

Žiga Jan¹, Irma Virant Klun², Borut Peterlin³, Branko Zorn⁴

Vpliv epigenetskih modifikacij na razvoj in funkcijo moške gamete

Effects of Epigenetic Modifications on Male Gamete Development and Function

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: spermatogeneza, DNA metilacija, gen izražanje, histoni, RNA interferenca, genomsko vtisnjenje

Epigenetske modifikacije DNA so del genomske regulacije. So oznake, ki spremenijo vzorec izražanja genov in tako na nivoju celotnega genoma vzpostavijo celično-specifični profil izražanja genov. Ključne so med razvojem, ko sprva poskrbijo za pluripotenost predimplantacijskega zarodka, kasneje pa za celično diferenciacijo. Ker so te oznake dinamične, lahko omogočijo razvoj spolnih celic. V tem članku opisujemo metilacijo DNA, histonske modifikacije in interferenco z RNA in njihovo morebitno vlogo med razvojem moških gamet. Predstavljamo tudi nekatere nove dokaze, kako nepravilnosti v epigenetskih oznakah vplivajo na funkcijo moške gamete – spermija.

ABSTRACT

KEY WORDS: spermatogenesis, DNA methylation, gene expression, histones, RNA interference, genomic printing

Epigenetic DNA modifications participate in genome regulation. These marks modulate the gene expression pattern and, on the whole genome scale, provide a cell-specific expression profile. They are pivotal to development, as they first enable preimplantation embryo pluripotency and, later on, cell differentiation. Because these marks are dynamic, they allow for the development of germ cell. In this review, DNA methylation, histone modifications and RNA interference are presented and their possible role in male germ cell development is discussed. Some early evidence linking erroneous epigenetic marks to male gamete (spermatozoon) dysfunction is also presented.

¹ Žiga Jan, dr. med., Center za andrologijo, Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva 2, 1000 Ljubljana.

² Doc. dr. Irma Virant Klun, univ. dipl. biol., IVF laboratorij, Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana.

³ Prof. dr. Borut Peterlin, dr. med., Inštitut za medicinsko genetiko, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva 3, 1000 Ljubljana.

⁴ Doc. dr. Branko Zorn, dr. med., Center za andrologijo, Klinični oddelek za reprodukcijo, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva 2, 1000 Ljubljana.

UVOD

Z dešifriranjem človeškega genoma se odpira kopica vprašanj o regulaciji ekspresije genov. Izkazalo se je, da genomska regulacija poteka tudi s pomočjo oznak v nivoju nad genomom, s t. i. epigenetskimi oznakami. »Epigenom« je kritična komponenta genomske regulacije, saj omogoča prostorsko in časovno selektivno izražanje genov (1).

Epigenetika preučuje načine za spremembo fenotipa, ki ne nastanejo zaradi mutacije zapisa DNA, ampak sprememb v nivoju nad njim – v strukturi kromatina (2). Epigenetske modifikacije so pravzaprav skupina mehanizmov znotraj zapletenega nadzorne sistema za rast in diferenciacijo celic (3). Botrujejo temu, da se ženski in moški alel istega gena izražata različno in so osnova za nastajanje razlik med razvojem tkiv in organov. Delujejo kot kompleksne šablone za branje genoma, saj širijo informacijski potencial osnovnega zapisa DNA in zato omogočajo diferencialno izražanje genov med različnimi vrstami celic. Njihov vzorec se lahko deduje, unikatno obliko pa dobi med razvojem spolnih celic.

Ponavadi med epigenetske oznake šteje mo kovalentne spremembe DNA in histonov, v zadnjem času pa tudi regulatorna kratka

zaporedja RNA – t. i. kratko nekodirajočo RNA (angl. *snRNA* – *short non-coding RNA*) (1). Laboratorijske metode, ki so omogočile študije epigenetskih mehanizmov genomske regulacije, so pregledno predstavili drugje (4, 5).

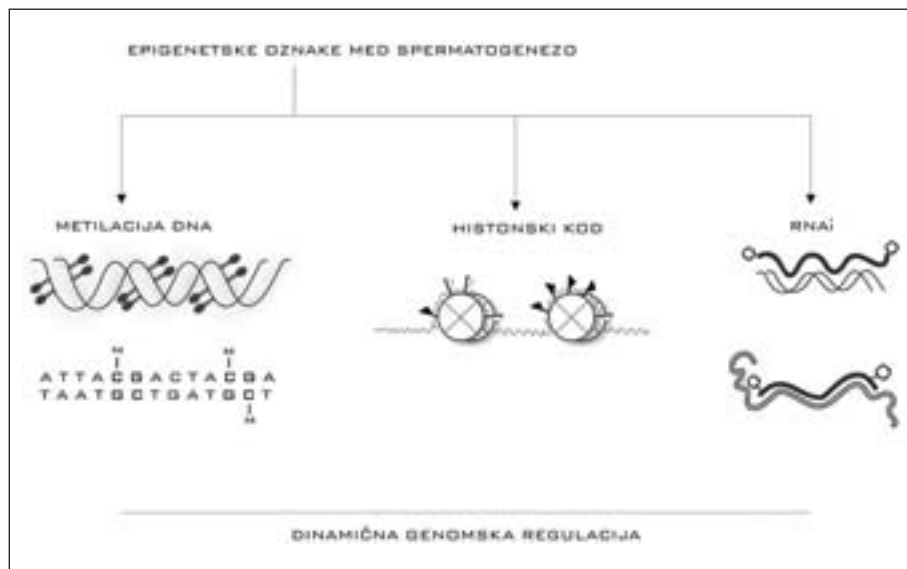
Neplodnost prizadene 10 do 15 % mladih parov. Moška neplodnost je enako pogosta kot ženska. Nastane zaradi motenj delovanja reproduktivnega trakta ali motenj nastajanja in dozorevanja spolnih celic. Veliko vzrokov za moško neplodnost ostane nepojasnjenih, zato bi epigenetske raziskave lahko dodatno razložile nekatere izmed nerazjasnjenih primerov, napovedale potek bolezni in ponudile nove možnosti za njihovo zdravljenje. Ne preseneča torej intenzivnost epigenetskih raziskav, zlasti na področju molekularne reprodukcije.

VRSTE EPIGENETSKIH OZNAK

Metilacija DNA

Metilacija DNA je ena najbolj raziskanih oznak za uravnava izražanja genov (slika 1). Omogočajo jo encimi iz družine metiltransferaz DNA, ki metilirajo citozin (1). Metilirani citozin večinoma najdemo tik ob gvaninu v dinukleotidnem zaporedju citozin-gvanin (CpG) in le manjši del izven CpG – kar označujemo kot CpN. Pari CpG se pogosto pojavljajo

342



Slika 1. Epigenetske oznake. RNAi – interferenca z RNA.

v skupinah, t. i. »otočkih CpG« (angl. *CpG islands*). Otočki CpG so izredno pomembni v uravnavanju izražanja genov, večinoma se nahajajo blizu promotorjev konstitutivnih (stalno aktivnih) genov in so se med evolucijo izredno malo spreminjali.

Poznamo več metiltransferaz DNA (Dnmt). Med seboj se razlikujejo glede na funkcijo, saj je npr. Dnmt3a sposobna (hemi)metilirati poprej neoznačene odseke DNA, medtem ko Dnmt1 metilira izključno že prej hemimetilirane odseke DNA (tabela 1) (6). Za metilno oznako na CpG je namreč značilno, da se lahko deduje. Pri podvajanju se oznaka ohrani na eni strani hčerinske vijačnice DNA, hemimetilirano DNA pa prepozna Dnmt1 in metilira tudi njen komplementarni del. Menijo, da metilacija DNA lahko predstavlja nov mehanizem nemendelevskega dedovanja (7).

Metilacijo DNA klasično razumemo v povezavi z represijo prepisovanja v ciljnem odseku DNA (1). Metilacija otočka CpG prepreči vezavo regulatorskih beljakovin (npr. insulatorjev) in tako onemogoči izražanje gena. Poleg zagotavljanja utišanja monoalelne ekspresije ima metilacija vlogo tudi v utišanju večjih delov genoma, še zlasti transpozonskih zaporedij, in s tem omogoča stabilnost genoma (8). Domnevajo, da naj bi bilo pri človeku kar 60% promotorskih mest blizu otočka CpG, pa tudi sicer stopnja izražanja gena večinoma ustreza metilacijskem statusu priležnih odsekov DNA (3). Kriteriji za določitev otočka CpG se med raziskavami razlikujejo, zato raje govorimo o odsekih z visoko oz. nizko vsebnostjo dinukleotidov CpG (angl. *HCP – high CpG content* oz. *LCP – low CpG content*). Odseki HCP so pogosto hipometilirani in nosijo zapise za konstitutivne, evolucijsko gledano izredno konzervativne gene. V odsekih LCP pa prevladuje hipermetilacija, povezana s tkivno-specifični-

Tabela 1. Ključne metiltransferaze DNA in njihove vloge v metilaciji DNA.

| Beljakovina | Naloga |
|-------------|---------------------------|
| Dnmt1 | Vzdrževalna metilacija |
| Dnmt3a | Metilacija <i>de novo</i> |
| Dnmt3L | Regulator Dnmt3a |

mi geni. Že dolgo vemo, da so Dnmt pomembni tudi za embrionalni razvoj, saj npr. delecija gena *Dnmt1* povzroči smrt zarodka (9). V zadnjih letih pa nova spoznanja kažejo, da ima metilacija DNA osrednje mesto v diferenciaciji celičnih linij in reprodukciji (10).

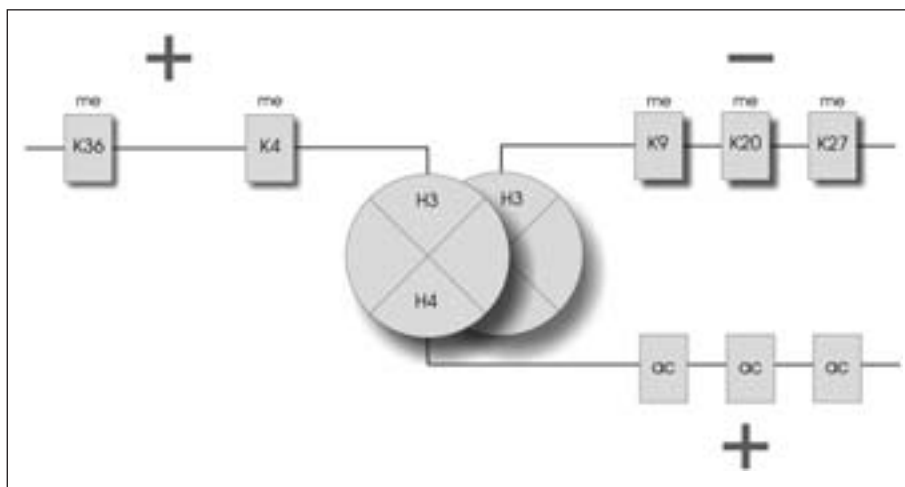
Glede na različno povprečno metiliranost posameznega otočka CpG med primerjanimi tkivi so vpeljali izraz diferencialno metilirana domena (DMD). Opazovana DMD je lahko v nekaterih tkivih hipo-, v drugih pa hipermetilirana in pogosto kaže na specialno funkcijo nekega tkiva. Nedavno so sicer odkrili, da je metilacija DNA na promotorju ciklična, in da imajo metiltransferaze Dnmt pri tem dvojno vlogo: metilacijsko in deaminacijsko (torej lahko tudi odstranijo metilno oznako) (11). Morda dvojna vloga metiltransferaz pojasnjuje, zakaj še niso odkrili beljakovine za aktivno demetilacijo.

Modifikacije histonov

Obstaja več kot sto posttranslacijskih kovalentnih modifikacij histonskih repov – N. Modifikacije omogočajo kompleksi za remodelacijo kromatina (ang. *chromatin remodeling complexes*), najbolj znani pa so proteini skupine Trithorax in Polycomb (12). Po pomenu izstopata acetilacija (ac) in metilacija (me) lizina na histonih. Histonske modifikacije različno sovpadajo

Tabela 2. Pogostejše histonske oznake in njihov pomen. Ac – acetilacija, me – metilacija.

| Histonska oznaka | Povezava | Lokacije, kjer se pojavljajo |
|------------------|-------------------------|--------------------------------|
| H3K4ac | aktivno prepisovanje | Globalno |
| H3K4me | aktivno prepisovanje | Promotorji |
| H3K27me | represija transkripcije | Promotorji |
| H3K9me | Inaktivacija | vtisnjeni geni, heterokromatin |
| H3K20me | Inaktivacija | LINE, heterokromatin |
| H3K36me | Elongacija | THII |



Slika 2. Modifikacije histonov in njihova povezava s transkripcijsko aktivnostjo. + – aktivno prepisovanje gena, -- represija prepisovanja gena, H – histon, K – lizin, me – metilacija, ac – acetilacija.

s prepisovanjem priležnih genov (slika 2, tabela 2).

Metilacija lizina je različno povezana s transkripcijsko aktivnostjo. Nad promotorji se pojavlja oznaka histona 3 na lizinu na mestu 4 (H3K4me), nad elongacijskimi zaporedji pa H3K36me. Ne preseneča torej, da oznako H3K4me pogosto najdemo blizu otcokov CpG. Menijo, da ti dve oznaki skupaj omogočata prepoznavanje še neznanih promotorskih mest (13). Sledi, da bi v genomu ta hip še neodkrita (kandidatne) gene lahko prepoznavali kar iz histonskih oznak nad njimi.

H3K27me je represivna oznaka, ki jo posreduje pomembna skupina beljakovin Polycomb. Ravno tako sta pomembni represivni oznaki H3K9me in H3K20me, ki se pojavljata nad heterokromatinskimi predeli. Občasno se lahko nad DNA skupaj pojavita antagonistični oznaki, npr. H3K4me in H3K27me. Večina takšnih bivalentnih oznak kasneje prevzame aktivno oznako H3K4me. Bivalentna oznaka zato označuje sekvence, ki čakajo na začetek transkripcije (14).

Acetilacija histonov omogoča boljši dostop do kromatina in zato večje izražanje genov. Zaradi acetilacije lizina se nevtralizira histonski naboj in se DNA lahko sprostí iz nukleosoma. Acetilni ostanek prepoznajo beljakovine, ki imajo poseben odsek, sposoben prepoznavati, t. i. bromodomeno (angl. bromodo-

main). Beljakovine z bromodomeno imajo sposobnost remodelacije kromatina in njegove aktivacije.

Menijo, da so ravno histonske oznake tiste, ki vzdržujejo epigenetski spomin, ko transkripcija ne poteka – in to ob odsotnosti metilacije. Nedavno so se dogovorili za enotno poimenovanje beljakovinskih kompleksov za remodelacijo kromatina (16).

Interferenca z RNA

Analize globalne transkripcije RNA so odkrile številne nekodirajoče RNA (angl. ncRNA – non-coding RNA). Slednje se ne prevajajo v beljakovine, udeležene pa so v regulaciji ekspresije genov bodisi na nivoju transkripcije bodisi na posttranskripcijskem nivoju (17). V prvem primeru se v regulacijo vpletajo prek organiziranja kromatina (obdajanje tarčnega zaporedja), v drugem pa vplivajo na stabilnost mRNA in s tem pogojujejo sintezo proteinov (18). Mehanizem regulacije z ncRNA imenujemo interferenca z RNA (angl. RNAi – RNA interference) in potrebuje udeležbo proteinov družine argonavtov (angl. Argonaute) (19).

Med spermatogenezo je pomembna skupina kratkih zaporedij RNA, ki se povezujejo z MIWI, beljakovinami argonavtske poddružine PIWI. Poimenovali so jih piRNA (angl. PIWI-related inhibitory RNA) (20). MIWI se

nahaja v spermatocitah in spermatidah ter je ključna za začetek spermiogeneze, piRNA pa se nahaja v spermatidah in je pomembna za kontrolo translacije (21). Menijo, da je RNA udeležena pri t. i. »paramutacijah«, kjer gre za prenos fenotipske lastnosti brez spremembe DNA, tudi pri sesalcih. Dedovanje s spermalno RNA so dokazali nedavno (22).

Genomsko vtisnjenje

Genomsko vtisnjenje (angl. *imprinting*) je poseben vzorec ekspresije določenih genov, pri katerem poteka ekspresija izključno monoalelno, pri čemer je ključno, ali izvira alel od matere ali od očeta. Geni za vtisnjenje vsebujejo v t. i. odseku za nadzor vtisnjenja (angl. *ICR – imprinting control region*) večje število dinukleotidov CpG, le-ti pa so na enem alelu metilirani. Takšna metilirana ICR (tudi ustreza definiciji DMD) se nato vpleta v ekspresijo priležnih genov tako, da fizično ovira vezavo posebnih regulatornih beljakovin – insulatorjev, ki sicer preprečujejo ekspresijo gena. V mehanizmu vtisnjenja torej metilirani odsek ICR z oviranjem nameščanja insulatorjev omogoči ekspresijo priležnega gena.

Večina vtisnjenih genov je materinega porekla (6). Genomsko vtisnjenje (angl. *imprinting*) se kot mehanizem za ekskluzivno monoalelno ekspresijo pojavlja le pri sesalcih, njen evolucijski pomen pa je verjetno v preprečevanju partenogeneze (t. j. razvoju oocita, kjer sta oba haploidna genoma prispela od istega spola, in izvira genom bodisi od dveh očetov bodisi dveh mater). Vtisnjenje je potemtakem mehanizem za epigenetsko preverjanje raznospolnega porekla določenih alelov in s tem potrditev raznospolnosti genoma (23).

Domnevajo, da je bilo genomsko vtisnjenje pomembno tudi med evolucijo vrst. Vtisnjeni geni so pogosto povezani z rastjo plodu oz. razvojem placente. Vloga očetovsko vtisnjenih genov (angl. *paternal imprinted genes*) naj bi bila v čim večji rasti plodu, vloga matersko vtisnjenih genov (angl. *maternal imprinted genes*) pa v zadostnem črpanju virov iz okolja (kar se odraža v kakovosti placente). Napake v vtisnjenju očetovsko vtisnjenih genov zato vodijo v mikrosomijo (črpanje virov oz. rast je nezadostna), napake pri matersko vtisnjenih genih pa v makrosomijo plodu

(črpanje je prekomerno). Monoalelna ekspresija zato predstavlja ravnotežje med težnjo po čim več in čim večjih potomcih, ki naj bi jo genetsko posredoval samec, in razpoložljivimi naravnimi viri, ki jih bo zagotavljala samica.

Moška in ženska zrela spolna celica se razlikujeta v statusu metilacije nad vtisnjenim alelom. Med razvojem spolnih celic mora obvezno priti do izbriisa oznak nad vtisnjenimi geni, da bi se glede na spol organizma lahko vzpostavil nov zarodku lasten, bodisi moški bodisi ženski, spolno-specifični epigenetski vzorec.

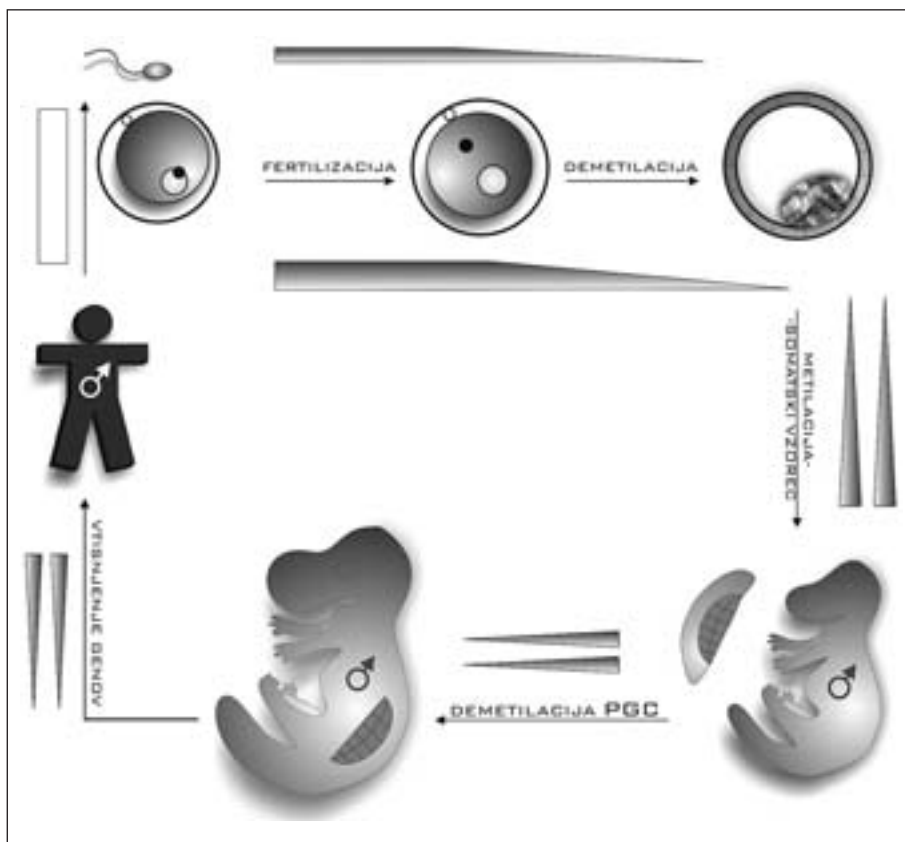
PREUREJANJE EPIGENETSKIH OZNAK MED RAZVOJEM ORGANIZMA

Demetilacija v zigoti in metilacija v večceličnem zarodku

Metilacijska oznaka je dinamična, saj se njen profil med razvojem organizma spreminja (slika 3). Epigenetsko preurejanje namreč zagotavlja prehod dednine iz dveh visoko specializiranih celic v novo totipotentno celico (24). V zadnjih letih so precej pozornosti namenili epigenetskimi vidikom zgodnjega embrionalnega razvoja, saj verjetno predstavljajo kontrolni nivo pluripotentnosti.

V trenutku oploditve se očetov in materin genom epigenetsko razlikujeta. Materin genom je namreč zaustavljen v metafazi II, potemtakem še vedno diploiden in vsebuje histone, očetov genom pa je haploiden in gosto pakiran s protamini, ne histoni. Po oploditvi se očetovi protamini zamenjajo za materine histone, jajčna celica pa dokonča mejozo. Kljub temu se ohranja epigenetska asimetrija, saj so očetovi histoni bolj acetilirani in manj metilirani kot homologni materini histoni (24).

Tik za tem pride do obsežnega preurejanja epigenetskih oznak (slika 1). Poteče hitra demetilacija očetove DNA, ki se zaključi še pred začetkom prve replikacije. Proces naj bi bil aktiven, čeprav ni jasno povsem, kako poteka. Verjetno so pri demetilaciji udeleženi mehanizmi za popravo DNA (angl. *mismatch repair*). Očetov pronukleus je pred začetkom prve replikacije praviloma hipometiliran glede na materinega.



Slika 3. Metilacija DNA med razvojem spreminja svoj profil. Debelina črte označuje nivo metilacije, naklon pa njeno dinamiko. PGC – primordialne zarodne celice (spolne). Moška spolna celica je v primerjavi z žensko precej bolj hipometilirana.

Hitra demetilacija ni popolna, saj ne obsega nekaterih »strukturnih« regij, kot so heterokromatin, pericentromerni odseki in retrotranspozoni IAP, še zlasti pa ne očetovskih vtisnjenih genov. To ohranjanje specifične metilacije verjetno prispeva k stabilnosti kromosomske zgradbe, utišanju retrotranspozonov in pravilnem vtisnjenju. Transpozoni se morajo utišati, da se ne bi prosto premikali po genomu in iztirili ekspresije genov. Zato so te sekvence pogosto hipermetilirane in obenem označene z represivnimi histonskimi oznakami, kot je H3K9me. Varovanje pred hitro demetilacijo naj bi zagotavljal protein stella (25).

Po valu hitre demetilacije očetovega genoma se obenem z delitvijo zigote začne počasna splošna demetilacija. Verjetno zaradi izklju-

čitve Dnmt1 iz nukleusa vzdrževalna metilacija med delitvijo celic ni več zadostna za ohranjanje poprejšnjega profila. Posledično imajo embrionalne celice nižjo stopnjo metiliranosti in hkrati posedujejo pluripotentne lastnosti. Namen dveh valov demetilacije je zagotoviti izenačen epigenetski profil obeh genomov, obenem pa tudi izničiti represivni učinek metilacije na nekatere ključne beljakovine pluripotentnosti. Mesti *Nanog* in *Oct4* (za beljakovini »pluripotentnosti«) sta npr. v spermiju še metilirani in se morata po oploditvi obvezno demetilirati (26). Dva valova demetilacije zato pomenita ključni regulacijski dogodek za vzpostavitev pluripotentnosti zigote (25). Zato je to zelo občutljivo obdobje, ko je v postopku zunajtelesne oploditve zelo pomembno, v kakšnem gojišču in ob kakšnih

biofizikalnih pogojih gojimo humani zarodek, da morebiti ne pride do epigenetskih nepravilnosti.

Kasneje z nadaljnjo delitvijo v celicah zarodka napreduje diferenciacija celic v embrionalne celične linije, ki jih spremlja vse večja metilacija, začenši z geni za pluripotenost. Do diferenciacije celic prihaja na razvojni stopnji kasne morule oziroma blastociste. Bolj diferencirane celične linije imajo svoj specifični epigenetski profil, ki je bolj metilirani in nosi drugačen histonski kod.

Obsežna demetilacija v primordialnih spolnih celicah in metilacija de novo

Ko se v epiblastu pojavijo primordialne zarodne celice (angl. *primordial germ cells* – PGC), še vedno nosijo somatski epigenetski vzorec. PGC morajo zato začeti z obsežnimi spremembami epigenoma, da bi si povrnila pluripotenost, vstopile v visoko specializirano diferenciacijo in naposled izdelale edinstven haploidni genom v zreli spolni celici (27). Če primerjamo ekspresijski profil PGC in pluripotentnih embrionalnih matičnih celic, so razlike namreč minimalne (28).

Z aktivno demetilacijo se izbriše somatski vzorec v PGC, znižuje se globalni nivo H3K4me in zvišuje H3K27me2 (29). V času migracije na urogenitalni greben se v PGC izražajo značilni dejavniki pluripotentnosti, kot sta *Oct4* in *Nanog*, zatem pa dejavniki, značilni za zarodne celice (*Blimp1*, *fragilis*) (27). Pri deklicah se reaktivira utišani kromosom X. Popolnoma se izbrišejo oznake nad geni za vtisnjenje in se vzpostavi nov, od spola odvisen vzorec. Vrstni red izginjanja somatskih in pridobivanja zarodnih oznak je značilen: izginejo oznake H3K9me (prek zmanjšanja aktivnosti histonske metiltransferaze GLP), zavre se transkripcija s Pol II, nato se poveča nivo H3K27me in končno reaktivira transkripcija s Pol II (29, 30).

Ob prihodu na urogenitalni greben v PGC poteče metilacija *de novo*, specifična za vsak spol (31). Njen namen je vzpostavitev oznak nad DMD in s tem vtisnjenje genov, kasneje pomembno za razvoj novega organizma po oploditvi.

EPIGENETSKE OZNAKE MED SPERMATOGENEZO

Metilacija DNA med mišjo spermatogenezo

Čeravno se genom v spermijih hkrati z diferenciacijo dodatno metilira, je spermalni epigenetski profil drugačen od ostalih diferenciranih tkiv (tabela 3). Nivo metilacije DNA v mišjih testisih je značilno nižji od vrednosti za ostala tkiva in vsebuje kar 8 × več hipometiliranih lokusov glede na somatska tkiva (32). Hipometilirana področja se presenetljivo pojavljajo daleč od neponavljajočih se zaporedij in otočkov CpG oz. promotorjev »hišnih« genov. To hipometilacijo LCP si razlagamo z obsežno tkivno-specifično ekspresijo genov med gametogenezo, ki v somatskih tkivih ne poteka in je potemtakem »zaklenjena« z metilacijo. Nekaj satelitskih zaporedij, presenetljivo hipometiliranih v testisih, pa ima morda regulatorno vlogo kasneje med embrionalnim razvojem.

Še bolj presenetljiva pa je ugotovitev, da v metilacijskem statusu med embrionalnimi matičnimi celicami (angl. *embryonic stem cells* – ESC), embrionalnimi zarodnimi celicami (angl. *embryonic germ cells* – EGC) in spermiji globalno gledano ni razlik – vsakokrat gre za hipometilirane genome. Vendar obstaja kljub globalno izenačeni metilaciji pomembna razlika med ESC, EGC in bolj zreliimi oblikami gamete – v spermijih je namreč ključni dejavnik pluripotentnosti, gen *Nanog*, metilirani (26).

Čeprav specifična metilacija v spolnih celicah večinoma poteče, še preden dosežejo razvojno stopnjo spermatogonija, so ravno tako dokazali tako metilacijo *de novo* kot tudi demetilacijo tudi med spermatogenezo vse do pahitenske spermatocite, večinoma v zaporedjih LCP (33).

Miške mutantke za *Dnmt3L*^{-/-}, ki so neplodne in s številnimi kromosomskimi nepravilnostmi, specifičnega profila ne vzpostavijo (32). Morda ima *Dnmt3L* nalogo priskrbiti metilne oznake za tako specifične dogodke, kakršna je mejoza. Mutanti *Dnmt3L*^{-/-} so imeli manj gonocitov in so kasneje vstopali v mejozo, kar lahko govori tudi za motnjo mitoze (34). Pri defektu *Dnmt3L* se aktivirajo

retrotranspozoni in ovirajo nastanek sinaptonemnega kompleksa. Vsekakor pa je Dnmt3L beljakovina, ki omogoči paternalno vtisnjenje in metilacijo transpozonov (10). Ekspresija Dnmt3L omejena na gamete, in o tej beljakovini lahko govorimo kot o ključnem dejavniku plodnosti.

Histske oznake med mišjo spermatogenezo

Represivna oznaka H3K9me označuje heterokromatin in jo posreduje histonska metiltransferaza G9a (nova nomenklatura: KMT1C, op. a.). Pogojna, časovno tempirana mutacija vodi pri miših v neuspešno mejozo, kar kaže, da skrbi G9a za utišanje genov med tem dogodkom (tabela 3) (35).

Koncentracija AOF2 (nova nomenklatura: KDM1, op. a.), lizinske histonske demetilaze, je v testisih značilno povišana (36). Ohranja pravilen nivo H3K4me. Povezuje se s proteinom MBD, ki ima vezavno domeno za metil-CpG (angl. *MBD, methyl-binding domain*) in histonsko deacetilazo HDAC1. Na začetku mejoze, v preleptotenu, se poviša nivo H3K4me, ki se med zigotonom in pahitonom zniža, tej dinamiki pa sledi tudi AOF2.

Različne epigenetske oznake se nad DMD ob genih za vtisnjenje pojavljajo v tipičnih kombinacijah. DMD blizu *H19*, očetovskega gena za vtisnjenje, je v somatskih tkivih na enem alelu metilirana, na drugem pa ne. Gre torej za pravilno vtisnjenje z ekskluzivno ekspresijo enega alela. Zanimivo pa je, da se ob metilirani DMD pojavita H4K20me3 in H3K9me3, ob nemetilirani pa H3K4me2 in H3ac (37). Preverili so, ali se ta kombinacija pojavi že med spermatogenezo, in ugotovili, da se nad materinsko vtisnjenimi geni pojav-

ljata H3K4me in H3ac, nad očetovskimi pa sta odsotni. To pomeni, da nosijo lokusi različne histonske oznake, glede na to pač, ali so metilirani ali ne.

MikroRNA med mišjo spermatogenezo

V testisih se nahajajo posebno velike količine okrog 30 nukleotidov dolge regulatorne RNA, piRNA, ki se povezuje s proteini vrste Argonavti – Piwi. Miši, mutanti za Miwi, mišjo podvrsto Piwi, so bile neplodne (20). Nedavno so dobro opredelili izražanje miRNA med gametogenezo in ugotovili, da so se pri mutantih za *Dicer*, regulatorni protein za miRNA, udeležen v mehanizmu RNAi, PGC in spermatogoniji slabše delili (tabela 3) (21). Pogojna izključitev *Dicer1* je pri miših povzročila neplodnost, najbrž zato, ker je izostalo pravilno zorenje (38). V prihodnosti lahko pričakujemo več poročil o vlogi kratkih regulatornih odsekov RNA med spermatogenezo, v nastajanju pa so tudi podatkovne zbirke za mišjo miRNA (39).

Epigenetske oznake in spermatogeneza pri moškem

Ker imajo epigenetske oznake pomembno mesto med dozorevanjem spolnih celic, rastoče število študij povezuje nepravilnosti v epigenetskih mehanizmih z zmanjšano moško plodnostjo neznane etiologije. Preučevali so zlasti metilacijo DNA, ostala dva mehanizma zaenkrat manj (tabela 4).

Prvi poskusi so merili globalni nivo metilacije DNA v spermijih. V njih niso opazili povezanosti s slabim spermogramom, obstajala pa je povezava z globalno hipermetiliranostjo DNA in deležem zanositev v postopkih

Tabela 3. *Nekatere epigenetske oznake med mišjo spermatogenezo.*

| | |
|-----------------------|---|
| Metilacija DNA | Odseki LCP – relativno hipometilirani Celokupna metilacija – podobna pluripotentnim celicam Ključni geni pluripotence – metilirani Nepravilnosti Dnmt3L – neuspešna mejoza |
| Histske oznake | Vloga KMT1C – utišanje genov med mejozo Koncentracija KDM1 med mejozo – značilen profil Različno vtisnjen alel – različna histonska oznaka |
| MikroRNA | Mutacija gena <i>Dicer</i> – manj delitev spolnih celic |

Tabela 4. Nekateri epigenetski mehanizmi, ki se pojavljajo v povezavi s slabšo spermatogenezo.

| Nepravilna epigenetska oznaka | Klinični izvid |
|---|-----------------------|
| Hipometilacija <i>H19</i> (očetovsko vtisnjen gen) | Oligozoospermija |
| Hipermetilacija <i>MEST</i> (materinsko vtisnjen gen) | Oligozoospermija |
| Motnja izražanja metiltransferaz DNA 1 (<i>Dnmt1</i>) | Zastoj spermatogeneze |

zunajtelesne oploditve (IVF) (40). Drugi so se osredotočili na lokuse genov za vtisnjenje in ugotavljali, da je pri oligozoospermikih, t. j. moških z majhnim številom spermijev, pogostejša hipometilacija gena *H19*, ki je pomemben gen za očetovsko vtisnjenje (41). Zopet druga skupina pa, nasprotno, ni potrdila povezanosti med napačno vtisnjenim genom *H19* in oligozoospermijo (42). Poročali so, da je bila pri oligozoospermikih metilacija niza promotorjev za gene, ki se specifično izražajo v testisih, povečana, vendar v tej študiji niso opazovali genov za vtisnjenje (43).

Povezavo med oligozoospermijo in spremenjenim metilacijskim statusom sedmih genov za vtisnjenje sta potrdili novejši študiji, pri čemer so bili očetovski geni (npr. *H19*) praviloma hipo-, materini (npr. *MEST*) pa hipermetilirani (44, 48). Trenutno prinaša najbolj celovito sliko o povezanosti oligozoospermije in aberantne metilacije študija več sto lokusov, ki je pokazala, da gre pri oligozoospermiji za globalno motnjo metilacije (45). *MEST*, maternalno vtisnjen gen, je bil npr. hipermetiliran, kar govori za nepravilno demetilacijo moških gamet med razvojem. Študija prinaša pomembno spoznanje, da pri nekaterih oligozoospermikih ne gre za nepravilno vtisnjenje posameznih genov, ampak za globalno motnjo metilacije DNA.

Ko so opazovali prisotnost beljakovin, ki posredujejo epigenetske oznake, sta bila pri normospermikih signala (signala sta bila mRNA za *Dnmt1* in beljakovina *Dnmt1*) prisotna v celicah vseskozi od stopnje spermatogonijev do stopnje spermatocitov, pri pacientih z zastojem na nivoju okroglih spermatid pa je bil njun signal pozitiven zgolj na nivoju spermatocitov (46). To kaže, da je vzdrževalna metilacija pri nezadostni spermatogenezi motena, vendar ni jasne povezanosti z motnjo demetilacije, ki jo predpostavljajo zgoraj omenjene študije.

Pomejotska menjava histonov za protamin

Menjava poteka v treh stopnjah

V podaljšani spermatidi kromatin nadaljuje z zgoščevanjem. Histone (H) v veliki meri zamenjajo protamini, ki omogočijo maksimalno kompaktnost kromatina in s tem učinkovitejši transport do jajčne celice. Protaminska kondenzacija zavre ekspresijo genov. Menjava histonov za protamine poteče v več fazah in z vmesnimi različicami histonov: H → H1t → tranzicijski proteini 1, 2 → protamini (H – histon, H1t – za testis specifična oblika histona 1) (2). Najprej pride do vgrajevanja različic histonov, tipičnih za testise. Za njimi se v kromatin vgrajujejo tranzicijski proteini, ki jih nazadnje zamenjajo protamini.

Pri človeku naj bi se zamenjalo do 85 % histonov, preostali pa ostanejo, da bi med dozorevanjem spermatid ohranili vsaj minimalno transkripcijsko aktivnost. Morda služijo tudi kot model za histonske oznake tik po oploditvi (6, 41). Subtotalna menjava že takoj po oploditvi omogoči takojšnjo transkripcijo, še preden se večina protaminov zamenja za histone iz jajčne celice (47). Takšno tezo podpira tudi ugotovitev, da je moški pronukleus po oploditvi 2,5-krat večji od ženskega in predvidoma transkripcijsko tudi bolj aktiven (6). To je predpriprava na aktivacijo očetovega genoma, ki se vključi na razvojni stopnji 4 do 6 celic predimplantacijskega zarodka; ves razvoj do te stopnje namreč poteka na osnovi materinih mRNA.

Pomen pravilne acetilacije histonov

Za pravilno menjavo histonov za protamin je pomembna časovno in količinsko natančna acetilacija histonov. Le-ta namreč spremeni naboj beljakovine in olajša združitev DNA od histonskega vretena. Zavrtja spermatogeneza

je povezana s prezgodnjo in reducirano hipe-racetilacijo H4ac (48).

Za pravilno preureditev kromatina v spermatocitah in okroglih spermatidah je pomembna beljakovina z bromodomeno (Brd), ki prepozna acetiliran lizin in je sposobna kondenzirati acetilirani kromatin. Brdt je absolutni dejavnik za moško neplodnost: njegova mutacija prepreči spermatogenezo, saj se heterokromatin nepravilno oblikuje (49).

Razmerje P1/P2 vpliva na plodnost

Poznamo dve vrsti protaminov, P1 in P2. Porušeno razmerje med njima je povezano z zavrnjo spermatogenezo oz. neplodnostjo pri moških. Povezano je z večjo fragmentacijo DNA, kar kaže, da protamin varuje DNA pred poškodbami. Abnormalne količine protamina so posledica previsokih količin transkriptov za protamin, zaradi motenega nadzora nad ekspresijo. Menijo, da porušeno razmerje P1/P2 pravzaprav odraža generalizirano motnjo v prepisovanju mRNA in so protamini kontrolor spermatogeneze (50).

VLOGA EPIGENETIKE V ASISTIRANI REPRODUKCIJI

Novejše tehnike oploditve z biomedicinsko pomočjo (angl. *assisted reproductive techniques* – ART), kot je neposredni vnos spermija v citoplazmo jajčne celice (angl. *intracytoplasmic sperm injection* – ICSI), obsegajo tudi odvzem nezrelih spolnih celic. Zelo tvegani so bili poskusi v preteklosti, da bi pri moških brez spermijev z metodo ICSI v jajčne celice injicirali spermatide (angl. *round spermatid injection* – ROSI). Glede na to, da se epigenetski profil med razvojem moške gamete dramatično spreminja, se hitro pojavi vprašanje, ali obstaja nevarnost prenosa redkih epigenetskih sindromov ravno zaradi oploditve jajčne celice z epigenetsko nezrelo moško gameto (52–54).

Molekularna logika je preprosta: nedozorela spolna celica bi se na tak način izognila naravni selekciji kljub morebitnim deficitarnim epigenetskim mehanizmom. Epigenetskega izvora naj bi bila tako številna bolezenska stanja, kot je Angelmanov sindrom, sindrom Prader-Wili, retinoblastom in cela paleta rakavih obolenj (55, Pogosto omenjajo v po-

vezavi z ART nevarnost povečane pojavnosti Beckwith-Wiedemannovega sindroma (BWS), povezanega z nepravilno vtisnjenim *H19*. Ena študija je poročala o nepravilnem vtisnjenju *H19* pri miših, spočetih *in vitro*, in to povezovala tudi z gojiščem za celice (56). Druga študija na mišjih zarodkih, spočetih po oploditvi *in vitro* (angl. *in vitro fertilization* – IVF), je odkrila nepravilno ekspresijo več genov, tudi *H19* in *MEST*, ravno tako v povezavi z gojiščem za kulturo embrija. Aberantna ekspresija se je kazala predvsem v celicah placent. Pomenljivo je to, da je normalno *H19* v placenti nemetiliran. Lahko potemtakem motnjo genomskega vtisnjenja povežemo z zastojem fetusa v rasti? Pilotske študije nakazujejo, da povezava morda obstaja (58). Le ena študija je epigenetske spremembe v mišjih blastocistah potrdila v povezavi z medijem, poleg tega pa tudi v povezavi s tehniko ART – več anomalij kot pri *in vivo* so ugotavljali pri oploditvi *in vitro* (59).

Glede na 30 let pozitivnih izkušenj s postopki IVF pri človeku lahko pomisleke o prenosu epigenetskih sindromov zaradi ART zavrnemo. Tudi kohortne študije do sedaj niso potrdile takšne povezanosti (60–62). Bojazen je zanemarljiva, saj so strokovnjaki ocenili verjetnost prenosa epigenetske bolezni na manj kot 1% (63). Vendar še vedno kličejo k previdnosti in pozornem sledenju pacientom v postopkih ART zaradi dodatnih potrditev varnosti tehnologije (64). Predvsem je treba biti previden v novih postopkih maturacije gamet *in vitro* in potencialne gametogeneze *in vitro* iz matičnih celic.

Ustrezno bi bilo še naprej pozorno spremljati otroke, spočete z ART. Velja omeniti, da je v svetu vedno bolj izražena težnja po sledenju otrok po ART. Prav zato se podatki o rezultatih ART zbirajo v številnih registrih, nacionalnih in globalnih (evropski, ameriški, avstralski in tudi slovenski) in tudi redno letno publicirajo v strokovnih revijah. Verjetno nobena veja medicine nima tako natančnega sledenja rezultatov zdravljenja kot ravno reproduktivna medicina (dr. Kovačič B., *dopisno*, 70). V slovenskem prostoru so poročila o tem skromna (rojenih je namreč šele nekaj več kot 6000 otrok) (71, 72). V slovenskih centrih za zdravljenje neplodnosti se zarodke goji podaljšano do razvojne stopnje blastociste.

Podaljšano gojenje zarodkov je sicer po svetu ustaljena praksa, Slovenija se po tem prav ničemer ne razlikuje od drugih držav. Nobeno poročilo do sedaj tudi ni povezovalo podaljšane gojenja zarodkov z večjim tveganjem za anomalije pri otrocih (*dr. Kovačič B., dopisno, 73*).

Vsekakor je smiselno nadaljnje sledenje spočetih otrok, pa tudi povezovanje strokovnjakov reproduktivne biomedicine s pediatri. Takšne prospektivne, dobro zasnovane raziskave bi ne odgovarjale samo na bojazen o domnevno višji pojavnosti epigenetskih sindromov, ampak tudi omogočale vpogled v druga zdravstvena stanja, ki se morda pogosteje pojavljajo pri teh otrocih. Kohorte očetje-sinovni bi omogočile oceno plodnosti dečkov, spočetih v postopkih ART od očetov z zmanjšano plodnostjo, in tako razjasnile mnoge primere zmanjšane moške plodnosti.

ZAKLJUČEK

Nova spoznanja o epigenetskih mehanizmih nam pomagajo razumeti, kako se izvaja kontrola genske ekspresije med zgodnjim embrionalnim razvojem in diferenciacijo, še posebej pa med razvojem spolnih celic. Najnovejše tehnologije preučevanja kromatina in RNAi, kombinirane z uporabo mikromrežnih analiz, bodo dajale podatke za zbirke epigenetskih profilov različnih celic, tako raznih somatskih kot tudi gamet. Spisek potencialnih epigenetskih dejavnikov neplodnosti se hitro daljša. Upamo lahko, da bomo mogli z novimi spoznanji o vplivu epigenetske (dis)regulacije na razvoj in funkcijo moške gamete razvijati tudi nove oblike ugotavljanja vzrokov in zdravljenja moške neplodnosti.

Slike je izdelala gdč. Arijana Haskaj, študentka arhitekture.

LITERATURA

- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007; 128 (4): 669–81
- Rousseaux S, Faure AK, Thévenon J, et al. Epigenetics of the sperm cell. *Gynecol Obstet Fertil* 2006; 34 (9): 831–5
- Genomic biology: the epigenomic era opens [Comment News]. *Nature* 2007; 448 (7153): 548–9.
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; 8 (4): 286–98.
- Schones DE, Zhao K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* 2008; 9 (3): 179–91.
- Biermann K, Steger K. Epigenetics in male germ cells. *J Androl* 2007; 28 (4): 466–80.
- Chong S, Vickaryous N, Ashe A, et al. Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nat Genet* 2007; 39 (5): 614–22.
- DNMT1 knockout delivers a strong blow to genome stability and cell viability [Comment News]. *Nat Genet* 2007; 39 (3): 289–90.
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69 (6): 915–26.
- Webster K, O'Bryan MK, Fletcher S, et al. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102 (11): 4068–73.
- Métivier R, Gallais R, Tiffocche C, et al. Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature* 2008; 452 (7183): 45–50.
- Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128 (4): 747–62.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 2007; 448 (7153): 553–60.
- Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, et al. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 2007; 130 (1): 77–88.
- Ng RK, Gurdon JB. Epigenetic memory of an active gene state depends on histone H3.3 incorporation into chromatin in the absence of transcription. *Nat Cell Biol* 2008; 10 (1): 102–9.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, et al. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* 2007; 131 (4): 633–6.
- Zaratiegui M, Irvine DV, Martienssen RA. Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* 2007; 128 (4): 763–76.
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 (3): 219–30.
- Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9 (1): 22–32.
- Girard A, Sachidanandam R, Hannon G, et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; 442 (7099): 199–202.

21. Hayashi K, Chuva de Sousa Lopes S, Kaneda M, et al. MicroRNA biogenesis is required for mouse primordial germ cell development and spermatogenesis. *PLoS ONE* 2008; 3 (3): 1738.
22. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, et al. Inheritance of an epigenetic change in the mouse: a new role for RNA. *Biochem Soc Trans* 2007; 35 (3): 623-5.
23. Paoloni-Giacobino A, D'Aiuto L, Cirio MC, et al. Conserved features of imprinted differentially methylated domains. *Gene* 2007; 399 (1): 33-45.
24. Morgan HD, Santos F, Green K, et al. Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet* 2005; 14 (1): 47-58.
25. Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007; 447 (7143): 425-32.
26. Farthing CR, Ficiz G, Ng RK, et al. Global mapping of DNA methylation in mouse promoters reveals epigenetic reprogramming of pluripotency genes. *PLoS Genet* 2008; 4 (6): e1000116.
27. Hayashi K, de Sousa Lopes SM, Surani MA. Germ cell specification in mice. *Science* 2007; 316 (5823): 394-6.
28. Elliott AM, de Miguel MP, Rebel VI, et al. Identifying genes differentially expressed between PGCs and ES cells reveals a role for CREB-binding protein in germ cell survival. *Dev Biol* 2007; 311 (2): 347-58.
29. Seki Y, Yamaji M, Yabuta Y, et al. Cellular dynamics associated with the genome-wide epigenetic reprogramming in migrating primordial germ cells in mice. *Development* 2007; 134 (14): 2627-38.
30. Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature* 2008; 452 (7189): 877-81.
31. Maatouk D, Kellam L, Mann MR, et al. DNA methylation is a primary mechanism for silencing postmigratory primordial germ cell genes in both germ cell and somatic cell lineages. *Development* 2006; 133 (17): 3411-8.
32. Oakes CC, La Salle S, Smiraglia D, et al. A unique configuration of genome-wide DNA methylation patterns in the testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (1): 228-33.
33. Oakes C, La Salle S, Smiraglia D, et al. Developmental acquisition of genome-wide DNA methylation occurs prior to meiosis in male germ cells. *Dev Biol* 2007; 307 (2): 368-79.
34. La Salle S, Oakes CC, Neaga OR, et al. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 104.
35. Tachibana M, Nozaki M, Takeda N, et al. Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *EMBO J* 2007; 26 (14): 3346-59.
36. Godmann M, Auger V, Ferraroni-Aguar V, et al. Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis. *Biol Reprod* 2007; 77 (5): 754-64.
37. Delaval K, Govin J, Cerqueira F, et al. Differential histone modifications mark mouse imprinting control regions during spermatogenesis. *EMBO J* 2007; 26 (3): 720-9.
38. Maatouk DM, Loveland KL, McManus M, et al. Dicer1 Is Required for Differentiation of the Mouse Male Germline. *Biol Reprod* 2008.
39. Sai Lakshmi S, Agrawal S. piRNABank: a web resource on classified and clustered Piwi-interacting RNAs. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 173-7.
40. Benchaib M, Braun V, Ressnikof D, et al. Influence of global sperm DNA methylation on IVF results. *Hum Reprod* 2005; 20 (3): 768-73.
41. Marques C, Carvalho F, Sousa M, Barros A. Genomic imprinting in disruptive spermatogenesis. *Lancet* 2004; 363 (9422): 1700-2.
42. Hartmann S, Bergmann M, Bohle RM, et al. Genetic imprinting during impaired spermatogenesis. *Mol Hum Reprod* 2006; 12 (6): 407-11.
43. Kitamura E, Igarashi J, Morohashi A, et al. Analysis of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) in humans. *Genomics* 2007; 89 (3): 326-37.
44. Kobayashi H, Sato A, Otsu E, et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum Mol Genet* 2007; 16 (21): 2542-51.
45. Houshdaran S, Cortessis V, Siegmund K, et al. Widespread epigenetic abnormalities suggest a broad DNA methylation erasure defect in abnormal human sperm. *PLoS ONE* 2007; 2 (12): e1289.
46. Omissano OA, Biermann K, Hartmann S, et al. DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem Cell Biol* 2007; 127 (2): 175-81.
47. Wu TF, Chu DS. Epigenetic processes implemented during spermatogenesis distinguish the paternal pronucleus in the embryo. *Reprod Biomed Online* 2008; 16 (1): 13-22.
48. Rousseaux S, Reynoird N, Ecoffier E, et al. Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online* 2008; 16 (4): 492-503.
49. Shang E, Nickerson H, Wen D, et al. The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation. *Development* 2007; 134 (19): 3507-15.

50. Carrell D, Emery B, Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? *Hum Reprod Update* 2007; 13 (3): 313-27.
51. Carrell DT. Contributions of spermatozoa to embryogenesis: assays to evaluate their genetic and epigenetic fitness. *Reprod Biomed Online* 2008; 16 (4): 474-84.
52. Jacob S, Moley KH. Gametes and embryo epigenetic reprogramming affect developmental outcome: implication for assisted reproductive technologies. *Pediatr Res* 2005; 58 (3): 437-46.
53. Georgiou I, Syrrou M, Pardalidis N, et al. Genetic and epigenetic risks of intracytoplasmic sperm injection method. *Asian J Androl* 2006; 8 (6): 643-73.
54. Price TM, Murphy SK, Younglai EV. Perspectives: the possible influence of assisted reproductive technologies on transgenerational reproductive effects of environmental endocrine disruptors. *Toxicol Sci* 2007; 96 (2): 218-26.
55. Paoloni-Giacobino A. Epigenetics in reproductive medicine. *Pediatr Res* 2007; 61 (5 Pt 2): 51-7.
56. Li T, Vu T, Ulaner G, et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. *Mol Hum Reprod* 2005; 11 (9): 631-40.
57. Rivera RM, Stein P, Weaver JR, et al. Manipulations of mouse embryos prior to implantation result in aberrant expression of imprinted genes on day 9.5 of development. *Hum Mol Genet* 2008; 17 (1): 1-14.
58. Guo L, Choufani S, Ferreira J, et al. Altered gene expression and methylation of the human chromosome 11 imprinted region in small for gestational age (SGA) placentae. *Dev Biol* 2008; 320 (1): 79-91.
59. Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, et al. Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Dev Biol* 2007; 7: 116.
60. Anthony S, Buitendijk S, Dorrepaal C, et al. Congenital malformations in 4224 children conceived after IVF. *Hum Reprod* 2002; 17 (8): 2089-95.
61. Schieve L, Meikle S, Ferre C, et al. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med* 2002; 346 (10): 731-7.
62. Neri Q, Takeuchi T, Palermo G. An update of assisted reproductive technologies results in the United States. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1127: 41-8.
63. Bowdin S, Allen C, Kirby G, et al. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod* 2007; 22 (12): 3237-40.
64. Weksberg R, Shuman C, Wilkins-Haug L, et al. Workshop report: evaluation of genetic and epigenetic risks associated with assisted reproductive technologies and infertility. *Fertil Steril* 2007; 88 (1): 27-31.
65. Mikkelsen AL, Smith S, Lindenberg S. Possible factors affecting the development of oocytes in in-vitro maturation. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 5: 11-7.
66. Kehler J, Hübner K, Schöler HR. Derivation of germ cells from embryonic stem cells. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2006; (60): 125-42.
67. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, et al. Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 2006; 24 (8): 1931-6.
68. Lacham - Kaplan O. In vivo and in vitro differentiation of male germ cells in the mouse. *Reproduction* 2004; 128 (2): 147-52.
69. Bukovsky A, Gupta SK, Virant - Klun I, et al. Study origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human and rat ovaries. *Methods Mol Biol* 2008; 450: 233-65.
70. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2004: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008; 23 (4): 756-71.
71. Lovšin B, Tomažević T, Novak - Antolič Ž, et al. Pregnancy and birth of singletons after IVF-ET. *Zdrav Vestn* 1994; 63: 129-31.
72. Zorn B, Virant - Klun I, Drobnič S, et al. Nosečnost in otroci po metodi neposrednega vnosa semenčice v citoplazmo jajčne celice na Ginekološki kliniki v Ljubljani [Pregnancies and children after intracytoplasmic sperm injection attempt at the department of obstetrics and gynecology in Ljubljana]. *Zdrav Vestn* 2000; 69: 67-73.
73. Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, et al. A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod* 2005; 20 (2): 413-9.

Prispelo 4. 9. 2008.