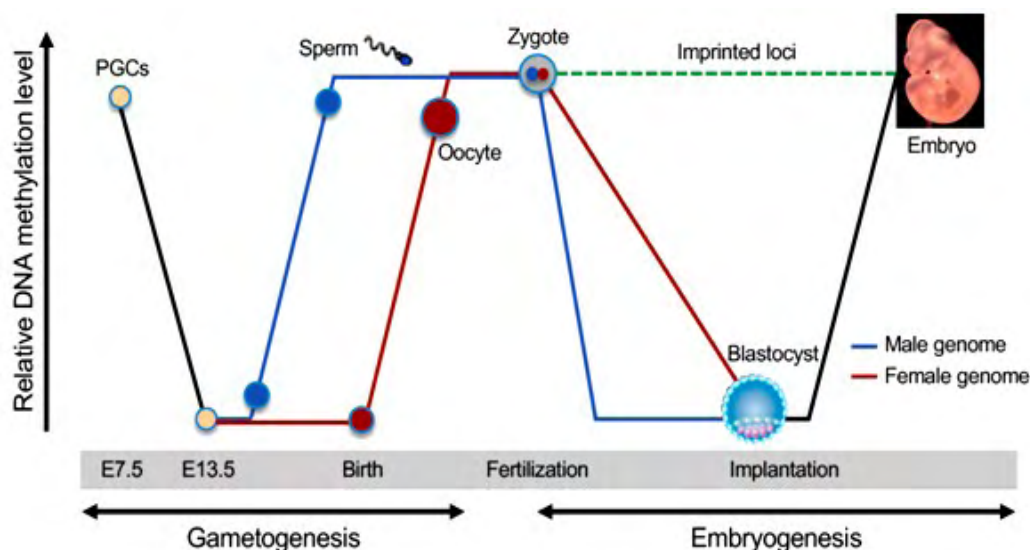
Εικόνα 7: Απομεθυλίωση του DNA του πατρικού γαμέτη στο ζυγωτό από την πρωτεΐνη TET. (Seisenberger et al. 2013)

Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι πολλοί γονιδιακοί τόποι, ειδικά τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία, διακόπτουν τον επαναπρογραμματισμό τόσο σε ποντίκια, όσο και σε ανθρώπους (εικόνα 7). Ως εκ τούτου, η ιδέα ότι, οι επαγόμενες από το περιβάλλον μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA, μπορούν να σταματήσουν τον επαναπρογραμματισμό και έτσι να μεταδοθούν σε πολλές γενιές, παραμένει μια έγκυρη υπόθεση. (Barouki et al. 2018) Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα ποντίκια ακούτι, όπου το πρότυπο της μεθυλίωσης του ρετροτρανσποζονίου IAP διαγράφεται εντελώς κατά τον επαναπρογραμματισμό της αρσενικής γαμετικής σειράς, παρέχοντας μια εξήγηση για την επιγενετική κληρονομικότητα του κίτρινου χρώματος του δέρματος ή του φαινοτύπου της στρογγυλής ουράς, αντίστοιχα. (Morgan et al. 1999)

2.1c ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Η γονιδιωματική αποτύπωση περιλαμβάνει τη διαφορική μεθυλίωση του DNA, του πατρικού ή του μητρικού αλληλόμορφου, σε περισσότερα από 120 γονίδια στα αναπτυσσόμενα αρσενικά γαμετικά κύτταρα και ως εκ τούτου την επιγενετική ρύθμιση των γονιδίων αυτών και την επιρροή μιας σειράς φυσιολογικών και συμπεριφορικών αποτελεσμάτων. (Βαχτσεβάνου Α 2020; Jarred, Bildsoe, and Western 2018) Η αλληλική μεθυλίωση προέρχεται από τη γαμετική σειρά σε συγκεκριμένα σημεία της αλληλουχίας, που είναι γνωστά ως περιοχές ελέγχου της αποτύπωσης και διατηρείται στα μητρικά ή πατρικά αλληλόμορφα, με αποτέλεσμα το ένα αντίγραφο να είναι μεθυλιωμένο σε μεγάλο βαθμό και το άλλο μη μεθυλιωμένο (εικόνα 8). (Kobayashi et al. 2012)

Η μεθυλίωση των περιοχών αυτών καθιερώνεται στη γαμετική γραμμή και σταθεροποιείται μέσω της διαφορικής οργάνωσης της χρωματίνης. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012) Για παράδειγμα, τα γονικά αποτυπωμένα - μεθυλιωμένα γονίδια, όπως το MEST, που συνήθως μεθυλιώνονται στα ωκύτταρα και δεν μεθυλιώνονται στο σπέρμα, εκφράζονται μέσω του πατρικού



κληρονομικού αντιγράφου καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής. (Kaneda 2011)

Εικόνα 8: Μεθυλίωση και γονιδιωματική αποτύπωση (Y. Li et al. 2019)

Στα αρσενικά γαμετικά κύτταρα, τα αποτυπωμένα επιγενετικά μονοπάτια διαγράφονται και, όπως έχει ήδη αναφερθεί, η νέα μεθυλίωση του DNA στο σπέρμα συμβαίνει σε γονικά αποτυπωμένα γονίδια και σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες

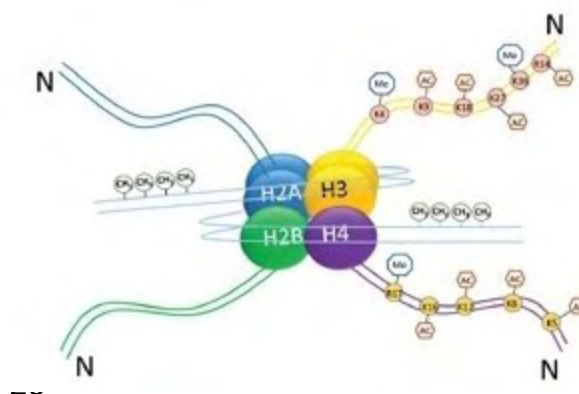
(σπερματογόνια και σπερματοκύτταρα τύπου A), πριν από την έναρξη της μείωσης. Η επαναμεθυλίωση πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο, ώστε όλα τα σπερματοζώαρια να διατηρούν τις σωστές πατρικές αποτυπώσεις, με τη δράση της DNMT3A και του συν-παράγοντα DNMT3L κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής. Στο στάδιο αυτό τα πρότυπα της μεθυλίωσης των γαμετικών κυττάρων διακρίνονται από αυτά των σωματικών κυττάρων και παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του άνδρα. (J. C. Chan, Nugent, and Bale 2018; Farhadova, Gomez-Velazquez, and Feil 2019; Jarred, Bildsoe, and Western 2018)

Στην περίπτωση των αποτυπωμένων γονιδίων και μόνο στην αρσενικά γαμετικά κύτταρα, ο επαναπρογραμματισμός αναγκάζει και τα δύο πατρικά μεθυλιωμένα αντίγραφα των γονιδίων να επαναμεθυλιωθούν πλήρως, ενώ τα μητρικά μεθυλιωμένα γονίδια θα παραμείνουν μη μεθυλιωμένα. (Kaneda 2011) Έχει αναφερθεί ότι μόνο ένας μικρός αριθμός γονιδίων έχει πατρική αποτύπωση, συμπεριλαμβανομένων των IGF2, H19, RASGRF1 και GTL2. Λόγω της δια βίου συντήρησης των μοτίβων της αποτύπωσης, οι μεταβολές στα πρότυπα της μεθυλίωσης σε αυτές τις περιοχές έχουν τη δυνατότητα να μεταδίδονται στους απογόνους, αφού επηρεάζουν την πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, τη λειτουργία του πλακούντα και έχουν αντίκτυπο στη συμπεριφορά και το μεταβολισμό. (Dent and Isles 2014; Kaneda 2011; Madon-Simon et al. 2014) Ταυτόχρονα, η δημιουργία κληρονομούμενων σημείων μεθυλιωμένης αποτύπωσης κατά τη διάρκεια της γαμετογένεσης είναι απαραίτητη και η ανώμαλη μεθυλίωση τους συνδέεται με τη στειρότητα και με χρόνιες διαταραχές. (Donkin and Barrès 2018; Laurentino, Borgmann, and Gromoll 2016)

2.2 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ

2.2a ΓΕΝΙΚΑ

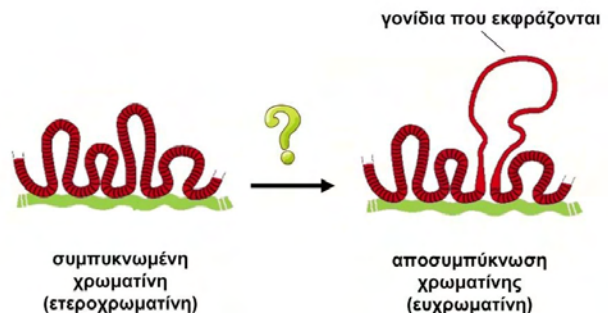
Οι ιστόνες H2A, H2B, H3, H4 είναι οι βασικότερες πρωτεΐνες που διευκολύνουν τη συσπείρωση του DNA σε νουκλεοσώματα, τα οποία αποτελούν τις βασικές μονάδες οργάνωσης της χρωματίνης (εικόνα 9). Οι ιστόνες είναι μικρές, πολύ



βασικές πρωτεΐνες με μη δομημένες αμινοτελικές και καρβοξυτελικές ουρές, οι οποίες φορτίζονται θετικά λόγω του ότι είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα, όπως αργινίνη και λυσίνη, γεγονός που διευκολύνει την αλληλεπίδραση με το αρνητικά φορτισμένο DNA. (Βαχτσεβάνου Α 2020; Chioccarelli et al. 2020; Dorman, Schmella, and Wesmiller 2017; Felsenfeld 2014) Γίνεται, λοιπόν, αντιληπτό ότι συγκεκριμένα αμινοξέα στα αμινικά άκρα των ιστονών υποβάλλονται σε μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, όπως ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση, σουμοϋλίωση και ουβικουιτίνωση υπό την δράση των ακετυλοτρανσφερασών των ιστονών, των αναστολέων των ακετυλασών, των μεθυλοτρανσφερασών και των απομεθυλασών. (Βαχτσεβάνου Α 2020; Felsenfeld 2014; Rodenhiser and Mann 2006) Τα ένζυμα των ακετυλασών προσθέτουν ακετυλομάδες στα κατάλοιπα της λυσίνης και πιστεύεται ότι οι ακετυλιωμένες ιστόνες έχουν μειωμένη συγγένεια με το DNA και τις ιστόνες, επιτρέποντας στην χρωματίνη να παραμείνει σε χαλαρή και μεταγραφικά ενεργή κατάσταση. (Gelato and Fischle 2008) Αντίθετα, οι αποακετυλάσες των ιστονών απομακρύνουν τις ακετυλομάδες, οι οποίες είναι πιο συμπυκνωμένες και αποτρέπουν την έκφραση του γονιδίου, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι η φωσφορυλίωση των ιστονών σχετίζεται με την ενεργοποίηση των γονιδίων. (Ausió et al. 2003; M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Η φωσφορυλίωση, η ουβικουιτίνωση και η σουμοϋλίωση των ιστονών λαμβάνουν χώρα, επίσης, σε κατάλοιπα λυσίνης, σερίνης, θρεονίνης και τυροσίνης. (Chioccarelli et al. 2020; Giaccone et al. 2019)

Τα τελευταία 12 χρόνια, ανακαλύφθηκαν τροποποιήσεις ιστονών, που ονομάζονται συλλογικά ακυλίωσεις και διαθέτουν μεταβλητά ηλεκτροστατικά και δομικά χαρακτηριστικά. Για παράδειγμα, η προπιοσυλίωση και η βουτυρυλίωση φέρουν μια επιπλέον ομάδα μεθυλίου ή αιθυλίου σε σύγκριση με την ακετυλίωση, ενώ η κροτοσυλίωση περιέχει έναν ακόρεστο δεσμό. Η κροτοσυλίωση, που προάγει τη μεταγραφική δραστηριότητα, καθώς ανοίγει τη δομή της χρωματίνης, και η αποκροτοσυλίωση ρυθμίζονται από την κροτοσυλίωση της ιστόνης και την αποκροτοσυλίωση, αντίστοιχα. (Chioccarelli et al. 2020; Crespo et al. 2020) Τέλος, η μαλονυλίωση, η σουκινυλίωση και η γλουταρυλίωση καταλήγουν σε ένα καρβοξυλικό οξύ και η υδροξυ-βουτυρυλίωση φέρει μια ομάδα OH, ενώ πιο πρόσφατα, το τοπίο των τροποποιήσεων των καταλοίπων της λυσίνης των ιστονών έχει διευρυνθεί περαιτέρω με την ταυτοποίηση της βενζοϋλίωσης και της γαλακτυλίωσης. (Crespo et al. 2020)

Οι τροποποιήσεις των ιστονών μπορεί να υπάρχουν σε μια, δυο ή και σε τρεις ιστόνες ταυτόχρονα. (Gatewood et al. 1990) Αυτές οι χημικές τροποποιήσεις μεταβάλλουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του DNA και των ιστονών, αλλάζοντας τον βαθμό αναδίπλωσης της χρωματίνης και της γονιδιακής δραστηριότητας. (Deobagkar and Chandra 2003) Στο άρθρο τους οι Νικολάου και Χουβαρδάς, το 2015, τονίζουν ότι ο ρόλος των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων σε επιγενετικό επίπεδο, αναδείχθηκε αρχικά στο



Εικόνα 10: Οι μορφές της χρωματίνης (Chromatin Remodeling 2020)

πλαίσιο της οργάνωσης του DNA σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη (εικόνα 10). Η παρατήρηση αυτή οδήγησε, στις αρχές της δεκαετίας του 2000, στη διατύπωση του "κώδικα των ιστονών", σύμφωνα με τον οποίο, διαφορετική μοριακή σήμανση των ιστονών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και, κατά συνέπεια, να προσδώσει διαφορετική προσβασιμότητα σε ρυθμιστικές πρωτεΐνες και μεταγραφικούς παράγοντες. (Νικολάου και Χουβαρδάς 2015)

Επομένως, αυτές οι τροποποιήσεις καθορίζουν αν το DNA που βρίσκεται τυλιγμένο γύρω από τις ιστόνες, είναι διαθέσιμο για μεταγραφή, καθώς και την ταχύτητά της. (Βαχτσεβάνου Α 2020) Συγκεκριμένες τροποποιήσεις, όπως η H3K4me3 τείνουν να συμβαίνουν σε υποκινητές και ενισχυτές, ενώ η μεθυλίωση σε άλλα κατάλοιπα της ίδιας ιστόνης, όπως η H3K27me3 και η H3K9me, σχετίζονται με κατασταλτική λειτουργία. (Νικολάου και Χουβαρδάς 2015; Fischle et al. 2003) Γενικά, οι τροποποιήσεις αυτές, στις οποίες αναφερόμαστε συχνά και ως "μοριακή σήμανση των ιστονών", είναι το αποτέλεσμα της ομοιοπολικής προσθήκης χημικών ομάδων σε συγκεκριμένα κατάλοιπα των διαφόρων πρωτεϊνών του οκταμερούς και ταυτόχρονα σε πολλά διαφορετικά κατάλοιπα κατά μήκος της ουράς τους. (Ho et al. 2017)

Συμβολίζονται με χαρακτηριστικό τρόπο που περιλαμβάνει:

1. το μόριο της ιστόνης που αφορά η σήμανση, για παράδειγμα H3, H4,

2. το κατάλοιπο στο οποίο συμβαίνει η τροποποίηση που συμβολίζεται με το αμινοξύ, ακολουθούμενο από έναν αριθμό που αντιστοιχεί στη θέση του στην πρωτοταγή αλληλουχία της ιστόνης, για παράδειγμα K4: λυσίνη-4, S12: σερίνη-12,
3. τη χημική ομάδα της προσθήκης, για παράδειγμα me-μεθυλίωση, ac-ακετυλίωση, rh-φωσφορυλίωση και
4. τον αριθμό των ομάδων της προσθήκης που μπορεί να ποικίλει ανάλογα με το είδος της ομάδας, για παράδειγμα me1: μονο-μεθυλίωση, me3: τρι-μεθυλίωση. (Νικολάου και Χουβαρδάς 2015)

Για παράδειγμα, η ακετυλίωση της λυσίνης 5 στην ιστόνη H4 οδηγεί στην τροποποιημένη ιστόνη H4K5ac, ενώ η μεθυλίωση της λυσίνης 4 ή 36 στην ιστόνη H3 οδηγεί στην H3K4me3 και H3K36me3, αντίστοιχα. (Gatewood et al. 1990)

2.2b ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Εκτός από τις κανονικές παραλλαγές των ιστονών, υπάρχει μια ειδικά για τους όρχεις, η ιστόνη tH2B. (M. B. Shamsi, Kumar, and Dada 2011) Όταν το σπερματοζωάριο εισέρχεται στο ωοκύτταρο, η περιτυρητική πρωτεΐνη theca παραμένει συνδεδεμένη και περιέχει την εξωπυρηνική ιστόνη H2B. Οι περιτυρητικές αυτές πρωτεΐνες είναι πιθανό να ενσωματωθούν στον λειτουργικό πατρικό προπυρήνα και να θεωρηθεί επιγενετική συμβολή του σπερματοζωαρίου στο έμβρυο. (Aul and Oko 2001; Yamauchi, Shaman, and Ward 2011)

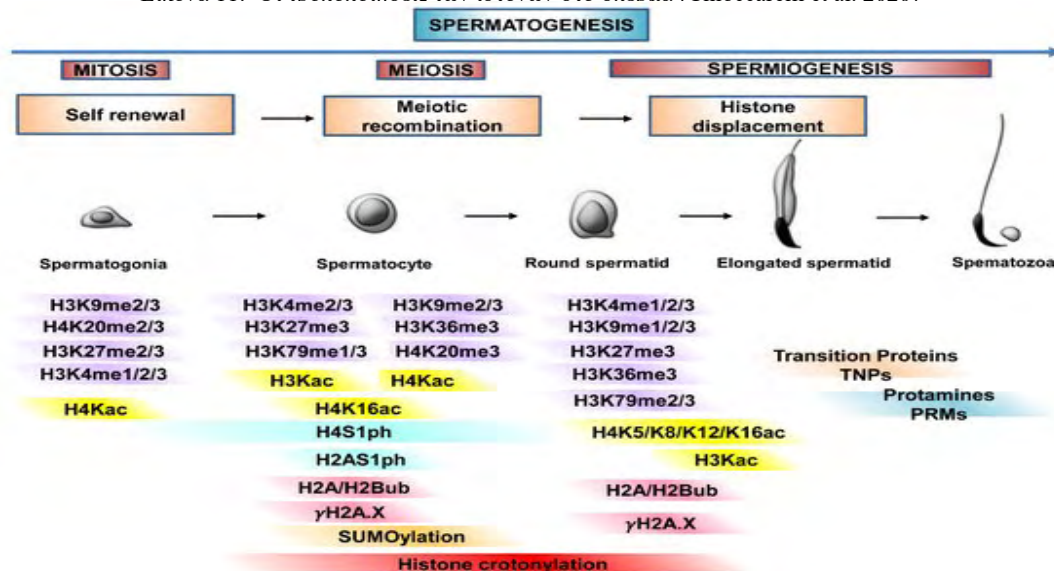
Η ανάλυση του επιπέδου πακεταρίσματος της χρωματίνης σε συνδυασμό με την ανίχνευση του σήματος της H4K12ac φανερώνει ότι τα νουκλεοσώματα δεν συγκρατούνται τυχαία, αλλά εντοπίζονται σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις στο σπέρμα, όπως οι απομακρυσμένες διαγονιδιακές και ενδογονιδιακές περιοχές, αλλά και τα αποτυπωμένα γονίδια. (Donkin and Barrès 2018; Gold, Jung, and Corces 2018) Επιπλέον, άλλες μελέτες αποκάλυψαν ότι το 7,5% των ιστονών που υπάρχουν σε ανθρώπινα διπλοειδή σωματικά κύτταρα διατηρούνται στους πυρήνες του σπέρματος. (Gold, Jung, and Corces 2018)

Τα αποτελέσματα από πειράματα ανάλυσης υποδηλώνουν ότι οι ιστόνες του σπέρματος που βρίσκονται στην περιοχή του υποκινητή ενός γονιδίου φέρουν μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις, συνέπεια της μεταγραφικής κατάστασης του προηγούμενου σταδίου ωρίμανσης των σπερματοζωαρίων. Οι τροποποιήσεις των ιστονών στην περιοχή των υποκινητών των γονιδίων μπορεί να είναι ενεργές,

κατασταλτικές ή δισθενείς. Περίπου το 60% των υποκινητών των γονιδίων του σπέρματος βρίσκονται σε ενεργή επιγενετική κατάσταση. Έχει αποδειχθεί ότι το 28% των υποκινητών των γονιδίων στο σπέρμα που περιέχουν την ιστόνη H3K27me3 έχουν, επίσης, και την ιστόνη H3K4me2, δισθενή σηματοδότηση ενδεικτική μιας ισορροπημένης κατάστασης του υποκινητή. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των εμβρύων, όπως HOX, SOX, FOX, TBX, PAX, CDX και GATA, είναι αυτοί των οποίων οι υποκινητές διαθέτουν αυτή τη δισθενή σηματοδότηση. Ίσως αυτές οι τροποποιήσεις των ιστονών να περιέχουν επιγενετικές πληροφορίες που επηρεάζουν τη μεταγραφή στο πρώιμο έμβryo. (Gold, Jung, and Corces 2018; Ho et al. 2017)

Οι τροποποιήσεις των ιστονών ρυθμίζουν την εξέλιξη των γαμετικών κυττάρων από σπερματογόνια σε σπερματοζωάρια, καθώς εμπλέκονται στη δυναμική οργάνωση της χρωματίνης κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, στη φάση της μείωσης και στη διαφοροποίησή τους (εικόνα 11). (Chioccarelli et al. 2020) Ειδικότερα, το επίπεδο της H3K4me κορυφώνεται στα σπερματογονικά βλαστικά κύτταρα και απαιτείται ώστε τα αρχέγονα κύτταρα να αρχίσουν τη διαφοροποίηση και να γίνουν σπερματοκύτταρα. Στη συνέχεια, μειώνεται κατά τη διάρκεια της μείωσης. Αντίθετα, τα επίπεδα των H3K9me και H3K27me αυξάνονται κατά τη μείωση, αλλά η απομάκρυνση της H3K9me στο τέλος της είναι απαραίτητη για

Εικόνα 11: Οι τροποποιήσεις των ιστονών στο σπέρμα (Chioccarelli et al. 2020)



έναρξη της σπερματογένεσης. (Sonnack et al. 2002)

Στην ανάπτυξη και την ωρίμανση του σπέρματος, οι περιοχές με τις ιστόνες H3K4me2 και H3K4me3 παραμένουν μη μεθυλιωμένες, ενώ η πλειονότητα των

νησίδων CpG μεθυλιώνονται. Όπως αναφέρουν οι Stewart et al., αυτό το μοτίβο μεθυλίωσης του DNA παρατηρείται στα σωματικά κύτταρα, αλλά παρατηρώντας το ίδιο αποτέλεσμα και στο σπέρμα παρέχονται ισχυρότερες ενδείξεις ότι η τροποποίηση των ιστονών σε αυτά τα στάδια αφορά την de novo DNA μεθυλίωση, η οποία κατευθύνεται από την κατανομή των ιστονών H3K4me2 και H3K4me3. (Stewart, Veselovska, and Kelsey 2016)

Έρευνες έχουν αποκαλύψει υψηλά επίπεδα των ιστονών H3K4me1, H3K9me1, H3K9me2, H3K27me3 και H4ac στο ανθρώπινο σπέρμα. Συγκεκριμένα, η μελέτη του υποκυτταρικού εντοπισμού τους στο ανθρώπινο σπέρμα δείχνει ότι οι ιστόνες H4ac και H3K27me3 υπάρχουν στον πυρήνα του σπέρματος και στο μεσαίο τμήμα των ουρών, ενώ η αλληλεπίδραση της πρώιμης έναρξης των ιστονών H3K4me3 και H3K36me3 προκαλεί μεταβολές στο προφίλ της μεθυλίωσής του. (Chioccarelli et al. 2020; Morselli et al. 2015) Ακόμη, κατά την ανάλυση σπερματοζωαρίων από ποντικούς και ανθρώπους με συμπυκνωμένους πυρήνες, τόσο η ιστόνη H4 όσο και η H4rh, φάνηκε ότι σχετίζεται με την ωρίμανση του πυρήνα των σπερματοζωαρίων. Η φωσφορυλίωση της ιστόνης H4S1 πιστεύεται, επίσης, ότι αποτελεί μέρος της ιστονικής αντικατάστασης και είναι μία από τις κοινές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. (Bao and Bedford 2016; Z. Zhang et al. 2020; Z. H. Zhang et al. 2016)

Επιπλέον, μετά τη γονιμοποίηση, το έμβρυο πρέπει να αναδιατάξει τις πατρικές περιοχές της ετεροχρωμίνης και της ευχρωματίνης στον προπυρήνα για να σχηματίσει ένα λειτουργικό εμβρυϊκό γονιδίωμα. Για τη σωστή ανάπτυξη, ο πατρικός προπυρήνας υπερακετυλιώνεται λίγο μετά τη γονιμοποίηση με ακετυλίωση των λυσινών 5 και 16 της ιστόνης H4 και των λυσινών 9, 14, 18 και 27 της ιστόνης H3. (Champroux et al. 2018) Τόσο η παρουσία των ακετυλιωμένων ιστονών στο μεταγραφικά αδρανές σπέρμα, όσο και η συσχέτιση τροποποιημένων ιστονών με αναπτυξιακά γονίδια υποδηλώνουν ότι οι τροποποιήσεις αυτές στο σπέρμα αντιπροσωπεύουν επιγενετικές υπογραφές που μεταδίδονται στο ωοκύτταρο και εμπλέκονται στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στο το πρώιμο έμβρυο. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012)

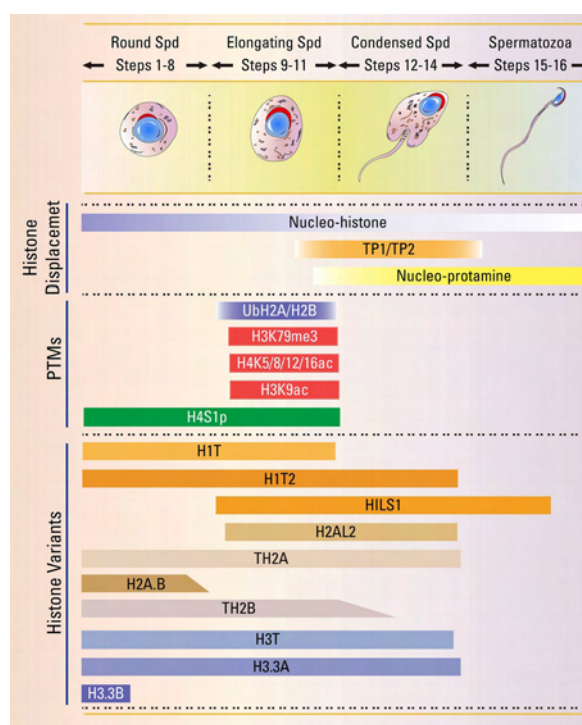
Επιπλέον, ο χρόνος εγκατάστασης και απομάκρυνσης της μεθυλίωσης είναι σημαντικός για τη σπερματογένεση, με τη μονομεθυλίωση, τη διμεθυλίωση και την τριμεθυλίωση των ιστονών H3K4, H3K9 και H3K27 να αποτελούν απαραίτητες προϋποθέσεις. (Godmann et al. 2007) Είναι ενδιαφέρον ότι τόσο η ειδικότητα της

θέσης όσο και ο αριθμός των μεθυλομάδων μπορούν να ρυθμίσουν την επιγενετική υπογραφή στο σπέρμα. Για παράδειγμα, η ιστόνη H3K4me συνήθως συνδέεται με ενεργά γονίδια, ενώ η ιστόνη H3K27me αφορά ανενεργά γονίδια. Ωστόσο, ανάλογα με την παρουσία άλλων τροποποιημένων ιστονών στην ίδια γονιδιακή περιοχή, η H3K4me μπορεί να δράσει ως καταστολέας και η H3K27me ως ενεργοποιητής. (Douglas T. Carrell and Hammoud 2009)

Σχετικά με τους υποκινητές των γονιδίων κατά τη σπερματογένεση, οι ιστόνες H3K4me2 και H3K4me3 έχει φανεί ότι εμφανίζουν μονοσθενή χαρακτήρα που ενεργεί αποκλειστικά ως ενεργοποιητής και καταστολέας της γονιδιακής έκφρασης, αντίστοιχα. Από αυτές τις παρατηρήσεις έχει προταθεί ότι η επιγενετική, στα κύτταρα των σπερματοζωαρίων, περιλαμβάνει δύο διαφορετικά στάδια. Το ένα στάδιο σχετίζεται με τη δημιουργία των σπερματοζωαρίων και περιλαμβάνει μεθυλωμένες ιστόνες με μονοσθενή χαρακτηριστικά και το άλλο αφορά στην εμβρυογένεση που περιλαμβάνει μεθυλωμένες ιστόνες με δισθενή χαρακτηριστικά. (Faure et al. 2003)

2.2c ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΙΣΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Εκτός από τη ρύθμιση της μεταγραφής ενός γονιδίου, οι τροποποιήσεις των ιστονών επηρεάζουν την αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και ελέγχουν την αντιγραφή, τον ανασυνδυασμό και την υψηλότερου επιπέδου οργάνωση των χρωμοσωμάτων. (Βαχτσεβάνου A 2020) Η δομή της χρωματίνης των σπερματοζωαρίων είναι όμοια με εκείνης των σωματικών κυττάρων μέχρι τη δεύτερη μειωτική διαίρεση, που οδηγεί τα σπερματοκύτταρα στο σχηματισμό των στρογγυλών σπερματίδων. (Νικολόπουλου 2017)



Εικόνα 12: Επιγενετικά γεγονότα κατά την αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. (Wang et al. 2019)

Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, η χρωματίνη των σπερματοζωαρίων ρυθμίζεται επιγενετικά, με αποτέλεσμα να συμπυκνώνεται το DNA στο ένα έκτο του αρχικού του όγκου. Αυτό το γεγονός προκαλείται από την σταδιακή αντικατάσταση του 85-95% των ιστονών από μικρότερες, πολύ βασικές, πλούσιες σε αργινίνη και κυστεΐνη νουκλεοπρωτεΐνες που ονομάζονται πρωταμίνες. Τα απλοειδή βλαστικά κύτταρα υφίστανται εκτεταμένες μορφολογικές αλλαγές και η αναδιοργάνωση της πυρηνικής χρωματίνης ξεκινά από τις στρογγυλές σπερματίδες έως και τον σχηματισμό των ώριμων σπερματοζωαρίων (εικόνα 12). (Colaco and Sakkas 2018; Donkin and Barrès 2018; T. Wang et al. 2019)

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι η ιστόνη H3K79me ανιχνεύεται αποκλειστικά στα επιμήκη σπερματοειδή που προηγούνται της αντικατάστασης των ιστονών από τις πρωταμίνες και, επίσης, σχετίζεται με την υπερ-ακετυλίωση της ιστόνης H4, η οποία είναι, κατά κύριο λόγο, υπεύθυνη για την αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες στα απλοειδή σπερματοειδή κύτταρα. (Bao and Bedford 2016; Sonnack et al. 2002) Ωστόσο, η βουτυρυλίωση είναι δυνατό να συμβεί ταυτόχρονα με την υπερακετυλίωση των ιστονών κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, αποτρέποντας την ακετυλίωση που εξαρτάται από την αφαίρεση της ιστόνης και, τελικά, καθυστερεί την αντικατάστασή της από τις πρωταμίνες, οδηγώντας στη ρύθμιση της συμπίεσης της χρωματίνης. (Barral et al. 2017; Gaucher et al. 2010; Goudarzi et al. 2016)

Η πρωταμινοποίηση είναι μια επιγενετική ρυθμιστική διαδικασία, ειδική για τα σπερματοζώαρια, κατά την οποία διευκολύνεται η συμπύκνωση του πυρήνα, και η οποία απαιτείται για την κινητικότητα του σπέρματος. (Rousseaux et al. 2009; N. Song et al. 2011) Η συγκέντρωση των παραγόντων που περιέχονται στο σπερματικό υγρό, όπως ο ψευδάργυρος, μπορεί να ρυθμίσει τον σχηματισμό των πρωταμινών και στη συνέχεια τη δομή της χρωματίνης με πολύ δυναμικό τρόπο, επιτρέποντας τον υψηλό βαθμό συμπύκνωσής της, με αποτέλεσμα την καθιέρωση μιας τρισδιάστατης δομής πολύ διαφορετική από αυτή των σωματικών κυττάρων, αλλά παρόμοια με αυτήν των εμβρυϊκών βλαστοκυττάρων. (Björndahl and Kvist 2003; Donkin and Barrès 2018; Gold, Jung, and Corces 2018) Η διαδικασία αυτή παίζει ζωτικό ρόλο στην ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και τα προστατεύει από φυσικούς ή χημικούς γονιδιοτοξικούς παράγοντες, εξασφαλίζοντας έτσι τη βέλτιστη γονιδιωματική ακεραιότητά του. (Sakkas et al. 2002; Z. H. Zhang et al. 2016)

Όταν οι ιστόνες υπερακετυλιώνονται, η συγγένεια τους με το DNA μειώνεται από την απώλεια του θετικού φορτίου τους, οδηγώντας σε μια πιο χαλαρή

διαμόρφωση της δομής της χρωματίνης και η οποία επιτρέπει την μεταγραφή. Παράλληλα, αυτή η χαλαρή διαμόρφωση της πρωτεΐνης και του DNA διεγείρει τη διάσπαση της διπλής έλικας του DNA από το ένζυμο τοποϊσομεράση. (Rousseaux et al. 2009; N. Song et al. 2011) Ακολουθεί η επισκευή του DNA, με σκοπό την αντικατάσταση των ειδικών για τους όρχεις υπερ-ακετυλιωμένων ιστονών, με τη βοήθεια των πυρηνικών πρωτεϊνών μετάβασης, TP1 και TP2, με τους δύο τύπους φωσφορυλιωμένων πρωταμινών, P1 και P2, στο στάδιο της επιμήκυνσης των σπερματοειδών. Έτσι, προκαλείται καθολική διακοπή της μεταγραφής των γονιδίων στο σπέρμα. (Balhorn 2018; Monis B. Shamsi, Simon, and Carrell 2017)

Η βαθμιαία αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες στο DNA του σπέρματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης σβήνει παθητικά τις επιγενετικές υπογραφές που μεταφέρθηκαν από τις αφαιρούμενες ιστόνες. Έτσι, η πρωταμινοποίηση συμμετέχει στον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό με τον ίδιο τρόπο όπως η απομεθυλίωση του DNA κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Το περιβάλλον επηρεάζει την τροποποίηση των ιστονών και την τοποθέτηση των πρωταμινών και ως εκ τούτου, μπορεί να αποτελεί μια επιγενετική επιρροή. (Ward 2009; Yamauchi et al. 2007) Θεωρείται ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις που δρουν στην ικανότητα της πρωταμινοποίησης των κυττάρων προετοιμάζουν το έμβρυο για το εξωτερικό περιβάλλον και του προσδίδουν ένα πλεονέκτημα επιβίωσης ρυθμίζοντας τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και οι οποίες εμπλέκονται στον ενεργειακό μεταβολισμό και την λιπογένεση. (Q. Gao et al. 2014)

Εκτεταμένη αναδιαμόρφωση της χρωματίνης εμφανίζεται, επίσης, στις ιστόνες κατά τον επαναπρογραμματισμό της βλαστικής σειράς. Κατά την αναδιαμόρφωσή της, στα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα εντοπίζεται η κατασταλτική τροποποίηση της ιστόνης H3K9me2. Ωστόσο, κατά τη μετανάστευση των γεννητικών κυττάρων, η ιστόνη αυτή αντικαθίσταται από μια άλλη ιστόνη με τροποποίηση που αφορά την κατασταλτική της κατάσταση, την H3K27me3. (Seki et al. 2005; Sekl et al. 2007) Επιπλέον απομάκρυνση ή αναδιοργάνωση των κατασταλτικών τροποποιήσεων των ιστονών, ή και τα δύο, συμβαίνει όταν τα ανθρώπινα γεννητικά κύτταρα εισέλθουν στην αναπτυσσόμενη γονάδα. (Hajkova et al. 2008; Prokorpuk et al. 2017; Sachs et al. 2013) Παρόλο που οι μηχανισμοί και η βιολογική σημασία αυτών των αλλαγών δεν έχουν ακόμη καθοριστεί, η ιστόνη H3K27me3 έχει βρεθεί σε γονίδια που αφορούν την ανάπτυξη του σπέρματος, γεγονός που υποδεικνύει τον σημαντικό ρόλο αυτής

της τροποποίησης στην πατρική βλαστική γραμμή και, ενδεχομένως, στους απογόνους. (Lesch et al. 2013; Sachs et al. 2013)

2.3 ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs

2.3a ΓΕΝΙΚΑ

Μεταξύ των φορέων των πληροφοριών που είναι δυνητικά υπεύθυνοι για τη μετάδοση των μη γενετικών πληροφοριών μεταξύ των γενεών, σημαντική προσοχή έχει επικεντρωθεί σε ρυθμιστικά RNAs που δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες (ncRNAs). Οι Chen et al., το 2016, επιβεβαίωσαν ότι πέρα από το πατρικό γονιδίωμα, τα σπερματοζώρια περιέχουν μη γενετικές πληροφορίες, ένα διαφορετικό πληθυσμό RNA, που μπορούν να μεταδοθούν στο έμβryo. (Q. Chen, Yan, and Duan 2016) Το σπέρμα περιλαμβάνει τα RNAs που αλληλεπιδρούν με τις πρωτεΐνες PIWI (piRNAs), τα microRNAs (miRNAs), τα πυρηνικά RNAs (snRNAs), τα ενδογενή μικρά παρεμβαλλόμενα RNA (ενδο-siRNA), το ριβοσωμικό RNA (rRNA) και τα μακρά μη κωδικοποιά RNAs (lncRNAs). (Castel and Martienssen 2013; Daxinger and Whitelaw 2012; Yan 2014)

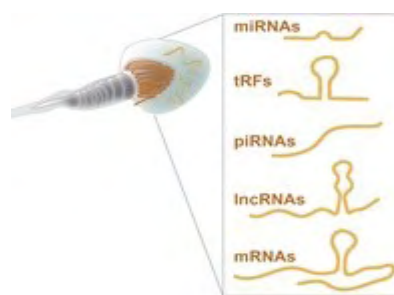
Τα snRNAs είναι μικρά μόρια που αποτελούνται από 20-24 νουκλεοτίδια με υψηλή πυκνότητα κωδικονίων τερματισμού και χωρίς εκτεταμένα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης, ενώ δρουν μέσω ατελούς σύζευξης με τις βάσεις στα 3'-5' άκρα ή με τις κωδικοποιητικές αλληλουχίες των mRNAs των γονιδίων στόχων τους. (Costa 2005; Hamatani 2012) Σε αντίθεση με τα γραμμικά RNAs, πρόσφατα ανακαλύφθηκαν και τα κυκλικά RNAs (circRNAs), τα οποία χαρακτηρίζονται από ομοιοπολικά κλειστές δομές συνεχούς βρόχου χωρίς 5' άκρα και 3' πολύ (A) ουρές. (A. Huang et al. 2020) Ακόμη, φάνηκε ότι ρυθμίζουν την έκφραση του γονιδίου στόχου μέσω αλληλεπίδρασης με τα miRNAs και εμφανίζουν ειδικότητα για ιστούς και στάδια ανάπτυξης. (Yang et al. 2016)

Ειδικότερα, τα μικρά RNAs (miRNAs) ανακαλύφθηκαν το 1990, όμως οι λειτουργίες τους δεν κατανοήθηκαν πριν από το 2.000. (Ζαφρανάς και Ζαφρανάς 2015) Λειτουργούν ως επιγενετικοί ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης, είτε μέσω του μηχανισμού της μετάφρασης, είτε προκαλώντας αποδόμηση των συμπληρωματικών στόχων των mRNAs. (G. D. Johnson et al. 2011) Το ανθρώπινο γονιδίωμα περιέχει πάνω από χίλια είδη miRNAs, που έχουν «στοχοποιημένο» πάνω

από το 60% των γονιδίων και περίπου τα μισά από αυτά βρίσκονται εντός των ιντρονίων των γονιδίων και δεν μεταγράφονται. (Ζαφρανάς and Ζαφρανάς 2015) Τα miRNAs υπάρχουν κατά την πρώιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, όπου ρυθμίζουν διάφορες βιολογικές λειτουργίες, επηρεάζοντας την επιγενετική απενεργοποίηση κάποιων γονιδίων και την προστασία του DNA από ιούς και τρανσποζόνια. (Hamatani 2012; Luteijn and Ketting 2013)

2.3b ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΟΠΟΙΗΤΙΚΑ RNAs ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Οι Zhao et al. ανέφεραν ότι περίπου 4.000 διαφορετικά αντίγραφα RNAs ανιχνεύθηκαν στο ώριμο σπέρμα (εικόνα 13). (Zhao et al. 2006) Είναι αξιοσημείωτο ότι ο μισός πληθυσμός των RNAs που υπάρχει στο σπέρμα είναι μοναδικός σε ορισμένα άτομα. (Hammoud et al. 2009; Timothy G. Jenkins and Carrell 2011) Λόγω της συμπαγούς μορφής της χρωματίνης του σπέρματος, πιστεύεται ότι το RNA του δεν είναι λειτουργικό και δεν μπορεί να μεταγραφεί από το πυρηνικό DNA, καθώς είναι κατάλοιπα της γονιδιακής έκφρασης κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. (Curry, Safranski, and Pratt 2011; Yan et al. 2008) Είναι, πλέον, σαφές ότι, τα υπόλοιπα αντίγραφα διατηρούνται επιλεκτικά και υπάρχουν κάποιες ενδείξεις μεταγραφικής δραστηριότητας στα σπερματοζώαρια, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα RNAs που μεταδίδονται μέσω του σπέρματος είναι λειτουργικά και μπορεί να προέρχονται από τα αποτυπωμένα γονίδια σε μη μεθυλιωμένες ιστόνες. (Giacone et al. 2019; Ostermeier et al. 2004)



Εικόνα 13: Τα μη κωδικοποιητικά RNAs (K. Gapp and Bohacek 2018)

Είναι ενδιαφέρον ότι, στο σπέρμα, τα RNAs μπορούν να εντοπιστούν στην πλασματική μεμβράνη, στο ακρόσωμα και τις σχετικές μεμβράνες, στον πυρήνα, στον πυρηνικό φάκελο, στην περιπυρηνική θέκα και στα μιτοχόνδρια. Τα περισσότερα mRNAs και rRNAs συνδέονται με την εξωτερική μεμβράνη του σπέρματος, ενώ τα tRNAs και τα miRNAs εμφανίζονται ενσωματωμένα στον πυρηνικό φάκελο. (Graham D. Johnson et al. 2015; Yan et al. 2008) Η ουρά του σπέρματος είναι, επίσης, πλούσια σε tRNAs, miRNAs και piRNAs. Η παραγωγή τους συμβαίνει, αρχικά, κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. (Sharma et al. 2016)

Ακόμη, η ανάλυση των γαμετικών κυττάρων ταυτοποίησε την παρουσία των miRNAs σε όλα τα στάδια διαφοροποίησής τους, συμπεριλαμβανομένων των πυρήνων των σπερματοζωαρίων. Με τον τρόπο αυτό το DNA διατηρείται συνδεδεμένο με τις ιστόνες κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. (Hamatani 2012) Ενδεικτικά, αναφέρεται ότι το miR122a παρατηρείται σε αυξημένη ποσότητα στα αρσενικά βλαστικά κύτταρα και το miR146 εμπλέκεται στη σπερματογένεση και ρυθμίζεται κατά τη διάρκεια της σπερματογονικής διαφοροποίησης. (Huszar and Payne 2013; T. Liu et al. 2013) Ακόμη, ένας υπότυπος miRNA, γνωστό ως επι-miRNA έχει αποδειχθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της έκφρασης των DNMT1, DNMT3a και DNMT3b, καθώς και στην ακετυλίωση και μεθυλίωση των ιστονών στο σπέρμα. (Brykczynska et al. 2010; Osella et al. 2014)

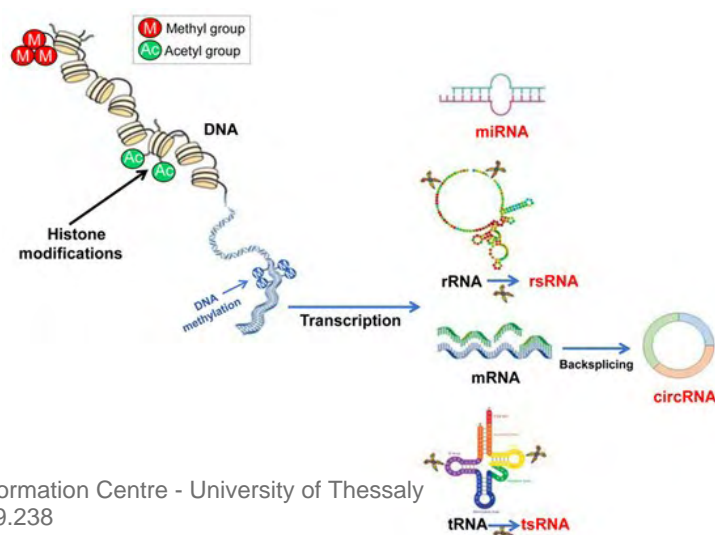
Σημαντικός είναι και ο ρόλος των ncRNAs στην αποσιώπηση της χρωματινής σε αρκετές αποτυπωμένες περιοχές, όπως το Air-ncRNA, το οποίο έχει αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός παράγοντας για την πατρική αποσιώπηση των γονιδίων Igf2r, Slc22a2 και Slc22a3. Μια παρόμοια αναφορά έχει γίνει για το γονίδιο Kcnq1ot1, το οποίο βρίσκεται εντός ενός ιντρονίου του γονιδίου KCNQ1. (Sleutels, Zwart, and Barlow 2002) Παράλληλα, η μοναδική ακολουθία τους διασφαλίζει την επιλεκτικότητα της θέσης της de novo επιγενετικής αποσιώπησης. (Saito and Siomi 2010)

Άλλα σημαντικά μόρια που ανήκουν στα sncRNAs και πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην επιγενετική κληρονομικότητα είναι τα θραύσματα tRNAs ή tRFs. Αποτελούνται από 10-45 νουκλεοτίδια και προέρχονται, κυρίως, από το 5' άκρο είτε του ώριμου tRNA, είτε του προ-tRNA. Ένας ρόλος των tRFs στο σπέρμα προτάθηκε από την παρατήρηση ότι τα tRFs συμμετέχουν στη σύνθεση των piRNAs σε γαμέτες ποντικών και ζυγωτών. (García-López et al. 2014) Στον άνθρωπο, τα piRNAs, που εμπλέκονται στην ωρίμανση του σπέρματος, είναι μια αλληλουχία 30 νουκλεοτιδίων που αλληλεπιδρούν με τις λεγόμενες πρωτεΐνες Piwi. (Conine et al. 2018; Xiao et al. 2018) Το σύμπλεγμα Piwi - piRNA επιφέρει την αποσιώπηση των γονιδίων στον αρσενικό γαμέτη, ενώ κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, οι πρωτεΐνες Piwi φαίνεται να μεσολαβούν στην ανταλλαγή των ιστονών από τις πρωταμίνες. (Siomi et al. 2011) Η αύξηση των μετάγραφων των πρωτεϊνών PIWIL στο σπέρμα συσχετίστηκε με τη μεταγραφή των δεικτών που σχετίζονται με τη βιογένεση των piRNAs στο έμβρυο, όπως τα TDRD και HENMT1. (Fernandes et al. 2018)

Επιπρόσθετα, τα piRNAs είναι υπεύθυνα για την αποσιώπηση των τρανσποζονίων στα γαμετικά κύτταρα των θηλαστικών και την καθιέρωση της ειδικής αλληλουχίας κατά τη μεθυλίωση του DNA του πατρικού αποτυπώματος κατά τον επαναπρογραμματισμό της γαμετικής σειράς στα ποντίκια. (Saito and Siomi 2010; Watanabe et al. 2011) Στους ανθρώπους, τα piRNAs, ακολουθούμενα από tRNAs και miRNAs, αποτελούν τις πιο άφθονες υποομάδες ncRNAs στο περιεχόμενο των πλήρως ώριμων σπερματοζωαρίων. (Donkin et al. 2016; Krawetz et al. 2011a) Αυτή η σύνθεση αλλάζει, ωστόσο, καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσής τους, με τα piRNAs να αυξάνονται κατά τις πρώτες διεργασίες της σπερματογένεσης και στη συνέχεια μειώνονται, ενώ τα tRNAs αυξάνονται καθώς προχωρά η ωρίμανση. (Q. Chen et al. 2016)

Επιπλέον, τα miRNAs σχεδόν ταυτίζονται με τα siRNAs. (Ζαφρανάς και Ζαφρανάς 2015) Πρόσφατα, ένας αριθμός siRNAs ταυτοποιήθηκε σε αρσενικά γαμετικά κύτταρα ποντικού. (R. Song et al. 2011) Ένα από τα αυτά, το Miwi, φάνηκε ότι κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που εκφράζεται ειδικά στα σπερματοκύτταρα και στα σπερματοειδή. (Grivna et al. 2006) Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι τα νοκ-άουτ ποντίκια Miwi διακόπτουν την ωρίμανση των στρογγυλών σπερματίδων. (Deng and Lin 2002) Έχει αποδειχθεί ότι τα mRNAs, τα piRNAs και τα siRNAs, μπορούν να χρησιμεύσουν ως «οδηγοί αλληλουχίας» με σκοπό να κατευθύνουν τη μεθυλίωση του DNA ή την τροποποίηση της χρωματίνης και των ιστονών και να στοχεύσουν σε συγκεκριμένους γονιδιακούς τόπους. (Ozcan et al. 2015; Yan 2014)

Ως μια νέα κατηγορία ncRNA, τα circRNAs βρίσκονται στο επίκεντρο του ερευνητικού πεδίου (εικόνα 14). Σε μια μεταγραφική ανάλυση των αναπαραγωγικών κυττάρων των ποντικών, οι Li et al. ανακάλυψαν 18.822 circRNAs, εκ των οποίων τα 245 εντοπίστηκαν αποκλειστικά σε άνδρες. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι τα γονίδια αυτών των circRNAs συμμετείχαν στη διαφοροποίηση των αναπαραγωγικών βλαστικών κυττάρων και στον προσδιορισμό του φύλου. Επιπλέον, οι Dong et al.



επιβεβαίωσαν τη σταθερή παρουσία 15.996 circRNAs στο σπέρμα, αποδεικνύοντας τη σχέση μεταξύ των γονιδίων και της σπερματογένεσης, της κινητικότητας του σπέρματος και της γονιμοποίησης. (W. W. Dong et al. 2016; X. Li, Ao, and Wu 2017)

Τέλος, τα μακρά μη κωδικοποιητικά RNAs αυξάνουν την γονιδιακή έκφραση με τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων, μειώνουν την έκφραση των γονιδίων συμπυκνώνοντας τη δομή της χρωματίνης και αλλάζουν τη γονιδιακή έκφραση μεταβάλλοντας τη μεταγραφή. (Dey, Mueller, and Dutta 2014) Φάνηκε ότι υπάρχουν, επίσης, στο σπέρμα και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη γονιδιωματική αποτύπωση. (K. Gapp and Bohacek 2018)

Οι Stephen Krawetz et al., ανακάλυψαν ότι αυτά τα πολλά είδη RNAs που υπάρχουν στο σπέρμα των θηλαστικών μπορούν να μεταφερθούν στα ωοκύτταρα μετά τη γονιμοποίηση. (Krawetz et al. 2011a) Ακόμη μια επιβεβαίωση αυτού προηγήθηκε το 2004, από την επιστημονική ομάδα του Ostermeier, οι οποίοι

Εικόνα 14: Τα κυκλικά RNAs – Μια σχηματική άποψη των κύριων επιγενετικών διεργασιών. (Chioccarelli et al. 2020)

κατέδειξαν την αποτελεσματική μεταφορά του πατρικού RNA στο ωοκύτταρο μαζί με τη χρωματίνη του σπέρματος. Το ανθρώπινο σπέρμα φάνηκε να περιέχει μια περίπλοκη σύνθεση RNAs και να υποβάλλεται σε πλήρη επεξεργασία των 3' πολυ-A-ουρών και με την αφαίρεση των ιντρονίων. Η ίδια ομάδα έδειξε, επίσης, ότι τα πατρικώς προερχόμενα RNAs παραμένουν χωρίς επεξεργασία για 3 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και μερικά, ενώ υπάρχουν στο σπέρμα, απουσιάζουν από τα ωοκύτταρα μετά τη γονιμοποίηση. (Ostermeier et al. 2004)

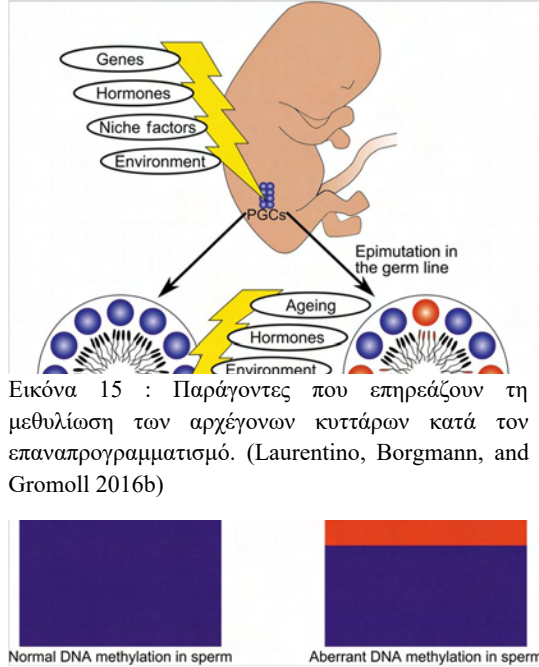
Έπειτα ακολούθησε από τους Mino Rassoulzadegan et al. η ανακάλυψη ότι η ένεση με RNA, το οποίο συλλέγεται από το σπέρμα ή τον ιστό του σώματος διαγονιδιακών ποντικών, σε ζυγωτά, μπορεί να επιδρά στην υγεία και την ανάπτυξη των απογόνων και να μεταφέρει σύνθετους φαινοτύπους σε επόμενες γενιές. (Rassoulzadegan et al. 2006) Στη συνέχεια, διαφορετικά εργαστήρια αναγνώρισαν ότι τα RNAs του σπέρματος μπορούν να αλλάξουν ως απόκριση στις εμπειρίες της ζωής. (Fullston et al. 2013; Gapp et al. 2014; Rodgers et al. 2013) Είναι πιθανό ότι διάφορες κατηγορίες RNAs του σπέρματος μεσολαβούν σε μεμονωμένα χαρακτηριστικά ενός πολύπλοκου φαινοτύπου, για παράδειγμα στην ανοχή στη γλυκόζη έναντι γνωστικών διαταραχών. (Gapp et al. 2014) Γενικά, όσον αφορά στις λειτουργίες του RNA του

σπέρματος οι μελέτες σε ζώα και σε ανθρώπους αποκαλύπτουν τρεις βασικούς ρόλους: την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων στην επιδιδυμίδα, τη μετάδοση του γονικού φαινοτύπου και την ανάπτυξη των εμβρύων. (Q. Chen, Yan, and Duan 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΥΜΒΟΛΗ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΣΤΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

3.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Η ατελής απομεθυλίωση του DNA των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων, κατά τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό, ανοίγει ένα βιολογικό χρονικό παράθυρο, επιτρέποντας τη μεταφορά των περιβαλλοντικών επιδράσεων από τη μία γενιά στην άλλη. (Donkin and Barrès 2018; Tang et al. 2018) Αυτό μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση μεταλλάξεων ή να μεταβάλει τις παραμέτρους του σπέρματος, το οποίο εμφανίζει παρεκκλίνουσες μορφές μεθυλίωσης του DNA κατά την εκσπερμάτωση (εικόνα 15). (Laurentino, Borgmann, and Gromoll 2016) Αρκετά γονίδια σταματούν τις δυο φάσεις της απομεθυλίωσης και του επιγενετικού επαναπρογραμματισμού, για παράδειγμα τα αποτυπωμένα γονίδια, οι επαναλαμβανόμενες περιοχές του γονιδιώματος, καθώς και τα γονίδια που σχετίζονται με την παχυσαρκία, τον καρκίνο και τις παθήσεις του εντέρου. Τέλος, στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται και τα γονίδια που εκφράζονται στον εγκέφαλο και ελέγχουν τη λειτουργία του και τη νευρική ανάπτυξη. (Donkin and Barrès 2018; Tang et al. 2018) Θεωρητικά, οι μεταλλαγές σε αυτά τα γονίδια δεν επιδιορθώνονται και μπορούν να αποτελέσουν ένα πιθανό μέσο για την επίτευξη της επιγενετικής κληρονομικότητας. (Kläver et al. 2015; Wei, Schatten, and Sun 2015)



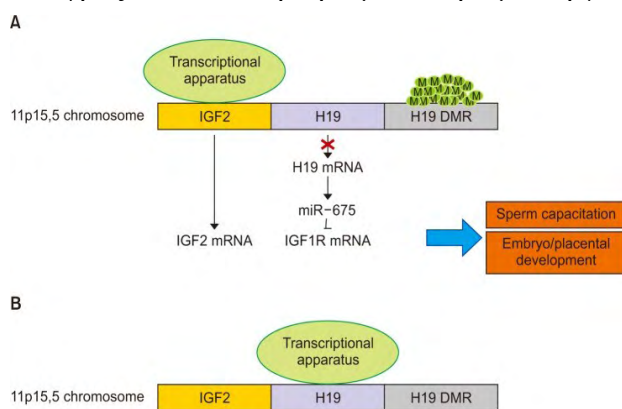
Εικόνα 15 : Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεθυλίωση των αρχέγονων κυττάρων κατά τον επαναπρογραμματισμό. (Laurentino, Borgmann, and Gromoll 2016b)

Τα γονίδια που αποτρέπουν την απομεθυλίωση έχουν επιβεβαιωθεί σε ανθρώπινα γαμετικά κύτταρα και αποτελούν κρίσιμα σημεία της γενετικής αποτύπωσης στην φυσιολογική ανάπτυξη. Και αυτό συμβαίνει διότι τα λάθη στα αποτυπωμένα γονίδια μπορούν να οδηγήσουν σε νευροαναπτυξιακές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένων των συνδρόμων Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi, Silver-Russell, Albright, Angelman και του όγκου του Wilms. (Kaneda 2011) Επίσης, οι ανωμαλίες της αποτύπωσης, έχει αποδειχθεί, ότι προκαλούν νευρο-συμπεριφορικές διαταραχές, όπως αυτισμό, διπολική συναισθηματική διαταραχή και σχιζοφρένεια. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012)

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως η γενετική αποτύπωση προϋποθέτει τον χρονικό συγχρονισμό μεταξύ της απομεθυλίωσης του DNA, της δημιουργίας των επιγενετικών σημείων, της γονιμοποίησης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Επομένως, μπορεί να υποθεθεί ότι η εσφαλμένη ρύθμιση μιας ή περισσότερων από αυτές τις διαδικασίες θα μπορούσε να σχετίζεται με παθολογίες που αφορούν τη στειρότητα, τις δυσπλασίες στο πρώιμο έμβρυο, την υπολειπόμενη ή αυξημένη ανάπτυξη του εμβρύου, καθώς και τη διακοπή της ανάπτυξής του. (Chang et al. 2005; Gomes et al. 2007; Murrell et al. 2004)

Το αποτυπωμένο γονίδιο H19 έχει μελετηθεί ευρέως και φάνηκε ότι κωδικοποιεί ένα μη κωδικοποιητικό κυτταροπλασματικό RNA και εμπλέκεται στη μεταφορά και τη σύνθεση πρωτεϊνών. (Yonghui Zhang and Tycko 1992) Συγκεκριμένα, κωδικοποιεί το lncRNA H19 που στοχεύει το miR-675, το οποίο, με τη σειρά του, καταστέλλει τη μεταγραφή του γονιδίου IGF1R και με αυτόν τον τρόπο ρυθμίζει αρνητικά τον πολλαπλασιασμό των τροφοβλαστικών κυττάρων του ανθρώπινου πλακούντα. (W. L. Gao et al. 2012; Keniry et al. 2012) Για το λόγο αυτό, το γονίδιο H19 είναι το αποτυπωμένο γονίδιο που μελετήθηκε περισσότερο στην ανδρική υπογονιμότητα. (Brannan et al. 1990)

Έχει μέγεθος 2,7 kb και βρίσκεται στο χρωμόσωμα 11p15.5, ενώ περιλαμβάνει πέντε εξόνια και τέσσερα ιντρόνια. (Brannan et al. 1990) Στους ανθρώπους, εκφράζεται σε περιορισμένο αριθμό οργάνων κατά τη διάρκεια συγκεκριμένης



Εικόνα 16: Η πιθανή επίδραση της έκφρασης των γονιδίων H19 και IGF2 στην γονιμότητα των ανδρών. (Giacone et al. 2019)

περιόδου της εμβρυϊκής ζωής, ενώ η έκφρασή του σε ενήλικους ιστούς περιορίζεται σε σκελετικά και καρδιακά μυϊκά κύτταρα. (Yonghui Zhang and Tycko 1992)

Η πιθανή επίδραση της έκφρασης των γονιδίων H19 και IGF2 στην γονιμότητα των ανδρών, σύμφωνα με την εικόνα 16, φαίνεται να πραγματοποιείται με δυο τρόπους.

Πρώτον, στο πατρικό αλληλόμορφο σε υγιή γόνιμο άνδρα, η διαφορετική μεθυλίωση του γονιδίου H19 οδηγεί στην έκφραση του γονιδίου IGF2, ενώ η καταστολή της μεταγραφής του γονιδίου H19 αυξάνει την έκφραση του IGF1R. Και τα δυο μεταγγραφα, IGF2 και IGF1R, εμπλέκονται στην ωρίμαση των σπερματοζωαρίων, στην ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα. Δεύτερων, στους στείρους άνδρες, τα χαμηλά ποσοστά περιοχών με διαφορετική μεθυλίωση του γονιδίου H19, στο σπέρμα, οδηγούν σε καταστολή και των δυο γονιδίων, IGF2 και IGF1R, επηρεάζοντας έτσι αρνητικά την ικανότητα του σπέρματος, την ανάπτυξη του εμβρύου και του πλακούντα (εικόνα 16). (Giacone et al. 2019)

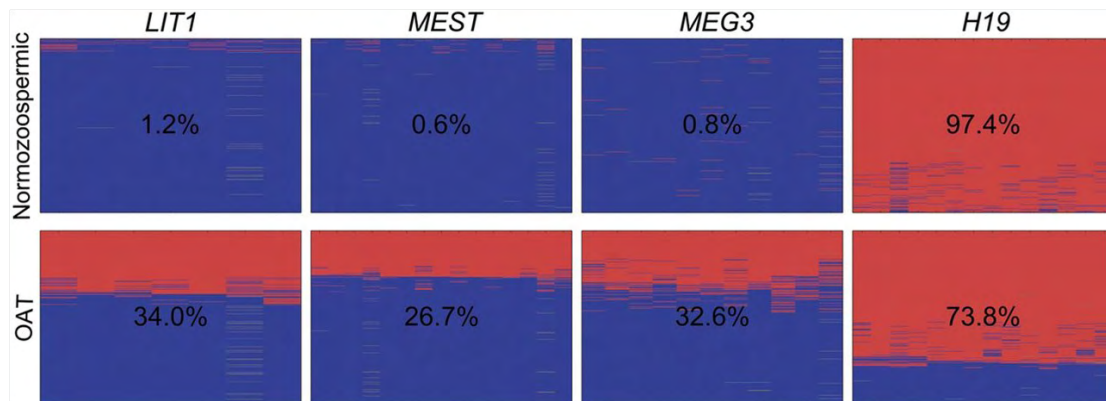
Όσον αφορά στην απομεθυλίωση του DNA και σύμφωνα με την ανασκόπηση των Laurentino et al., το 2016, η ανεπάρκεια των ενζύμων Tet1 και Tet2, στα ποντίκια, φάνηκε ότι προκαλεί μια ανωμαλία στη μεθυλίωση στα γονίδια αποτύπωσης H19, MEST, PEG3 και IGF2R. (Bermejo-Álvarez et al. 2015; Dawlaty et al. 2013) Επίσης, μια άλλη μελέτη επιβεβαιώνει ότι η μειωμένη μεθυλίωση του DNA του σπέρματος στα αποτυπωμένα γονίδια H19, MEG3, PEG1 και PEG3 έχει την ικανότητα να περάσει σε δύο γενιές, σε ένα μοντέλο ποντικών. (W. Z hang et al. 2019)

Οι Shamsi et al., στην ανασκόπησή τους το 2017, παρουσιάζουν μια μελέτη κοορτής, στην οποία σχεδόν το 50% των ολιγοζωοσπερμικών ανδρών εμφάνισαν ελαττωματική μεθυλίωση του DNA στο πατρικώς αποτυπωμένο γονίδιο H19 ή στο μητρικώς αποτυπωμένο γονίδιο MEST. (Marques et al. 2008) Λίγα χρόνια αργότερα,

οι Kläver και Gromoll επιβεβαίωσαν ότι η ανδρική υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται με, περίπου, εννέα φορές αυξημένο κίνδυνο παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA του πατρικού αλληλόμορφου στο γονίδιο H19 σε σύγκριση με τους μάρτυρες. (Gromoll and Kläver 2014) Πιο συγκεκριμένα, με τη μετα-αναλυτική τους προσέγγιση, οι Santi et al., το 2017, απέδειξαν ότι σχετίζεται με τη μειωμένη μεθυλίωσή του. (Santi et al. 2017)

Ένα χρόνο αργότερα, οι Sujit et al., εξέτασαν 6 γόνιμους και 6 υπογόνιμους άνδρες. Οι ερευνητές συσχέτισαν τα αποτυπωμένα γονίδια BCAN, CTNNA3, DLGAP2, GATA3, MAGI2 και TP73 με τα γονίδια SPATA5, SPATA7, SPATA16 και SPATA22 που σχετίζονται με τη σπερματογένεση και την υπογονιμότητα. Τα αποτελέσματά τους αποκάλυψαν ότι οι υπογόνιμοι άνδρες εμφάνιζαν 1.436 CpG νησίδες υπερμεθυλιωμένες και 244 νησίδες υπομεθυλιωμένες συγκριτικά με τους γόνιμους άνδρες. (Dam et al. 2007; Dorosh et al. 2013; Sujit et al. 2018; A. J. Tanaka et al. 2015)

Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί μειωμένη μεθυλίωση των αποτυπωμένων γονιδίων και σε στείρους άνδρες. (Giacone et al. 2019; Santi et al. 2017) Οι Laurentino et al., απέδειξαν ότι οι στείροι άντρες είναι πιο πιθανό να έχουν παρεκκλίνουσα μεθυλίωση στα γονίδια αποτύπωσης MEST ή H19, στο DNA του σπέρματος, σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες (εικόνα 17). (Laurentino, Borgmann, and Gromoll 2016) Σ' αυτό συναινούν οι Tang et al., οι οποίοι το 2018, αποκάλυψαν περιοχές διαφορετικής μεθυλίωσης στα τρία αποτυπωμένα γονίδια, H19, GNAS και DIRAS3, μεταξύ των γόνιμων και των στείρων ανδρών, ειδικά εκείνων με ολιγοζωοσπερμία. Πιο συγκεκριμένα, οι στείροι άνδρες εμφάνιζαν μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των CpG νησίδων του σπέρματος. (Tang et al. 2018)



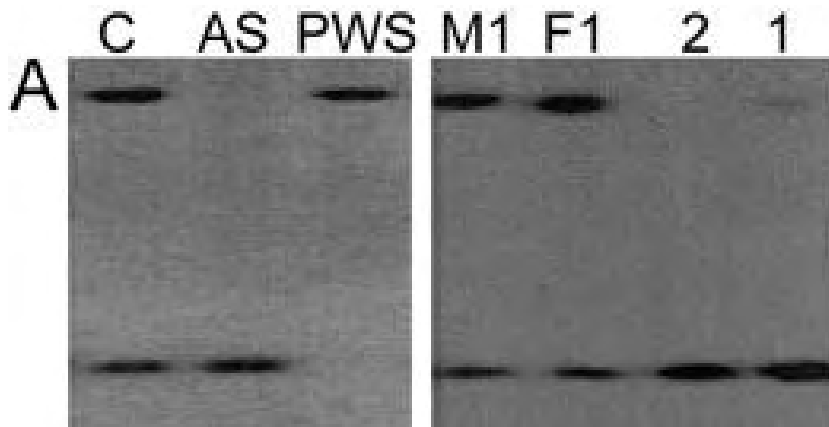
Εικόνα 17 - Αποτελέσματα από την αλληλούχηση των αποτυπωμένων γονιδίων KCNQ10T1 / LIT1, MEST, MEG3 και H19 σε νορμοζωοσπερμικούς και ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμικούς άνδρες με βάση τις παραμέτρους του σπέρματος. Κάθε κατακόρυφη θέση αντιπροσωπεύει μία νησίδα CpG και κάθε οριζόντια γραμμή αντιπροσωπεύει μια μοναδική ανάγνωση της αλληλουχίας. Η κόκκινη γραμμή υποδηλώνει ότι η τοποθεσία μεθυλιώθηκε και η μπλε γραμμή υποδηλώνει ότι ήταν μη μεθυλιωμένη. (Laurentino, Borgmann, and Gromoll 2016)

Εκτός από τα αποτυπωμένα γονίδια, μελέτες που διερευνούν τη μεθυλίωση σε ολόκληρο το γονιδίωμα έχουν εντοπίσει διαφορετικά προφίλ μεθυλίωσης στα γονίδια HSPA1L, HSPA1B, TYRO3, CGβ και FAM189A που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα. (Timothy G. Jenkins et al. 2016; Laqqan and Hammadeh 2018) Οι Laqqan and Hammadeh ανακάλυψαν μια σημαντική διαφορά στο επίπεδο της μεθυλίωσης μεταξύ των υπογόνιμων ανδρών και των μαρτύρων σε όλες τις CpG νησίδες στο γονίδιο TYRO3 και στη CpG1 του γονιδίου CGβ. Επιπλέον, διαφορετικά επίπεδα μεθυλίωσης βρέθηκαν στις CpG1 και CpG2 στο γονίδιο FAM189A1, όπου οι ερευνητές εντόπισαν μια ισχυρή συσχέτιση μεταξύ του επιπέδου της μεθυλίωσης στην CpG1 και των διαφορετικών τύπων κινητικότητας του σπέρματος. (Laqqan and Hammadeh 2018)

Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι η τροποποίηση της 5-μεθυλκυτοσίνης σε 5-υδροξυμεθυλοκυτοσίνη, στο σπέρμα, σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα. Σε αυτές τις αναφορές, οι στείροι άνδρες αποδείχθηκε ότι περιέχουν υψηλότερο ρυθμό μετατροπής της 5-μεθυλκυτοσίνης από ότι οι γόνιμοι άνδρες και η υπογονιμότητα που προκύπτει σχετίζεται με ελαττώματα στη μορφολογία του σπέρματος και με υψηλό ρυθμό κατακερματισμού του DNA του σπέρματος. (Efimova et al. 2017; Wang et al. 2015) Τέλος, οι Urdinguio et al., το 2015, εντόπισαν τα μειωμένα επίπεδα μεθυλίωσης των επαναλήψεων AluYb8 στο σπέρμα στείρων ανδρών. (Urdinguio et al. 2015)

Ακόμη μια παράμετρος που μπορεί να επηρεάσει την κανονική κατανομή των επιγενετικών υπογραφών πριν, κατά τη διάρκεια και μετά τη γονιμοποίηση σχετίζεται με τον *in vitro* χειρισμό των ανθρώπινων γαμετών και των εμβρύων στο στάδιο της προεμφύτευσης κατά τη χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αυτό συνεπάγεται την αποτύπωση σφαλμάτων, η οποία, με τη σειρά της, έχει ως αποτέλεσμα την επιγενετική αλλοίωση συγκεκριμένων γονιδίων και την απώλεια της έκφρασης των αποτυπωμένων γονιδίων με συγκεκριμένη γονική προέλευση. Σε παιδιά που έχουν συλληφθεί μέσω αυτών των τεχνικών, έχει τεκμηριωθεί αυξημένη συχνότητα διαταραχών σε αποτυπωμένα γονίδια. (Schagdarsurengin, Paradowska, and Steger 2012)

Για παράδειγμα, ένα ποσοστό 5-10% των σποραδικών περιπτώσεων με σύνδρομο Beckwith–Wiedemann εμφανίζουν υπερμεθυλίωση του γονιδίου H19 και ταυτόχρονη απώλεια αποτύπωσης του γονιδίου IGF2. (Gomes et al. 2007; Murrell et al. 2004) Άλλοι ερευνητές αναφέρουν τη δημιουργία δυο δίδυμων κοριτσιών, μέσω της ενδοκυτταροπλασματικής ένεσης σπέρματος, με σύνδρομο Silver – Russell, των οποίων το βάρος και το ύψος τους παρέμειναν σταθερά μικρότερα από την τρίτη εκατοστιαία θέση στις καμπύλες ανάπτυξης. Τα κορίτσια εμφάνιζαν ταυτόχρονη απώλεια της μεθυλίωσης στα πατρικώς αποτυπωμένα γονίδια H19 και IGF2. (Cocchi et al. 2013) Οι Poplinski et al. συνηγορούν στην παραπάνω άποψη, καθώς, ήδη από το 2010, εντόπισαν την παρεκκλίνουσα μεθυλίωση των γονιδίων MEST και IGF2/H19 σε υπογόνιμους άνδρες και υπέθεσαν ότι τα αρσενικά γαμετικά κύτταρα είναι μια πιθανή πηγή με παρεκκλίνουσα επιγενετική ιδιότητα σε παιδιά που συλλαμβάνονται μέσω των τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Οι ερευνητές συσχέτισαν την χαμηλή περιεκτικότητα του σπέρματος σε σπερματοζώαρια με την υπομεθυλίωση των γονιδίων IGF2 / H19 στο κέντρο ελέγχου 1 και με την, ταυτόχρονη, υπερμεθυλίωση του γονιδίου MEST. (Poplinski et al. 2010)



Επιπρόσθετα, οι Cox et al., μελέτησαν ένα 3χρονο κορίτσι, που προέκυψε μετά από ενδοκυτταροπλασματική ένεση σπέρματος λόγω ολιγοσπερμίας και μειωμένης κινητικότητας του σπέρματος του πατέρα. Το κορίτσι παραπέμφθηκε για αξιολόγηση της αναπτυξιακής καθυστέρησης, ιδιαίτερα στην ομιλία, και της υποτονίας. Εμφάνιζε, επίσης, ανισορροπία, διαταραχές ύπνου και υπερβολικά χαρούμενη προσωπικότητα,

Εικόνα 18: Μοριακή ανάλυση. Ένα φυσιολογικό άτομο ελέγχου (C) και οι γονείς του κοριτσιού (M1, μητέρα, F1, πατέρας) έχουν μεθυλιωμένη μητρική ταινία (κορυφή λωρίδας) και μη μεθυλιωμένη πατρική ταινία (κάτω μέρος λωρίδας) ίσης έντασης. Οι ασθενείς με σύνδρομο Angelman syndrome και Prader-Willi εμφανίζουν μόνο μία μη μεθυλιωμένη ή μεθυλιωμένη ταινία, αντίστοιχα. (Cox et al. 2002)

ενώ η ηλικία ανάπτυξής της αντιστοιχούσε σε 18 μήνες. Οι αναλύσεις τους έδειξαν ανώμαλο πρότυπο της μεθυλίωσης του χρωμοσώματος 15, που ελήφθη με στύπωμα Southern και με τη χρήση του ανιχνευτή SNRPN, αποκαλύπτοντας μια ισχυρή μη μεθυλιωμένη ταινία και μια αχνή μεθυλιωμένη ταινία και η οποία αντιστοιχούσε στο 10% της συνολικής έντασης στην πυκνομετρία (εικόνα 18). (Cox et al. 2002)

Οι Benchaib et al., περιγράφουν μια μελέτη στην οποία συμμετείχαν 63 άνδρες και των οποίων οι γυναίκες είχαν λάβει μέρος σε ένα πρόγραμμα εξωσωματικής γονιμοποίησης. Η υπερμεθυλίωση του DNA σε ολόκληρο το γονιδίωμα του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένων και των γονιδίων της αποτύπωσης, συσχετίστηκε με την αποτυχία της εγκυμοσύνης. (Benchaib et al. 2005) Επομένως, αποδεικνύεται ότι υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της μεθυλίωσης του DNA στα αποτυπωμένα γονίδια και των μη φυσιολογικών παραμέτρων του σπέρματος, ιδιαίτερα όσον αφορά στην ποσότητα, στην κινητικότητα και τη μορφολογία του. (Gromoll and Kläver 2014) Ακόμη, έπειτα από ανάλυση της μεθυλίωσης του DNA, σε περισσότερες από 485.000 θέσεις, στο γονιδίωμα του σπέρματος γόνιμων και μη γόνιμων ανδρών, τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι με τη χρήση της εξωσωματικής

γονιμοποίησης, τα πρότυπα της μεθυλίωσης στο σπέρμα των ανδρών θα μπορούσαν να προβλέψουν την εμφάνιση διαταραχών στο έμβρυο. (Aston et al. 2015)

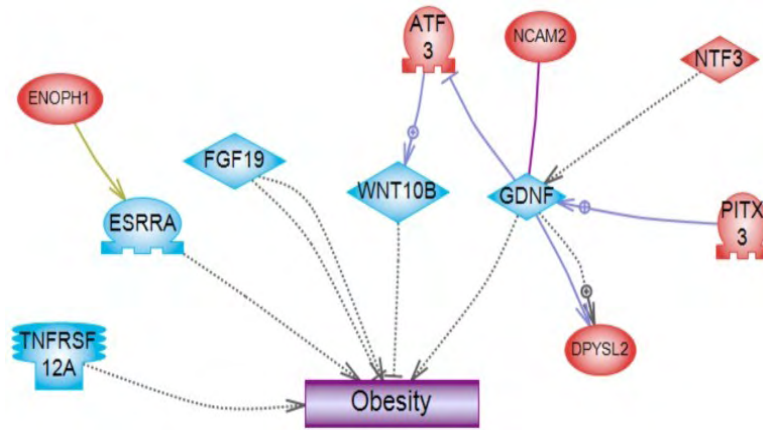
Έχει βρεθεί, ακόμη, ότι η ανεπάρκεια των ενζύμων DNMT3A ή DNMT3L οδηγεί σε ανεπαρκή μειωτική διαίρεση, σε απόπτωση σπερματοκυττάρων και σε στειρότητα, με συνοδή υπομεθυλίωση όλου του γονιδιώματος. (Bourc'his and Bestor 2004; Kaneda et al. 2004; Webster et al. 2005) Στην ανασκόπηση που πραγματοποίησαν οι Colaco και Sakkas, το 2018, αναφέρουν πως η υπερμεθυλίωση των υποκινητών CREM του σπέρματος, που οδηγεί σε μια ανώμαλη αναλογία των πρωταμιών P1/P2, έχει συσχετιστεί με την ατελή συμπίεση της χρωματίνης του σπέρματος, με την μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος και με την ανδρική υπογονιμότητα. (Nanassy et al. 2012)

Η ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα έχει, επίσης, συσχετιστεί με την υπερμεθυλίωση του υποκινητή των γονιδίων DAZL και MTHFR σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας. (Khazamipour et al. 2009; Navarro-Costa et al. 2010; W. Wu et al. 2010) Μια, επιπλέον, παράμετρος της ανδρικής υπογονιμότητας αφορά στην υπερμεθυλίωση των υποκινητών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, με άμεση συνέπεια την αποσιώπησή τους, και την ταυτόχρονη υπομεθυλίωση των ογκογονιδίων. Σαν αποτέλεσμα, οι επιγενετικές αυτές τροποποιήσεις αλλάζουν τη συμπεριφορά και τη λειτουργία των γαμετικών κυττάρων και την αποτύπωση του DNA και, επομένως, προκαλούν ογκογένεση των βλαστικών κυττάρων των όρχεων μέσω της μεθυλίωσης σε δινουκλεοτίδια CpH/CpA/ CpC/CpT. (Cheung et al. 2016; J. M. K. Ng and Yu 2015; Shen et al. 2018; Skotheim et al. 2002; Struhl 2014)

Επιδημιολογικά δεδομένα συσχετίζουν την έκθεση των ανδρών σε φθαλικές ενώσεις με τη χαμηλή ποιότητα του σπέρματος, με την κακή ποιότητα του εμβρύου και με το αυξημένο διάστημα για την επίτευξη μιας εγκυμοσύνης. Οι συγγραφείς περιγράφουν 50 ζευγάρια με θεραπεία εξωσωματικής γονιμοποίησης που συμμετέχουν στη Μελέτη Περιβαλλοντικής Επιγενετικής και Ανάπτυξης του Σπέρματος (SEEDS) και των οποίων τα ζυγωτά εμφάνισαν μειωμένη ποιότητα της βλαστοκύστης την 5^η ημέρα, χωρίς όμως να έχει επηρεαστεί η ποιότητα του βλατομεριδίου την 3^η ημέρα. Φάνηκε, λοιπόν, ότι οι φθαλικοί εστέρες μπορεί να επηρεάσουν τη μεθυλίωση του DNA του σπέρματος σε γονίδια ή κοντά σε γονίδια που σχετίζονται με την πρόιμη εμβρυογένεση. (H. Wu et al. 2017)

Από την άλλη πλευρά, οι Manikkam et al., μελέτησαν την έκθεση της εγκύου στις φθαλικές ενώσεις και την εμφάνιση παθήσεων στους άρρενες απογόνους.

Συμπέραναν, λοιπόν, ότι η υπερμεθυλίωση των γονιδίων *Tnfrsf12a*, *Esrra*, *Fgf19* και *Wnt10b* στο σπέρμα, που προκαλείται λόγω της έκθεσης των εγκύων στις φθαλικές ενώσεις, σχετίζονται με την έναρξη της παχυσαρκίας κατά την ενηλικίωση των αρρένων απογόνων την τρίτης γενιάς. Ταυτόχρονα, οι οδοί της κυτταρικής σηματοδότησης του νευροτροφικού παράγοντα (*Gdnf*) και της νευροτροφίνης 3



(*Ntf3*) φαίνεται ότι εμπλέκονται στο αναγνωρισμένο δίκτυο γονιδίων (εικόνα 19). (Manikkam, Tracey, et al. 2012)

Εικόνα 19: Γονίδια και σηματοδοτικά μονοπάτια που σχετίζονται με την εμφάνιση της παχυσαρκίας της τρίτης γενιάς απογόνων

Ακόμη ένα κρίσιμο παράθυρο ευαισθησίας χαρακτηρίζεται η περίοδος προσδιορισμού του

γονάδιου φύλου, με την επακόλουθη επαναμεθυλίωση του DNA να ξεκινά κατά την ωρίμανση των όρχεων. (Lees-Murdock and Walsh 2008; W. Reik, Dean, and Walter 2001; Rose et al. 2014) Έχει προταθεί ότι, οι διαφορικά μεθυλωμένες προγονικές περιοχές που προκαλούνται από την βινκλοζολίνη, σταματούν την απομεθυλίωση του DNA στο σπέρμα των απογόνων της γενιάς F3 και αντιπροσωπεύουν τη διαγενεακή επιγενετική κληρονομικότητα. (Iqbal et al. 2015; Manikkam et al. 2013) Σημαντική είναι και η παρατήρηση της αλλοιωμένης μεθυλίωσης του DNA του σπέρματος και σε μη αποτυπωμένα γονίδια στους όρχεις, που σχετίζονται με τη σπερματογένεση, μετά από προγονική έκθεση σε βινκλοζολίνη. (Skinner et al. 2019)

Επιπλέον, έχουν βρεθεί μεταβολές στη μεθυλίωση του DNA του αρσενικού αρχέγονου γαμετικού κυττάρου στη γενιά F3 ή F4, απόγονοι που προήλθαν από έγκυες γυναίκες οι οποίες εκτέθηκαν σε βινκλοζολίνη κατά τη διάρκεια της επαναμεθυλίωσης. Η μειωμένη μεθυλίωση των υποκινητών των γονιδίων *GPR33*, *KCNE2*, *ANXA1*, *OLR735*, *OLR1624*, *PARP-9*, *KCNG1*, *EEF1D* και *NMRAL1* βρέθηκε να σχετίζονται με την εμφάνιση παθήσεων στους απογόνους. Ειδικότερα, παρουσίασαν καρδική αρρυθμία, ταχυκαρδία, ογκογένεση γαστρεντερικού συστήματος και μειωμένη οσφρητική ικανότητα. (Guerrero-Bosagna et al. 2010) Οι αρσενικοί απόγονοι εμφάνισαν, επίσης, ογκογένεση των γεννητικών κυττάρων, με

την πρωτεΐνη Annexin V, του γονιδίου ANXA1, να παρουσιάζει αύξηση, στο σπέρμα των ποντικών που εκτέθηκαν σε βινκλοζολίνη κατά τη διάρκεια της κύησης, αφού βρέθηκε να μειώνεται η μεθυλίωσή του. (Elzeïnova et al. 2008) Η αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου συσχετίζεται με την ενίσχυση της επιθετικότητας του όγκου του προστάτη, μέσω της αύξησης της έκφρασης και της δραστηριότητας του γονιδίου IL-6. Είναι ενδιαφέρον ότι η βινκλοζολίνη βρέθηκε να προάγει τη διαγενετική κληρονομικότητα του προστάτη. (Inokuchi et al. 2009)

Ταυτόχρονα, ανιχνεύθηκαν αλλοιώσεις και στο ώριμο, μεθυλιωμένο, DNA του σπέρματος μετά από έκθεση σε μεθυλοχλωρίδιο, φυτοφάρμακα, πλαστικά χημικά, διοξίνη και υδρογονάνθρακες. (Manikkam, Guerrero-Bosagna, et al. 2012) Ειδικότερα, η έκθεση σε πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες μπορεί να οδηγήσει σε υπομεθυλίωση στους γονιδιακούς τόπους LINE-1, SINE-B1 και SINE-B2 στους όρχεις, με συνέπεια την ανδρική υπογονιμότητα. (Godschalk et al. 2015) Οι περιβαλλοντικοί ρύποι, συμπεριλαμβανομένου του αρσενικού, έχουν αναφερθεί ότι προκαλούν επιγενετικές αλλαγές και βλάβη στο DNA του σπέρματος. Στην ανασκόπηση που διεξήχθη από τους Singh και Du Mond, το 2007, επισημαίνεται ότι τόσο οι χαμηλές όσο και οι υψηλές συγκεντρώσεις αρσενικού οδήγησαν σε αλλαγές στην κατάσταση της μεθυλίωσης του DNA, με το χαμηλό επίπεδο περιβαλλοντικής έκθεσης να έχει, επίσης, βρεθεί ότι σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα. (Gunes et al. 2018) Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι η έκθεση σε αρσενικό προκαλεί υπομεθυλίωση του DNA σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα του προστάτη. (Benbrahim-Tallaa et al. 2005)

Τα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA του σπέρματος μεταβάλλονται ως απόκριση στην έκθεση του πατρικού στρες, όπως το άγχος λόγω του πρόωρου διαχωρισμού του βρέφους από τη μητέρα του και η ρύθμιση της αίσθησης του φόβου μέσω των οσμών. (Dias and Ressler 2014a) Έρευνες έχουν δείξει ότι η οσμή της ακετοφαινόνης από τον πατέρα προκάλεσε την υπομεθυλίωση των CpG νησίδων στον υποδοχέα του γονιδίου της ακετοφαινόνης, Olfr151, στο σπέρμα, επιγενετική απόκριση που εξυπηρετεί μια συγκεκριμένη φυσιολογική προσαρμογή. (Dias and Ressler 2014a; Donkin and Barrès 2018) Αυτό το γεγονός υποδηλώνει ότι η εμπειρία του άγχους μπορεί να παράγει απογόνους με συγκεκριμένες συμπεριφορικές αλλαγές, που αντιστοιχούν σε αυξημένη συμπεριφορική ευαισθησία των απογόνων στη σχετική οσμή. (Franklin et al. 2010)

Σε μια άλλη μελέτη, καταδεικνύεται ότι τα αρσενικά που εκτέθηκαν στο άγχος του πρόωρου μητρικού διαχωρισμού δημιούργησαν απογόνους με καταθλιπτικές συμπεριφορές. Οι αναλύσεις των ερευνητών αποκάλυψαν ότι η μεθυλίωση των CpG νησίδων στη θέση έναρξης της μεταγραφής των γονιδίων MeCP2 και CB1 αυξήθηκε στο σπέρμα της γενιάς F1, σε αντίθεση με το γονίδιο CRFR2, όπου μειώθηκε η μεθυλίωσή του. Αυτές οι αλλοιωμένες συμπεριφορές συσχετίστηκαν, επίσης, με αλλαγές στα πρότυπα της μεθυλίωσης του DNA σε τόπους που σχετίζονται με γονίδια ρύθμισης του στρες και με επιγενετικά μονοπάτια τόσο στο πατρικό γαμετικό κύτταρο, όσο και στον εγκέφαλο των απογόνων. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκαν τα προφίλ μεθυλίωσης του DNA των ίδιων γονιδίων στον εγκέφαλο των απογόνων της γενιάς F2 και αποκαλύφθηκαν τα πρότυπα που αναφέρθηκαν παραπάνω. (Franklin et al. 2010) Ωστόσο, πώς το άγχος προκαλεί τέτοια συγκεκριμένα σημεία μεθυλίωσης του σπέρματος και πώς αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν τον προγραμματισμό των ιστών στους ενήλικες απογόνους τους για την παραγωγή φαινοτύπων συμπεριφοράς δεν είναι, ακόμη, πλήρως γνωστοί. (Chan, Nugent, and Bale 2018)

Οι Roberts et al., επιβεβαιώνουν πως η παιδική κακοποίηση έχει συσχετιστεί με επιγενετικές υπογραφές στο ανθρώπινο αίμα, το σάλιο, τον εγκεφαλικό ιστό και το σπέρμα. Οι συγγραφείς ταυτοποίησαν 12 διαφορεικά μεθυλιωμένες περιοχές του DNA του σπέρματος, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων MAPT και CLU που σχετίζονται με τη νευρωνική λειτουργία, του γονιδίου SDK1 που αφορά στις ανοσολογικές λειτουργίες και του γονιδίου PRDM16, το οποίο ρυθμίζει τα λιποκύτταρα. Η διαπίστωση της συσχέτισης της μεθυλίωσης του σπέρματος μετά την κακοποίηση και της διαγενεακής κληρονομικότητας επιβεβαιώθηκε έπειτα από ενδελεχή εξέταση της σωματικής και της ψυχικής υγείας των ενηλίκων απογόνων, των οποίων η μητέρες συμμετείχαν στη Μελέτη Υγείας των Νοσηλευτών II, εγγράφηκαν το 1996 σε ηλικίες 9-14 ετών και παρακολουθούνταν ετησίως ή ανά δυο έτη. (Roberts et al. 2018)

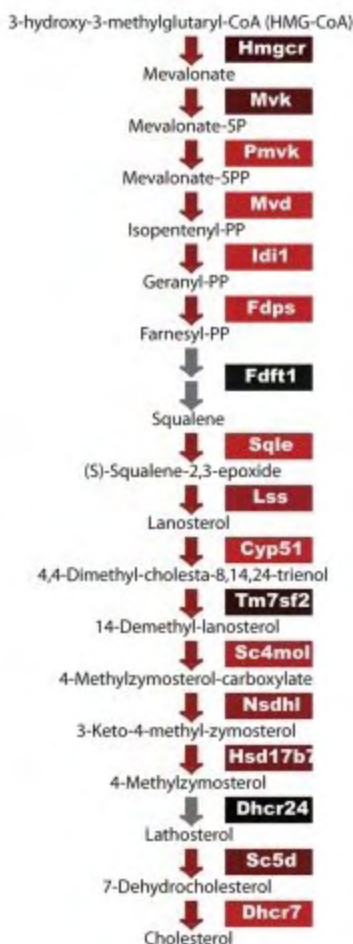
Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι το ψυχολογικό άγχος στους πατέρες διαταράσσει το μεταβολισμό των απογόνων, γεγονός που υποστηρίζει ότι διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα ενσωματώνονται σε μια μη ειδική, αλλά συνεπή, μεταβολική απόκριση στους απογόνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι πολλές διαγενεακές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στις μεταβολικές ενδείξεις στους απογόνους, όπως η ανοχή στη γλυκόζη και οι μεταβολές της γονιδιακής έκφρασης στα μεταβολικά όργανα. (Katharina Gapp et al. 2014) Ως παράδειγμα αναφέρεται ένα μοντέλο

ποντικού με διαβήτη τύπου 2, όπου τα σπερματοζώαρια μετέφεραν τη μεθυλίωση του DNA σε γονίδια που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης και τον διαβήτη τύπου 2. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με τους Wei et al., το 2014, επηρεάζονται τα γονίδια PIK3CA και PIK3R1 του μονοπατιού της ινσουλίνης, με τις μεταβολικές διαταραχές που παρατηρήθηκαν στις επόμενες γενιές να οφείλονται στην αυξημένη μεθυλίωση των συγκεκριμένων γονιδίων του σπέρματος. (Wei et al. 2014)

Στο άρθρο των Ornelas et al., το 2017, επιβεβαιώνεται το γεγονός ότι οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ζώα και σε ανθρώπους έχουν αποδείξει την επίδραση της πατρικής διατροφής στον φαινότυπο του απογόνου τους μέσω του επιγονιδιώματος. (Ornellas et al. 2017) Για παράδειγμα, τα αρσενικά ποντίκια που ακολούθησαν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά δημιούργησαν θηλυκούς απογόνους με μειωμένη ομοιόσταση γλυκόζης-ινσουλίνης, μια κατάσταση που σχετίζεται με την αλλοιωμένη έκφραση 642 γονιδίων στα νησίδα του παγκρέατος και τον υπομεθυλωμένο υποδοχέα του γονιδίου IL13RA2. (S. F. Ng et al. 2010) Ακόμη, σε νεογέννητα ποντικών, παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ της παχυσαρκίας των ανδρών, πριν τη σύλληψη, και της διαφορεικά μεθυλωμένης περιοχής του αποτυπωμένου γονιδίου IGF2, ιδιαίτερα στις περιοχές με υπομεθυλίωση. (Soubry et

al. 2013)

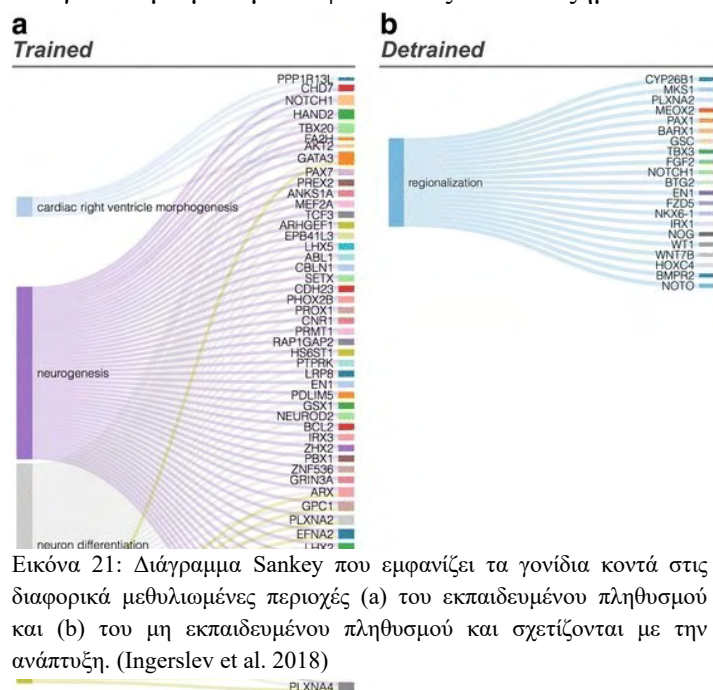
Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά αναδιαμορφώνει τη μεθυλίωση του DNA του σπέρματος των αρσενικών ποντικών και των απογόνων τους σε 92, κοινές και μη κοινές, γονιδιωματικές περιοχές που βρίσκονται κοντά σε γονίδια με μη ειδική γονιδιακή λειτουργία, όπως ο κυτταρικός εντοπισμός, η μεταφορά και μεταβολικές διεργασίες. Ειδικότερα 18 περιοχές εμφάνισαν διαφορεική



μεθυλίωση, ιδίως των γονιδίων SLC3A2, TBRG4 και MFSD7, όπου τα δυο πρώτα φάνηκαν υπερμεθυλιωμένα και το τρίτο υπομεθυλιωμένο. (de Castro Barbosa et al. 2016)

Στην ανασκόπηση των Ornelas et al., γίνεται αναφορά στη μελέτη ποντικών που λάμβαναν διαίτα χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες και ο απόγονος τους εμφάνισε αυξημένη μεθυλίωση στο γονίδιο PPAR-A, ένα γονίδιο που εμπλέκεται στο σχηματισμό των πρώτων ενζύμων για την οξείδωση των λιπιδίων στα μιτοχόνδρια. Άλλοι ερευνητές μελέτησαν, σε ποντικούς, τα γονίδια που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της χοληστερίνης και παρατήρησαν την αυξημένη έκφρασή τους, λόγω της μειωμένης μεθυλίωσής τους, σε απογόνους των οποίων οι γονείς έλαβαν διαίτα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (εικόνα 20). (Carone et al. 2010) Ωστόσο, οι Shea et al., απέδειξαν ότι αδέρφια ποντικών που τρέφονταν με διαφορετικές δίαιτες είχαν παρόμοια μεθυλίωση στο σπέρμα τους σε σύγκριση με μη αδέρφια που ακολουθούσαν πανομοιότυπες δίαιτες. Αυτό το γεγονός αποδεικνύει ότι η φυσικά εμφανιζόμενη επιγενετική παραλλαγή επηρεάζει τα πρότυπα της μεθυλίωσης στο γονιδίωμα του σπέρματος περισσότερο από την πατρική διατροφή. (Shea et al. 2015)

Από την άλλη πλευρά, η ανεπάρκεια του πατρικού φολικού οξέος σε αρουραίους, 4 εβδομάδες πριν από τη σύλληψη, συνέβαλε στην αυξημένη μεθυλίωση του γονιδιώματος του σπέρματος και στη συνοδή μείωση στην έκφραση των πρωτεϊνών των γονιδίων FRα, IGF-2 και IGF-1R, με επακόλουθο τη δημιουργία απογόνων με μειωμένο φολικό οξύ και αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο πλάσμα



Εικόνα 21: Διάγραμμα Sankey που εμφανίζει τα γονίδια κοντά στις διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές (a) του εκπαιδευμένου πληθυσμού και (b) του μη εκπαιδευμένου πληθυσμού και σχετίζονται με την ανάπτυξη. (Ingerslev et al. 2018)

τους. (Mejos et al. 2013)

Είναι σημαντικό να γίνει αναφορά σε μελέτες, των οποίων οι ερευνητές συμπέραναν ότι παράγοντες σχετικοί με τον τρόπο ζωής προκαλούν διαφορετική μεθυλίωση του DNA του σπέρματος, πολύ κοντά σε γονίδια που σχετίζονται με τον έλεγχο της νευρογένεσης και την ανάπτυξη του κεντρικού

νευρικού συστήματος. Συγκεκριμένα, τα δείγματα σπερματοζωαρίων που συλλέχθηκαν πριν και μετά από άσκηση έξι εβδομάδων, καθώς και μετά από τρεις μήνες χωρίς προπόνηση με την συγκεκριμένη άσκηση, έδειξαν ότι η μεθυλίωση του DNA μειώνεται κοντά σε γονίδια που σχετίζονται με τη νευρογένεση και, σε αισθητά υψηλότερο βαθμό στον ασκούμενο πληθυσμό, σε σύγκριση με τον μη ασκούμενο (εικόνα 21). Αυτό αποκαλύπτει ότι ο χρόνος δεν είναι ο κύριος παράγοντας που οδηγεί στην επιγενετική αναδιαμόρφωση και υποδηλώνει ότι οι επιγενετικές αλλαγές μπορούν να προκαλούνται και από εξωτερικές επιρροές. (Ingerslev et al. 2018)

Σε μια πρόσφατη μελέτη των Dong et al. διερευνήθηκε η σχέση μεταξύ της κατάστασης μεθυλίωσης των γονιδίων SNRPN και H19 και της ανδρικής υπογονιμότητας. Η μελέτη περιελάμβανε 205 στείρους άνδρες καπνιστές με παθολογικές παραμέτρους του σπέρματος και 50 νορμοσπερμικούς άνδρες καπνιστές. Αποδείχθηκε, λοιπόν, ότι η ανώμαλη μεθυλίωση των αποτυπωμένων γονιδίων H19 και SNRPN σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα και το κάπνισμα έχει προταθεί ότι αποτελεί παράγοντα κινδύνου μέσω της υπομεθυλίωσης του γονιδίου H19 και της υπερμεθυλίωσης του γονιδίου SNRPN σε στείρους άνδρες. (Dong et al. 2016)

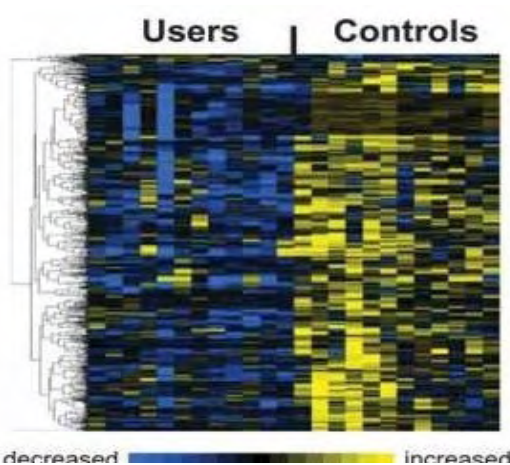
Σε αυτό συναινούν οι Jenkins et al., οι οποίοι, έπειτα από σύγκριση της μεθυλίωσης του σπέρματος μεταξύ 78 καπνιστών και 78 μη καπνιστών, βρήκαν 141 διαφορεικά μεθυλιωμένες νησίδες CpG, με τους άνδρες καπνιστές να εμφανίζουν υπομεθυλίωση στο γονίδιο H19 και υπερμεθυλίωση στο SNRPN. Ταυτόχρονα παρατηρήθηκε μια μεταβλητότητα στη μεθυλίωση του DNA μεταξύ των καπνιστών, υποδηλώνοντας ότι το κάπνισμα μπορεί να προκαλέσει στοχευμένη μεθυλίωση στο DNA, επηρεάζοντας την ποιότητα του σπέρματος σε σύγκριση με τους μη καπνιστές. (T. G. Jenkins et al. 2017) Επιπλέον, μεταξύ μιας ομάδας 14 καπνιστών, γόνιμων ανδρών και μιας ομάδας 14 μη καπνιστών, γόνιμων ανδρών, βρέθηκαν 11 διαφορετικά μεθυλιωμένες CpG νησίδες. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται οι CpG περιοχές κοντά στα γονίδια PGAM5 και PTPRN2, γονίδια σημαντικά για τη σπερματογένεση. Τα αποτελέσματα έδειξαν την υπερμεθυλίωση των συγκεκριμένων περιοχών, ενώ, αντίθετα, φάνηκε υπομεθυλίωση στις CpG περιοχές του γονιδίου TYRO3. (Alkhaled et al. 2018; Laqqan and Hammadeh 2018)

Ωστόσο, μια πρόσφατη μελέτη σε ποντικούς άρχισε να παρέχει μια μηχανιστική σχέση μεταξύ της ελαττωματικής μεθυλίωσης που προκαλείται από το κάπνισμα και της επακόλουθης συμπεριφοράς των απογόνων F1 και F2 γενιάς. Για παράδειγμα, ενήλικα αρσενικά ποντίκια που εκτέθηκαν σε νικοτίνη, μέσω πόσιμου νερού για 12

εβδομάδες, εμφάνισαν γενετικές και συμπεριφορικές διαταραχές τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες απογόνους της F1 γενιάς. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν διαταραχές στη μάθηση σε απογόνους F2 γενιάς σε αρσενικά ποντίκια που προέρχονταν από θηλυκά, γενιάς F1, που είχαν εκτεθεί σε πατρική νικοτίνη. Τα σπερματοζώρια των ανδρών που εκτέθηκαν στη νικοτίνη, είχαν υψηλότερη μεθυλίωση στο γονιδίωμα τους και χαμηλότερη μεθυλίωση στον υποκινητή του υποδοχέα της ντοπαμίνης D2 σε σύγκριση με τα σπερματοζώρια από μη εκτεθειμένους άνδρες. (McCarthy et al. 2018)

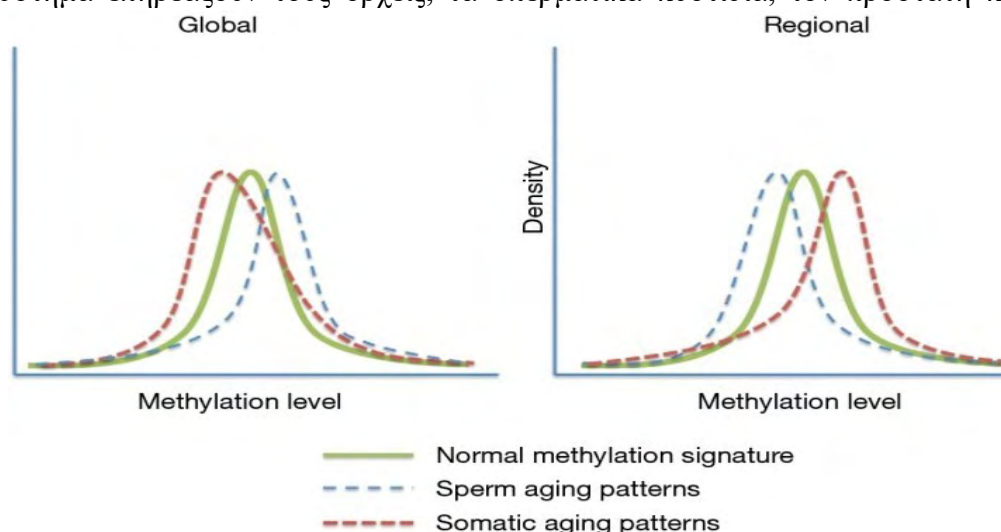
Μια πρόσφατη μελέτη από την ομάδα του Murphy et al. επικεντρώθηκε στις επιγενετικές επιδράσεις του καπνίσματος της μαριχουάνας και της τετραϋδροκανναβινόλης στην αναπαραγωγική υγεία. Στους ανθρώπους και τους αρουραίους, η έκθεση σ' αυτές τις ουσίες μειώνει τη μεθυλίωση του DNA του σπέρματος και την πυκνότητά του (εικόνα 22). Για το λόγο αυτό, οι άνδρες παρουσιάζουν ένα μεγάλο αριθμό αναπαραγωγικών αποτυχιών, μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης και πρόωρο τοκετό με χαμηλό βάρος γέννησης του εμβρύου. (Murphy et al. 2018) Επιπλέον, η χρήση της κάνναβης προκαλεί υπομεθυλίωση στο ανθρώπινο σπέρμα, σε 9 νησίδες CpG που βρίσκονται στο ιντρόνιο 7 του γονιδίου DLGAP2, ένα γονίδιο που σχετίζεται με τις διαταραχές φάσματος αυτισμού και εμπλέκεται στην οργάνωση των συνάψεων και στη νευρωνική σηματοδότηση. (Murphy et al. 2018; Schrott et al. 2020)

Τέλος, η έκθεση των αρσενικών ποντικών σε αιθανόλη, πριν τη γονιμοποίηση, προκάλεσε την αυξημένη έκφραση του γονιδίου BDNF, σε μια περιοχή του εγκεφάλου που σχετίζεται με τη γνώση, την κίνηση και τις ψυχιατρικές διαταραχές. Είναι αξιοσημείωτο ότι το BDNF βρέθηκε υπομεθυλιωμένο στα σπερματοζώρια της πατρικής γενιάς F0, καθώς και στους αρσενικούς απογόνους της γενιάς F1. (Finegersh and Homanics 2014)



Εικόνα 22: Κάθε στήλη αντιπροσωπεύει έναν συμμετέχοντα, ενώ κάθε σειρά αντιπροσωπεύει μια νησίδα CpG. (Murphy et al. 2018)

Ήδη από το 2000, οι Ford et al., απέδειξαν ότι η μεγαλύτερη ηλικία των ανδρών συσχετίστηκε με αυξημένο χρόνο επίτευξης της εγκυμοσύνης και παράλληλα με μειωμένα ποσοστά εγκυμοσύνης. (Ford et al. 2000) Οι Khandwala et al., το 2017, επιβεβαίωσαν ότι η μέση ηλικία για την επίτευξη της πατρότητας στις Ηνωμένες Πολιτείες, είναι τα 30,9 χρόνια, ενώ στην Ιταλία τα 35 χρόνια. (Khandwala et al. 2017) Κατά τη γήρανση, οι φυσιολογικές αλλαγές στο ανδρικό αναπαραγωγικό σύστημα επηρεάζουν τους όρχεις, τα σπερματικά κυστίδια, τον προστάτη και την

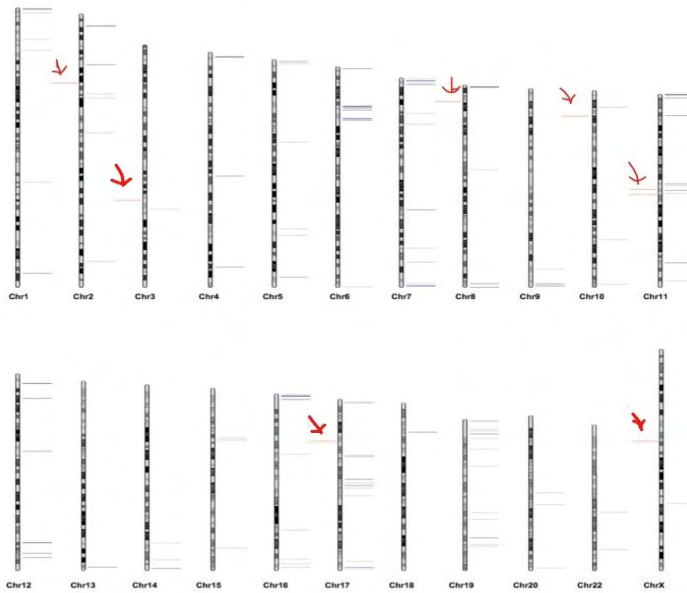


Εικόνα 23: Σχεδιαγράμματα θεωρητικής πυκνότητας που απεικονίζουν τις διαφορές στις μεταβολές της μεθυλίωσης που σχετίζονται με την ηλικία μεταξύ ανθρώπινου σπέρματος και σωματικών κυττάρων. (Timothy G. Jenkins et al. 2014)

επιδιδυμίδα. Συγκριτικές μελέτες ποιότητας σπέρματος σε άνδρες άνω των 50 ετών έναντι ανδρών ηλικίας 30 ετών έδειξαν μια μείωση της τάξης 3-22% στον όγκο του σπέρματος, 3,37% στην κινητικότητα του σπέρματος και 4-18% στη μορφολογία του στα ηλικιωμένα άτομα. (Kidd, Eskenazi, and Wyrobek 2001)

Ανάμεσα στις πιο ενδιαφέρουσες ενδείξεις σχετικά με την επίδραση της πατρικής ηλικίας στην αυξημένη συχνότητα διαφόρων διαταραχών στους απογόνους είναι οι επιγενετικές μεταβολές στο σπέρμα, καθώς μπορούν να συσσωρευτούν με την πάροδο του χρόνου και να έχουν τη δυνατότητα να επηρεάσουν τη γονιμότητα, την εμβρυογένεση και ακόμη και την υγεία των απογόνων (εικόνα 23). (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018) Για παράδειγμα, οι αλλαγές της μεθυλίωσης του DNA που σχετίζονται με τη γονιμότητα των ανδρών μπορούν να συσσωρευτούν με την αύξηση της ηλικίας. (Fraga et al. 2005) Επομένως, μπορούμε να υποθέσουμε ότι οι μεταβολές της μεθυλίωσης που σχετίζονται με την ηλικία μπορεί να συμβούν και στο σπέρμα. (Timothy G. Jenkins, Aston, and Carrell 2018)

Στην πραγματικότητα, οι Oakes et al., περιέγραψαν την υπερμεθυλίωση σε ολόκληρο το γονιδίωμα του σπέρματος και την άμεση συσχέτισή της με την αύξηση της ηλικίας. (Christopher C. Oakes et al. 2003) Προηγούμενες μελέτες αναφέρουν τη συχνότητα με την οποία διαιρείται ο συγκεκριμένος τύπος κυττάρου, ως βασικό



Εικόνα 24: Χρωμοσωμικές θέσεις με μεταβολή στη μεθυλίωση του DNA στο σπέρμα, όπου οι (140) μπλε γραμμές αντιπροσωπεύουν την υπομεθυλίωση και οι (8) κόκκινες την υπερμεθυλίωση. (Timothy G. Jenkins et al. 2014)

χαρακτηριστικό, που επηρεάζει το μέγεθος των μεταβολών που σχετίζονται με τη μεθυλίωση του DNA στο σπέρμα κατά τη γήρανση. (Thompson et al. 2010) Σε μελέτη που πραγματοποίησαν οι Jenkins et al., το 2014, φάνηκε ότι κατά τη γήρανση των ανδρών η μεθυλίωση του DNA στο σπέρμα μειώθηκε σε 140 γονιδιακές περιοχές και αυξήθηκε μόνο σε 8 περιοχές (εικόνα 24), σε εκείνες που ρυθμίζουν τα γονίδια DRD4 και TNXB. Είναι αξιοσημείωτο ότι αυτές οι μεταβολές της μεθυλίωσης παρουσιάστηκαν σε γονίδια

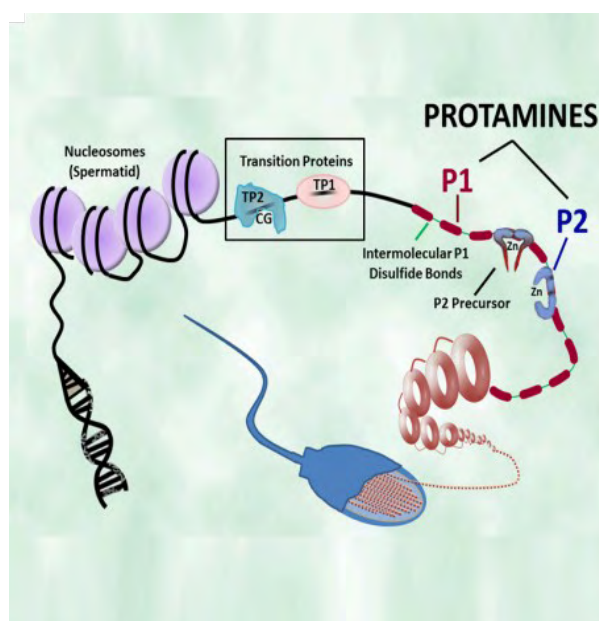
που είναι γνωστό ότι σχετίζονται με νευροψυχιατρικές νόσους, όπως διπολική διαταραχή και σχιζοφρένεια. (Timothy G. Jenkins et al. 2014)

Κατά τη γήρανση των ινοβλαστών, πραγματοποιείται προοδευτική απώλεια της DNMT1 και αύξηση των *de novo* DNMTs. Έχει παρατηρηθεί, σε όρχεις ποντικού, ότι τα επίπεδα των DNMTs κορυφώνονται μεταγεννητικά και μειώνονται σε σταθερά επίπεδα περίπου ένα μήνα αργότερα. Είναι πιθανό ότι ορισμένα επίπεδα των DNMTs θα μπορούσαν να μειωθούν και άλλα να αυξηθούν, αντίστοιχα, με τη γήρανση. Αυτά, τα τροποποιημένα επίπεδα των DNMTs σε ηλικιωμένους άνδρες φαίνεται ότι συμβάλουν στη διακοπή των επιγενετικών διεργασιών που επηρεάζουν τον επιγενετικό επαναπρογραμματισμό, τη δημιουργία και τη διατήρηση των πατρικών

αποτυπωμάτων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, αλλά και μετά τη γονιμοποίηση. (Perrin, Brown, and Malaspina 2007)

3.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΟΔΗΓΟΥΝ ΣΕ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΙΣΤΟΝΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, περίπου το 10-15% της χρωματίνης στο σπέρμα παραμένει συνδεδεμένο με τις ιστόνες. Ωστόσο, τα μειωμένα επίπεδα ή η πλήρης απουσία των πρωταμινών και η μεγαλύτερη διατήρηση των ιστονών κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης μπορεί να προκαλέσουν ανώμαλη συμπίκνωση της χρωματίνης στην κεφαλή του σπέρματος. Αυτό οδηγεί σε διάσπαση του κλώνου του DNA κατά την εκσπερμάτιση και σε υπογονιμότητα. (D'Occhio, Hengstberger, and Johnston 2007; Wykes and Krawetz 2003)



Εικόνα 25: Οι πρωταμίνες του σπέρματος. (Mammalian Protamines - www.briarpatchbio.com n.d.)

Θεωρείται, πλέον, δεδομένη η γνώση ότι, στους ανθρώπους, οι πρωταμίνες P1 και P2 (εικόνα 25) υπάρχουν σε περίπου ίσες ποσότητες στο DNA του σπέρματος και η ακατάλληλη χρονική ρύθμισή τους οδηγεί σε αλλοιωμένη έκφραση των ώριμων πρωτεϊνών και σε υπογονιμότητα. (Aoki, Liu, and Carrell 2005) Επιπλέον, οι Jenkins et al., στην ανασκόπηση που υλοποίησαν το 2018, επισημαίνουν ότι ο αλλοιωμένος λόγος P1/P2, η αυξημένη διατήρηση των ιστονών ή η πλήρης ανεπάρκεια των πρωταμινών στο σπέρμα, αποτελούν αιτίες στειρότητας στους άνδρες. (D. T. Carrell and Liu 2001; Hammoud et al. 2009) Επιπλέον, η διατήρηση της επιγενετικής μορφής των ιστονών στο σπέρμα υποδηλώνει έναν πιθανό ρόλο στα πρώιμα αναπτυσσόμενα έμβρυα, γεγονός που επιφέρει δυσμενείς επιπτώσεις. Έτσι, οι επιγενετικές ανωμαλίες στο γονιδίωμα των στείρων ανδρών μπορεί να προκαλέσουν σφάλματα μετά τη γονιμοποίηση. (Douglas T. Carrell and Hammoud 2009; Chioccarelli et al. 2020)

Στη μελέτη τους, οι Talebi et al., εξέτασαν τις επιδράσεις της κίρσοκίλης στη συμπίκνωση της χρωματίνης και στην ακεραιότητα του DNA των εκσπερματωμένων

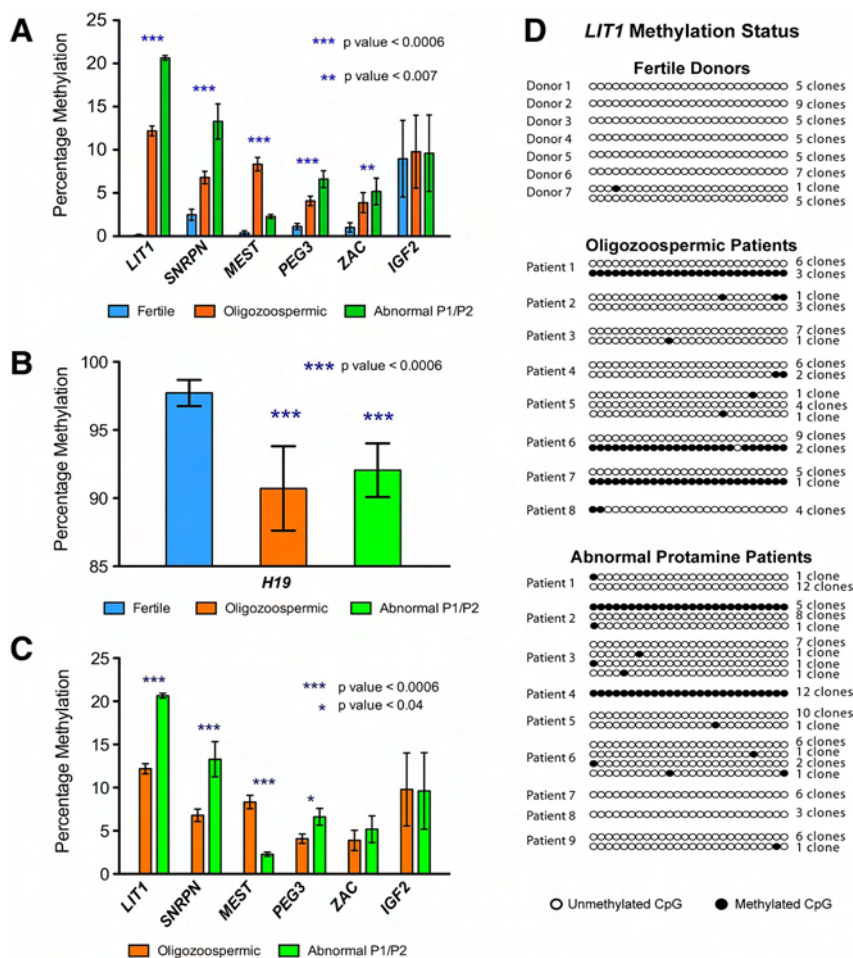
σπερματοζωαρίων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα δείγματα της κισσοκήλης έχουν υψηλότερο ποσοστό σπερματοζωαρίων με ανώμαλο DNA και ανώριμη χρωματίνη από ό,τι οι γόνιμοι άνδρες και οι στérροι άντρες χωρίς κισσοκήλη. (Talebi et al. 2008) Οι ερευνητές παρατήρησαν την ανώμαλη αναλογία των πρωταμινών P1 και P2 στο σπέρμα των ανδρών με κισσοκήλη και την συνακόλουθη ανώμαλη συμπύκνωση της χρωματίνης στα σπερματοζωάρια, καταλήγοντας στην επιγενετική αιτία της εμφάνισής της. (González-Marín, Gosálvez, and Roy 2012) Μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 291 κύκλους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής περιέγραψε το ρόλο της αναλογίας ιστόνη προς πρωταμίνη του σπέρματος και τη συμβολή του στην ανάπτυξη των εμβρύων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για αναλογία που κυμαίνεται από 6 έως 26%, ο ρυθμός σχηματισμού της βλαστοκύστης ήταν σημαντικά υψηλότερος. (Francis et al. 2014)

Στο άρθρο τους, οι Li et al., κατέδειξαν ότι η δεσμευτική πρωτεΐνη CHD5 και η πρωτεΐνη BRDT, που είναι ειδικές για τους όρχεις, εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και συμμετέχουν στη διαδικασία αυτής της αντικατάστασης. Παρατήρησαν, ακόμη, ότι στον άνθρωπο, η χαμηλή έκφραση τους στα γαμετικά κύτταρα σχετίζεται με την ανδρική υπογονιμότητα. Ειδικότερα, οι άνδρες στους οποίους πραγματοποιήθηκε επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου CHD5, στο σπέρμα, παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη απόδοση και κινητικότητα του σπέρματος, καθώς και υψηλό ποσοστό σπέρματος με ανώμαλη μορφολογία στην κεφαλή των σπερματοζωαρίων. Επίσης, η ιστολογική εξέταση αποκάλυψε μειωμένο αριθμό επιμήκων σπερματίδων, στα οποία παρατηρήθηκε παρεκκλίνουσα κατακράτηση ιστονών και αυξημένα επίπεδα των TP1 και TP2, P1 και P2. Επιπλέον, ο ανοσοφθορισμός έδειξε ότι η ακετυλίωση της ιστόνης H4 μειώθηκε στις σπερματίδες των συγκεκριμένων όρχεων. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν τον σπουδαίο ρόλο του γονιδίου CHD5 στην αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες στις αναπτυσσόμενες σπερματίδες. (W. Li et al. 2014; Zhuang et al. 2014)

Οι συγγραφείς Colaco και Sakkas, στην ανασκόπηση τους το 2018, επιβεβαιώνουν τα ευρήματα που υποστηρίζουν το γεγονός ότι η ανεπάρκεια της P2 στα σπερματοζωάρια επηρεάζει την ανάπτυξη των εμβρύων, με μόνο το 11% των ζυγωτών να αναπτύσσονται στο στάδιο της βλαστοκύστης και το 86% να παραμένει στο στάδιο των 2-6 κυττάρων. (Cho et al. 2003) Τέλος, όσον αφορά στις πρωταμίνες, φαίνεται ότι η ανεπάρκειά τους στο σπέρμα, κατά την εισαγωγή του σε ένα

ωοκύτταρο, επηρεάζει την ικανότητα της γονιμοποίησής του, μέσω της πρόκλησης της πρόωρης χρωμοσωμικής συμπύκνωσης που προκύπτει από την υψηλή συγκέντρωση των ιστονών. (Dera-Martynow et al. 2012) Οι Martianov [et al. 2005](#) και Tanaka et al. 2005, έπειτα από ιστολογική εξέταση που πραγματοποίησαν, αποκάλυψαν μορφολογικές ανωμαλίες που παρατηρήθηκαν σε ποσοστό >80% της συνολικής ποσότητας του σπέρματος. Παρατήρησαν την ανώμαλη επιμήκυνση των σπερματίδων και την ελαττωματική συμπύκνωση του DNA στις επιμήκεις σπερματίδες να υποδηλώνουν έναν κρίσιμο ρόλο της ιστόνης H1T2 στην αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. (Martianov et al. 2005; H. Tanaka et al. 2005)

Η ερευνητική ομάδα των Hammoud et al., μελέτησαν τα έξι αποτυπωμένα γονίδια, LIT1, SNRPN, MEST, ZAC, PEG3 και IGF2, των οποίων, φυσιολογικά, απομεθυλιώνεται το πατρικό αλληλόμορφο και το H19, το οποίο, φυσιολογικά, παραμένει πατρικώς μεθυλιωμένο. Σε ολιγοζωοσπερμικούς και σε άνδρες με ανώμαλη ποσότητα πρωταμινών φάνηκε υπερμεθυλίωση των CpG νησίδων όλων των γονιδίων, εκτός του IGF2 (εικόνα 26A). Περαιτέρω, η πατρική διαφορικά μεθυλιωμένη περιοχή του γονιδίου H19 υπομεθυλιώθηκε σημαντικά και στις δύο ομάδες των στέρων ανδρών (εικόνα 26B). Επομένως, οι στείροι ασθενείς εμφανίζουν μεταβολές στη μεθυλίωση σε έξι από τους επτά ελεγχόμενους γονιδιακούς τόπους (εικόνα 26C). Ωστόσο, κατά τη σύγκριση της μεθυλίωσης μεταξύ των δύο στέρων πληθυσμών, οι ασθενείς με μη φυσιολογική αναλογία πρωταμινών εμφανίζουν εκτεταμένη υπερμεθυλίωση στα των γονιδίων LIT1 και SNRPN σε σύγκριση με τους ολιγοζωοσπερμικούς άνδρες. Αντίθετα, η υπερμεθυλίωση στο MEST είναι σημαντικά υψηλότερη σε ολιγοζωοσπερμικούς ασθενείς (εικόνα 26D). (Hammoud et al. 2010)



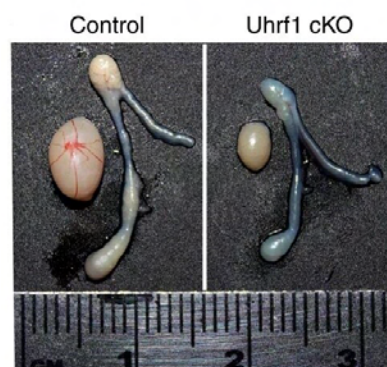
παρουσιάζουν μια μελέτη, στην οποία διαπιστώθηκε ότι οι στérροι άνδρες εμφάνιζαν Εικόνα 26: Τα συνολικά πρότυπα μεθυλίωσης, στα πατρικά αποτυπωμένα γονίδια, μεταβλήθηκαν στο σπέρμα των στέρρων ασθενών. Το $P < .05$ είναι σημαντικό. (Hammoud et al. 2010)

τυχαία κατανομή των διατηρημένων ιστονών στο γονιδίωμά τους σε σύγκριση με τους γόνιμους άνδρες. Ενώ ο εντοπισμός των συγκεκριμένων ιστονών ήταν, γενικά, φυσιολογικός σε ολόκληρο το γονιδίωμα σε στέρρους άνδρες, υπήρξε μείωση των ιστονών H3K4me3 και H3K27me σε αποτυπωμένους γονιδιακούς τόπους και αναπτυξιακά γονίδια. (Hammoud et al. 2011) Στην ανασκόπηση του 2020, οι Chioccarelli et al, επισημαίνουν πως η ακετυλιωμένη ιστόνη H3K9 εντοπίζεται, κυρίως, στα εκσπερματωμένα σπερματοζωάρια. Στους γόνιμους άνδρες, σχετίζεται με συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος του σπέρματος, όπως υποκινητές, εξόνια και διαγονιδιακές περιοχές, μερικές από τις οποίες εμπλέκονται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, ορίζοντας έναν επιγενετικό κώδικα που θα μπορούσε να μεταδοθεί στο έμβρυο και να επηρεάσει την γονιδιακή έκφραση μετά τη γονιμοποίηση. Το πρότυπο αυτό τροποποιείται στο σπέρμα των ολιγοζωοσπερμικών στέρρων ανδρών, με την πλειονότητα να εμφανίζει παρεκκλίνουσα συμπύκνωση της χρωματίνης του σπέρματος και συνακόλουθο την αποτυχία της εγκυμοσύνης ή την παλλίνδρομη κύηση. (Steilmann et al. 2011)

Άλλοι συγγραφείς, εντόπισαν, ακόμη, τη μειωμένη ακετυλίωση της ιστόνης H4 σε άνδρες με μειωμένη σπερματογένεση. Ομοίως, οι Schon et al. διαπίστωσαν μια μείωση της τάξης του 4-17% της συνολικής H4ac και ταυτόχρονη διακοπή της ωρίμανσης των στρογγυλών σπερματίδων, έπειτα από σύγκριση δειγμάτων σπέρματος από τερατοζωοσπερμικούς και νορμοσπερμικούς άρρενες. (Schon et al. 2019) Ωστόσο, οι αναλύσεις βιοψίας από δείγματα όρχεων υπογόνιμων ανδρών έδειξαν πρόωρη υπερακετυλίωση της ιστόνης H4 στα σπερματοκύτταρα αντί των σπερματοειδών. (Sonnack et al. 2002)

Κατά τη γονιμοποίηση, όταν σχηματίζονται οι προπυρήνες, ο πατρικός προπυρήνας παρουσιάζει ένα ισχυρό σήμα ακετυλίωσης στην ιστόνη H4K12. Ωστόσο, έχει φανεί ότι η μειωμένη ακετυλίωσή της, σε υποκινητές σημαντικούς για την εμβρυϊκή ανάπτυξη, στο σπέρμα υπογόνιμων ανδρών, αντικατοπτρίζει μια ανεπαρκή συμπίκνωση της χρωματίνης του σπέρματος που επηρεάζει τη μεταφορά των επιγενετικών υπογραφών στο ωοκύτταρο. (Paradowska et al. 2012) Στη μελέτη τους, οι Štiavnická et al., ανέλυσαν δείγματα σπέρματος μιας μεγάλης ομάδας ανδρών. Σύμφωνα με τα ευρήματά τους τα επίπεδα της ιστόνης H3K4me2 ήταν σημαντικά υψηλότερα σε ασθενοζωοσπερμικούς και ολιγοασθενοζωοσπερμικούς άρρενες σε σχέση με τους νορμοσπερμικούς και συσχετίζονται με την ανωριμότητα του σπέρματος, με αποτέλεσμα να βλάπτουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του απογόνου. Επίπρόσθετα, αξίζει να σημειωθεί ότι τα τερατοζωοσπερμικά και τα ασθενοζωοσπερμικά δείγματα δείχνουν αλλοιωμένη μεθυλίωση και της ιστόνης H3K9 σε σύγκριση με τους νορμοσπερμικούς ασθενείς. (Štiavnická et al. 2020)

Οι Marion Crespo et al., στο πρόσφατα δημοσιευμένο άρθρο τους, το 2020, επισημαίνουν ότι τα μειωμένα επίπεδα της κροτονυλίωσης και της ακετυλίωσης της ιστόνης H3K27 συσχετίστηκαν με τον τερματισμό της έκφρασης των γονιδίων, άρα με μειωμένη διαφοροποίηση των σπερματίδων, μειωμένη κινητικότητα του σπέρματος και μειωμένο ποσοστό γονιμοποίησης, με επακόλουθο την υπογονιμότητα. (Crespo et al. 2020) Ένα χρόνο νωρίτερα, η επιστημονική ομάδα των Juan Dong et al., απέδειξε ότι το γονίδιο UHRF1 σχετίζεται με τις τροποποιήσεις των ιστονών στους όρχεις και η διαγραφή του κατά τη διαφοροποίηση των σπερματογόνιων οδηγεί σε ελαττωματική μειωτική

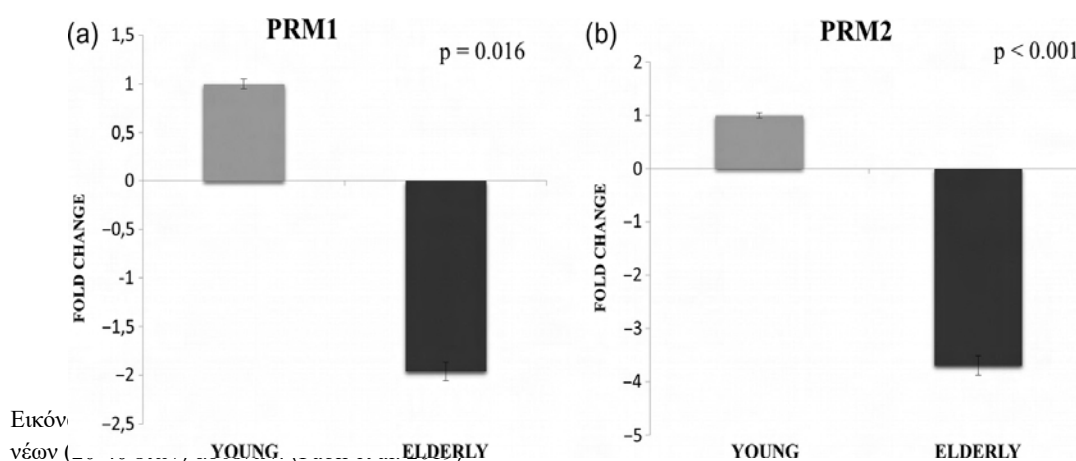


Εικόνα 27: Ακαθόριστη μορφολογία των όρχεων και της επιδιδυμίδας από ποντίκια της ομάδας μαρτύρων και της ομάδας Uhrf1 CKO στη μεταγεννητική ημέρα 56. (J. Dong et al. 2019)

διαίρεση και τελικά στειρότητα, πιθανώς λόγω ενός συνδυασμού επιδράσεων από την απομεθυλίωση του DNA, τη μείωση της μεθυλίωσης των ιστονών και την εκτροπή των μονοπατιών του piRNA (εικόνα 27). (J. Dong et al. 2019)

Οι Donkin και Barres, το 2018, πρότειναν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επιδρούν στο γονιδίωμα του πατέρα αλλάζουν την αισθητηριακή αντίληψη στην επόμενη γενιά μέσω των ιστονών που διατηρούνται σε γονίδια που εμπλέκονται στην αισθητηριακή αντίληψη. (Arpanahi et al. 2009; Dias and Ressler 2014b) Σύμφωνα με τους συγγραφείς, τα σπερματοζωάρια των παχύσαρκων ανδρών εμφανίζουν διαφορετικά μεθυλιωμένες περιοχές σε γονίδια με διατηρημένες ιστόνες, σε σύγκριση με τους αδύνατους άντρες. (Donkin et al. 2016) Αυτά τα ευρήματα υποστηρίζουν έναν συγκεκριμένο ρόλο των διατηρημένων ιστονών στην εμβρυϊκή ανάπτυξη. Επίσης, αποδίδουν μια πιθανή επίδραση του τρόπου ζωής και των περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον αναπτυξιακό προγραμματισμό μέσω της διαμόρφωσης της τοποθέτησης των ιστονών στο σπέρμα. (Donkin and Barrès 2018)

Ορισμένοι συγγραφείς διερεύνησαν τη σχέση μεταξύ της γήρανσης των ανδρών και του κατακερματισμού του DNA του σπέρματος, των ανωμαλιών στη συμπύκνωση της χρωματίνης και της ελαττωματικής έκφρασης των πρωταμινών. (Wyrobek et al. 2006) Τα αποτελέσματα των Paoli et al., το 2019, απέδειξαν τη σημαντική μείωση της ποιότητας του σπέρματος με την αύξηση της ηλικίας, που εκδηλώνεται ως μείωση του όγκου, του συνολικού αριθμού και της κινητικότητας του σπέρματος και ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των ανώμαλων μορφών. Αυτό το γεγονός αποδόθηκε στη σημαντική μείωση της έκφρασης των P1 και P2 στα ηλικιωμένα άτομα (εικόνα 28). Αυτό αντικατοπτρίστηκε, επίσης, από τη μείωση του mRNA των P1/P2 στα ηλικιωμένα άτομα σε σχέση με τους νεότερους μάρτυρες. Αντιθέτως, δεν βρέθηκαν αλλαγές βιολογικής σημασίας στην έκφραση των TNP1/TNP2 σε ηλικιωμένα άτομα. (Paoli et al. 2019)



Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνών έχουν δείξει ότι η επαγωγή του οξειδωτικού στρες από το κάπνισμα τσιγάρων μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη διαδικασία της πρωταμινοποίησης, μέσω επιγενετικής αποσιώπησης της P2 στη χρωματίνη του σπέρματος. Σαν αποτέλεσμα, επηρεάζεται η κινητικότητα του σπέρματος, η βιωσιμότητα και η συγκέντρωσή του κατά την εκσπερμάτωση. (Yu et al. 2014) Μέχρι στιγμής, μόνο τρεις μελέτες έχουν διερευνήσει τη σχέση του καπνίσματος και της πρωταμινοποίησης σε σχέση με τη γονιμότητα του ανθρώπου. Η πρώτη μελέτη έδειξε ότι το κάπνισμα είχε αρνητικό αντίκτυπο στα επίπεδα P2 και ο λόγος P1/P2 ήταν σημαντικά υψηλότερος στους καπνιστές από ό, τι στους μη καπνιστές. Οι δομικές αλλαγές στις πρωταμίνες ή / και οι μεταβολές στην ικανότητα δέσμευσης του DNA τους, που προκαλείται από το οξειδωτικό στρες, έχουν προταθεί ως πιθανές αιτίες για την αρνητική επίδραση του καπνίσματος στη διαδικασία της πρωταμινοποίησης. (Hammadeh et al. 2010)

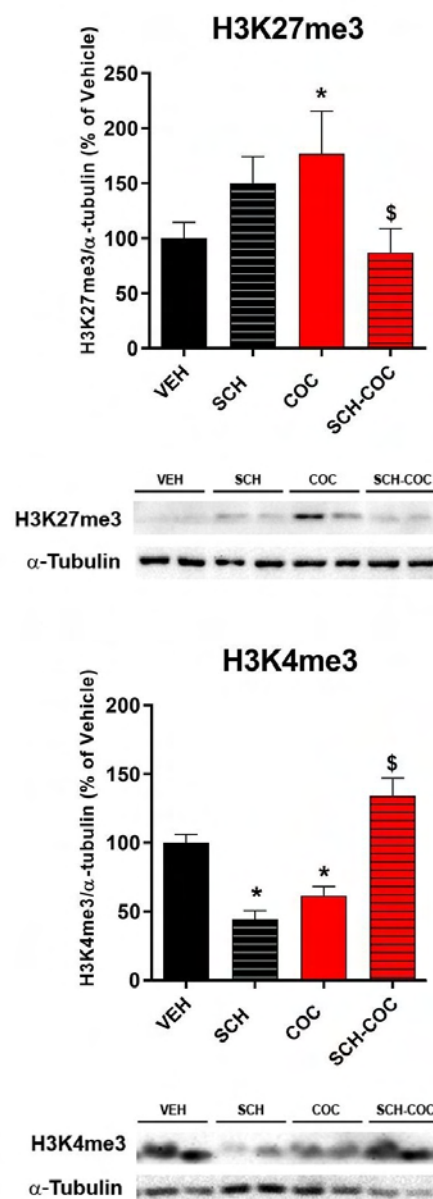
Στη δεύτερη μελέτη, ο λόγος της ιστόνης H2B προς την ολική πυρηνική πρωτεΐνη, στα σπερματοζώαρια των καπνιστών σε στείρα ζευγάρια, βρέθηκε να είναι υψηλότερο από αυτό των μη καπνιστών, υποδεικνύοντας την αρνητική επίδραση του καπνίσματος στην αναλογία ιστόνη/πρωταμίνη και στη γονιμότητα των ανδρών. (M. F. Hamad et al. 2014) Η τρίτη μελέτη σχεδιάστηκε για να αξιολογήσει τη σχέση μεταξύ των ιδιοτήτων του σπέρματος και της αναλογίας των mRNA των πρωταμινών σε 64 καπνιστές και 59 μη καπνιστές. Σε αυτή τη μελέτη, τα επίπεδα των mRNAs των P1 και P2 σε καπνιστές βρέθηκαν να είναι σημαντικά χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά των μη καπνιστών. Επιπλέον, οι λόγοι mRNA των P1 και P2 ενδέχεται να συσχετίζονται αρνητικά και σημαντικά με τον αριθμό των σπερματοζωαρίων, τη φυσιολογική μορφολογία του σπέρματος και τον όγκο του. (M. Hamad et al. 2019)

Επιπλέον, πρόσφατα στοιχεία υποδηλώνουν ότι η πρόσληψη κοκαΐνης έχει συσχετιστεί με την εξασθενημένη αναπαραγωγική λειτουργία των ανδρών, συμπεριλαμβανομένου του αυξημένου οξειδωτικού στρες, της ίνωσης των σπερματικών σωληναρίων και της απόπτωσης των γεννητικών κυττάρων. Σαν επακόλουθο παρατηρείται μειωμένη παραγωγή σπέρματος μέσω της αυξημένης δέσμευσης της ντοπαμίνης στον υποδοχέα της, DRD1, λειτουργία παρόμοια με τον μηχανισμό που ακολουθείται στον εγκέφαλο. Τα ευρήματα των González et al., το 2020, επιβεβαιώνουν ότι μέσω της ενεργοποίησης του DRD1, μπορεί να προκληθεί ανισορροπία των ιστονών H3K4me3 και H3K27me3, που ενδέχεται να επηρεάσει την ανάπτυξη του εμβρύου (εικόνα 29). Ακόμη, οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η

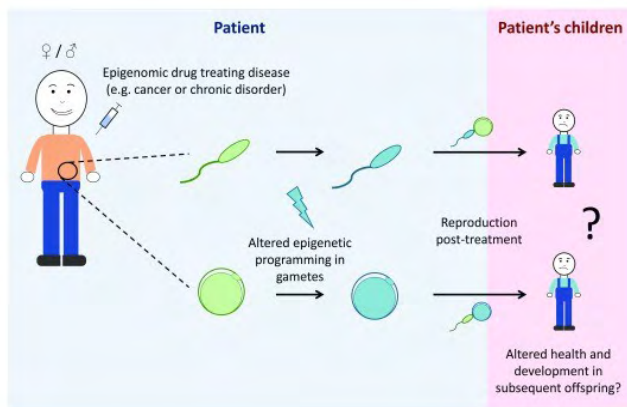
θεραπεία με κοκαΐνη αύξησε τα επίπεδα των ενζύμων KMT1C, G9A και μείωσε τα ένζυμα KDM1A, LSD1. Αυτές οι αλλοιώσεις προκαλούν τροποποιημένα πρότυπα μεθυλίωσης των καταλοίπων των λυσινών της ιστόνης H3, με αποτέλεσμα την αποσιώπηση της γονιδιακής μεταγραφής σε βλαστικά κύτταρα ποντικού. (González et al. 2020)

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι η χορήγηση της κοκαΐνης σε ζωικά μοντέλα μπορεί να προκαλέσει μη γενετική κληρονομικότητα με χαρακτηριστικά εθισμού από τον πατέρα στους απογόνους, συμπεριλαμβανομένων των αρνητικών αποτελεσμάτων της γέννησης, των αυξημένων ποσοστών άγχους και κατάθλιψης, καθώς, επίσης, επηρεάζει την ανάπτυξη και τη συμπεριφορά. Αυτή η πατρική μετάδοση οφείλεται στην ατελή αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. Για παράδειγμα, έχουν αναφερθεί αυξημένα επίπεδα των ιστονών H3K9ac2 και H3K14ac2, που σχετίζονται με τον υποκινητή του γονιδίου BDNF, στο σπέρμα αρουραίων που βρίσκονταν υπό την επίρεια κοκαΐνης, καθώς και στους αρσενικούς απογόνους τους. (Vassoler et al. 2013)

Ακόμη μια ομάδα συγγραφέων αποτελούμενη από τους Jarred et al., επισημαίνουν ότι ορισμένα φάρμακα μπορούν να επηρεάσουν την αναπαραγωγική υγεία μέσω επιγενετικής επιρροής. Σε ένα μοντέλο της νόσου του Huntington, η χορήγηση των αποακετυλασών των ιστονών σε ενήλικα ποντίκια, προκάλεσε την



Εικόνα 29 Επίδραση της κοκαΐνης (COC) στις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των καταλοίπων της ιστόνης H3 σε αρσενικά βλαστικά κύτταρα. (González et al. 2020)



Εικόνα 30: Η επίδραση των φαρμάκων στους επιγενετικούς μηχανισμούς που συμβαίνουν στην ανδρική βλαστική γραμμή. Το ανοιχτό μπλε φόντο αντιπροσωπεύει αυτό που συμβαίνει στον ασθενή, ενώ το ροζ φόντο αντιπροσωπεύει τα παιδιά του ασθενούς. Οι πράσινοι γαμέτες αντιπροσωπεύουν το επιγενετικά φυσιολογικό σπέρμα και τα ωκύτταρα, ενώ οι μπλε γαμέτες αντιπροσωπεύουν το σπέρμα και τα ωκύτταρα με αλλοιωμένα επιγενώματα. (Jarred, Bildsoe, and Western 2018)

απομεθυλίωση των ιστονών και την ταυτόχρονη μεθυλίωση του συνολικού DNA του σπέρματος. Οι απόγονοι εμφάνισαν βελτιωμένο φαινότυπο της νόσου, προφανώς λόγω της επίδρασης των αποακετυλασών στους επιγενετικούς μηχανισμούς (εικόνα 30). (Jia et al. 2015)

Όλο και περισσότερα στοιχεία υποστηρίζουν ότι οι διατροφικοί παράγοντες

αλλάζουν τη σηματοδότηση των ιστών στο σπέρμα σε διάφορους οργανισμούς. Το αρσενικό *Drosophila* που έλαβε μια διαίτα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα παρουσίασε μεταγραφική καταστολή στο σπέρμα. Η ανταπόκριση στην πατρική διατροφή εξαρτιόταν από την πρωταμινοποίηση της χρωματίνης του σπέρματος, ιδίως μέσω της αποσιώπησης των ιστονών H3K9me3 και H3K27me3. (Öst et al. 2014) Επιπλέον, ο ρυθμός διατήρησης της ιστόνης H3K4me1 σε γονίδια υπεύθυνα για τη ρύθμιση της εμβρυογένεσης, στα σπερματοζώαρια ανδρών που τράφηκαν με διαίτα αυξημένη σε λιπαρά, ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σύγκριση με τους άνδρες της ομάδας ελέγχου. (Terashima et al. 2015)

Ακόμη μια παράμετρος αφορά τη διαίτα με χαμηλά επίπεδα φυλλικού οξέος, που συνεπάγεται μειωμένα επίπεδα των ιστονών H3K4me, H3K9me και H3K9me3 στα σπερματοζώαρια και έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση διαταραχών στους απογόνους, ενώ η έκθεση σε παράγοντες που διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα συσχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα της ιστόνης H3K27me3, λόγω της αλλοιωμένης έκφρασης του γονιδίου EZH2 στους όρχεις. (Siddeek et al. 2018)

Όπως φαίνεται από τα ερευνητικά δεδομένα των Siklenka et al., η υπερέκφραση της απομεθυλάσης KDM1A επηρεάζει την ιστόνη H3K4 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, με αποτέλεσμα τα μειωμένα ποσοστά επιβίωσης και τις αναπτυξιακές ανωμαλίες στις τρεις επόμενες γενιές. Η αυξημένη δραστηριότητα της KDM1A κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του σπέρματος συσχετίστηκε με την μειωμένη μεθυλίωση της ιστόνης και με την τροποποιημένη έκφραση του RNA του

σπέρματος, γεγονός που υποδηλώνει ότι η τροποποίηση της ιστόνης θα μπορούσε να συμμετάσχει στα παρατηρούμενα διαγενετικά αποτελέσματα. (Siklenka et al. 2015)

Μελέτες σε knock-out ποντίκια κατέδειξαν την επιρροή των τροποποιήσεων των ιστονών κατά τη διάρκεια της μείωσης στους γαμέτες. Αναφέρθηκε ότι οι μεταλλάξεις στην ιστόνη H3K9 του γονιδίου *Sun39h2*, στους γαμέτες, δημιούργησαν ανωμαλίες στους όρχεις των θηλαστικών. Περαιτέρω έρευνα διαπίστωσε ότι τα μεταλλαγμένα σπερματοκύτταρα παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα της ιστόνης H3K9me3 και αυτά τα κύτταρα σταμάτησαν στο στάδιο του παχυτενίου. (Peters et al. 2002) Το γονίδιο *PRDM9*, που κωδικοποιεί την μεθυλτρανσφεράση της ιστόνης H3K4, εκφράζεται στο πρώιμο στάδιο της μείωσης στους γαμέτες. Το *Prdm9* νокάουτ σε ποντίκια απέδειξε ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι απαραίτητο για τη σύναψη των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης στο στάδιο της προφάσης, αφού η αποσιώπησή του κατέστειλε την έκφραση των αυτοσωματικών γονιδίων στα σπερματοκύτταρα. (Hayashi, Yoshida, and Matsui 2005) Επίσης, γίνεται λόγος για τη δυσλειτουργία των τροποποιήσεων των ιστονών H3K9me και H3ac/H4ac, που είναι ζωτικής σημασίας για την αντικατάσταση των ιστονών και τη συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων. Η αποσιώπηση των γονιδίων *HDM1A* και *HDM2A* επάγει τη δυσλειτουργία αυτών των τροποποιήσεων, γεγονός που επιφέρει μικροορχία και στειρότητα. (Z. Liu et al. 2010; Okada et al. 2007)

Το γονίδιο *PYGO2* κωδικοποιεί την ιστόνη H3K4me3 μέσω ενός πολύ διατηρημένου μοτίβου και ανιχνεύεται ειδικά στους πυρήνες των επιμήκων σπερματιδών. Επιπλέον, η ιστόνη H3K9ac, η οποία συνυπάρχει κανονικά με την H4ac στις επιμήκεις σπερματίδες, μειώθηκε στους όρχεις που παρουσίασαν αποσιώπηση του γονιδίου. Η επιγενετική αποσιώπηση του γονιδίου είχε ως αποτέλεσμα την αρσενική στειρότητα, η οποία προκλήθηκε από την παρεκκλίνουσα έκφραση του γονιδίου μετά το στάδιο της μείωσης και την ανώμαλη πυρηνική συμπύκνωση. Φάνηκε ότι μπορεί να υπάρχει μια διασταύρωση μεταξύ των ιστονών H3K4me3 και H3K9ac, επειδή το γονίδιο «διαβάζει» το σήμα της ιστόνης H3K4me3 και ενεργοποιεί τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών. (Nair et al. 2008)

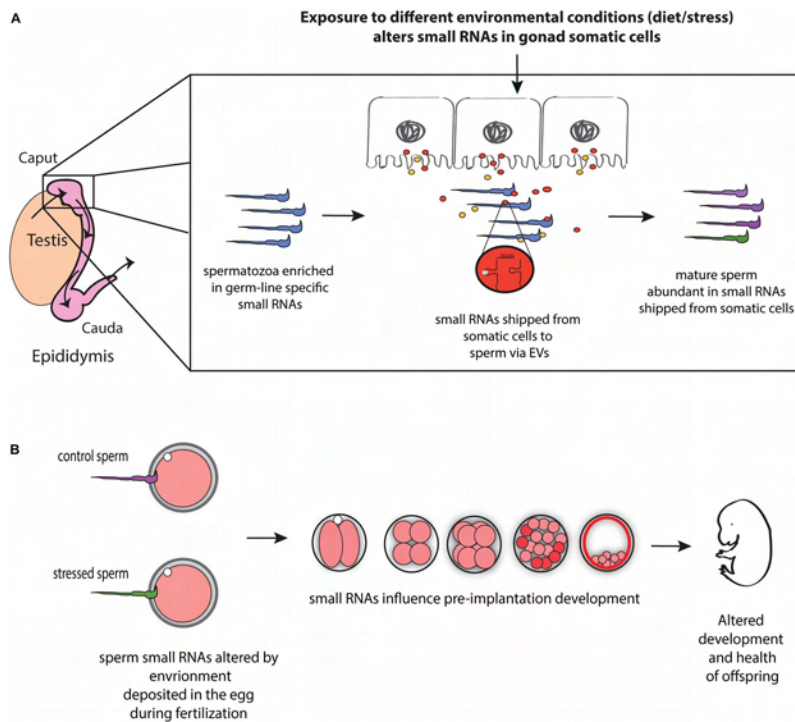
Έπειτα από μελέτη, οι Lu et al., πρότειναν πως η απώλεια του γονιδίου *RNF8* προκάλεσε σημαντικά ελαττώματα στα τελευταία αναπτυξιακά στάδια των σπερματιδών, συμπεριλαμβανομένης της συμπύκνωσης του DNA και ενός ευρέος φάσματος μορφολογικών ανωμαλιών στις κεφαλές και τις ουρές του σπέρματος, οφειλόμενα στην ελλαττωματική αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. Οι

διατηρημένες ιστόνες στο ώριμο σπέρμα ποντικών όπου έχει αποσιωπηθεί το γονίδιο (knock-out mice) παρατηρήθηκαν σε αυξημένο ποσοστό σε σύγκριση με το σπέρμα του wild type, όπου εντοπίστηκαν μόνο οι P1 και P2. Οι ερευνητές συμπέραναν ότι η μεσολαβούμενη, από το γονίδιο RNF8, ουβικιτινίωση των ιστονών H2A και H2B είναι απαραίτητη για την αντικατάσταση των ιστονών από στις πρωταμίμες στη χρωματίνη του σπέρματος. (Lu et al. 2010) Επιπλέον, υπήρξε μια δραματική μείωση στην ακετυλίωση της ιστόνης H4K16 στα βλαστικά κύτταρα knock-out ποντικών, ένα βασικό σήμα για την αντικατάσταση των ιστονών. (Akhtar and Becker 2000)

Οι Chen et al., απέδειξαν ότι η αποσιώπηση του γονιδίου Sirt1 οδηγεί σε μείωση της υπερακετυλίωσης της ιστόνης H4 σε απλοειδή κύτταρα ποντικών και σε μειωμένη συμπύκνωση της χρωματίνης. Σαν αποτέλεσμα, οι ερευνητές παρατήρησαν το αυξημένο ποσοστό σπερματοζωαρίων με ανώμαλη μορφολογία και την υπογονιμότητα. (Y. Chen et al. 2012) Τέλος, οι Bao and Bedford, σε δυο ανεξάρτητες έρευνες, το 2009 και το 2015, απέδειξαν πως η αποσιώπηση του γονιδίου Pargp1 προκάλεσε υπογονιμότητα ή και στειρότητα, λόγω των ανωμαλιών στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων, συμπεριλαμβανομένου του ελαττωματικού σχήματος και της ελαττωματικής συμπύκνωσής του. Πιο συγκεκριμένα, εμφανίστηκε ανώμαλη κατακράτηση της ιστόνης H3, του ειδικού για τους όρχεις παράγοντα TH2B, του συνδέτη H1T και του γονιδίου HILS1. (Bao and Bedford 2016)

3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΑ ncRNAs ΤΟΥ ΣΠΕΡΜΑΤΟΣ

Η πρώτη απόδειξη ότι μια περιβαλλοντικά επαγόμενη επίδραση μπορεί να μεταδοθεί από τον πατέρα στον απόγονο μέσω των RNAs δόθηκε από τους Gapp et al., το 2014 (εικόνα 31). Σε αυτό το πείραμα, το ολικό RNA που εξήχθη από το σπέρμα των ποντικών που εκτέθηκαν σε τραυματικό στρες πρώιμης ζωής εγχύθηκε σε γονιμοποιημένα ωοκύτταρα και προκάλεσε έναν σύνθετο φαινότυπο στην επόμενη γενιά, συμπεριλαμβανομένων των αλλαγών στη συμπεριφορά τους, των μηχανισμών αντιμετώπισης του στρες, του υπερμεταβολισμού και της απελευθέρωσης της γλυκόζης. Τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση των miR-375-3p, miR-375-5p, miR-200b-3p, miR-672-5p and miR-466-5p στο σπέρμα της πρώτης γενιάς απογόνων, καθώς και στον ιππόκαμπο, τον υποθάλαμο και τον εγκέφαλό τους κατά την ενηλικίωση. (Katharina Gapp et al. 2014) Ακόμη, οι Rodgers et al., το 2015, έδειξαν ότι η ενδο-ζυγωτική ένεση ενός μείγματος 9 miRNAs (miR-29c, miR-30a, miR-30c,



Εικόνα 31: (A) Κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και μετά την ωρίμανση των όρχεων, δημιουργούνται ncRNAs που μπορούν να ρυθμιστούν από περιβαλλοντικές συνθήκες, οδηγώντας σε ένα μεταβαλλόμενο μικρό φορτίο RNA στο σπέρμα. (B) Τα ncRNAs του σπέρματος παραδίδονται στα ωοκύτταρα κατά τη γονιμοποίηση και επηρεάζουν την πρόωμη έκφραση των γονιδίων του εμβρύου, με αποτέλεσμα την αλλαγή της πρόωμης ανάπτυξης και της υγείας των ενήλικων απογόνων. (Sharma 2019)

miR-32, miR-193-5p, miR-204, miR-375, miR-532-3p, miR-69) θα μπορούσε να μειώσει αρκετά τους mRNAs στόχους στο ζυγωτό και να προκαλέσει ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια στον ενήλικο απόγονο. Τα microRNAs παρατηρήθηκαν σε αυξημένα επίπεδα και στα σπερματοζωάρια των αρσενικών ποντικών γονέων που εκτέθηκαν σε συνθήκες στρες για διάστημα 42 ημερών πριν από την αναπαραγωγή.

Είναι ενδιαφέρον ότι τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση της DNMT3A αναφέρονται ως μοριακοί στόχοι για 4 από τα 9 microRNAs. (Rodgers et al. 2015)

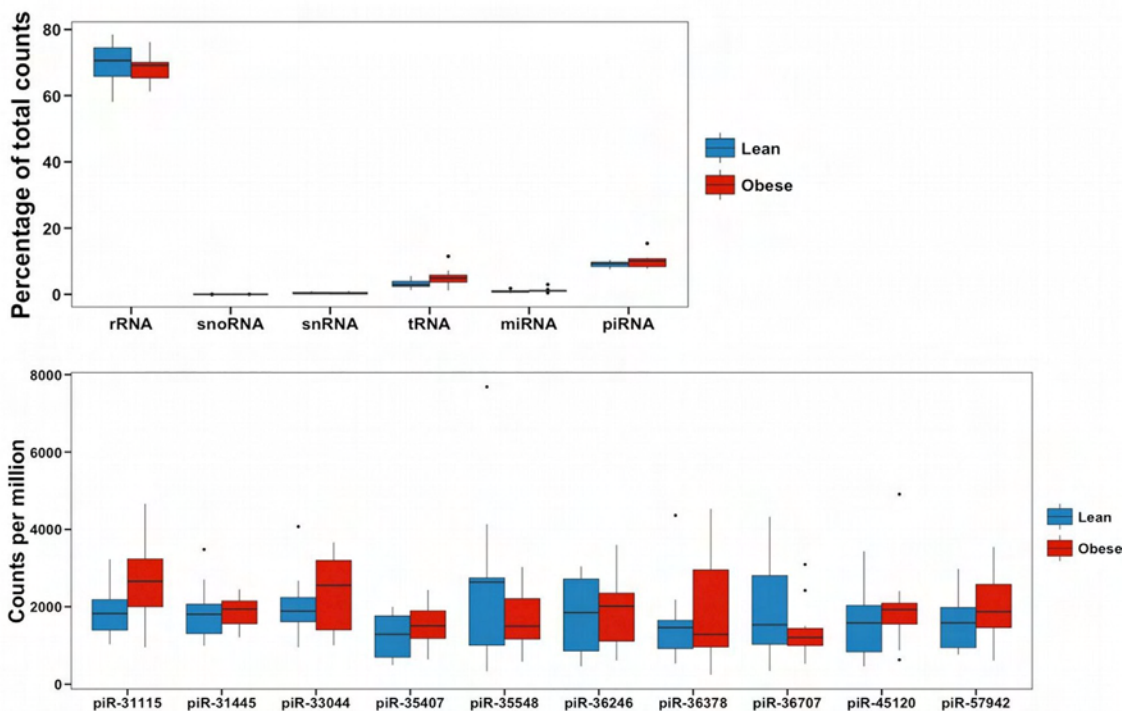
Οι Grandjean et al., παρείχαν υποστηρικτικά στοιχεία για το ρόλο των miRNAs στην επιγενετική κληρονομικότητα της γαμετικής σειράς. Ανέφεραν ότι μια δίαιτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά/σάκχαρα οδηγεί σε μεταβολικό φαινότυπο στον απόγονο, που χαρακτηρίζεται από αυξημένο βάρος, αντίσταση στην ινσουλίνη και μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη. Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η ένεση του miR-19, σε ζυγωτό, προερχόμενο από σπέρμα ανδρών που ακολουθούσαν διατροφή με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, μπόρεσε να αναπαραγάγει τον μεταβολικό φαινότυπο. (Grandjean et al. 2015)

Επιπλέον 13 miRNAs που μεταδίδονται μέσω του σπέρματος διαμορφώθηκαν με τη λήψη δίαιτας με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και φάνηκε ότι μετέφεραν αυτό το τροποποιημένο φορτίο των miRNAs στο έμβρυο κατά τη γονιμοποίηση, αλλάζοντας την πορεία της ανάπτυξης και επηρεάζοντας τον φαινότυπο των ενήλικων απογόνων. (Fullston et al. 2016) Οι ερευνητές απέδειξαν ότι η πατρική

έκθεση στη συγκεκριμένη διαίτα, προκαλεί σε ποντίκια μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη και αντίσταση στην ινσουλίνη, τόσο στους άρρενες όσο και σε θήλειες απογόνους και παχυσαρκία μετά την ενηλικίωση. (Fullston et al. 2013) Ειδικότερα, η πρόσληψη αυξημένης ποσότητας λιπαρών οδηγεί στην αύξηση του miR-133b στο σπέρμα, το οποίο στοχεύει και καταστέλλει τη δράση του IGF-1R κατά την ανάπτυξη του εμβρύου, συμβάλλοντας στην εξασθενημένη ανάπτυξη του εμβρύου πριν την εμφύτευση. (Mitchell, Bakos, and Lane 2011)

Επίσης, το miR-196a-5p, που συμμετέχει στην πρόιμη εμβρυϊκή ανάπτυξη, φάνηκε αυξημένο στο σπέρμα και τους όρχεις των ανδρών που έλαβαν τέτοιου τύπου διαίτα, με αποτέλεσμα την αδυναμία της φυσιολογικής ανάπτυξης του εμβρύου. (Hornstein et al. 2005) Επιπλέον, έρευνες έχουν δείξει ότι, σε άνδρες που λάμβαναν διαίτα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, ανιχνεύονται υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης των miR-205 και miR 340 στο σπέρμα τους, οδηγώντας σε καρκινογένεση και στειρότητα. (Hulf et al. 2013)

Έχει αποδειχθεί ότι τα σπερματοζώαρια από παχύσαρκους ανθρώπους και αρουραίους, εμφανίζουν αλλοιωμένη έκφραση των piRNAs επηρεάζοντας την επιγενετική κληρονομικότητα της μεταβολικής δυσλειτουργίας. (Donkin et al. 2016) Στη μελέτη των Krawetz et al., φάνηκε ότι οι παχύσαρκοι άνδρες είχαν στο σπέρμα τους αυξημένα ποσοστά των piRNAs και των θραυσμάτων tRNAs (tRFs). (Krawetz et al. 2011b) Ειδικότερα οι Donkin et al. επισημαίνουν πως, αν και η κατανομή των υποτύπων των snRNAs ήταν αμετάβλητη, το επίπεδο έκφρασης συγκεκριμένων miRNAs, piRNAs, tRFs και snRNAs άλλαξαν στα σπερματοζώαρια των παχύσαρκων ανδρών. (Donkin et al. 2016) Αναφορικά με τα piRNAs, οι Hunter et al., ανέλυσαν υγιή παχύσαρκα άτομα της αναπαραγωγικής ηλικίας και ανακάλυψαν ότι η έκφραση 37 piRNAs άλλαξε στα σπερματοζώαρια, σε σύγκριση με τα σπερματοζώαρια των αδύνατων ανδρών (εικόνα 32) και επιπλέον, αποκάλυψε ότι το μετάγραφο γονίδιο της κοκαΐνης και της αμφεταμίνης, ένας αρνητικός ρυθμιστής της πρόσληψης τροφής που εμπλέκεται στην παχυσαρκία, ήταν ο πιθανός στόχος. (Hunter et al. 2004)



Εικόνα 32: Επάνω διάγραμμα: έκφραση των υποτύπων των snRNA στο σπέρμα των παχύσαρκων και των αδύνατων ανδρών, με βάση την εκατοστιαία θέση. Κάτω διάγραμμα: μεταβολές στην έκφραση των piRNAs στο σπέρμα των παχύσαρκων και των αδύνατων ανδρών, με βάση την εκατοστιαία θέση. (Donkin et al. 2016)

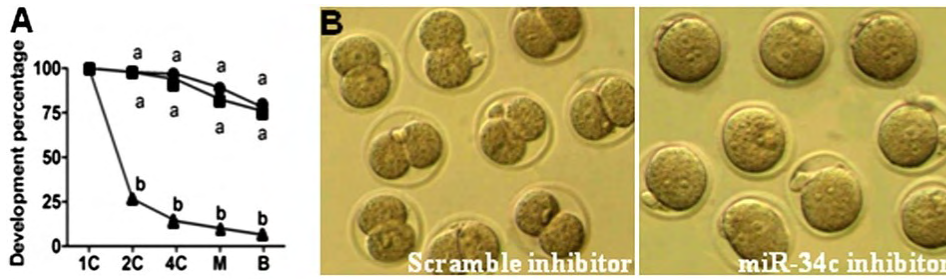
Πιο πρόσφατα, αρκετές ομάδες έχουν παράσχει αποδεικτικά στοιχεία ότι τα tRFs και οι τροποποιήσεις τους έχουν, επίσης, προταθεί ως φορείς διαγενεακής κληρονομικότητας και νέες αναφορές επιβεβαιώνουν τις αλλαγές στο φορτίο των RNAs των σπερματοζωαρίων μετά από διάφορες περιβαλλοντικές προκλήσεις. (K. Garr and Bohacek 2018) Πιο συγκεκριμένα, στην επιδιδυμίδα, όπου λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του σπέρματος μετά από τους όρχεις, τα εξωκυτταρικά κυστίδια των επιθηλιακών κυττάρων παρέχουν snRNAs στο ωριμάζον σπέρμα. Το περιεχόμενο αυτών των «επιδιδυμοσωμάτων» αποδείχθηκε ότι μεταβάλλει τα tRFs του σπέρματος ως απόκριση στην πατρική διατροφή, υποστηρίζοντας ότι τα επιδιδυμικά επιθηλιακά κύτταρα μπορεί να είναι οι δυναμικοί μεσολαβητές μεταξύ των πατρικών

περιβαλλοντικών εκθέσεων και των αλλαγών στο RNA του σπέρματος. (Sharma et al. 2016)

Το 2016, δύο ανεξάρτητες μελέτες επιβεβαίωσαν ότι μια δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά ή χαμηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, που δόθηκε σε αρσενικά ποντίκια, συσχετίστηκε με αυξημένα επίπεδα θραυσμάτων tRNAs στο σπέρμα, που στη συνέχεια συσχετίστηκαν με μεταβολική νόσο στους απογόνους τους. (Champroux et al. 2018) Ο πιθανός ρόλος των tRFs προτάθηκε μέσω της αναγνώρισης της αλληλουχίας tRF-Gly-GCC ως καταστολέα, η οποία βρίσκεται σε ενεργή κατάσταση στο έμβryo κατά το στάδιο της προεμφύτευσης. (Sharma et al. 2016) Σε μια άλλη μελέτη, η μικροέγχυση των τροποποιημένων tRFs, από την πατρική διατροφή, σε ζυγωτό, είχε ως αποτέλεσμα τη μεταβολή στην έκφραση γονιδίων στο έμβryo, ιδίως την καταστολή των ενδογενών ρετρό-στοιχείων. (Chen et al. 2016)

Σύμφωνα με τους Ingerslev et al. υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι οι παράγοντες του τρόπου ζωής μπορούν να ρυθμίσουν το piRNA στο σπέρμα. Για παράδειγμα, σε ένα πείραμα που περιελάμβανε έξι εβδομάδες σωματικής άσκησης φάνηκε ότι μεταβλήθηκε η έκφραση 6 διαφορετικών piRNAs στα σπερματοζώαρια από αδύνατους και υγιείς νεαρούς άνδρες. (Ingerslev et al. 2018) Ωστόσο, η διακοπή της άσκησης για 3 μήνες αποκάλυψε την αντιστροφή στις μεταβολές της έκφρασης των piRNAs. Το piR-hsa-28160, του οποίου η έκφραση μεταβάλλεται ως απόκριση στην άσκηση, αντίστρεψε το let7a στο σπέρμα, ένα miRNA που είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στη φλεγμονή και μεταβολισμό της γλυκόζης. Επομένως, αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι οι επιδράσεις στον τρόπο ζωής είναι συγκεκριμένες και ότι η έκφραση των piRNAs του σπέρματος είναι δυναμική. (Castella et al. 2015)

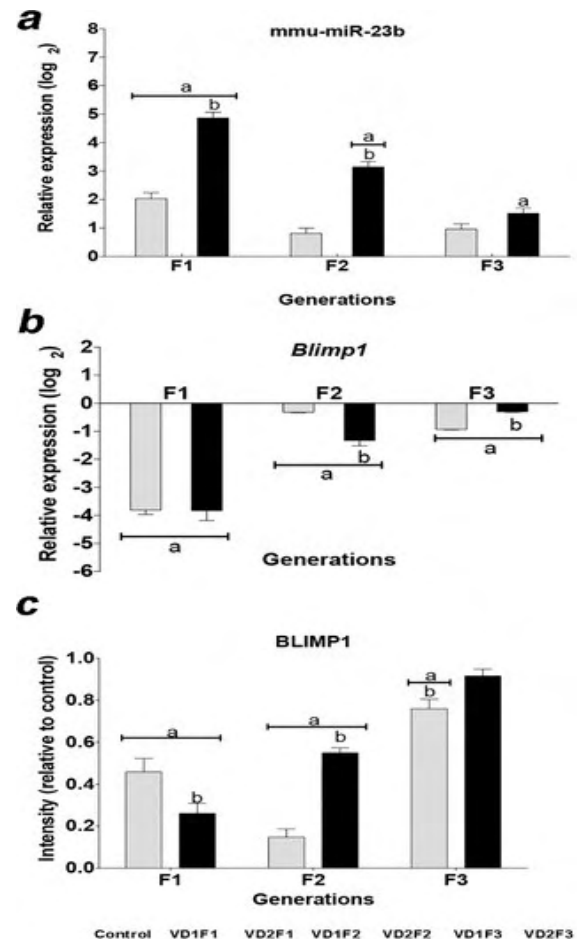
Πλήθος μελετών έχουν εντοπίσει τη λειτουργία των miRNAs στα σπερματοζώαρια. Για παράδειγμα, το miR-34c είναι το πιο συχνό miRNA στο ανθρώπινο σπέρμα και η αναστολή του, που μεταφέρεται από το σπέρμα στο ζυγωτό, έχει ως αποτέλεσμα τη ζυγωτική διακοπή. Οι Liu et al., το 2012, απέδειξαν πως το miR-34c έχει βασικό ρόλο στην πρώτη διαίρεση του εμβρύου ποντικού, καθώς η ένεση ενός αναστολέα του σε ζυγωτό διέκοψε την κυτταρική διαίρεση του εμβρύου (εικόνα 33 A/B). (Liu et al. 2012)



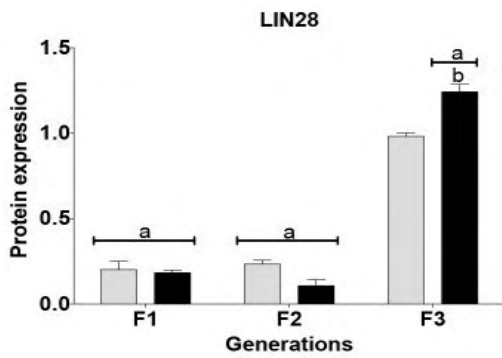
Εικόνα 33: Επιδράσεις του αναστολέα miR-34c στην ανάπτυξη εμβρύων ποντικού. (Α) Η ένεση του αναστολέα miR-34c κατέστειλε την ανάπτυξη των ζυγωτών. Το ποσοστό της ανάπτυξης βασίζεται στον αριθμό των εμβρύων ενός κυττάρου (1C) που χρησιμοποιήθηκαν. Υπήρξαν σημαντικές μειώσεις στην ανάπτυξη στα στάδια των δύο κυττάρων (2C), των τεσσάρων κυττάρων (4C), του μοριδίου (M) και της βλαστοκύστης (B) που προήλθαν από ζυγωτά, στα οποία εγχύθηκε ο αναστολέας miR-34c (▲) σε σύγκριση με τα ζυγωτά ελέγχου, στα οποία εγχύθηκε ο αναστολέας ανακατασκευής (■). Δεν βρέθηκε διαφορά στην ανάπτυξη μεταξύ των μη επεξεργασμένων (●) και των ζυγωτών ελέγχου. Κάθε σημείο δεδομένων αντιπροσωπεύει περισσότερα από 200 έμβρυα. Τα γράμματα "a" και "b" υποδηλώνουν $P < 0,001$ στο ίδιο χρονικό σημείο. (B) Ο αναστολέας miR-34c ανέστειλε την σύντηξη των προπυρήνων. Οι προπυρήνες σε ζυγωτά που εγχύθηκαν με αναστολέα ανακατασκευής συντήχθηκαν και τα ζυγωτά διασπάστηκαν 20 ώρες μετά την ένεση. (W. M. Liu et al. 2012)

Επιπλέον, σε μια μελέτη ποντικών, η προγεννητική έκθεση σε βινκλοζολίνη οδήγησε στην αύξηση των miRNAs, όπως το miR-23b και let-7 στα αρχέγονα γαμετικά εμβρυϊκά κύτταρα, γεγονός που παρατηρήθηκε σε τρεις διαδοχικές γενιές. Συνολικά, τα δεδομένα των ερευνητών δείχνουν ότι η διαγενεακή ανοδική ρύθμιση του let-7 και του miR-23b σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα ζώων που εκτέθηκαν σε βινκλοζολίνη συσχετίστηκε με την υπορύθμιση των πρωτεϊνών Blimp1 (εικόνα 34) και Lin28 (εικόνα 35) σε τρεις γενιές, και τα οποία εμπλέκονται στη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων. Σαν αποτέλεσμα παρατηρείται η μειωμένη γονιμότητα των αρρένων. (Brieno-Enríquez et al. 2015)

Στη μελέτη των Denomme et al., το 2017, ταυτοποιήθηκαν 10 miRNAs, στο σπέρμα ανδρών με μειωμένη ποιότητα, σημαντικά μεταβαλλόμενα (εικόνα 36A) και συσχετίστηκαν με την κακή ανάπτυξη της βλαστοκύστης, μέσω

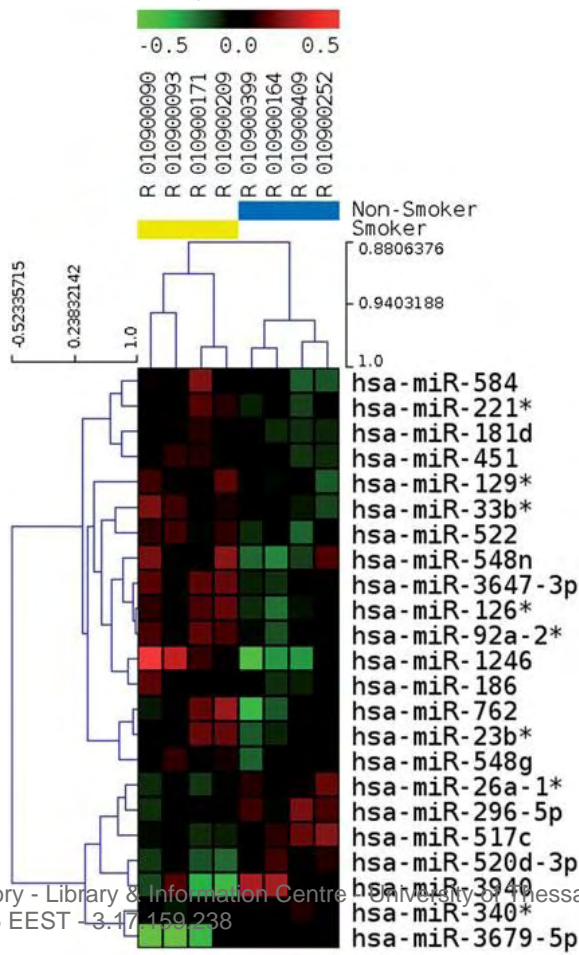
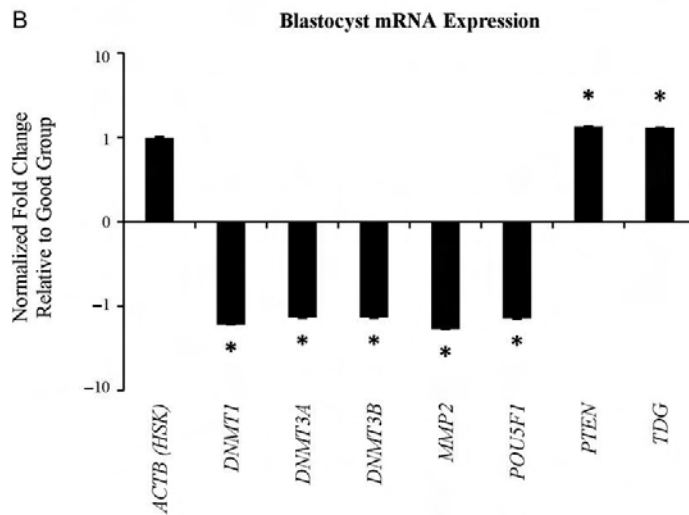
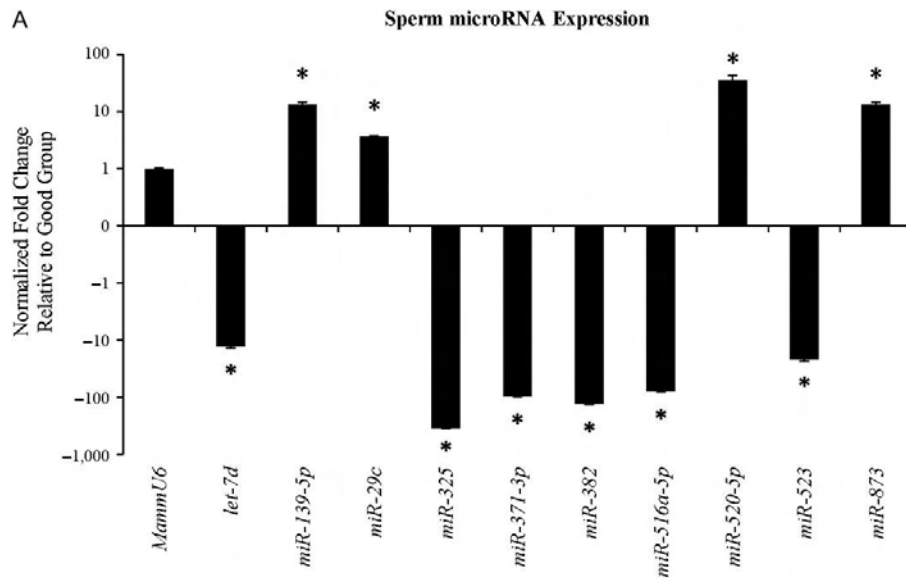


Εικόνα 34: Διάγραμμα α) Σχετική έκφραση του miR-23b σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα εκτεθειμένων εμβρύων, σε σχέση με τα έμβρυα μάρτυρες. Διάγραμμα β) Σχετική έκφραση των Blimp1 mRNA και BLIMP1 πρωτεΐνης (c) Σχετική έκφραση του Blimp1 mRNA σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα εκτεθειμένων εμβρύων σε σχέση με τα έμβρυα μάρτυρες. Σε κάθε διάγραμμα όπου a: δείχνει μια σημαντικά στατιστική διαφορά των VD1 και VD2 σε σύγκριση με τους μάρτυρες ($p < 001$), b: δείχνει μια σημαντικά στατιστική διαφορά του VD1 σε σύγκριση με το VD2 ($p < 001$). Το ανοιχτό γκρι χρώμα: VD1(1mg/Kg), το μαύρο χρώμα: VD2(100mg/Kg). (Brieno-Enríquez et al. 2015)



αντίστοιχων μεταβολών σε γονίδια στόχους (εικόνα 36B) που εμπλέκονται στην ενεργοποίηση του εμβρυϊκού γονιδιώματος, στην εμφύτευση της βλαστοκύστης και στη μεθυλίωση του DNA. (Denomme et al. 2017)

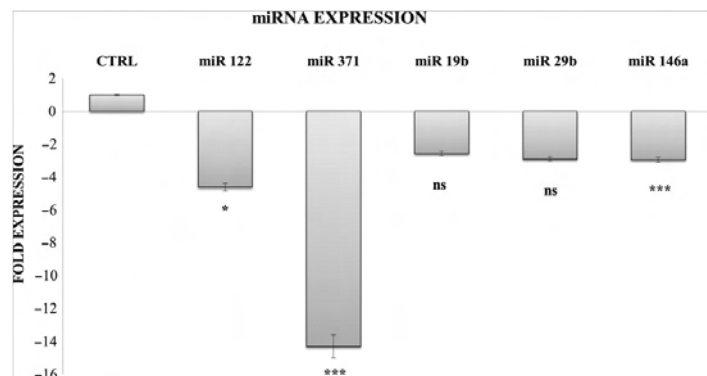
Εικόνα 35: Επίπεδα πρωτεΐνης LIN28 σε αρχέγονα γαμετικά κύτταρα εκτεθειμένων εμβρύων. (Briño-Enríquez et al. 2015)



Εικόνα 36: Η έκφραση (A) των miRNAs και (B) των mRNAs των γονιδίων στόχων τους αλλάζει στην ομάδα των ζυγωτών με μειωμένη ποιότητα σπέρματος. Ομαλοποιημένη έκφραση του miRNA της εσωτερικής σταθεράς MammU6 και του mRNA του γονιδίου ACTB σε σχέση με την ομάδα των ζυγωτών με καλή ποιότητα σπέρματος. Η στατιστική σημασία του $P < 0,05$ δηλώνεται με αστερίσκο. (Denomme et al. 2017) Ενδιαφέρον προκαλεί ότι το κάπνισμα μπορεί να έχει επίδραση στην έκφραση των miRNAs στα ανθρώπινα σπερματοζώαρια. Έπειτα από αξιολόγηση των προφίλ των

miRNAs και των mRNAs των γονιδίων στόχων τους, στα σπερματοζώαρια 4 καπνιστών και 4 μη καπνιστών, 15 mRNAs και 23 miRNAs εκφράστηκαν διαφορετικά στους καπνιστές έναντι των μη καπνιστών (εικόνα 37). Επιπλέον, καταγράφηκε αυξημένη έκφραση 16 miRNAs στους καπνιστές, ενώ 7 μειώθηκαν. Αναφέρθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των miRNAs και των πιθανών mRNA στόχων τους, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι οι αλλαγές στην έκφραση των miRNAs που προκαλούνται από το κάπνισμα μπορεί να προωθήσουν αλλοιώσεις στην έκφραση των mRNAs στους καπνιστές. (Metzler-Guillemain et al. 2015) Οι κυρίαρχες οδοί, που διαμεσολαβούνται από τα miRNAs που εκφράζονται διαφορετικά στα σπερματοζώαρια των καπνιστών, εμπλέκονται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο. Αυτές οι οδοί είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη του σπέρματος και του εμβρύου. Επιπλέον, τα αποπτωτικά μονοπάτια υπορυθμίζονται στα σπερματοζώαρια καπνιστών, με το NFκB να λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής. (Amanai, Brahmajosyula, and Perry 2006)

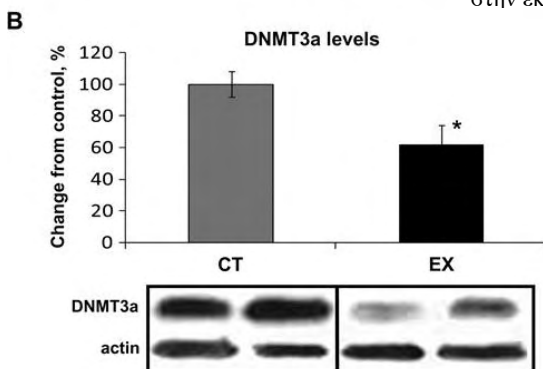
Στην ανασκόπηση των Paoli et al., το 2019, αναφέρεται η τροποποιημένη έκφραση 67 miRNAs στο σπέρμα 40 ηλικιωμένων ανδρών σε σχέση με 40 νεαρά άτομα, εκ των οποίων οι 8



A

miRNA	Fold induction	Target
miR-29a	2.33	DNMT3a,
miR-29b	1.23	DNMT3a,

Εικόνα 38: Τα miRNAs εμπλέκονται στους μηχανισμούς της γήρανσης και της σπερματογένεσης. Το miR-146a 3πλάσια μείωση (P <0,001), το miR-371 14πλάσια μείωση (P <0,001) και το miR-122 5πλάσια μείωση (P = 0,01). Αντιθέτως, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην έκφραση των miR-19b και miR-29b. (Paoli et al. 2019)

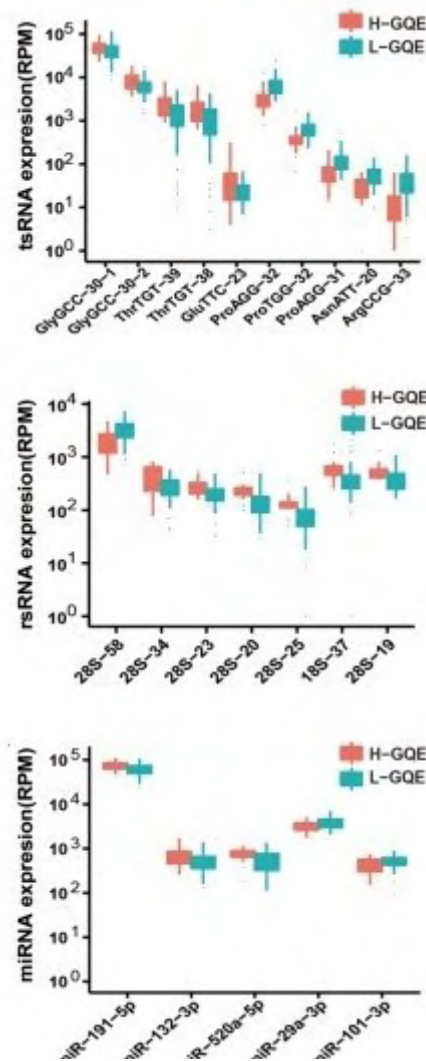


εμφάνισαν υψηλότερη έκφραση και οι 59 χαμηλότερη. Η ταυτοποίηση ορισμένων miRNAs αποκάλυψε μια σημαντικά χαμηλότερη έκφραση των miR-122, miR-371 και miR-146a στο σπέρμα των ηλικιωμένων ανδρών (εικόνα 38). (Paoli et al. 2019)

Οι Filkowskiy et al. αποκάλυψαν πως η πατρική έκθεση στην ακτινοβολία είχε ως αποτέλεσμα τις μεταβολές των miRNAs στους γαμέτες τους. Οι ερευνητές παρατήρησαν μια ιδιαίτερα σημαντική αύξηση των miR-29a και 29b (εικόνα 39A) και ταυτόχρονη μια μείωση της DNMT3a (εικόνα 39 B) στους όρχεις των εκτεθειμένων ζώων. (Filkowskiy et al. 2009)

Σήμερα, τα ncRNAs είναι μόρια που εμπλέκονται στον έλεγχο της ποιότητας του σπέρματος. Είναι ενδιαφέρον ότι μια πρόσφατη μελέτη των Chioccarelli et al., προτείνει μια διαφορική έκφραση των tRNAs, rRNAs και miRNAs, σε 87 δείγματα σπέρματος που συλλέχθηκαν από άνδρες, συντρόφους ζευγαριών που υποβάλλονται σε γονιμοποίηση *in vitro*, σε σχέση με την ποιότητα του εμβρύου. Οι ερευνητές ανακάλυψαν ότι δύο τύποι 5'-tRFs, το GlyGCC-30-1 και το GlyGCC-30-2, μειώθηκαν στην ομάδα με μειωμένη ποιότητα σπέρματος, συγκριτικά με την ομάδα που εμφάνιζε καλή ποιότητα του σπέρματος (εικόνα 40- πρώτο διάγραμμα). Έτσι, η εσφαλμένη ρύθμιση αυτών των tsRNAs μπορεί να συμβάλει στην κακή ποιότητα του σπέρματος και τη μη φυσιολογική πρόωμη ανάπτυξη του εμβρύου. (Chioccarelli et al. 2020)

Τα rsRNAs, φυσιολογικά, εκφράζονται στο σπέρμα σε υψηλή ποσότητα. Στη συγκεκριμένη έρευνα φάνηκε η χαμηλή έκφρασή τους στην ομάδα με χαμηλή ποιότητα σπέρματος και προκειμένου να διερευνηθούν τη συσχέτιση μεταξύ των rsRNAs και της ποιότητας του σπέρματος, οι ερευνητές ανέλυσαν την έκφρασή τους και εντόπισαν επτά διαφορετικά εκφρασμένα rsRNAs, τα 28S-58, 28S-34, 28S-23, 28S-20, 28S-25, 18S-37, 28S-19. Από την ανάλυση φάνηκε ότι μόνο το 28S-58 αυξήθηκε στην ομάδα με χαμηλή ποιότητα σπέρματος, ενώ τα υπόλοιπα έξι rsRNAs μειώθηκαν (εικόνα 40-δεύτερο διάγραμμα). Επιπλέον, οι συγγραφείς προσδιόρισαν πέντε miRNAs που εκφράστηκαν διαφορετικά μεταξύ των

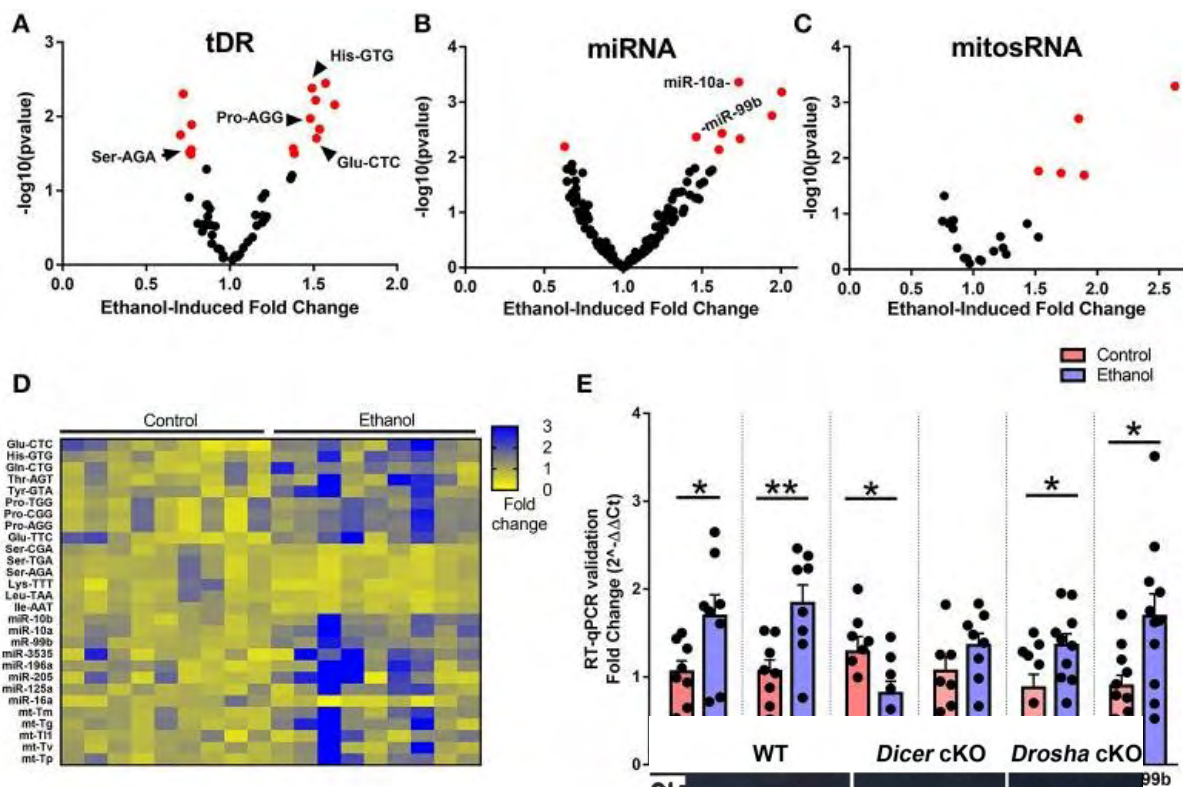


Εικόνα 40: Διαφορική έκφραση των tRNAs, rRNAs και miRNAs στο σπέρμα, ανάλογα με την ποιότητά του. (Chioccarelli et al. 2020)

δύο ομάδων. Τα τρία miRNAs (miR-132-3p, miR-191-3p και miR-520a-5p) μειώθηκαν και τα δύο miRNAs (miR-101-3p και miR-29a-3p) αυξήθηκαν στην ομάδα με μειωμένη ποιότητα σπέρματος, συγκριτικά με την ομάδα που εμφάνιζε καλή ποιότητα του σπέρματος (εικόνα 40-τρίτο διάγραμμα), υποδεικνύοντας ότι αυτά τα στοχευόμενα miRNAs μπορεί να είναι σημαντικά για την σπερματογένεση και την ανάπτυξη πρώιμου εμβρύου. (Chioccarelli et al. 2020)

Επιπλέον, πρόσφατα, έχουν ταυτοποιηθεί αλλαγές σε συγκεκριμένα miRNAs, tRNAs, και mtRNAs του σπέρματος μετά από χρόνια έκθεση στην αιθανόλη. Ειδικότερα τροποποιήθηκαν 15 tDRs, 8 miRNAs και 5 mtRNAs. Ενδεικτικά, βρέθηκαν αυξημένα τα Glu-CTC, His-GTG, miR-10a, miR-99b και μειώθηκε το Ser-AGA. (Romपाल et al. 2018)

Οι Zhang et al., αναφερόμενοι στις τροποποιήσεις των ncRNAs, επισημαίνουν



Εικόνα 41: Η χρόνια έκθεση στην αιθανόλη μεταβάλλει πολλά ε δείχνουν τη στατιστική σημαντικότητα ($q \leq 0,1$). (Romपाल et al.

ότι η 5-μεθυλκυτοσίνη, η ψευδοουριδίνη και η N1-μεθυλαδενοσίνη έχουν βρεθεί σε κλάσματα RNAs του σπέρματος και ότι η συγκεκριμένη τοποθεσία κατανομής αυτών των τροποποιήσεων αναμένεται να επηρεάσει

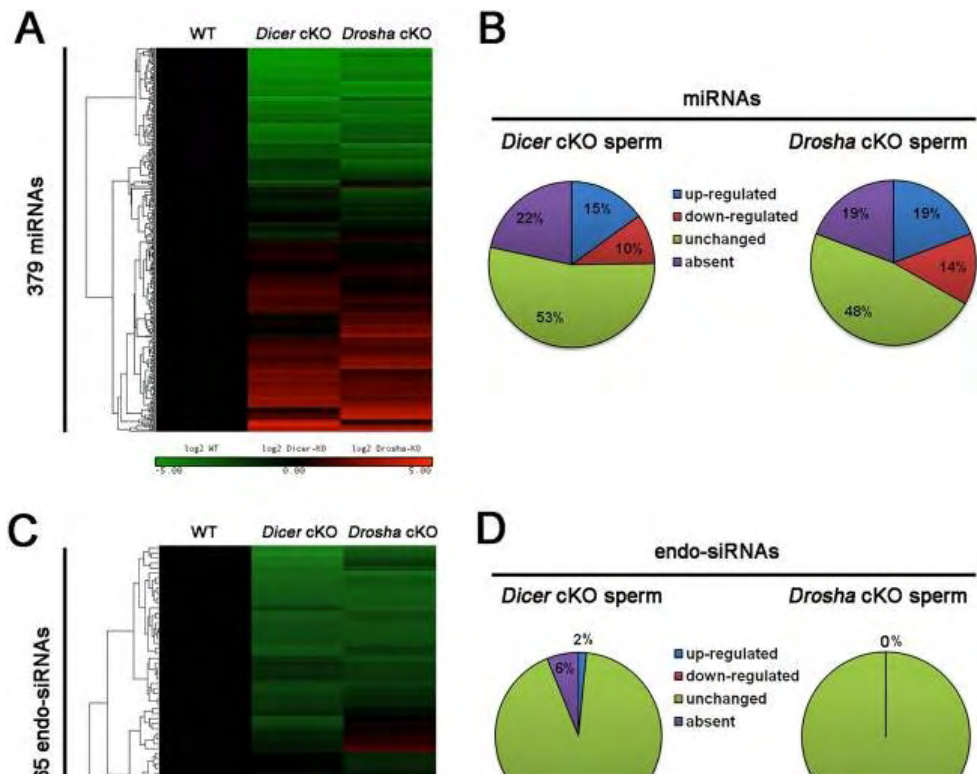


το δυναμικό της δέσμευσης του RNA στο DNA και τις πρωτεΐνες. Αυτά με τη σειρά τους θα μπορούσαν να αυξήσουν τη δυναμικότητα των RNAs του σπέρματος πέρα από τις πρωτοταγείς αλληλουχίες και να επηρεάσουν επιγενετικά τη λειτουργικότητα του σπέρματος. (Zhang et al. 2018)

Μια άλλη αναφορά έδειξε ότι η αποσιώπηση του γονιδίου DDX1, είχε ως αποτέλεσμα τη διαγενεακή κληρονομικότητα της θνησιμότητας των ποντικών άγριου τύπου. Γνωρίζοντας τον ρόλο του γονιδίου DDX1 στη δέσμευση, στο ζετύλιγμα και στη μεταφορά του RNA, η απώλεια του DDX1 μπορεί να επηρεάσει τη δευτεροταγή δομή, τη σταθερότητα, την αποδόμηση, τον υποκυτταρικό εντοπισμό και τη μετάφραση των RNAs. Επομένως, οι συγγραφείς αναφέρουν την αλληλεπίδραση μεταξύ των μη φυσιολογικών RNAs και της διαταραγμένης δομής της χρωματίνης ως αιτία για τον θανατηφόρο φαινότυπο των απογόνων. (Hildebrandt et al. 2015)

Η επιγενετική απενεργοποίηση των ενζύμων Dicer και Drosha σε σπερματικά κύτταρα, έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε ολίγο/ασθενό/τερατοζωοσπερμία, μέσω της επίδρασής τους στα snRNAs (εικόνα 42). Για να το προσδιορίσουν αυτό οι ερευνητές πραγματοποίησαν αλληλούχιση των snRNAs του σπέρματος. Συνολικά 379 miRNAs ταυτοποιήθηκαν στο σπέρμα των ποντικών Wild Type, Dicer cKO και Drosha cKO (εικόνα 43A). Στο σπέρμα των Dicer cKO ποντικών, το 47% των miRNAs απορρυθμίστηκε, όπου το 15% αυτών αυξήθηκε και το 32% μειώθηκε, ενώ

Εικόνα 42: Ακαθόριστη μορφολογία των όρχεων και των επιδιδυμίδων σε ενήλικα Wild Type, Dicer cKO και Drosha cKO ποντίκια. (Chioccarelli et al. 2020)



Εικόνα 43: Η εμφάνιση των ncRNAs του σπέρματος, όπου τα Dicer και Drosha cKO άλλαξαν τα προφίλ έκφρασης των miRNAs και endo-siRNAs, όπως αποκαλύπτεται από τις αναλύσεις snRNA-Seq. (Chioccarelli et al. 2020)

το 53% παρέμεινε αμετάβλητο (εικόνα 43B). Ομοίως, στο σπέρμα των Droscha cKO ποντικών, το 52% των miRNAs απορυθμίστηκε, με το 19% να εμφανίζεται αυξημένο και το 33% μειωμένο, σε σύγκριση με τους μάρτυρες Wild Type, ενώ το 48% των miRNAs παρέμεινε αμετάβλητο. Παρόμοια, 65 ενδο-siRNAs αναγνωρίστηκαν στο σπέρμα των ποντικών Dicer cKO (εικόνα 43C), από τα οποία τα 4 (6%) μειώθηκαν σημαντικά και μόνο 1 (2%) αυξήθηκε (εικόνα 43D). Τέλος, στο σπέρμα των Droscha cKO ποντικών, κανένα από τα 65 ενδο-siRNA δεν έδειξε σημαντικές αλλαγές σε σύγκριση με τους μάρτυρες Wild Type (εικόνα 43D). Αποτέλεσμα της επιγενετικής αποσιώπησης των ενζύμων αυτών στο σπέρμα ποντικών, είναι η απορρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων προεμφύτευσης του εμβρύου. (Chioccarelli et al. 2020)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗ ΤΩΝ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΣΤΟ ΣΠΕΡΜΑ

Μια μετα-ανάλυση που δημοσιεύθηκε το 2015 από 30 άρθρα στα οποία συμμετείχαν 115.000 συμμετέχοντες ανέφεραν σημαντική συσχέτιση μεταξύ της ανδρικής παχυσαρκίας και του μειωμένου αναπαραγωγικού δυναμικού, καθώς και μειωμένα ποσοστά γεννήσεων ζωντανών απογόνων. Μετά την απώλεια βάρους, παρατηρήθηκε βελτίωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων, της μορφολογίας, της κινητικότητας και της ακεραιότητας του DNA τόσο στους άνδρες όσο και στους ποντικούς. (Campbell et al. 2015; Håkonsen et al. 2011)

Στο άρθρο τους, η επιστημονική ομάδα των McPherson και Lane, επιβεβαιώνουν τα παραπάνω ευρήματα. Χρησιμοποιώντας ένα μοντέλο ποντικιού, κατέδειξαν ότι οι παρεμβάσεις που στοχεύουν στη βελτίωση της πατρικής μεταβολικής υγείας, κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων παραθύρων πριν από τη σύλληψη, μπορούν να ομαλοποιήσουν τις ανώμαλες επιγενετικές υπογραφές στο σπέρμα και να βελτιώσουν τη μεταβολική υγεία των θηλυκών απογόνων. Πράγματι, οι παρεμβάσεις διατροφής ή άσκησης για 8 εβδομάδες σε παχύσαρκους άνδρες αποκατέστησαν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και την παχυσαρκία στις θηλυκές απογόνους. Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκαν φυσιολογικά επίπεδα των miRNAs του σπέρματος που συνδέονται με το χρωμόσωμα X και στοχεύουν γονίδια που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την απόπτωση, κεντρικά μονοπάτια για τα ωοκύτταρα και την πρώιμη εμβρυογένεση. Επιπλέον, οι συννοσηρότητες που σχετίζονται με την παχυσαρκία, συμπεριλαμβανομένης της φλεγμονής, της

δυσανεξίας στη γλυκόζη, του στρες και της υπερχοληστερολαιμίας, φάνηκαν να έχουν καλή πρόγνωση έπειτα από παρατήρηση της συγκέντρωσης των miRNAs του σπέρματος και των φαινοτύπων των απογόνων. (McPherson and Lane 2014)

Ωστόσο, εκτός από τη διαίτα, η πρόσληψη μικροθρεπτικών συστατικών μπορεί, επίσης, να αλλάξει το επιγένομα. Για παράδειγμα, το φολικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει τις παραμέτρους αξιολόγησης του σπέρματος, ειδικά μεταξύ ανδρών με πολυμορφισμό στο γονίδιο μεταβολισμού του φολικού οξέος, MTHFR, και μπορεί να θεωρηθεί μέρος της από του στόματος συμπλήρωσης μικροθρεπτικών συστατικών στην υπογονιμότητα των ανδρών. Το 2019, η ομάδα των W. Huang et al., πρότεινε ότι οι επιλογές της διατροφής και της άσκησης, που έχουν γίνει από τους άνδρες την περίοδο πριν από την σύλληψη, μπορεί να αλλάξουν το επιγενετικό προφίλ του σπέρματος, να επηρεάσουν την ποιότητα του και να επαναπρογραμματίσουν την υγεία των μελλοντικών γενεών. (W. Huang et al. 2020)

Στην έρευνα των [Herst](#) et al., βρέθηκε ότι τα miRNAs του σπέρματος που επηρεάστηκαν μόνο από ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους είναι γνωστό ότι στοχεύουν γονίδια που εμπλέκονται στην ανάπτυξη των μαστικών αδένων και των εμβρυϊκών οργάνων στην F1 γενιά, στη διαφοροποίηση του φύλου και στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος στην F2 γενιά και στη γνωστική λειτουργία και την ανάπτυξη του εγκεφάλου στην γενιά F3. Όταν η έκθεση αυτή συνδυάστηκε με συμπληρωματική χορήγηση φολικού οξέος, ωστόσο, αυτές οι ίδιες γονιδιακές οδοί στοχευμένες με miRNAs διαταράχθηκαν σε μικρότερη έκταση και μόνο στο σπέρμα F1. (Herst et al. 2019)

Η μελέτη των [Ingerslev](#) et al., αποκαλύπτει ότι η βραχυπρόθεσμη προπόνηση αντοχής προκαλεί αξιοσημείωτη αναδιαμόρφωση στο επιγένομα του σπέρματος μέσω των snCRNAs και της μεθυλίωσης του DNA σε κοντινή απόσταση από τις περιοχές έναρξης της μεταγραφής, συγκεκριμένα, σε γονίδια που σχετίζονται με τη νευρολογική ανάπτυξη και λειτουργία. (Ingerslev et al. 2018) Επιπλέον, οι ερευνητές Siddeek et al., αποκάλυψαν ότι τα γονίδια Dicer και Drosha αντιπροσωπεύουν κρίσιμα ένζυμα για τη βιογένεση των miRNAs. (Siddeek et al. 2018) Πραγματοποιώντας μια ένεση σπέρματος με τα ένζυμα Dicer και Drosha σε ποντίκια, οι Shuiqiao Yuan et al. περιέγραψαν μια κρίσιμη λειτουργία των πατρικών miRNAs στον έλεγχο της μεταγραφικής ομοιόστασης στα ζυγωτά και τα έμβρυα των δύο κυττάρων, τα οποία θα μπορούσαν να διασωθούν με την έγχυση ολικού ή μέρους του

RNA, που προέρχεται από σπέρμα άγριου τύπου, σε έμβρυα που προκύπτουν από μεθόδους υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. (Yuan et al. 2016)

Ένας αυξανόμενος αριθμός κλινικών εξωσωματικής γονιμοποίησης προσφέρουν στους ασθενείς τους από του στόματος αντιοξειδωτική θεραπεία για τη βελτίωση της ποιότητας του σπέρματος μειώνοντας το οξειδωτικό στρες. (Wright, Milne, and Leeson 2014) Σε μια μελέτη, η χορήγηση ενός συνδυασμού βιταμινών B, βιταμίνης E και ψευδαργύρου, για 4 μήνες, βελτίωσε τη γονιμότητα των ανδρών συντρόφων σε ζευγάρια με τουλάχιστον δύο αποτυχημένες προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και, μετά από 12 μήνες, είχε ως αποτέλεσμα την αυθόρμητη εγκυμοσύνη και, τελικά, την απόκτηση απογόνου σε 18 ζευγάρια, ενώ τα ζευγάρια με τρεις προσπάθειες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οδηγήθηκαν σε 22 εγκυμοσύνες και 15 ζωντανές γεννήσεις. (Dattilo et al. 2014) Παρόμοια, μια ανασκόπηση του Cochrane που δημοσιεύθηκε το 2014 ανέλυσε 48 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές, συμπεριλαμβανομένων συνολικά 4.179 υπογόνιμων ανδρών ηλικίας 20-52 ετών και ανέφερε ότι η αντιοξειδωτική θεραπεία μπορεί να βελτιώσει τόσο τα κλινικά ποσοστά της εγκυμοσύνης, όσο και τα ποσοστά των γεννήσεων. (Showell et al. 2011)

Μελέτες αποκάλυψαν ότι η βιταμίνη D αλληλεπιδρά, επίσης, με το επιγένομα του σπέρματος, καθώς κρίσιμα γονίδια στην οδό σηματοδότησης της βιταμίνης περιλαμβάνουν νησίδες CpG στους υποκινητές τους, με αποτέλεσμα να αποσιωπούνται με την επίδραση της μεθυλίωσης. Ωστόσο, η κύρια επιγενετική επίδραση της βιταμίνης D φαίνεται να συνδέεται με την ακετυλίωση των ιστονών, καθώς ο υποδοχέας της βιταμίνης D3 αλληλεπιδρά με συμπαράγοντες που έρχονται σε επαφή με τις ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών που εμπλέκονται στην μεταγραφική ενεργοποίηση. (Karlic and Varga 2011; Pike, Meyer, and Bishop 2012)

Ακόμη, η εφαρμογή του αναστολέα των αποακετυλασών των ιστονών, τριχοστατίνη A, σε ποντίκια, συσχετίστηκε με την ανδρική υπογονιμότητα, η οποία θα μπορούσε να αντιστραφεί με την απομάκρυνσή της. Είναι ενδιαφέρον ότι σε διάφορες κυτταρικές σειρές καρκίνου, η γαλλική επιγαλοκατεχίνη, η κύρια πολυφαινόλη που υπάρχει στο πράσινο τσάι, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη μεθυλίωση του DNA, αναστέλλοντας το DNMT1 ή τη διυδροφολική αναγωγή, τις τροποποιήσεις των ιστονών, μέσω αναστολής της ακετυλοτρανσφεράσης, καθώς και την έκφραση των miRNAs. (Schagdarsurengin and Steger 2016)

Μόλις το 2019, οι Luján et al., πραγματοποίησαν μια έρευνα στην οποία συμμετείχαν 21 ασθενείς. Από αυτούς οι 9 ανήκαν στην ομάδα των γόνιμων μαρτύρων και οι 12 στην ομάδα θεραπείας της ιδιοπαθούς στειρότητας. Οι ερευνητές ανακάλυψαν μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία για την ανδρική υπογονιμότητα με τη χρήση αναλόγων της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης, η οποία βελτίωσε τον αριθμό των σπερματοζωαρίων και την κινητικότητα τους. (Luján et al. 2019)

Συνοπτικά, η ομάδα του Han, έδειξε ότι η απενεργοποίηση του γονιδίου SOX30 στους όρχεις μέσω της μεθυλίωσης, βλάπτει μοναδικά τη σπερματογένεση, προκαλώντας πιθανώς μη αποφρακτική αζωοσπερμία, ενώ η, εκ νέου, έκφρασή του μπορεί να αποκαταστήσει επιτυχώς τη σπερματογένεση και την γονιμότητα. (F. Han et al. 2014) Τέλος, οι συγγραφείς παρουσιάζουν την παραδοσιακή κινεζική ιατρική σαν μια εναλλακτική μέθοδο θεραπείας. Στο άρθρο των Shao [Hu Zhou](#) et al., φάνηκε ότι η θεραπεία τύπου shengjing επιδρά στον άξονα υποθάλαμο-υπόφυση-όρχεις, ανακουφίζει τη φλεγμονή, αποτρέπει το οξειδωτικό στρες, μειώνει τον κατακερματισμό του DNA και ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων. Επιπλέον, φάνηκε ότι έχει την ικανότητα να βελτιώνει τη συγκέντρωση του σπέρματος, την κινητικότητα και το ποσοστό της εγκυμοσύνης μειώνοντας το ποσοστό της απώλειας του αποτυπωμένου γονιδίου H19, μέσω τροποποίησης των επιγενετικών δεικτών. (Shao [Hu Zhou](#) et al., 2019)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Οι υπάρχουσες μελέτες παρέχουν στοιχεία ότι οι επιγενετικές υπογραφές που σχετίζονται με το σπέρμα μπορούν να επηρεάσουν την γονιμοποίηση, την ανάπτυξη του εμβρύου και την υγεία του απογόνου. Η επιγενετική ρύθμιση εξακολουθεί να είναι ένας πιθανός και εξαιρετικά ειδικός μηχανισμός για τις περιπτώσεις όπου η έκθεση των γαμετών στους περιβαλλοντικούς παράγοντες συμβαίνει πριν τη σύλληψη, προγεννητικά, ή ακόμα και σε οποιαδήποτε άλλη στιγμή της ζωής. Οι επιγενετικοί μηχανισμοί που συμβάλλουν στην επιγενετική ρύθμιση επιδρούν στα διαφορετικά επίπεδα της ανάπτυξης των γαμετικών κυττάρων και φαίνεται να δρουν σε μια πλειάδα μορίων-στόχους εντός του γονιδιώματος.

Οι πλέον εξέχοντες μηχανισμοί του επιγενετικού προγραμματισμού που συζητήθηκαν στην παρούσα ανασκόπηση είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα πατρικά μη κωδικοποιητικά RNAs. Πληθώρα

διαφορετικών ερευνών έχει αποκαλύψει ότι παράγοντες που εμπλέκονται στους μηχανισμούς αυτούς είναι η διατροφή, η άσκηση, η χρήση ουσιών, οι περιβαλλοντικοί ρύποι και οι χημικές ουσίες, η ακτινοβολία, η ηλικία, το στρες και τα φάρμακα. Αναφορικά με τις επιπτώσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα των ανδρών, έχουν περιγραφεί η μειωμένη γονιμότητα, η στειρότητα και η διαγενεακή κληρονομικότητα. Ωστόσο, αν και πολλοί από τους παράγοντες που προκαλούν επιγενετικές τροποποιήσεις έχουν διευκρινιστεί, οι υποκείμενοι μηχανισμοί συχνά είναι ελάχιστα κατανοητοί.

Αρχικά, απαιτούνται περισσότερες διαγενεακές μελέτες που να εστιάζουν σε περιβαλλοντικές εκθέσεις στον πληθυσμό της γενιάς F0, στις επιδράσεις στην επιγενετική του σπέρματος και σε οποιαδήποτε ένδειξη των επιπτώσεων στα αποτελέσματα της υγείας στους απογόνους. Χρειάζονται βελτιωμένες τεχνικές για την απομόνωση του σπέρματος με σκοπό να επιτρέπεται η πολλαπλή ανάλυση σε περιορισμένες ποσότητες αρχικού υλικού. Απαιτείται, επίσης, πρόοδος στη βιολογία των συστημάτων για την απόλυτη ενσωμάτωση και ανάλυση των πολύπλοκων και πολύπλευρων επιγενετικών πληροφοριών, αλλά και στην κατανόηση της μεταβλητότητας των επιγενετικών προφίλ του σπέρματος.

Η μελέτη του επιγενετικού προτύπου των σπερματοζωαρίων μπορεί να βοηθήσει στην καλύτερη κατανόηση των αιτιών της ανδρικής υπογονιμότητας. Επιπλέον, οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εστιαστούν σε επιγενετικές τροποποιήσεις που σχετίζονται με συγκεκριμένες αιτίες στειρότητας και επαναλαμβανόμενη απώλεια της εγκυμοσύνης. Ίσως ο εντοπισμός ενός υποσυνόλου ατόμων, στα οποία φαίνεται να κληρονομείται, θα μπορούσε να ανοίξει το δρόμο για περαιτέρω μελέτες συσχέτισης σε ολόκληρο το γονιδίωμα και για παρεμβάσεις που θα μπορούν να αποτρέψουν ή να τροποποιήσουν συγκεκριμένες επιζήμιες επιγενετικές υπογραφές, με στόχο τη βελτιστοποίηση της μεταβολικής και αναπαραγωγικής υγείας. Έτσι θα αναπτυχθεί η δυνατότητα σχεδιασμού μέτρων πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας της ανδρικής στειρότητας που οφείλεται σε επιγενετικούς παράγοντες συμβάλλοντας τουλάχιστον εν μέρει στην αντιμετώπιση ενός σοβαρού προβλήματος της σύγχρονης κοινωνίας όπως η μειωμένη αναπαραγωγική ικανότητα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, Ashok, Aditi Mulgund, Alaa Hamada, and Michelle Renee Chyatte. 2015. "A Unique View on Male Infertility around the Globe." *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(1): 37. <http://www.rbej.com/content/13/1/37> (November 4, 2020).
- Akhtar, Asifa, and Peter B. Becker. 2000. "Activation of Transcription through Histone H4 Acetylation by MOF, an Acetyltransferase Essential for Dosage Compensation in *Drosophila*." *Molecular Cell* 5(2): 367–75.
- Alkhaled, Y. et al. 2018. "Impact of Cigarette-Smoking on Sperm DNA Methylation and Its Effect on Sperm Parameters." *Andrologia* 50(4).
- Amanai, Manami, Manjula Brahmajosyula, and Anthony C.F. Perry. 2006. "A Restricted Role for Sperm-Borne MicroRNAs in Mammalian Fertilization1." *Biology of Reproduction* 75(6): 877–84.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.106.05649>
9 (November 1, 2020).
- Aoki, Vincent W., Lihua Liu, and Douglas T. Carrell. 2005. "Identification and Evaluation of a Novel Sperm Protamine Abnormality in a Population of Infertile Males." *Human Reproduction* 20(5): 1298–1306.
<https://academic.oup.com/humrep/article/20/5/1298/2356832> (October 23, 2020).
- Arpanahi, Ali et al. 2009. "Endonuclease-Sensitive Regions of Human Spermatozoal Chromatin Are Highly Enriched in Promoter and CTCF Binding Sequences." *Genome Research* 19(8): 1338–49. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.094953.109>.
(October 28, 2020).
- Aston, Kenneth I et al. 2015. "Aberrant Sperm DNA Methylation Predicts Male Fertility Status and Embryo Quality." *Fertility and Sterility*® 104(6).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.019> (October 3, 2020).
- Aul, Ritu B., and Richard J. Oko. 2001. "The Major Subacrosomal Occupant of Bull Spermatozoa Is a Novel Histone H2B Variant Associated with the Forming Acrosome during Spermiogenesis." *Developmental Biology* 239(2): 376–87.
- Ausió, J. et al. 2003. "Syndromes of Disordered Chromatin Remodeling." *Clinical Genetics* 64(2): 83–95.
- Balhorn, Rod. 2018. "Sperm Chromatin: An Overview." In *A Clinician's Guide to Sperm DNA and Chromatin Damage*, Springer International Publishing, 3–30.
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-71815-6_1 (October 14, 2020).
- Bao, Jianqiang, and Mark T. Bedford. 2016. "Epigenetic Regulation of the Histone-to-Protamine Transition during Spermiogenesis." *Reproduction* 151(5): R55–70.

- www.reproduction-online.org (September 21, 2020).
- Barouki, R. et al. 2018. “Epigenetics as a Mechanism Linking Developmental Exposures to Long-Term Toxicity.” *Environment International* 114: 77–86.
- Barral, Sophie et al. 2017. “Histone Variant H2A.L.2 Guides Transition Protein-Dependent Protamine Assembly in Male Germ Cells.” *Molecular Cell* 66(1): 89-101.e8.
- Benbrahim-Tallaa, Lamia et al. 2005. “Molecular Events Associated with Arsenic-Induced Malignant Transformation of Human Prostatic Epithelial Cells: Aberrant Genomic DNA Methylation and K-Ras Oncogene Activation.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 206(3): 288–98.
- Benchaib, Mehdi et al. 2005. “Influence of Global Sperm DNA Methylation on IVF Results.” *Human Reproduction* 20(3): 768–73.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640258/> (October 3, 2020).
- Bermejo-Álvarez, P. et al. 2015. “Tet-Mediated Imprinting Erasure in H19 Locus Following Reprogramming of Spermatogonial Stem Cells to Induced Pluripotent Stem Cells.” *Scientific Reports* 5: 13691–13691. www.nature.com/scientificreports/ (September 22, 2020).
- Björndahl, Lars, and Ulrik Kvist. 2003. “Sequence of Ejaculation Affects the Spermatozoon as a Carrier and Its Message.” *Reproductive BioMedicine Online* 7(4): 440–48.
- Bourc’his, Déborah, and Timothy H. Bestor. 2004. “Meiotic Catastrophe and Retrotransposon Reactivation in Male Germ Cells Lacking Dnmt3L.” *Nature* 431(7004): 96–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15318244/> (October 3, 2020).
- Boyer, Laurie A. et al. 2005. “Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells.” *Cell* 122(6): 947–56.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16153702/> (October 16, 2020).
- Brannan, C I, E C Dees, R S Ingram, and S M Tilghman. 1990. “The Product of the H19 Gene May Function as an RNA.” *Molecular and Cellular Biology* 10(1): 28–36.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1688465/> (October 4, 2020).
- Brieño-Enríquez, Miguel A. et al. 2015. “Exposure to Endocrine Disruptor Induces Transgenerational Epigenetic Deregulation of MicroRNAs in Primordial Germ Cells” ed. Jae Yong Han. *PLOS ONE* 10(4): e0124296.
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124296> (November 1, 2020).
- Brykczynska, Urszula et al. 2010. “Repressive and Active Histone Methylation Mark Distinct Promoters in Human and Mouse Spermatozoa.” *Nature Structural and Molecular Biology* 17(6): 679–87. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20473313/> (October 13, 2020).
- Campbell, Jared M., Michelle Lane, Julie A. Owens, and Hassan W. Bakos. 2015. “Paternal Obesity Negatively Affects Male Fertility and Assisted Reproduction Outcomes: A

- Systematic Review and Meta-Analysis.” *Reproductive BioMedicine Online* 31(5): 593–604.
- Carone, Benjamin R. et al. 2010. “Paternally Induced Transgenerational Environmental Reprogramming of Metabolic Gene Expression in Mammals.” *Cell* 143(7): 1084–96.
- Carrell, D. T., and L. Liu. 2001. “Altered Protamine 2 Expression Is Uncommon in Donors of Known Fertility, but Common among Men with Poor Fertilizing Capacity, and May Reflect Other Abnormalities, of Spermiogenesis.” *Journal of Andrology* 22(4): 604–10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11451357/> (October 23, 2020).
- Carrell, Douglas T., and Saher Sue Hammoud. 2009. “The Human Sperm Epigenome and Its Potential Role in Embryonic Development.” *Molecular Human Reproduction* 16(1): 37–47. <https://academic.oup.com/molehr/article/16/1/37/1057860> (October 13, 2020).
- Castel, Stephane E, and Robert A Martienssen. 2013. “RNA Interference in the Nucleus: Roles for Small RNAs in Transcription, Epigenetics and Beyond.” *Nature Reviews Genetics* 14. www.nature.com/reviews/genetics (October 18, 2020).
- Castella, Sandrine et al. 2015. “Ilf3 and NF90 Functions in RNA Biology.” *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 6(2): 243–56. <http://doi.wiley.com/10.1002/wrna.1270> (November 1, 2020).
- de Castro Barbosa, Thais et al. 2016. “High-Fat Diet Reprograms the Epigenome of Rat Spermatozoa and Transgenerationally Affects Metabolism of the Offspring.” *Molecular Metabolism* 5(3): 184–97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2015.12.002> (October 5, 2020).
- Champroux, Alexandre et al. 2018. “A Decade of Exploring the Mammalian Sperm Epigenome: Paternal Epigenetic and Transgenerational Inheritance.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6(MAY): 50. www.frontiersin.org (September 21, 2020).
- Chan, Jennifer C., Bridget M. Nugent, and Tracy L. Bale. 2018. “Parental Advisory: Maternal and Paternal Stress Can Impact Offspring Neurodevelopment.” *Biological Psychiatry* 83(10): 886–94.
- Chang, Aimee S. et al. 2005. “Association between Beckwith-Wiedemann Syndrome and Assisted Reproductive Technology: A Case Series of 19 Patients.” *Fertility and Sterility* 83(2): 349–54. [/pmc/articles/PMC4872595/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/154872595/) (October 13, 2020).
- Chen, Qi et al. 2016. “Sperm TsRNAs Contribute to Intergenerational Inheritance of an Acquired Metabolic Disorder.” *Science* 351(6271): 397–400. <https://science.sciencemag.org/content/351/6271/397> (October 3, 2020).
- Chen, Qi, Wei Yan, and Enkui Duan. 2016. “Epigenetic Inheritance of Acquired Traits through Sperm RNAs and Sperm RNA Modifications.” *Nature Reviews Genetics* 17(12): 733–43. <https://www.nature.com/articles/nrg.2016.106> (September 21, 2020).

- Chen, Yue et al. 2012. “Quantitative Acetylome Analysis Reveals the Roles of SIRT1 in Regulating Diverse Substrates and Cellular Pathways.” *Molecular and Cellular Proteomics* 11(10): 1048–62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22826441/> (October 30, 2020).
- Cheung, Hoi Hung et al. 2016. “Hypermethylation of Genes in Testicular Embryonal Carcinomas.” *British Journal of Cancer* 114(2): 230–36. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26625006/> (October 4, 2020).
- Chioccarelli, Teresa et al. 2020. “Histone Post-Translational Modifications and CircRNAs in Mouse and Human Spermatozoa: Potential Epigenetic Marks to Assess Human Sperm Quality.” *Journal of Clinical Medicine* 9(3): 640. <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/3/640> (September 21, 2020).
- Cho, Chunghee et al. 2003. “Protamine 2 Deficiency Leads to Sperm DNA Damage and Embryo Death in Mice.” *Biology of Reproduction* 69(1): 211–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12620939/> (October 13, 2020).
- “Chromatin Remodeling.” 2020. In *Definitions*, <https://docplayer.gr/9615555-Anadiaplasi-tis-hromatinis-chromatin-remodeling.html> (October 18, 2020).
- Colaco, Stacy, and Denny Sakkas. 2018. “Paternal Factors Contributing to Embryo Quality.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 35(11): 1953–68. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30206748/> (September 21, 2020).
- Conine, Colin C. et al. 2018. “Small RNAs Gained during Epididymal Transit of Sperm Are Essential for Embryonic Development in Mice.” *Developmental Cell* 46(4): 470-480.e3. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30057276/> (October 18, 2020).
- Costa, Fabrício F. 2005. “Non-Coding RNAs: New Players in Eukaryotic Biology.” *Gene* 357(2): 83–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16111837/> (October 13, 2020).
- Cox, Gerald F. et al. 2002. “Intracytoplasmic Sperm Injection May Increase, the Risk of Imprinting Defects.” *American Journal of Human Genetics* 71(1): 162–64. [/pmc/articles/PMC384973/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12620939/) (October 5, 2020).
- Crespo, Marion et al. 2020. “Multi-Omic Analysis of Gametogenesis Reveals a Novel Signature at the Promoters and Distal Enhancers of Active Genes.” *Nucleic acids research* 48(8): 4115–38. <https://academic.oup.com/nar/article/48/8/4115/5809165> (September 21, 2020).
- Curry, Erin, Timothy J. Safranski, and Scott L. Pratt. 2011. “Differential Expression of Porcine Sperm MicroRNAs and Their Association with Sperm Morphology and Motility.” *Theriogenology* 76(8): 1532–39.
- D’Occhio, M. J., K. J. Hengstberger, and S. D. Johnston. 2007. “Biology of Sperm Chromatin Structure and Relationship to Male Fertility and Embryonic Survival.” *Animal Reproduction Science* 101(1–2): 1–17.

- Dam, Anika H.D.M. et al. 2007. "Homozygous Mutation in SPATA16 Is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia." *American Journal of Human Genetics* 81(4): 813–20.
- Dattilo, Maurizio et al. 2014. "The Importance of the One Carbon Cycle Nutritional Support in Human Male Fertility: A Preliminary Clinical Report." *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(1): 71. /pmc/articles/PMC4119238/?report=abstract (November 4, 2020).
- Davis, Tamara L., Grace J. Yang, John R. McCarrey, and Marisa S. Bartolomei. 2000. "The H19 Methylation Imprint Is Erased and Re-Established Differentially on the Parental Alleles during Male Germ Cell Development." *Human Molecular Genetics* 9(19): 2885–94. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11092765/> (September 22, 2020).
- Dawlaty, Meelad M. et al. 2013. "Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development." *Developmental Cell* 24(3): 310–23. <https://indiana.pure.elsevier.com/en/publications/combined-deficiency-of-tet1-and-tet2-causes-epigenetic-abnormalit> (September 22, 2020).
- Daxinger, Lucia, and Emma Whitelaw. 2012. "Understanding Transgenerational Epigenetic Inheritance via the Gametes in Mammals." *Nature Reviews Genetics* 13(3): 153–62. <https://www.nature.com/articles/nrg3188> (October 18, 2020).
- Deng, Wei, and Haifan Lin. 2002. "Miwi, a Murine Homolog of Piwi, Encodes a Cytoplasmic Protein Essential for Spermatogenesis." *Developmental Cell* 2(6): 819–30. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12062093/> (October 13, 2020).
- Denomme, Michelle M. et al. 2017. "Alterations in the Sperm Histone-Retained Epigenome Are Associated with Unexplained Male Factor Infertility and Poor Blastocyst Development in Donor Oocyte IVF Cycles." *Human Reproduction* 32(12): 2443–55. <https://academic.oup.com/humrep/article/32/12/2443/4565816> (September 21, 2020).
- Dent, Claire L., and Anthony R. Isles. 2014. "Brain-Expressed Imprinted Genes and Adult Behaviour: The Example of Nesp and Grb10." *Mammalian Genome* 25(1–2): 87–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23974804/> (October 16, 2020).
- Deobagkar, Deepti D., and H. Sharat Chandra. 2003. "The Inactive X Chromosome in the Human Female Is Enriched in 5-Methylcytosine to an Unusual Degree and Appears to Contain More of This Modified Nucleotide than the Remainder of the Genome." *Journal of Genetics* 82(1–2): 13–16.
- Depa-Martynow, Magdalena et al. 2012. "Impact of Protamine Transcripts and Their Proteins on the Quality and Fertilization Ability of Sperm and the Development of Preimplantation Embryos." *Reproductive Biology* 12(1): 57–72.
- Dey, Bijan K., Adam C. Mueller, and Anindya Dutta. 2014. "Long Non-Coding Rnas as Emerging Regulators of Differentiation, Development, and Disease." *Transcription*

- 5(4). /pmc/articles/PMC4581346/?report=abstract (September 22, 2020).
- Dias, Brian G., and Kerry J. Ressler. 2014a. "Parental Olfactory Experience Influences Behavior and Neural Structure in Subsequent Generations." *Nature Neuroscience* 17(1): 89–96.
- . 2014b. "Parental Olfactory Experience Influences Behavior and Neural Structure in Subsequent Generations." *Nature Neuroscience* 17(1): 89–96. <https://www.nature.com/articles/nn.3594> (October 28, 2020).
- Dong, Juan et al. 2019. "UHRF1 Suppresses Retrotransposons and Cooperates with PRMT5 and PIWI Proteins in Male Germ Cells." *Nature Communications* 10(1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12455-4> (September 21, 2020).
- Dong, Wei Wei et al. 2016. "Identification and Characterization of Human Testis Derived Circular RNAs and Their Existence in Seminal Plasma." *Scientific Reports* 6. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27958373/> (September 22, 2020).
- Donkin, Ida et al. 2016. "Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans." *Cell Metabolism* 23(2): 369–78.
- Donkin, Ida, and Romain Barrès. 2018. "Sperm Epigenetics and Influence of Environmental Factors." *Molecular Metabolism* 14: 1–11.
- Dorman, Janice S., Mandy J. Schmella, and Susan W. Wesmiller. 2017. "Primer in Genetics and Genomics, Article 1: DNA, Genes, and Chromosomes." *Biological Research for Nursing* 19(1): 7–17. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1099800416678321> (September 22, 2020).
- Dorosh, Andriy et al. 2013. "Expression Analysis of MND1/GAJ, SPATA22, GAPDHS and ACR Genes in Testicular Biopsies from Non-Obstructive Azoospermia (NOA) Patients." *Reproductive Biology and Endocrinology* 11(1).
- Efimova, Olga A. et al. 2017. "Genome-Wide 5-Hydroxymethylcytosine Patterns in Human Spermatogenesis Are Associated with Semen Quality." *Oncotarget* 8(51): 88294–307. www.impactjournals.com/oncotarget/ (October 5, 2020).
- Elzeinova, Fatima et al. 2008. "Effect of Low Dose of Vinclozolin on Reproductive Tract Development and Sperm Parameters in CD1 Outbred Mice." *Reproductive Toxicology* 26(3–4): 231–38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18940246/> (October 20, 2020).
- "Epigenetic Inheritance." 2012. *Science* 338(6107): 579–579. <https://www.bing.com/images/search?view=detailV2&ccid=xYjLUfYd&id=F8264348EA3804EA3D5ABAF26E43E422FCB04489&thid=OIP.xYjLUfYdDEftJvzEW1BG9gHaJP&mediaurl=https%3A%2F%2Fd3i71xaburhd42.cloudfront.net%2Fbb7d3938e0e2a5a931d40bde663a2500f862abd7%2F4-Figure1-1.pn> (October 11, 2020).

- Farhadova, Sabina, Melisa Gomez-Velazquez, and Robert Feil. 2019. "Stability and Lability of Parental Methylation Imprints in Development and Disease." *Genes* 10(12). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31810366/> (September 21, 2020).
- Faure, A. K. et al. 2003. "Misregulation of Histone Acetylation in Sertoli Cell-Only Syndrome and Testicular Cancer." *Molecular Human Reproduction* 9(12): 757–63.
- Felsenfeld, Gary. 2014. "A Brief History of Epigenetics." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(1): a018200. <http://cshperspectives.cshlp.org/> (September 22, 2020).
- Fernandes, Maria Gomes et al. 2018. "Human-Specific Subcellular Compartmentalization of P-Element Induced Wimpy Testis-like (PIWIL) Granules during Germ Cell Development and Spermatogenesis." *Human Reproduction* 33(2): 258–69. </pmc/articles/PMC5850288/?report=abstract> (October 18, 2020).
- Filkowski, Jody N. et al. 2009. "Hypomethylation and Genome Instability in the Germline of Exposed Parents and Their Progeny Is Associated with Altered MiRNA Expression." *Carcinogenesis* 31(6): 1110–15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19959559/> (November 1, 2020).
- Finegersh, Andrey, and Gregg E. Homanics. 2014. "Paternal Alcohol Exposure Reduces Alcohol Drinking and Increases Behavioral Sensitivity to Alcohol Selectively in Male Offspring" ed. Thomas H. J. Burne. *PLoS ONE* 9(6): e99078. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0099078> (September 22, 2020).
- Fischle, Wolfgang et al. 2003. "Molecular Basis for the Discrimination of Repressive Methyl-Lysine Marks in Histone H3 by Polycomb and HP1 Chromodomains." *Genes and Development* 17(15): 1870–81. </pmc/articles/PMC196235/?report=abstract> (October 13, 2020).
- Ford, W C L et al. 2000. 15 Human Reproduction *Neither Sperm Function in Vitro and Perinatal Epidemiology*. Oxford Academic. www.ich.bris.ac.uk/localdir/itsus.html (September 22, 2020).
- Fraga, Mario F. et al. 2005. "Epigenetic Differences Arise during the Lifetime of Monozygotic Twins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(30): 10604–9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16009939/> (October 3, 2020).
- Francis, Sarah, Suseela Yelumalai, Celine Jones, and Kevin Coward. 2014. "Aberrant Protamine Content in Sperm and Consequential Implications for Infertility Treatment." *Human Fertility* 17(2): 80–89.
- Franklin, Tamara B. et al. 2010. "Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress across Generations." *Biological Psychiatry* 68(5): 408–15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20673872/> (October 5, 2020).
- Fullston, Tod et al. 2013. "Paternal Obesity Initiates Metabolic Disturbances in Two

- Generations of Mice with Incomplete Penetrance to the F₂ Generation and Alters the Transcriptional Profile of Testis and Sperm MicroRNA Content.” *The FASEB Journal* 27(10): 4226–43. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fj.12-224048> (November 1, 2020).
- . 2016. “Sperm MicroRNA Content Is Altered in a Mouse Model of Male Obesity, but the Same Suite of MicroRNAs Are Not Altered in Offspring’s Sperm” ed. Cristina Ovilo. *PLOS ONE* 11(11): e0166076. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0166076> (October 31, 2020).
- Gao, Qinqin et al. 2014. “Epigenetic Code and Potential Epigenetic-Based Therapies against Chronic Diseases in Developmental Origins.” *Drug Discovery Today* 19(11): 1744–50.
- Gao, Wen Long et al. 2012. “The Imprinted H19 Gene Regulates Human Placental Trophoblast Cell Proliferation via Encoding MiR-675 That Targets Nodal Modulator 1 (NOMO1).” *RNA Biology* 9(7): 1002–10. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22832245/> (October 3, 2020).
- Gapp, K., and J. Bohacek. 2018. “Epigenetic Germline Inheritance in Mammals: Looking to the Past to Understand the Future.” *Genes, Brain and Behavior* 17(3): e12407. <http://doi.wiley.com/10.1111/gbb.12407> (September 21, 2020).
- Gapp, Katharina et al. 2014. “Implication of Sperm RNAs in Transgenerational Inheritance of the Effects of Early Trauma in Mice.” *Nature Neuroscience* 17(5): 667–69. <https://www.nature.com/articles/nn.3695> (October 5, 2020).
- García-López, Jesús et al. 2014. “Global Characterization and Target Identification of PiRNAs and Endo-SiRNAs in Mouse Gametes and Zygotes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(6): 463–75.
- Gatewood, J. M. et al. 1990. “Isolation of Four Core Histones from Human Sperm Chromatin Representing a Minor Subset of Somatic Histones.” *Journal of Biological Chemistry* 265(33): 20662–66. <https://www.jbc.org/content/265/33/20662.abstract> (October 16, 2020).
- Gaucher, Jonathan et al. 2010. “From Meiosis to Postmeiotic Events: The Secrets of Histone Disappearance.” *FEBS Journal* 277(3): 599–604. <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1742-4658.2009.07504.x> (October 14, 2020).
- Gelato, Kathy A., and Wolfgang Fischle. 2008. “Role of Histone Modifications in Defining Chromatin Structure and Function.” *Biological Chemistry* 389(4): 353–63. <https://www.degruyter.com/view/journals/bchm/389/4/article-p353.xml> (October 13, 2020).
- Giacone, Filippo et al. 2019. “Epigenetics of Male Fertility: Effects on Assisted Reproductive Techniques.” *World Journal of Men’s Health* 37(2): 148–56.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30588778/> (September 21, 2020).
- Godmann, Maren et al. 2007. “Dynamic Regulation of Histone H3 Methylation at Lysine 4 in Mammalian Spermatogenesis.” *Biology of Reproduction* 77(5): 754–64.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article/77/5/754/2629744> (October 16, 2020).
- Godschalk, Roger W.L. et al. 2015. “Effects of Benzo[a]Pyrene on Mouse Germ Cells: Heritable DNA Mutation, Testicular Cell Hypomethylation and Their Interaction with Nucleotide Excision Repair.” *Toxicology Research* 4(3): 718–24.
www.rsc.org/toxicology (October 20, 2020).
- Gold, Hannah B., Yoon Hee Jung, and Victor G. Corces. 2018. “Not Just Heads and Tails: The Complexity of the Sperm Epigenome.” *Journal of Biological Chemistry* 293(36): 13815–20. [/pmc/articles/PMC6130957/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30588778/) (September 21, 2020).
- Gomes, M.V., C.C. Gomes, W. Pinto, and E.S. Ramos. 2007. “Methylation Pattern at the KvDMR in a Child with Beckwith–Wiedemann Syndrome Conceived by ICSI.” *American Journal of Medical Genetics Part A* 143A(6): 625–29.
<http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.31628> (October 5, 2020).
- González-Marín, Clara, Jaime Gosálvez, and Rosa Roy. 2012. “Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells.” *International Journal of Molecular Sciences* 13(11): 14026–52. [/pmc/articles/PMC3509564/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22344444/) (October 29, 2020).
- González, Betina et al. 2020. “Dopamine Receptor D1 Contributes to Cocaine Epigenetic Reprogramming of Histone Modifications in Male Germ Cells.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8: 216.
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00216/full> (September 21, 2020).
- Goudarzi, Afsaneh et al. 2016. “Dynamic Competing Histone H4 K5K8 Acetylation and Butyrylation Are Hallmarks of Highly Active Gene Promoters.” *Molecular Cell* 62(2): 169–80.
- Grandjean, Valérie et al. 2015. “RNA-Mediated Paternal Heredity of Diet-Induced Obesity and Metabolic Disorders.” *Scientific Reports* 5. [/pmc/articles/PMC4677355/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26111111/) (October 31, 2020).
- Grivna, Shane T., Ergin Beyret, Zhong Wang, and Haifan Lin. 2006. “A Novel Class of Small RNAs in Mouse Spermatogenic Cells.” *Genes and Development* 20(13): 1709–14.
- Gromoll, Jörg, and Ruth Kläver. 2014. “Bringing Epigenetics into the Diagnostics of the Andrology Laboratory: Challenges and Perspectives.” *Asian Journal of Andrology* 16(5): 669. <http://www.ajandrology.com/text.asp?2014/16/5/669/125412> (September 22, 2020).

- Guerrero-Bosagna, Carlos, Matthew Settles, Ben Lucker, and Michael K. Skinner. 2010. “Epigenetic Transgenerational Actions of Vinclozolin on Promoter Regions of the Sperm Epigenome.” *PLoS ONE* 5(9): 1–17.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20927350/> (October 3, 2020).
- Gunes, Sezgin, Asli Metin Mahmutoglu, Mehmet Alper Arslan, and Ralf Henkel. 2018. “Smoking-Induced Genetic and Epigenetic Alterations in Infertile Men.” *Andrologia* 50(9): e13124. <http://doi.wiley.com/10.1111/and.13124> (October 20, 2020).
- Hajkova, Petra et al. 2008. “Chromatin Dynamics during Epigenetic Reprogramming in the Mouse Germ Line.” *Nature* 452(7189): 877–81.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18354397/> (October 14, 2020).
- Håkonsen, Linn et al. 2011. “Does Weight Loss Improve Semen Quality and Reproductive Hormones? Results from a Cohort of Severely Obese Men.” *Reproductive Health* 8(1): 24. <https://reproductive-health-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-4755-8-24> (November 4, 2020).
- Hamad, M. F. et al. 2014. “Impact of Cigarette Smoking on Histone (H2B) to Protamine Ratio in Human Spermatozoa and Its Relation to Sperm Parameters.” *Andrology* 2(5): 666–77. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2047-2927.2014.00245.x> (October 28, 2020).
- Hamad, Mohammed, Nyaz Shelko, Mathias Montenarh, and Mohammed Eid Hammadeh. 2019. “The Impact of Cigarette Smoking on Protamines 1 and 2 Transcripts in Human Spermatozoa.” *Human Fertility* 22(2): 104–10.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14647273.2017.1382733> (October 28, 2020).
- Hamatani, Toshio. 2012. 97 Fertility and Sterility *Human Spermatozoal RNAs*. Elsevier.
- Hammadeh, M. E., M. F. Hamad, M. Montenarh, and C. Fischer-Hammadeh. 2010. “Protamine Contents and P1/P2 Ratio in Human Spermatozoa from Smokers and Non-Smokers.” *Human Reproduction* 25(11): 2708–20.
<https://academic.oup.com/humrep/article/25/11/2708/651629> (October 28, 2020).
- Hammoud, Saher Sue et al. 2009. “Distinctive Chromatin in Human Sperm Packages Genes for Embryo Development.” *Nature* 460(7254): 473–78.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19525931/> (October 16, 2020).
- . 2010. “Alterations in Sperm DNA Methylation Patterns at Imprinted Loci in Two Classes of Infertility.” *Fertility and Sterility* 94(5): 1728–33.
- . 2011. “Genome-Wide Analysis Identifies Changes in Histone Retention and Epigenetic Modifications at Developmental and Imprinted Gene Loci in the Sperm of Infertile Men.” *Human Reproduction* 26(9): 2558–69.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21685136/> (September 22, 2020).
- Han, Fei et al. 2014. “Epigenetic Regulation of Sox30 Is Associated with Testis

- Development in Mice.” *PLoS ONE* 9(5). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24810894/> (November 4, 2020).
- Hayashi, Katsuhiko, Kayo Yoshida, and Yasuhisa Matsui. 2005. “A Histone H3 Methyltransferase Controls Epigenetic Events Required for Meiotic Prophase.” *Nature* 438(7066): 374–78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16292313/> (October 30, 2020).
- Herst, P M et al. 2019. “Folic Acid Supplementation Reduces Multigenerational Sperm MiRNA Perturbation Induced by in Utero Environmental Contaminant Exposure.” *Environmental Epigenetics* 5(4): 1–10. <https://academic.oup.com/eep/article/5/4/dvz024/5677505> (November 4, 2020).
- Hildebrandt, Matthew R. et al. 2015. “Ddx1 Knockout Results in Transgenerational Wild-Type Lethality in Mice.” *Scientific Reports* 5. [/pmc/articles/PMC4408975/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27421580/) (September 22, 2020).
- Ho, Shuk Mei et al. 2017. “Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders.” *Reproductive Toxicology* 68: 85–104. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27421580/> (September 21, 2020).
- Hornstein, Eran et al. 2005. “The MicroRNA MiR-196 Acts Upstream of Hoxb8 and Shh in Limb Development.” *Nature* 438(7068): 671–74. <https://www.nature.com/articles/nature04138> (October 31, 2020).
- Huang, Anqing et al. 2020. “Circular RNA-Protein Interactions: Functions, Mechanisms, and Identification.” *Theranostics* 10(8): 3506–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32206104/> (September 21, 2020).
- Huang, Wen-Jie, Xi-Lan Lu, Jun-Tao Li, and Jian-Min Zhang. 2020. “Effects of Folic Acid on Oligozoospermia with *MTHFR* Polymorphisms in Term of Seminal Parameters, DNA Fragmentation, and Live Birth Rate: A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Trial.” *Andrology* 8(1): 110–16. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/andr.12652> (November 4, 2020).
- Hulf, T. et al. 2013. “Epigenetic-Induced Repression of MicroRNA-205 Is Associated with MED1 Activation and a Poorer Prognosis in Localized Prostate Cancer.” *Oncogene* 32(23): 2891–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22869146/> (October 31, 2020).
- Hunter, Richard G. et al. 2004. “CART in Feeding and Obesity.” *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15(9): 454–59.
- Huszar, Jessica M., and Christopher J. Payne. 2013. “MicroRNA 146 (Mir146) Modulates Spermatogonial Differentiation by Retinoic Acid in Mice.” *Biology of Reproduction* 88(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23221399/> (September 22, 2020).
- Inbar-Feigenberg, Michal et al. 2013. “Basic Concepts of Epigenetics.” *Fertility and Sterility* 99(3): 607–15.
- Ingerslev, Lars R. et al. 2018. “Endurance Training Remodels Sperm-Borne Small RNA

- Expression and Methylation at Neurological Gene Hotspots.” *Clinical Epigenetics* 10(1): 1–11. <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13148-018-0446-7> (October 5, 2020).
- Inokuchi, Junichi, Alice Lau, Darren R. Tyson, and David K. Ornstein. 2009. “Loss of Annexin A1 Disrupts Normal Prostate Glandular Structure by Inducing Autocrine IL-6 Signaling.” *Carcinogenesis* 30(7): 1082–88. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19351789/> (October 20, 2020).
- Iqbal, Khurshed et al. 2015. “Deleterious Effects of Endocrine Disruptors Are Corrected in the Mammalian Germline by Epigenome Reprogramming.” *Genome Biology* 16(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25853433/> (September 22, 2020).
- Jarred, Ellen G., Heidi Bildsoe, and Patrick S. Western. 2018. “Out of Sight, out of Mind? Germ Cells and the Potential Impacts of Epigenomic Drugs [Version 1; Referees: 3 Approved].” *F1000Research* 7: 1967. <https://doi.org/10.12688/f1000research.15935.1> (September 21, 2020).
- Jenkins, T. G. et al. 2017. “Cigarette Smoking Significantly Alters Sperm DNA Methylation Patterns.” *Andrology* 5(6): 1089–99. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28950428/> (September 22, 2020).
- Jenkins, Timothy G. et al. 2014. “Age-Associated Sperm DNA Methylation Alterations: Possible Implications in Offspring Disease Susceptibility.” *PLoS Genetics* 10(7). [/pmc/articles/PMC4091790/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4091790/?report=abstract) (October 21, 2020).
- . 2016. “Decreased Fecundity and Sperm DNA Methylation Patterns.” *Fertility and Sterility* 105(1): 51-57.e3.
- Jenkins, Timothy G., Kenneth I. Aston, and Douglas T. Carrell. 2018. “Sperm Epigenetics and Aging.” *Translational Andrology and Urology* 7(Suppl 3): S328–35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30159239/> (September 21, 2020).
- Jenkins, Timothy G., and Douglas T. Carrell. 2011. “The Paternal Epigenome and Embryogenesis: Poising Mechanisms for Development.” *Asian Journal of Andrology* 13(1): 76–80. [/pmc/articles/PMC3739388/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3739388/?report=abstract) (October 18, 2020).
- Jia, Haiqun et al. 2015. “HDAC Inhibition Imparts Beneficial Transgenerational Effects in Huntington’s Disease Mice via Altered DNA and Histone Methylation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(1): E56–64. [/pmc/articles/PMC4291662/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4291662/?report=abstract) (October 28, 2020).
- Jodar, Meritxell et al. 2013. “The Presence, Role and Clinical Use of Spermatozoal RNAs.” *Human Reproduction Update* 19(6): 604–24. [/pmc/articles/PMC3796946/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3796946/?report=abstract) (September 22, 2020).
- Johnson, G. D. et al. 2011. “Cleavage of RRNA Ensures Translational Cessation in Sperm at Fertilization.” *Molecular Human Reproduction* 17(12): 721–26.

- <https://academic.oup.com/molehr/article/17/12/721/978031> (October 18, 2020).
- Johnson, Graham D. et al. 2015. “Chromatin and Extracellular Vesicle Associated Sperm RNAs.” *Nucleic Acids Research* 43(14): 6847–59.
<https://academic.oup.com/nar/article/43/14/6847/2902731> (October 18, 2020).
- Kaneda, Masahiro et al. 2004. “Essential Role for de Novo DNA Methyltransferase Dnmt3a in Paternal and Maternal Imprinting.” *Nature* 429(6994): 900–903.
<https://www.nature.com/articles/nature02633> (October 3, 2020).
- . 2011. “Genomic Imprinting in Mammals-Epigenetic Parental Memories.” *Differentiation* 82(2): 51–56.
- Karlic, Heidrun, and Franz Varga. 2011. “Impact of Vitamin D Metabolism on Clinical Epigenetics.” *Clinical Epigenetics* 2(1): 55–61.
<http://www.clinicalepigeneticsjournal.com/content/2/1/> (November 4, 2020).
- Keniry, Andrew et al. 2012. “The H19 LincRNA Is a Developmental Reservoir of MiR-675 That Suppresses Growth and Igf1r.” *Nature Cell Biology* 14(7): 659–65.
<https://www.nature.com/articles/ncb2521> (October 3, 2020).
- Khandwala, Yash S., Chiyuan A. Zhang, Ying Lu, and Michael L. Eisenberg. 2017. “The Age of Fathers in the USA Is Rising: An Analysis of 168 867 480 Births from 1972 to 2015.” *Human Reproduction* 32(10): 2110–16.
<https://academic.oup.com/humrep/article/32/10/2110/4096427> (September 22, 2020).
- Khazamipour, N. et al. 2009. “MTHFR Promoter Hypermethylation in Testicular Biopsies of Patients with Non-Obstructive Azoospermia: The Role of Epigenetics in Male Infertility.” *Human Reproduction* 24(9): 2361–64.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19477879/> (October 3, 2020).
- Kidd, Sharon A., Brenda Eskenazi, and Andrew J. Wyrobek. 2001. “Effects of Male Age on Semen Quality and Fertility: A Review of the Literature.” *Fertility and Sterility* 75(2): 237–48. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11172821/> (September 22, 2020).
- Kläver, Ruth et al. 2015. “Direct but No Transgenerational Effects of Decitabine and Vorinostat on Male Fertility.” *PLoS ONE* 10(2). [/pmc/articles/PMC4334483/?report=abstract](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124440) (September 22, 2020).
- Kobayashi, Hisato et al. 2012. “Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks” ed. Wolf Reik. *PLoS Genetics* 8(1): e1002440.
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1002440> (October 16, 2020).
- Kota, Satya K., and Robert Feil. 2010. “Epigenetic Transitions in Germ Cell Development and Meiosis.” *Developmental Cell* 19(5): 675–86.
<http://www.cell.com/article/S1534580710004624/fulltext> (October 16, 2020).
- Krawetz, Stephen A. et al. 2011a. “A Survey of Small RNAs in Human Sperm.” *Human*

- Reproduction* 26(12): 3401–12. <http://pirnabank.ibab.ac.in/miranda/mir>. (October 18, 2020).
- . 2011b. “A Survey of Small RNAs in Human Sperm.” *Human Reproduction* 26(12): 3401–12. <http://pirnabank.ibab.ac.in/miranda/mir>. (October 31, 2020).
- Lacal, Irene, and Rossella Ventura. 2018. “Epigenetic Inheritance: Concepts, Mechanisms and Perspectives.” *Frontiers in Molecular Neuroscience* 11.
- Laqqan, M., and M. E. Hammadeh. 2018. “Aberrations in Sperm DNA Methylation Patterns of Males Suffering from Reduced Fecundity.” *Andrologia* 50(3).
- Laurentino, Sandra, Jennifer Borgmann, and Jörg Gromoll. 2016. “On the Origin of Sperm Epigenetic Heterogeneity.” *Reproduction* 151(5): R71–78. www.reproduction-online.org (September 21, 2020).
- Lees-Murdock, Diane J., and Colum P. Walsh. 2008. “DNA Methylation Reprogramming in the Germ Line.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 626: 1–15.
- Lesch, Bluma J. et al. 2013. “A Set of Genes Critical to Development Is Epigenetically Poised in Mouse Germ Cells from Fetal Stages through Completion of Meiosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(40): 16061–66. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043772/> (October 14, 2020).
- Li, Wangzhi et al. 2014. “Chd5 Orchestrates Chromatin Remodelling during Sperm Development.” *Nature Communications* 5: 3812. [/pmc/articles/PMC4151132/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043772/) (October 13, 2020).
- Li, Xiaoyong, Junping Ao, and Ji Wu. 2017. “Systematic Identification and Comparison of Expressed Profiles of LncRNAs and CircRNAs with Associated Co-Expression and CeRNA Networks in Mouse Germline Stem Cells.” *Oncotarget* 8(16): 26573–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28404936/> (September 22, 2020).
- Li, Yuanyuan, Trygve O. Tollefsbol, Shizhao Li, and Min Chen. 2019. “Prenatal Epigenetics Diets Play Protective Roles against Environmental Pollution.” *Clinical Epigenetics* 11(1).
- Lim, Pek Siew, M. Frances Shannon, and Kristine Hardy. 2010. “Epigenetic Control of Inducible Gene Expression in the Immune System.” *Epigenomics* 2(6): 775–95.
- Liu, Te et al. 2013. “MicroRNA-122 Influences the Development of Sperm Abnormalities from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Regulating TNP2 Expression.” *Stem Cells and Development* 22(12): 1839–50. [/pmc/articles/PMC3668510/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24043772/) (September 22, 2020).
- Liu, Wei Min et al. 2012. “Sperm-Borne MicroRNA-34c Is Required for the First Cleavage Division in Mouse.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(2): 490–94. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1110368109 (October 31, 2020).

- Liu, Zhaoliang et al. 2010. “Jmjd1a Demethylase-Regulated Histone Modification Is Essential for CAMP-Response Element Modulator-Regulated Gene Expression and Spermatogenesis.” *Journal of Biological Chemistry* 285(4): 2758–70.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19910458/> (October 30, 2020).
- Lu, Lin Yu et al. 2010. “RNF8-Dependent Histone Modifications Regulate Nucleosome Removal during Spermatogenesis.” *Developmental Cell* 18(3): 371–84.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20153262/> (October 30, 2020).
- Luján, Saturnino et al. 2019. “Sperm DNA Methylation Epimutation Biomarkers for Male Infertility and FSH Therapeutic Responsiveness.” *Scientific Reports* 9(1).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31727924/> (November 4, 2020).
- Luteijn, Maartje J., and René F. Ketting. 2013. “PIWI-Interacting RNAs: From Generation to Transgenerational Epigenetics.” *Nature Reviews Genetics* 14(8): 523–34.
<https://www.nature.com/articles/nrg3495> (October 18, 2020).
- Madon-Simon, Marta et al. 2014. “Antagonistic Roles in Fetal Development and Adult Physiology for the Oppositely Imprinted Grb10 and Dlk1 Genes.” *BMC Biology* 12(1). [/pmc/articles/PMC4280702/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057798/) (October 16, 2020).
- “Mammalian Protamines - Www.Briarpatchbio.Com.”
<https://www.briarpatchbio.com/virtue/woocommerce/mammalian-protamines/>
 (October 23, 2020).
- Manikkam, Mohan, Carlos Guerrero-Bosagna, et al. 2012. “Transgenerational Actions of Environmental Compounds on Reproductive Disease and Identification of Epigenetic Biomarkers of Ancestral Exposures.” *PLoS ONE* 7(2).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22389676/> (October 3, 2020).
- Manikkam, Mohan et al. 2014. “Pesticide Methoxychlor Promotes the Epigenetic Transgenerational Inheritance of Adult-Onset Disease through the Female Germline.” *PLoS ONE* 9(7). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25057798/> (October 3, 2020).
- Manikkam, Mohan, Rebecca Tracey, Carlos Guerrero-Bosagna, and Michael K. Skinner. 2012. “Pesticide and Insect Repellent Mixture (Permethrin and DEET) Induces Epigenetic Transgenerational Inheritance of Disease and Sperm Epimutations.” *Reproductive Toxicology* 34(4): 708–19.
<https://reference.medscape.com/medline/abstract/22975477> (October 3, 2020).
- . 2013. “Plastics Derived Endocrine Disruptors (BPA, DEHP and DBP) Induce Epigenetic Transgenerational Inheritance of Obesity, Reproductive Disease and Sperm Epimutations” ed. Toshi Shioda. *PLoS ONE* 8(1): e55387.
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0055387> (September 22, 2020).
- Marques, C. J. et al. 2008. “Abnormal Methylation of Imprinted Genes in Human Sperm Is Associated with Oligozoospermia.” *Molecular Human Reproduction* 14(2): 67–73.

- <https://academic.oup.com/molehr/article/14/2/67/1542581> (October 3, 2020).
- Martianov, Igor et al. 2005. "Polar Nuclear Localization of H1T2, a Histone H1 Variant, Required for Spermatid Elongation and DNA Condensation during Spermiogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(8): 2808–13. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15710904/> (October 14, 2020).
- McCarthy, Deirdre M. et al. 2018. "Nicotine Exposure of Male Mice Produces Behavioral Impairment in Multiple Generations of Descendants" ed. Eric Nestler. *PLOS Biology* 16(10): e2006497. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2006497> (September 22, 2020).
- McPherson, NicoleO, and Michelle Lane. 2014. "Male Obesity and Subfertility, Is It Really about Increased Adiposity?" *Asian Journal of Andrology* 0(0): 0. <http://www.ajandrology.com/preprintarticle.asp?id=148076> (November 4, 2020).
- Mejos, Karen Kay, Hye Won Kim, Eun Mi Lim, and Namsoo Chang. 2013. "Effects of Parental Folate Deficiency on the Folate Content, Global DNA Methylation, and Expressions of FR α , IGF-2 and IGF-1R in the Postnatal Rat Liver." *Nutrition Research and Practice* 7(4): 281–86. </pmc/articles/PMC3746162/?report=abstract> (October 21, 2020).
- Metzler-Guillemain, Catherine et al. 2015. "Sperm MRNAs and MicroRNAs as Candidate Markers for the Impact of Toxicants on Human Spermatogenesis: An Application to Tobacco Smoking." <http://dx.doi.org/10.3109/19396368.2015.1022835>. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/19396368.2015.1022835> (November 1, 2020).
- Mitchell, Megan, Hassan W. Bakos, and Michelle Lane. 2011. "Paternal Diet-Induced Obesity Impairs Embryo Development and Implantation in the Mouse." *Fertility and Sterility* 95(4): 1349–53.
- Morgan, Hugh D., Heidi G.E. Sutherland, David I.K. Martin, and Emma Whitelaw. 1999. "Epigenetic Inheritance at the Agouti Locus in the Mouse." *Nature Genetics* 23(3): 314–18. https://www.nature.com/articles/ng1199_314 (September 22, 2020).
- Morselli, Marco et al. 2015. "In Vivo Targeting of de Novo DNA Methylation by Histone Modifications in Yeast and Mouse." *eLife* 2015(4). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25848745/> (September 22, 2020).
- Murphy, Susan K. et al. 2018. "Cannabinoid Exposure and Altered DNA Methylation in Rat and Human Sperm." *Epigenetics* 13(12): 1208–21. </pmc/articles/PMC6986792/?report=abstract> (October 21, 2020).
- Murrell, Adele et al. 2004. "An Association between Variants in the IGF2 Gene and Beckwith-Wiedemann Syndrome: Interaction between Genotype and Epigenotype." *Human Molecular Genetics* 13(2): 247–55.

- <https://academic.oup.com/hmg/article/13/2/247/631046> (October 5, 2020).
- Nair, Mahalakshmi et al. 2008. “Nuclear Regulator Pygo2 Controls Spermiogenesis and Histone H3 Acetylation.” *Developmental Biology* 320(2): 446–55.
/pmc/articles/PMC2553271/?report=abstract (October 30, 2020).
- Nanassy, Laszlo, Lihua Liu, Jeanine Griffin, and Douglas T. Carrell. 2012. “The Clinical Utility of the Protamine 1/Protamine 2 Ratio in Sperm.” *Protein & Peptide Letters* 18(8): 772–77. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21443494/> (October 3, 2020).
- Navarro-Costa, Paulo et al. 2010. “Incorrect DNA Methylation of the DAZL Promoter CpG Island Associates with Defective Human Sperm.” *Human Reproduction* 25(10): 2647–54. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20685756/> (October 3, 2020).
- Ng, Jennifer Mun Kar, and Jun Yu. 2015. “Promoter Hypermethylation of Tumour Suppressor Genes as Potential Biomarkers in Colorectal Cancer.” *International Journal of Molecular Sciences* 16(2): 2472–96.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25622259/> (October 4, 2020).
- Ng, Sheau Fang et al. 2010. “Chronic High-Fat Diet in Fathers Programs β 2-Cell Dysfunction in Female Rat Offspring.” *Nature* 467(7318): 963–66.
<https://www.nature.com/articles/nature09491> (October 5, 2020).
- Oakes, C. C. et al. 2007. “Developmental Acquisition of Genome-Wide DNA Methylation Occurs Prior to Meiosis in Male Germ Cells.” *Developmental Biology* 307(2): 368–79.
- Oakes, Christopher C. et al. 2003. “Aging Results in Hypermethylation of Ribosomal DNA in Sperm and Liver of Male Rats.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(4): 1775–80. /pmc/articles/PMC149909/?report=abstract (October 21, 2020).
- Obata, Yayoi, and Tomohiro Kono. 2002. “Maternal Primary Imprinting Is Established at a Specific Time for Each Gene throughout Oocyte Growth.” *Journal of Biological Chemistry* 277(7): 5285–89. <http://www.jbc.org/> (September 22, 2020).
- Okada, Yuki et al. 2007. “Histone Demethylase JHDM2A Is Critical for Tnp1 and Prm1 Transcription and Spermatogenesis.” *Nature* 450(7166): 119–23.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17943087/> (October 30, 2020).
- Ornellas, Fernanda, Priscila V. Carapeto, Carlos A. Mandarin-de-Lacerda, and Marcia B. Aguilã. 2017. “Pais Obesos Levam a Metabolismo Alterado e Obesidade Em Seus Filhos Na Idade Adulta: Revisão de Estudos Experimentais e Humanos.” *Jornal de Pediatria* 93(6): 551–59.
- Osella, Matteo et al. 2014. “Interplay of MicroRNA and Epigenetic Regulation in the Human Regulatory Network.” *Frontiers in Genetics* 5(SEP).
/pmc/articles/PMC4186481/?report=abstract (October 13, 2020).
- Öst, Anita et al. 2014. “Paternal Diet Defines Offspring Chromatin State and

- Intergenerational Obesity.” *Cell* 159(6): 1352–64.
- Ostermeier, G. Charles et al. 2004. “Delivering Spermatozoan RNA to the Oocyte.” *Nature* 429(6988): 154. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15141202/> (October 18, 2020).
- Ozcan, Gulnihal et al. 2015. “Preclinical and Clinical Development of SiRNA-Based Therapeutics.” *Advanced Drug Delivery Reviews* 87: 108–19. <https://mdanderson.elsevierpure.com/en/publications/preclinical-and-clinical-development-of-sirna-based-therapeutics> (September 22, 2020).
- Paoli, Donatella et al. 2019. “Cytological and Molecular Aspects of the Ageing Sperm.” *Human Reproduction* 34(2): 218–27. <https://academic.oup.com/humrep/article/34/2/218/5245998> (September 21, 2020).
- Paradowska, Agnieszka S. et al. 2012. “Genome Wide Identification of Promoter Binding Sites for H4K12ac in Human Sperm and Its Relevance for Early Embryonic Development.” *Epigenetics* 7(9): 1057–70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22894908/> (October 28, 2020).
- Perrin, Mary C., Alan S. Brown, and Dolores Malaspina. 2007. “Aberrant Epigenetic Regulation Could Explain the Relationship of Paternal Age to Schizophrenia.” *Schizophrenia Bulletin* 33(6): 1270–73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17011111/> (October 21, 2020).
- Peters, Antoine H.F.M. et al. 2002. “Histone H3 Lysine 9 Methylation Is an Epigenetic Imprint of Facultative Heterochromatin.” *Nature Genetics* 30(1): 77–80. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11740497/> (October 30, 2020).
- Pike, J. Wesley, Mark B. Meyer, and Kathleen A. Bishop. 2012. “Regulation of Target Gene Expression by the Vitamin D Receptor - An Update on Mechanisms.” *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 13(1): 45–55. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11154-011-9198-9> (November 4, 2020).
- Poplinski, A. et al. 2010. “Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Methylation of MEST and IGF2/H19 ICR1.” *International Journal of Andrology* 33(4): 642–49.
- Pouresmaeili, Farkhondeh. 2019. “Epigenetics and Fertility.” <http://medcraveonline.com> (September 21, 2020).
- Prokopuk, Lexie et al. 2017. “PRC2 Is Required for Extensive Reorganization of H3K27me3 during Epigenetic Reprogramming in Mouse Fetal Germ Cells.” *Epigenetics and Chromatin* 10(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28239420/> (October 14, 2020).
- Reik, W., W. Dean, and J. Walter. 2001. “Epigenetic Reprogramming in Mammalian Development.” *Science* 293(5532): 1089–93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11498579/> (October 3, 2020).

- Roberts, Andrea L. et al. 2018. "Exposure to Childhood Abuse Is Associated with Human Sperm DNA Methylation." *Translational Psychiatry* 8(1): 194.
<http://www.nature.com/articles/s41398-018-0252-1> (October 5, 2020).
- Rodenhiser, David, and Mellissa Mann. 2006. "Epigenetics and Human Disease: Translating Basic Biology into Clinical Applications." *CMAJ* 174(3): 341–48.
</pmc/articles/PMC1373719/?report=abstract> (September 22, 2020).
- Rodgers, Ali B., Christopher P. Morgan, N. Adrian Leu, and Tracy L. Bale. 2015. "Transgenerational Epigenetic Programming via Sperm MicroRNA Recapitulates Effects of Paternal Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(44): 13699–704.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26483456/> (October 31, 2020).
- Rompala, Gregory R. et al. 2018. "Heavy Chronic Intermittent Ethanol Exposure Alters Small Noncoding RNAs in Mouse Sperm and Epididymosomes." *Frontiers in Genetics* 9(FEB).
- Rose, Catherine M. et al. 2014. "Dynamic Changes in DNA Modification States during Late Gestation Male Germ Line Development in the Rat." *Epigenetics and Chromatin* 7(1): 19. </pmc/articles/PMC4163680/?report=abstract> (October 3, 2020).
- Rousseaux, S. et al. 2009. "Spermiogenesis: Histone Acetylation Triggers Male Genome Reprogramming." *Gynecologie Obstetrique et Fertilité* 37(6): 519–22.
https://www.researchgate.net/publication/24432585_Spermiogenesis_Histone_acetylation_triggers_male_genome_reprogramming (October 18, 2020).
- Sachs, Michael et al. 2013. "Bivalent Chromatin Marks Developmental Regulatory Genes in the Mouse Embryonic Germline InVivo." *Cell Reports* 3(6): 1777–84.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23727241/> (October 14, 2020).
- Saito, Kuniaki, and Mikiko C. Siomi. 2010. "Small RNA-Mediated Quiescence of Transposable Elements in Animals." *Developmental Cell* 19(5): 687–97.
<http://www.cell.com/article/S1534580710004648/fulltext> (October 18, 2020).
- Saitou, Mitinori, Saya Kagiwada, and Kazuki Kurimoto. 2012. "Epigenetic Reprogramming in Mouse Pre-Implantation Development and Primordial Germ Cells." *Development* 139(1): 15–31. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22147951/> (September 22, 2020).
- Sakkas, Denny et al. 2002. "Nature of DNA Damage in Ejaculated Human Spermatozoa and the Possible Involvement of Apoptosis." *Biology of Reproduction* 66(4): 1061–67.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11906926/> (October 14, 2020).
- Santi, D., S. De Vincentis, E. Magnani, and G. Spaggiari. 2017. "Impairment of Sperm DNA Methylation in Male Infertility: A Meta-Analytic Study." *Andrology* 5(4): 695–703.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28718528/> (September 21, 2020).
- Schagdarsurengin, Undraga, Agnieszka Paradowska, and Klaus Steger. 2012. "Analysing

- the Sperm Epigenome: Roles in Early Embryogenesis and Assisted Reproduction.” *Nature Reviews Urology* 9(11): 609–19.
<https://www.nature.com/articles/nrurol.2012.183> (September 21, 2020).
- Schagdarsurengin, Undraga, and Klaus Steger. 2016. “Epigenetics in Male Reproduction: Effect of Paternal Diet on Sperm Quality and Offspring Health.” *Nature Reviews Urology* 13(10): 584–95. <https://www.nature.com/articles/nrurol.2016.157> (November 4, 2020).
- Schon, Samantha B. et al. 2019. “Histone Modification Signatures in Human Sperm Distinguish Clinical Abnormalities.” *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 36(2): 267–75. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10815-018-1354-7> (October 13, 2020).
- Schrott, Rose et al. 2020. “Cannabis Use Is Associated with Potentially Heritable Widespread Changes in Autism Candidate Gene DLGAP2 DNA Methylation in Sperm.” *Epigenetics* 15(1–2): 161–73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31451081/> (October 21, 2020).
- Seisenberger, Stefanie et al. 2013. “Reprogramming DNA Methylation in the Mammalian Life Cycle: Building and Breaking Epigenetic Barriers.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1609).
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0330> (October 11, 2020).
- Seki, Yoshiyuki et al. 2005. “Extensive and Orderly Reprogramming of Genome-Wide Chromatin Modifications Associated with Specification and Early Development of Germ Cells in Mice.” *Developmental Biology* 278(2): 440–58.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15680362/> (October 14, 2020).
- Sekl, Yoshiyuki et al. 2007. “Cellular Dynamics Associated with the Genome-Wide Epigenetic Reprogramming in Migrating Primordial Germ Cells in Mice.” *Development* 134(14): 2627–38. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17567665/> (October 14, 2020).
- Shamsi, M. B., K. Kumar, and R. Dada. 2011. “Genetic and Epigenetic Factors: Role in Male Infertility.” In *Indian Journal of Urology*, Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 110–20. [/pmc/articles/PMC3114572/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/214572/) (September 22, 2020).
- Shamsi, Monis B., Luke Simon, and Douglas T. Carrell. 2017. “The Epigenetics of Sperm Chromatin.” *Monographs in Human Genetics* 21: 116–27.
- Sharma, Upasna et al. 2016. “Biogenesis and Function of tRNA Fragments during Sperm Maturation and Fertilization in Mammals.” *Science* 351(6271): 391–96.
<http://science.sciencemag.org/> (October 18, 2020).
- . 2019. “Paternal Contributions to Offspring Health: Role of Sperm Small RNAs in

- Intergenerational Transmission of Epigenetic Information.” *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7(OCT): 1–15.
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2019.00215/full> (September 21, 2020).
- Shea, Jeremy M et al. 2015. “Genetic and Epigenetic Variation, but Not Diet, Shape the Sperm Methylome HHS Public Access.” *Dev Cell* 35(6): 750–58.
- Shen, Hui et al. 2018. “Integrated Molecular Characterization of Testicular Germ Cell Tumors.” *Cell Reports* 23(11): 3392–3406.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29898407/> (October 4, 2020).
- Showell, Marian G et al. 2011. “Antioxidants for Male Subfertility.” In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, John Wiley & Sons, Ltd.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21249690/> (November 4, 2020).
- Siddeek, Benazir, Claire Mauduit, Umberto Simeoni, and Mohamed Benahmed. 2018. “Siddeek.” *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 778: 38–44.
- Siklenka, Keith et al. 2015. “Disruption of Histone Methylation in Developing Sperm Impairs Offspring Health Transgenerationally.” *Science* 350(6261).
<https://science.sciencemag.org/content/350/6261/aab2006> (October 28, 2020).
- Siomi, Mikiko C., Kaoru Sato, Dubravka Pezic, and Alexei A. Aravin. 2011. “PIWI-Interacting Small RNAs: The Vanguard of Genome Defence.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12(4): 246–58. <https://www.nature.com/articles/nrm3089> (October 18, 2020).
- Skinner, Michael K. et al. 2013. “Environmentally Induced Transgenerational Epigenetic Reprogramming of Primordial Germ Cells and the Subsequent Germ Line.” *PLoS ONE* 8(7). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23869203/> (October 3, 2020).
- . 2019. “Transgenerational Sperm DNA Methylation Epimutation Developmental Origins Following Ancestral Vinclozolin Exposure.” *Epigenetics* 14(7): 721–39.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31079544/> (October 3, 2020).
- Skotheim, Rolf I. et al. 2002. “New Insights into Testicular Germ Cell Tumorigenesis from Gene Expression Profiling.” *Cancer Research* 62(8): 2359–64.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11956097/> (October 4, 2020).
- Sleutels, Frank, Ronald Zwart, and Denise P. Barlow. 2002. “The Non-Coding Air RNA Is Required for Silencing Autosomal Imprinted Genes.” *Nature* 415(6873): 810–13.
<https://www.nature.com/articles/415810a> (October 13, 2020).
- Song, Ning et al. 2011. “Immunohistochemical Analysis of Histone H3 Modifications in Germ Cells during Mouse Spermatogenesis.” *Acta Histochemica et Cytochemica* 44(4): 183–90. [/pmc/articles/PMC3168764/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21111111/) (October 18, 2020).
- Song, Rui et al. 2011. “Male Germ Cells Express Abundant Endogenous Sirnas.”

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(32): 13159–64. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21788498/> (October 13, 2020).
- Sonnack, V., K. Failing, M. Bergmann, and K. Steger. 2002. “Expression of Hyperacetylated Histone H4 during Normal and Impaired Human Spermatogenesis.” *Andrologia* 34(6): 384–90. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1439-0272.2002.00524.x> (October 13, 2020).
- Soubry, Adelheid et al. 2013. “Paternal Obesity Is Associated with IGF2 Hypomethylation in Newborns: Results from a Newborn Epigenetics Study (NEST) Cohort.” *BMC Medicine* 11(1): 1–10. <https://link.springer.com/articles/10.1186/1741-7015-11-29> (October 5, 2020).
- Steilmann, C. et al. 2011. “Presence of Histone H3 Acetylated at Lysine 9 in Male Germ Cells and Its Distribution Pattern in the Genome of Human Spermatozoa.” *Reproduction, Fertility and Development* 23(8): 997–1011. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22127005/> (October 23, 2020).
- Stewart, Kathleen R., Lenka Veselovska, and Gavin Kelsey. 2016. “Establishment and Functions of DNA Methylation in the Germline.” *Epigenomics* 8(10): 1399–1413.
- Štiavnická, Miriama et al. 2020. “H3K4me2 Accompanies Chromatin Immaturity in Human Spermatozoa: An Epigenetic Marker for Sperm Quality Assessment.” *Systems Biology in Reproductive Medicine* 66(1): 3–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31580744/> (October 28, 2020).
- Struhl, Kevin. 2014. “Is DNA Methylation of Tumour Suppressor Genes Epigenetic?” *eLife* 2014(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24623307/> (October 4, 2020).
- Suetake, Isao et al. 2004. “DNMT3L Stimulates the DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a Direct Interaction.” *Journal of Biological Chemistry* 279(26): 27816–23. <http://www.jbc.org/> (October 16, 2020).
- Sujit, Kumar Mohanty et al. 2018. “Genome-Wide Differential Methylation Analyses Identifies Methylation Signatures of Male Infertility.” *Human Reproduction* 33(12): 2256–67. <https://academic.oup.com/humrep/article/33/12/2256/5144622> (October 3, 2020).
- Sun, Yuan-Chao et al. 2017. *Epigenetic Regulation during the Differentiation of Stem Cells to Germ Cells*. www.impactjournals.com/oncotarget (September 21, 2020).
- Talebi, A. R., M. R. Moein, N. Tabibnejad, and J. Ghasemzadeh. 2008. “Effect of Varicocele on Chromatin Condensation and DNA Integrity of Ejaculated Spermatozoa Using Cytochemical Tests.” *Andrologia* 40(4): 245–51. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1439-0272.2008.00852.x> (October 29, 2020).
- Tanaka, Akemi J. et al. 2015. “Mutations in SPATA5 Are Associated with Microcephaly, Intellectual Disability, Seizures, and Hearing Loss.” *American Journal of Human*

- Genetics* 97(3): 457–64.
- Tanaka, Hiromitsu et al. 2005. “HANP1/H1T2, a Novel Histone H1-Like Protein Involved in Nuclear Formation and Sperm Fertility.” *Molecular and Cellular Biology* 25(16): 7107–19. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16055721/> (October 14, 2020).
- Tang, Qiuqin et al. 2018. “Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant DNA Methylation of Imprinted Loci in Sperm: A Case-Control Study.” *Clinical Epigenetics* 10(1): 134. <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0568-y> (September 22, 2020).
- Terashima, Minoru et al. 2015. “Effect of High Fat Diet on Paternal Sperm Histone Distribution and Male Offspring Liver Gene Expression.” *Epigenetics* 10(9): 861–71. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26252449/> (October 28, 2020).
- Thompson, Reid F. et al. 2010. “Tissue-Specific Dysregulation of DNA Methylation in Aging.” *Aging Cell* 9(4): 506–18. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1474-9726.2010.00577.x> (October 21, 2020).
- Trasler, J. M., B. F. Hales, and B. Robaire. 1986. “Chronic Low Dose Cyclophosphamide Treatment of Adult Male Rats: Effect on Fertility, Pregnancy Outcome and Progeny.” *Biology of Reproduction* 34(2): 275–83. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3082378/> (September 22, 2020).
- . 1987. “A Time-Course Study of Chronic Paternal Cyclophosphamide Treatment in Rats: Effects on Pregnancy Outcome and the Male Reproductive and Hematologic Systems.” *Biology of Reproduction* 37(2): 317–26.
- Urduinguio, Rocío G. et al. 2015. “Aberrant DNA Methylation Patterns of Spermatozoa in Men with Unexplained Infertility.” *Human Reproduction* 30(5): 1014–28. www.cegen.org (October 3, 2020).
- Vassoler, Fair M. et al. 2013. “Epigenetic Inheritance of a Cocaine-Resistance Phenotype.” *Nature Neuroscience* 16(1): 42–47. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23811446/> (October 28, 2020).
- Wang, Tong, Hui Gao, Wei Li, and Chao Liu. 2019. “Essential Role of Histone Replacement and Modifications in Male Fertility.” *Frontiers in Genetics* 10: 962. www.frontiersin.org (October 13, 2020).
- Wang, Xiu Xia et al. 2015. “Genome-Wide 5-Hydroxymethylcytosine Modification Pattern Is a Novel Epigenetic Feature of Globozoospermia.” *Oncotarget* 6(9): 6535–43. <https://mdanderson.elsevierpure.com/en/publications/genome-wide-5-hydroxymethylcytosine-modification-pattern-is-a-nov> (October 5, 2020).
- Ward, W. Steven. 2009. “Function of Sperm Chromatin Structural Elements in Fertilization

- and Development.” *Molecular Human Reproduction* 16(1): 30–36.
<https://academic.oup.com/molehr/article/16/1/30/1056814> (October 14, 2020).
- Watanabe, Toshiaki et al. 2011. “Role for PiRNAs and Noncoding RNA in de Novo DNA Methylation of the Imprinted Mouse *Rasgrf1* Locus.” *Science* 332(6031): 848–52.
<https://science.sciencemag.org/content/332/6031/848> (October 18, 2020).
- Webster, Kylie E. et al. 2005. “Meiotic and Epigenetic Defects in *Dnmt3L*-Knockout Mouse Spermatogenesis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(11): 4068–73. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753313/> (October 3, 2020).
- Wei, Yanchang et al. 2014. “Paternally Induced Transgenerational Inheritance of Susceptibility to Diabetes in Mammals.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(5): 1873–78.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1321195111 (October 5, 2020).
- Wei, Yanchang, Heide Schatten, and Qing Yuan Sun. 2015. “Environmental Epigenetic Inheritance through Gametes and Implications for Human Reproduction.” *Human Reproduction Update* 21(2): 194–208.
<https://academic.oup.com/humupd/article/21/2/194/785656> (September 22, 2020).
- Wright, C., S. Milne, and H. Leeson. 2014. “Sperm DNA Damage Caused by Oxidative Stress: Modifiable Clinical, Lifestyle and Nutritional Factors in Male Infertility.” *Reproductive BioMedicine Online* 28(6): 684–703.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24745838/> (November 4, 2020).
- Wu, Haotian et al. 2017. “Parental Contributions to Early Embryo Development: Influences of Urinary Phthalate and Phthalate Alternatives among Couples Undergoing IVF Treatment.” *Human Reproduction* 32(1): 65–75.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27927842/> (September 22, 2020).
- Wu, Wei et al. 2010. “Idiopathic Male Infertility Is Strongly Associated with Aberrant Promoter Methylation of Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*).” *PLoS ONE* 5(11). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21085488/> (October 3, 2020).
- Wykes, Susan M., and Stephen A. Krawetz. 2003. “The Structural Organization of Sperm Chromatin.” *Journal of Biological Chemistry* 278(32): 29471–77.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12775710/> (October 23, 2020).
- Wyrobek, A. J. et al. 2006. “Advancing Age Has Differential Effects on DNA Damage, Chromatin Integrity, Gene Mutations, and Aneuploidies in Sperm.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(25): 9601–6. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506468103> (September 22, 2020).
- Xiao, Juan et al. 2018. “Research Progress in SRNAs and Functional Proteins in Epididymosomes.” *Yi chuan = Hereditas* 40(3): 197–206.

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29576543/> (October 18, 2020).
- Yamauchi, Yasuhiro, Jeffrey A. Shaman, Segal M. Boaz, and W. Steven Ward. 2007. "Paternal Pronuclear DNA Degradation Is Functionally Linked to DNA Replication in Mouse Oocytes1." *Biology of Reproduction* 77(3): 407–15.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.107.061473> (October 14, 2020).
- Yamauchi, Yasuhiro, Jeffrey A. Shaman, and W. Steven Ward. 2011. "Non-Genetic Contributions of the Sperm Nucleus to Embryonic Development." *Asian Journal of Andrology* 13(1): 31–35.
- Yan, Wei et al. 2008. "Birth of Mice after Intracytoplasmic Injection of Single Purified Sperm Nuclei and Detection of Messenger RNAs and MicroRNAs in the Sperm Nuclei1." *Biology of Reproduction* 78(5): 896–902.
<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.107.067033> (October 18, 2020).
- . 2014. "Potential Roles of Noncoding RNAs in Environmental Epigenetic Transgenerational Inheritance." *Molecular and Cellular Endocrinology* 398(1–2): 24–30. [/pmc/articles/PMC4262681/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2462681/) (October 18, 2020).
- Yang, Chao et al. 2016. "Competing Endogenous RNA Networks in Human Cancer: Hypothesis, Validation, and Perspectives." *Oncotarget* 7(12): 13479–90. [/pmc/articles/PMC4924655/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24924655/) (September 22, 2020).
- Yu, Bolan et al. 2014. "Cigarette Smoking Is Associated with Abnormal Histone-to-Protamine Transition in Human Sperm." *Fertility and Sterility* 101(1): 51-57.e1.
- Yuan, Shuiqiao et al. 2016. "Sperm-Borne MiRNAs and Endo-SiRNAs Are Important for Fertilization and Preimplantation Embryonic Development." *Development (Cambridge)* 143(4): 635–47. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26718009/> (November 4, 2020).
- Zegers-Hochschild, Fernando et al. 2017. "The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017." *Fertility and Sterility* 108(3): 393–406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005> (November 4, 2020).
- Zhang, Wenping et al. 2019. "Paternal Benzo[a]Pyrene Exposure Alters the Sperm DNA Methylation Levels of Imprinting Genes in F0 Generation Mice and Their Unexposed F1-2 Male Offspring." *Chemosphere* 228: 586–94.
- Zhang, Yonghui, and Benjamin Tycko. 1992. "Monoallelic Expression of the Human H19 Gene." *Nature Genetics* 1(1): 40–44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1363808/> (October 4, 2020).
- Zhang, Yunfang et al. 2018. "Dnmt2 Mediates Intergenerational Transmission of Paternally Acquired Metabolic Disorders through Sperm Small Non-Coding RNAs." *Nature Cell*

- Biology* 20(5): 535–40. /pmc/articles/PMC5926820/?report=abstract (October 3, 2020).
- Zhang, Zhao Hui et al. 2016. “Dynamics of Histone H2A, H4 and HS1ph during Spermatogenesis with a Focus on Chromatin Condensation and Maturity of Spermatozoa.” *Scientific Reports* 6. /pmc/articles/PMC4848542/?report=abstract (September 21, 2020).
- Zhang, Zhaohui et al. 2020. “H4S1ph, an Alternative Epigenetic Marker for Sperm Maturity.” *Andrologia* 52(1).
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/and.13352> (October 16, 2020).
- Zhao, Yangxing et al. 2006. “Characterization and Quantification of mRNA Transcripts in Ejaculated Spermatozoa of Fertile Men by Serial Analysis of Gene Expression.” *Human Reproduction* 21(6): 1583–90. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16501037/> (October 18, 2020).
- Zhuang, Tiangang et al. 2014. “CHD5 Is Required for Spermiogenesis and Chromatin Condensation.” *Mechanisms of Development* 131(1): 35–46.
 /pmc/articles/PMC3965579/?report=abstract (October 13, 2020).
- Βαχτσεβάνου Α. 2020. “Επιγενετικές Μεταβολές Που Προκύπτουν Από Προγεννητική Έκθεση Στον Καπνό ή Σε Βαρέα Μέταλλα ΛΑΡΙΣΑ 2018 Επιγενετικές Μεταβολές Που Προκύπτουν Από Προγεννητική Έκθεση Στον Καπνό ή Σε Βαρέα Μέταλλα.”
- Ζαφρανάς, Νικόλαος Α. και, and Αριστείδης Β. Ζαφρανάς. ““Εγκέφαλος, Φυσιολογία Και Μουσική.”” <https://www.openbook.gr/egkefalos-fysiologia-kai-mousiki/> (September 21, 2020).
- Μοίρας, Κ. Ι. 2011. 58 Παιδιατρ Κλιν Πανεπ Αθηνών *Επιγενετική-Νευροεπιγενετική*.
- Νικολάου, Χριστόφορος, and Παναγιώτης Χουβαρδάς. “Βιολογία Μεγάλων Δεδομένων Εισαγωγή.”
- Νικολόπουλου, Δημήτριου. 2017. “Συσχέτιση Παραμέτρων Αξιολόγησης Γονιμότητας Του Σπέρματος.” : 1–82.