



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

**Διερεύνηση των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων που σχετίζονται
με την υπογονιμότητα στον άνθρωπο**



ΑΛΕΞΑΝΔΡΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

Λάρισα 2014

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ**

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

- **ΨΑΡΡΑ ANNA- ΜΑΡΙΑ**

Επίκουρος Καθηγήτρια Βιοχημείας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετική Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών κ. Μαμούρη Ζήση.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ Μαμούρη Ζήση για την ανάθεση του θέματος αυτής της μεταπτυχιακής διατριβής, τη συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του στον προγραμματισμό και την εκτέλεση των πειραμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Αν. Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, κ. Μούτου Αικατερίνη καθώς και την Επ. Καθηγήτρια Βιοχημείας κ. Ψαρρά Άννα-Μαρία για την συμμετοχή τους στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον διδάκτορα κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο και την υποψήφια διδάκτορα κ. Σαρρή Κωνσταντίνα για την υποστήριξη και βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς επίσης και για τις χρήσιμες και παραγωγικές συζητήσεις για θέματα της διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μονάδα υποβοηθούμενης αναπαραγωγής EMBRYOLAB για την άψογη συνεργασία και την παροχή δειγμάτων και πληροφοριών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που επικρατούσε μέσα στο εργαστήριο.

Περίληψη

Στις μέρες μας η υπογονιμότητα επηρεάζει την ποιότητα ζωής πολλών ζευγαριών, έχοντας ποικίλες οικονομικές, ψυχολογικές και κοινωνικές προεκτάσεις. Περίπου ένα στα έξι ζευγάρια που βρίσκονται σε αναπαραγωγική ηλικία αντιμετωπίζει προβλήματα γονιμότητας. Πρόσφατες μελέτες αποδεικνύουν ότι ο ανδρικός παράγοντας συμβάλλει σε σημαντικό βαθμό στη διαμόρφωση του προφίλ ενός υπογόνιμου ζευγαριού. Τα προβλήματα γονιμότητας μπορεί να σχετίζονται με μια σειρά σωματικών, γενετικών, περιβαλλοντικών αλλά και άλλων παραγόντων ανεξήγητης αιτιολογίας. Ένας από τους υποψήφιους αιτιολογικούς παράγοντες της ανδρικής υπογονιμότητας αφορά τη δυσλειτουργία του μηχανισμού παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια τα οποία αποτελούν τα κέντρα παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Η εύρυθμη λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για την κάλυψη ενός αριθμού διεργασιών που είναι ζωτικής σημασίας για το κύτταρο. Μεταξύ αυτών είναι και η διαδικασία της σπερματογένεσης, της διαφοροποίησης και ομαλής λειτουργίας των σπερματοζωαρίων. Αδυναμία παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια λόγω μιτοχονδριακών γενετικών ανωμαλιών έχει συσχετισθεί με τη μειωμένη ποιότητα και γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Η παρούσα μελέτη έδειξε ότι υπάρχει μια τάση συσσώρευσης μεταλλάξεων σε άτομα που παρουσιάζουν παθολογικό φαινότυπο σπέρματος, ενώ εντοπίστηκαν νέες μιτοχονδριακές μεταλλάξεις που μπορούν να συσχετισθούν με την εμφάνιση της υπογονιμότητας. Για το λόγο αυτό η διερεύνηση των γενετικών ανωμαλιών του μιτοχονδριακού DNA είναι σημαντική και μπορεί να συμβάλλει στην διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας. Άλλωστε, όσο πιο ακριβής και συγκεκριμένη είναι η διάγνωση ενός υπογόνιμου ζευγαριού, τόσο πιο ειδική και αποτελεσματική είναι η θεραπεία που εφαρμόζεται αυξάνοντας έτσι την πιθανότητα επίτευξης κύησης.

Summary

It is common knowledge that, infertility affects the quality of life of many couples, having various economic, psychological and social implications. Approximately, one in six couples of reproductive age, is facing fertility problems. Recent studies show that the male factor contributes significantly to shaping the profile of an infertile couple. Fertility problems may be associated with a range of physical, genetic, environmental and other factors of unexplained etiology. One of the potential etiological factor of male infertility relates to the impairment of the energy reproduction mechanism in mitochondria. Mitochondrial are subcellular organelles serving as the energy centers of the cell. The proper mitochondrial function is necessary to cover a number of processes which are vital for the cell. Among them, is the process of spermatogenesis, differentiation and proper function of spermatozoa. Inability of energy production of mitochondria due to genetic abnormalities, has been associated with reduced sperm quality and fertilizing capacity. The current study has shown that there is a tendency to accumulate mutations in cases of abnormal sperm phenotype, while there have been identified new mitochondrial mutations that may be associated with the occurrence of infertility. For this reason, the investigation of genetic abnormalities of mitochondrial DNA is important and it can contribute to diagnose of male infertility. Besides, the more accurate and precise the diagnosis is, the more specific and effective treatment is applied, thereby increasing the likelihood of achieving pregnancy.

Περιεχόμενα

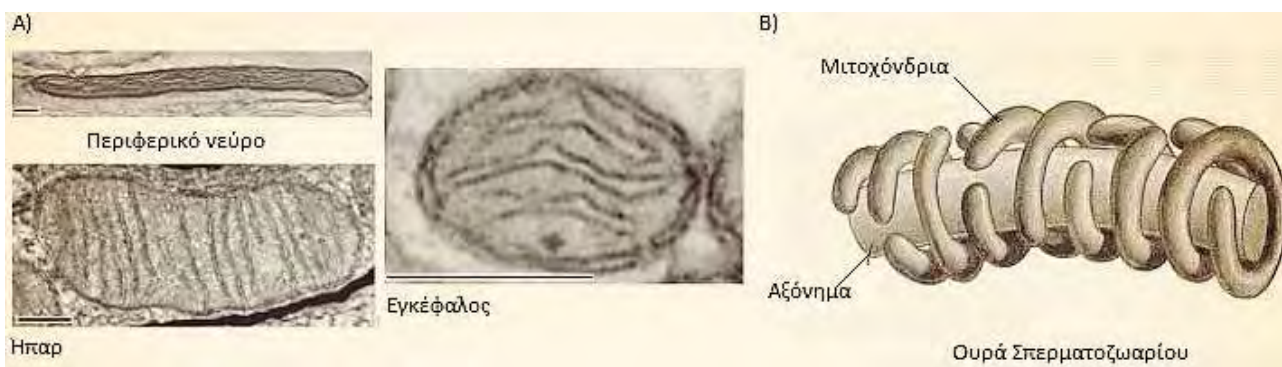
1. Δομή Μιτοχονδρίων.....	6
2. Δομή & Οργάνωση Μιτοχονδριακού DNA.....	7
3. Ιδιότητες Μιτοχονδριακού DNA	8
4. Λειτουργίες Μιτοχονδρίων	9
4.1. Παραγωγή Ενέργειας.....	9
4.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS).....	10
4.3. Απόπτωση.....	11
5. Μιτοχόνδρια στο πέρασμα της εξέλιξης.....	11
6. Ασυμβατότητα πυρήνα-μιτοχονδρίου	13
7. Μιτοχονδριακές ασθένειες	13
7.1. Μιτοχονδριακά Ελλείμματα	14
7.2. Σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA και rRNA	14
7.3. Σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας	15
7.4. Πυρηνικές μεταλλάξεις που προκαλούν δευτερογενώς μιτοχονδριακές ασθένειες.	16
7.5. Μιτοχόνδρια και ανδρική υπογονιμότητα	16
8. Σπερματογένεση	18
9. Δομή Σπερματοζωαρίου.....	20
10. Αλληλεπίδραση Σπερματοζωαρίου-ωοκυττάρου.....	21
10.1. Ενεργοποίηση.....	21
10.2. Ακροσωμική αντίδραση.....	22
10.3. Αναγνώριση & Σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωοκυττάρου	22
11. Ανδρική υπογονιμότητα	23
12. Διάγνωση Υπογονιμότητας.....	24
12.1. Ανάλυση Σπέρματος	24
12.2. Λειτουργικές Δοκιμές	24
13. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας	27
13.1. Γενετικοί Παράγοντες.....	27
13.2. Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες	27
13.3. Μικροελλείμματα στο Y χρωμόσωμα	27
13.4. Γονιδιακές Διαταραχές	28
13.5. Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες.....	29
13.6. Μολύνσεις ουρογεννητικού συστήματος	29
13.7. Ενδοκρινολογικές Διαταραχές	29
13.8. Υπερθερμία όσχεου.....	30
13.9. Ανοσοβιολογικοί Παράγοντες.....	30
14. Θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας	30
14.1. Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF).....	30
14.2. Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI)	31
Σκοπός	32
ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ	33
1. Βιολογικό υλικό.....	34
2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	36
2.1.Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα.....	36
2.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα.....	37
3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων.....	37

3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο	37
3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη	37
4. Ποσοτικός Προσδιορισμός του DNA	38
4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου	38
4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	38
5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	39
6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	41
7. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)	43
7.1. Αποδιάταξη των προϊόντων της PCR	44
7.2. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης	44
7.3. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο	44
8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών	45
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
1. PCR ενίσχυση επιλεγμένων μιτοχονδριακών γενετικών τόπων	47
2. Έλεγχος πολυμορφισμού εντός των επιλεγμένων μιτοχονδριακών γενετικών τόπων	48
3. Αλληλούχηση επιλεγμένων γονιδιακών τμημάτων	52
5. Συζήτηση	67
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69

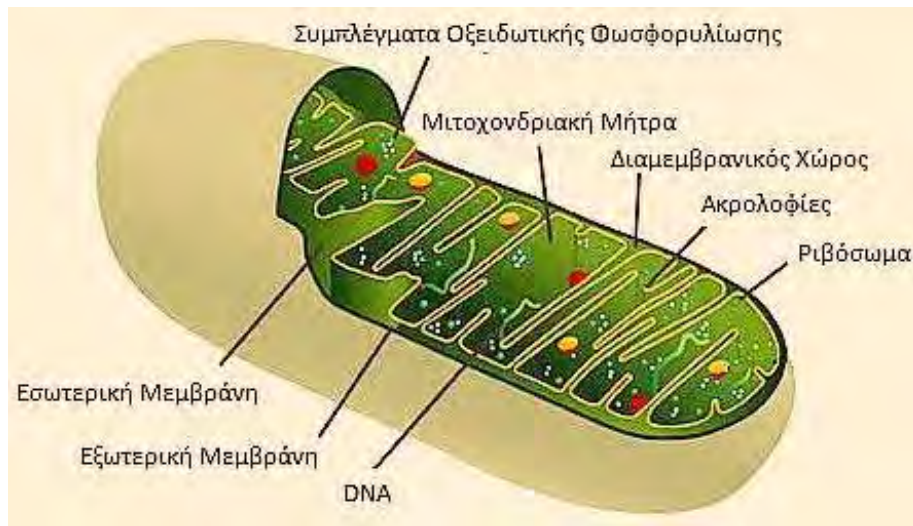
1. Δομή Μιτοχονδρίων

Τα μιτοχόνδρια είναι ημιαυτόνομα οργανίδια τα οποία απαντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα εκτός από τα ώριμα ερυθροκύτταρα και κάποια πρωτόζωα (Cummins, 1998). Τα οργανίδια αυτά αποτελούν συνήθως το 15-22% του συνολικού κυτταροπλασματικού όγκου, ενώ ο αριθμός τους ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων (Μαργαρίτης, 2008). Έτσι σε ένα ηπατικό κύτταρο απαντώνται περί τα 1.700 μιτοχόνδρια ενώ στο ωκύτταρο των αμφιβίων ο αριθμός τους φτάνει τα 10.000.000 (Μαργαρίτης, 2008). Το σχήμα τους δεν είναι σταθερό (κυκλικό, ελλειψοειδές, κυλινδρικό, επίμηκες), ενώ οι διαστάσεις τους είναι 0,3-1μm σε διάμετρο και 1-10μm σε μήκος (Meinhardt et al. 1999, Μαργαρίτης, 2008). Το σχήμα και το μέγεθος τους φαίνεται να εξαρτώνται από τις λειτουργικές ανάγκες του κυττάρου. Για παράδειγμα στο αξόνημα των μαστιγίων των σπερματοζωαρίων, τα μιτοχόνδρια έχουν κυλινδρική μορφή (Εικόνα 1.Β). Όπως έχει βρεθεί με ανοσοφθορισμό, η κατανομή των μιτοχονδρίων μέσα στα κύτταρα ακολουθεί σε πολλές περιπτώσεις την κατανομή των μικροσωληνίσκων, ενώ με παρατήρηση σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων έχει διαπιστωθεί διαρκής κίνηση και αλλαγή του σχήματός τους (Μαργαρίτης, 2008) (Εικόνα 1.Α).

Η δομή των μιτοχονδρίων είναι χαρακτηριστική (Εικόνα 2). Αποτελούνται από μια εξωτερική μεμβράνη και μια εσωτερική που σχηματίζει πολυάριθμες πτυχώσεις, τις ακρολοφίες. Οι δυο μεμβράνες έχουν διαφορετική σύσταση σε λιπίδια και πρωτεΐνες: η εξωτερική περιέχει 52% λιπίδια και 48% πρωτεΐνες, ενώ η εσωτερική περιέχει 24% λιπίδια και 76% πρωτεΐνες. Η εξωτερική μεμβράνη, παρουσιάζει κρυσταλλική κατανομή των συστατικών της, ενώ η εσωτερική περικλείει μια κοκκιώδη περιοχή, τη μιτοχονδριακή μήτρα. Μεταξύ των δύο μεμβρανών σχηματίζεται ένα διαμέρισμα, ο διαμεμβρανικός χώρος (Μαργαρίτης, 2008). Η εξωτερική μεμβράνη θεωρείται διαπερατή στα περισσότερα μικρά μόρια ($MB < 10,000$ Dalton) και ιόντα καθώς φέρει πρωτεΐνες, τις πορίνες που σχηματίζουν υδρόφιλους διαύλους (Μαργαρίτης, 2008, Stryer, 2007). Αντιθέτως, η εσωτερική μεμβράνη είναι σχετικά αδιαπέραστη από πολικά μόρια για αυτό μια μεγάλη οικογένεια μεταφορέων προάγει τη μετατόπιση μορίων όπως η ATP, το πυροσταφυλικό και το κιτρικό διαμέσου της μεμβράνης (Stryer, 2007). Επίσης, στην εσωτερική μεμβράνη έχουν εντοπισθεί αρκετά ένζυμα του κύκλου του Krebs, της αναπνευστικής αλυσίδας και της σύνθεσης ATP. Τέλος, όσον αφορά τη μιτοχονδριακή μήτρα, φέρει το γενετικό υλικό, τα ριβοσώματα που επιτελούν τη σύνθεση ορισμένων μιτοχονδριακών πρωτεϊνών καθώς και μια ποικιλία ενζύμων που συμμετέχουν στον κύκλο του Krebs και στην οξείδωση των λιπαρών οξέων (Cummins, 1998, Μαργαρίτης, 2008).



Εικόνα 1. Α) Ηλεκτρονιογραφία μιτοχονδρίων από διάφορους ιστούς. Επισημαίνεται η ετερογένεια του σχήματος των μιτοχονδρίων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο που απαντώνται. Β) Διαγραμματική απεικόνιση της μορφής των μιτοχονδρίων που περιβάλλουν το αξόνημα των μαστιγίων στην ουρά των σπερματοζωαρίων.



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση της δομής του μιτοχονδρίου

2. Δομή & Οργάνωση Μιτοχονδριακού DNA

Στον άνθρωπο, τα περισσότερα σωματικά κύτταρα φέρουν 10^3 - 10^4 αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA, ενώ ο αριθμός τους στα ώριμα ωκύτταρα ανέρχεται στα 10^5 μόρια περίπου (Cummins, 1998). Ο αριθμός των αντιγράφων ποικίλει μεταξύ των διαφορετικών κυτταρικών τύπων και υποδηλώνει τις διαφορετικές ενεργειακές απαιτήσεις του καθενός (Taylor et al. 2005). Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ένα δίκλωνο, κυκλικό μόριο DNA με μέγεθος 16569 bp (Shoffner et al. 1992, Clayton et al. 2000, St. John et al. 2000) (Εικόνα 3). Οι δύο αλυσίδες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος μπορούν να διαχωριστούν με βάση τη διαφορετική ανωτική πυκνότητα η οποία αντανακλά τη διαφορετική νουκλεοτιδική τους σύσταση. Έτσι η βαριά αλυσίδα (H-strand) έχει υψηλότερο ποσοστό σε γουανίνη και κυτοσίνη από ότι η ελαφριά αλυσίδα (L-strand) (Cummins, 1998).

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα φέρει 37 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν για 13 πολυπεπτίδια της αναπνευστικής αλυσίδας, δυο ριβοσωμικά μόρια rRNAs (12S και 16S) και 22 μόρια tRNAs. Τα 13 πολυπεπτίδια είναι θεμελιώδη δομικά και λειτουργικά συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας (Anderson et al. 1981, 1982). Επτά από αυτά είναι υπομονάδες του συμπλόκου I (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 και ND6), ένα του συμπλόκου III (Cytb), τρία του συμπλόκου IV (COXI, COXII και COXIII) και δύο του συμπλόκου V (ATP6 και ATP8) (Anderson et al. 1981, 1982). Τα 22 tRNAs και τα δύο rRNAs συμμετέχουν στη συγκρότηση της πρωτεϊνοσυνθετικής μηχανής των μιτοχονδρίων (Lodish et al. 1995, Shadel and Clayton. 1997). Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που απαιτούνται για τη σύσταση και τη σωστή λειτουργία του μιτοχονδρίου κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και μεταφέρονται στο οργανίδιο μέσω ειδικών αλληλουχιών στόχευσης για εισαγωγή στα μιτοχόνδρια (Mokranjac et al. 2005).

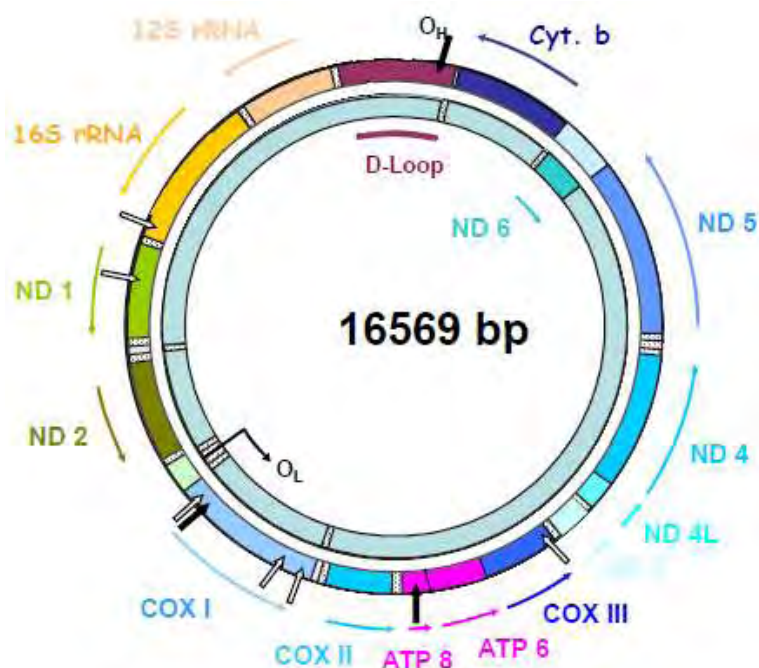
Όσον αφορά την οργάνωσή του, το μιτοχονδριακό DNA είναι ιδιαίτερα συμπυκνωμένο, καθώς τα γονίδια του δε φέρουν ιντρόνια και μεταξύ των γονιδίων υπάρχουν ελάχιστες μη κωδικές περιοχές (Anderson et al. 1981). Επίσης, στις περισσότερες περιπτώσεις τα κωδικόνια λήξης δημιουργούνται μετα-μεταγραφικά μέσω πολυαδενυλίωσης (Ojala et al. 1981), ενώ αρκετά γονίδια του, όπως τα ATP8, ATP6 και ND4-ND4L αλληλεπικαλύπτονται (Anderson et al. 1981). Η κύρια μη κωδική περιοχή του γονιδιώματος είναι η D-loop (displacement loop) η οποία εμφανίζει τριμερή διαμόρφωση και έχει μέγεθος 1.1 kb. Η περιοχή αυτή είναι υπερμεταβλητή και ασταθής ως προς την αλληλουχία της αλλά παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τη λειτουργία της καθώς περιλαμβάνει ρυθμιστικά στοιχεία τα οποία είναι σημαντικά για την αντιγραφή και

μεταγραφή του μιτοχονδριακού DNA (Cummins, 1998). Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει υποκινητές για τη μεταγραφή των γονιδίων που βρίσκονται και στις δύο αλυσίδες ενώ φέρει την περιοχή έναρξης της αντιγραφής για τη βαριά αλυσίδα (O_H). Η θέση έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (O_L) εντοπίζεται σε μια δεύτερη μη κωδική περιοχή μικρότερης έκτασης. Τέλος, ακόμα ένα χαρακτηριστικό της οργάνωσης του μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι η έλλειψη προστατευτικών ιστονών και πρωτεϊνών που συνδέονται στο DNA (Shoffner et al. 1993). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την έλλειψη επαρκούς επιδιορθωτικού μηχανισμού οδηγούν στην πρόκληση μεταλλάξεων με αποτέλεσμα το μιτοχονδριακό DNA να έχει υψηλότερο ρυθμό μεταλλακτικότητας σε σχέση με το πυρηνικό (Pesole et al. 1999).

3. Ιδιότητες Μιτοχονδριακού DNA

Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εμφανίζει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά συγκριτικά με το πυρηνικό γονιδίωμα. Ορισμένα από τα βασικά σημεία διαφοροποίησης των δυο γονιδιωμάτων παρουσιάζονται παρακάτω:

- Μητρικό πρότυπο κληρονομής. Το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δεν ακολουθεί το μενδελικό τρόπο κληρονομής, καθώς μεταβιβάζεται στην επόμενη γενιά μόνο μέσω του ωαρίου (Justin C. St John, 2012).
- Ετεροπλασμία. Φαινόμενο κατά το οποίο τα κύτταρα φέρουν ένα μείγμα μεταλλαγμένων και φυσιολογικών μιτοχονδρίων (Russell, 2009).
- Αντιγραφή ανεξάρτητη από τον κυτταρικό κύκλο. Η αντιγραφή του μιτοχονδριακού DNA δεν περιορίζεται στη φάση S, κατά την οποία αντιγράφεται το πυρηνικό DNA, αλλά συμβαίνει σε όλη τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου (Russell, 2009).
- Διαφορετικός γενετικός κώδικας. Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας αποκλίνει από τον πυρηνικό, καθώς περιλαμβάνει 60 κωδικόνια και τέσσερα κωδικόνια λήξης τα UAA, UAG, AGA και AGG. Σύμφωνα με τον τυπικό γενετικό κώδικα, το UGA είναι κωδικόνιο τερματισμού αλλά στα μιτοχόνδρια κωδικοποιεί για το αμινοξύ τρυπτοφάνη (Cummins, 1998).



Εικόνα 3. Χάρτης της γονιδιακής οργάνωσης του ανθρώπινου mtDNA. Η περίμετρος αντιπροσωπεύει το σχετικό μέγεθος του αντίστοιχου μιτοχονδριακού γονιδιώματος (16.569 bp), ενώ δείχνονται οι θέσεις των γονιδίων ριβοσωμικού RNA (rRNA), του κυτοχρώματος b, της κυτοχρωμικής οξειδάσης (υπομονάδες COX I, COX II, COX III), της ATP συνθάσης (ATP 6, ATP 8) καθώς και της NADH αφυδρογονάσης (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND4, ND5, ND6).

Επίσης, απεικονίζεται η περιοχή D-loop, εντός της οποίας βρίσκεται η θέση έναρξης της αντιγραφής της βαριάς (O_H), η θέση έναρξης της αντιγραφής της ελαφριάς αλυσίδας (O_L) καθώς και η κατεύθυνση της μεταγραφής των γονιδίων.

4. Λειτουργίες Μιτοχονδρίων

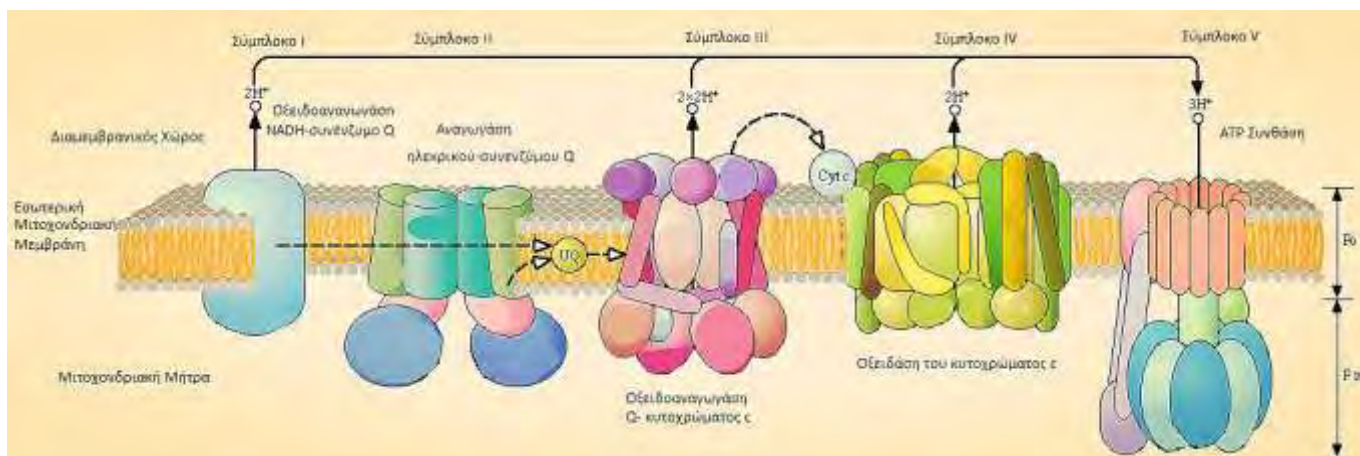
4.1. Παραγωγή Ενέργειας

Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά οργανίδια, υπεύθυνα για την παραγωγή του μεγαλύτερου ποσοστού ενέργειας στο κύτταρο μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (van der Giezen et al. 2005). Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποτελεί το επιστέγασμα μιας σειράς ενεργειακών μετασχηματισμών οι οποίοι ονομάζονται στο σύνολό τους κυτταρική αναπνοή. Αρχικά, καύσιμα οργανικά μόρια οξειδώνονται στον κύκλο του κιτρικού οξέος για να προκύψουν ηλεκτρόνια με υψηλό δυναμικό μεταφοράς. Στη συνέχεια αυτή η ηλεκτονιοκινητή δύναμη μετατρέπεται σε πρωτονιοκινητή δύναμη και η τελευταία με τη σειρά της σε δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκινητής δύναμης σε πρωτονιοκινητή δύναμη επιτελείται από τρεις αντλίες πρωτονίων. Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από τη συνθάση της ATP, ένα σύμπλοκο μορίων που συνθέτει ATP. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση αποκαλύπτει ότι οι βαθμιδώσεις συγκέντρωσης πρωτονίων είναι το μετατρέψιμο νόμισμα ελεύθερης ενέργειας στα βιολογικά συστήματα (Stryer, 2007) (Εικόνα 4).

Τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παρουσιάζονται παρακάτω (Gray et al. 2013, Stryer, 2007):

- Η οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH - συνενζύμου Q (σύμπλοκο I) είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 45 υπομονάδες. Η σύσταση αυτής της αντλίας πρωτονίων, όπως άλλωστε και των άλλων δυο της αναπνευστικής αλυσίδας, είναι συνέργεια γονιδίων που βρίσκονται τόσο στον πυρήνα όσο και στα μιτοχόνδρια. Έτσι επτά υπομονάδες κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 και ND6). Το σύμπλοκο αυτό φέρει μια προσθετική ομάδα φλαβινομονονουκλεοτιδίου (FMN) και μια σειρά από σύμπλοκα σιδήρου-θείου, τα οποία συμμετέχουν στη μεταφορά ενός ζεύγους ηλεκτρονίων από το NADH στο συνένζυμο Q. Το NADH οξειδώνεται σε NAD^+ ενώ το συνένζυμο Q ανάγεται σε QH_2 με την ταυτόχρονη άντληση δυο πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα.
- Το σύμπλοκο της αναγωγής του ζεύγους ηλεκτρικού - Q (σύμπλοκο II), έχει μάζα 140 kd και αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες οι οποίες κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα. Επίσης φέρει μια προσθετική ομάδα FAD και κέντρα σιδήρου-θείου μέσω των οποίων μεταφέρονται ηλεκτρόνια από το $FADH_2$ στο συνένζυμο Q. Ωστόσο, το σύμπλοκο αυτό δεν αντλεί πρωτόνια από τη μιτοχονδριακή μήτρα.
- Η δεύτερη από τις τρεις αντλίες πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c (σύμπλοκο III). Το ένζυμο είναι διμερές και κάθε μονομερές αποτελείται από 10 υπομονάδες, μία εκ' των οποίων κωδικοποιείται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Cytb). Επιπλέον, το σύμπλοκο περιέχει τρία μόρια αίμης (b_H , b_L , c_1) και μια πρωτεΐνη σιδήρου-θείου με ένα κέντρο 2Fe-2S. Η λειτουργία της οξειδοαναγωγής του ζεύγους Q-κυτοχρώματος c είναι η μεταφορά ηλεκτρονίων από την ουβικινόλη (QH_2) προς το οξειδωμένο κυτόχρωμα c. Ταυτόχρονα γίνεται άντληση πρωτονίων από τη μιτοχονδριακή μήτρα προς τον διαμεμβρανικό χώρο.
- Το τελικό στάδιο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι η οξείδωση του ανηγμένου κυτοχρώματος c που έχει παραχθεί από το σύμπλοκο III. Η διαδικασία αυτή είναι συζευγμένη με την αναγωγή του οξυγόνου σε δυο μόρια νερού. Η αντίδραση καταλύεται από την οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV). Όσον αφορά τη δομή του ενζύμου, αποτελείται από 19 υπομονάδες εκ' των οποίων οι τρεις (COI, COII, COIII) κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό DNA. Επίσης περιέχει δυο ομάδες αίμης (a , a_3) και τρία ιόντα χαλκού.

- Η σύνθεση της ATP πραγματοποιείται από ένα μοριακό συγκρότημα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Πρόκειται για τη συνθάση της ATP (σύμπλοκο V) ή F_1F_0 ATPάση, το οποίο αποτελείται από 19 υπομονάδες, από τις οποίες οι δύο (ATP8, ATP6) κωδικοποιούνται από το μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Η μεταφορά ηλεκτρονίων για τη σύνθεση ATP είναι συζευγμένη με τη βαθμίδωση συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δυο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Έτσι η F_1F_0 ATPάση χρησιμοποιεί τη διαβάθμιση πρωτονίων για τη σύνθεση ATP.



Εικόνα 4. Διαγραμματική απεικόνιση των συμπλόκων της αναπνευστικής αλυσίδας

4.2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS)

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν την κύρια πηγή ελευθέρων ριζών (ROS) (Kowaltowski et al. 2009). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ως παραπροϊόντα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης λόγω της ατελούς αναγωγής του μοριακού οξυγόνου (Kuznetsov et al. 2011, Fogg et al. 2011). Αποτελούν ενεργά παράγωγα του οξυγόνου τα οποία φέρουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Εξαιτίας της εξαιρετικά ασταθούς φύσης τους, οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με άλλα μόρια όπως λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα προκαλώντας βλάβες σε αυτά (Venkatesh et al. 2009).

Εκτιμάται ότι υπό φυσιολογικές συνθήκες, το 1-2% του μοριακού οξυγόνου των μιτοχονδρίων μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες (Ott et al. 2007). Λόγω της οργάνωσης του και της έλλειψης επιδιορθωτικού μηχανισμού, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι ιδιαίτερα ευάλωτο σε μεταλλάξεις που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες (Fogg et al. 2011). Έτσι λοιπόν, μεταλλάξεις στα γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης μπορούν να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία του μηχανισμού παραγωγής ενέργειας με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Άμεση συνέπεια είναι η έναρξη ενός φαύλου κύκλου παραγωγής ελευθέρων ριζών -πρόκλησης μεταλλάξεων (Linnane et al. 1989). Η αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών θεωρείται ένας από τους κύριους αιτιολογικούς παράγοντες πολλών παθολογικών καταστάσεων όπως είναι οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες, ο καρκίνος και η γήρανση (Kirkinetzosa and Moraesa, 2001). Παρόλα αυτά, έχει αποδειχθεί ότι οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να δράσουν ως σηματοδοτικά μόρια σε πολλές κυτταρικές διεργασίες, όπως ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η επαγωγή της απόπτωσης (Weinberg et al. 2009, Fruehauf et al. 2007, Fogg et al. 2009).

4.3. Απόπτωση

Ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος ή απόπτωση συνιστά μια γενετικά καθορισμένη και ενεργητική διαδικασία, που συμμετέχει καταλυτικά στην ομαλή ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων του οργανισμού (Μαργαρίτης, 2008). Τα μιτοχόνδρια έχουν κύριο ρόλο στην επαγωγή του εσωτερικού μονοπατιού της απόπτωσης. Το μονοπάτι αυτό μπορεί να επαχθεί από ενδοκυτταρικά σήματα όπως το κυτταρικό στρες, οι καταστροφές σε βιομόρια (κατακερματισμός του DNA), η έλλειψη αυξητικών παραγόντων και η παρουσία ελευθέρων ριζών. Μέσω του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου ο οργανισμός εξασφαλίζει ότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβες θα απομακρυνθούν προτού προκαλέσουν επιπλέον προβλήματα. Ωστόσο, εκτός από το εσωτερικό σήμα της απόπτωσης που επάγεται από τα μιτοχόνδρια υπάρχει και ένα εξωκυτταρικό μονοπάτι το οποίο πυροδοτείται από τη σύνδεση σηματοδοτικών μορίων επαγωγής της απόπτωσης στους αντίστοιχους υποδοχείς "θανάτου". Το εσωτερικό και το εξωκυτταρικό μονοπάτι της απόπτωσης διασταυρώνονται, οδηγώντας στην ενεργοποίηση των κασπασών, πρωτεάσες οι οποίες αποτελούν τους κύριους τελεστές της απόπτωσης (Fogg et al. 2011).

Όσον αφορά το εσωτερικό μονοπάτι της κυτταρικής απόπτωσης σηματοδοτείται από την αποσταθεροποίηση της εξωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος c καθώς και άλλων αποπτωτικών πρωτεϊνών (SMAC/Diablo, AIF) στο κυτοσόλιο. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c αποτελεί καθοριστικό βήμα στην επαγωγή των κασπασών και στην καταστολή της λειτουργίας των μιτοχονδρίων (Fogg et al. 2011). Η διαδικασία της απόπτωσης συνοδεύεται από χαρακτηριστικές αλλαγές στη μορφολογία του κυττάρου, όπως η εμφάνιση χαρακτηριστικών προεξοχών στην κυτταρική μεμβράνη, η συμπύκνωση της χρωματίνης, η αποδιάταξη του DNA, η διάσπαση του πυρήνα και αποσυναρμολόγησή του μέσα σε αποπτωτικά κυστίδια (Thompson et al. 1992).

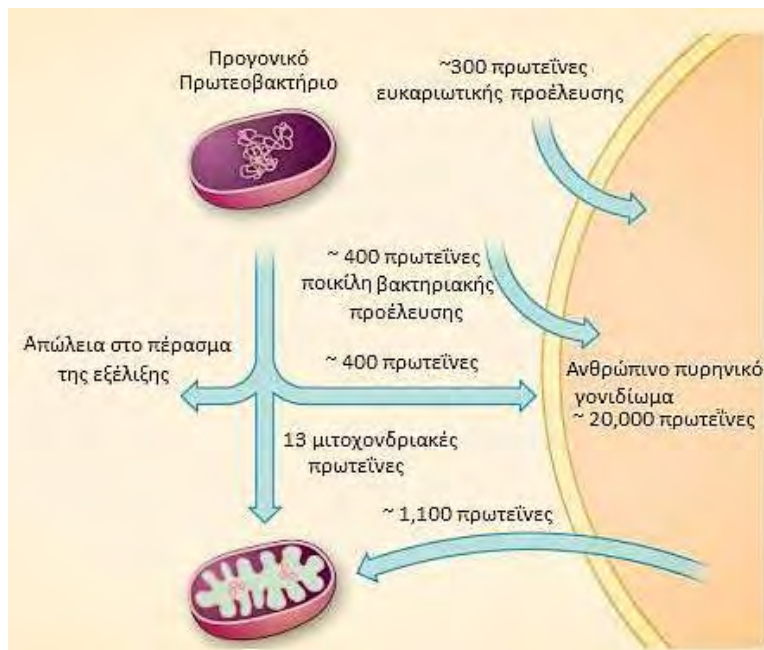
5. Μιτοχόνδρια στο πέρασμα της εξέλιξης

Σύμφωνα με τη θεωρία της ενδοσυμβίωσης, τα μιτοχόνδρια προήλθαν από ελεύθερα α-πρωτεοβακτήρια τα οποία ανέπτυξαν μια αμοιβαία ωφέλιμη σχέση με πρωτόγονα ευκαρυωτικά κύτταρα πριν από 2 δισεκατομμύρια χρόνια (Margulis, 1970). Ουσιαστικά τα προγονικά ευκαρυωτικά κύτταρα "εκμεταλλεύτηκαν" την ικανότητα των μιτοχονδρίων για αερόβιο μεταβολισμό γεγονός που τους επέτρεψε να αναπτυχθούν παρά τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις του τοξικού για τους αναερόβιους οργανισμούς οξυγόνου (Cummins, 1998). Καταλυτική σημασία για την παγίωση της υπόθεσης της συμβίωσης έχει η συνεχής συσσώρευση ενδείξεων για την παρουσία πολλών κοινών γνωρισμάτων ανάμεσα σε μιτοχόνδρια και αερόβια βακτήρια (Stryer, 2007). Για παράδειγμα, το μιτοχόνδριο αποτελείται από δύο μεμβράνες, όπου η εσωτερική έχει δομή παρόμοια με αυτήν των βακτηρίων ενώ η εξωτερική (μιτοχονδριακή) πιθανώς προέρχεται από τη μεμβράνη του φαγοσώματος του κυττάρου ξενιστή (Cummins, 1998). Ακόμα, η συγκριτική ανάλυση των πρωτεϊνών και των νουκλεϊκών οξέων, της δομής του DNA, των ριβοσωμάτων όπως και των βασικών μηχανισμών αντιγραφής, μεταγραφής και μετάφρασης αποτελούν στοιχεία που θυμίζουν περισσότερο προκαρυωτικούς παρά ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Μαργαρίτης, 2008). Η εξέταση του μιτοχονδριακού γονιδιώματος αποκαλύπτει ότι τα σημερινά μιτοχόνδρια προέρχονται από ένα και μόνο γεγονός ενδοσυμβίωσης. Το ίδιο όμως δεν ισχύει και για το μιτοχονδριακό προτέωμα. Έτσι, δεδομένα από την ανάλυση του, έδειξαν ότι από τις 1.100 γνωστές μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, τα 2/3 περίπου είναι ποικίλης βακτηριακής προέλευσης ενώ οι υπόλοιπες έχουν ευκαρυωτική καταγωγή (Pagliarini et al. 2008) (Εικόνα 5).

Γονιδιωματικές μελέτες, έδειξαν ότι στο πλαίσιο των ενδοσυμβιωτικών σχέσεων, παρατηρείται μια

μείωση στο μέγεθος του γονιδιώματος του ενδοσυμβιώτη και σταδιακή απώλεια των γονιδίων του συγκριτικά με την αυτόνομη διαβίωσή του. Η απώλεια αυτή μπορεί να χαρακτηρίζεται από την πλήρη απομάκρυνση γονιδίων του ενδοσυμβιώτη ή μπορεί να συνοδεύεται από αντικατάσταση του ενδοσυμβιωτικού γονιδίου από ένα γονίδιο του ξενιστή το οποίο έχει παρόμοια λειτουργία (Adams and Palmer, 2003). Ωστόσο η επικρατέστερη άποψη, είναι εκείνη της "λειτουργικής μεταφοράς" (Brandvain et al. 2008). Σύμφωνα με αυτή, η συνεξελικτική διεργασία οδήγησε πολλά μιτοχονδριακά γονίδια στον πυρήνα, επειδή εξασφαλίστηκε καλύτερα η πιστότητα της αντιγραφής τους κατά τη μίτωση-με τα δυο αντίγραφα να διπλασιάζονται πιο αποτελεσματικά σε σχέση με χιλιάδες που θα υπήρχαν στα μιτοχονδριακά-ενώ υποβαθμίζεται και η αντιπαράθεση του πυρηνικού με το κυτταροπλασματικό γονιδίωμα (Αλαχιώτης 2007, Cummins, 1998). Μια εναλλακτική εξήγηση στηρίζει ότι η απώλεια των μιτοχονδριακών γονιδίων αποτελεί μια διαδικασία προσαρμογής (Brandvain et al. 2008). Έτσι λοιπόν, η μετακίνηση των μιτοχονδριακών γονιδίων στον πυρήνα αποτέλεσε καθοριστικό βήμα ώστε να σταθεροποιηθεί η μετάβαση από έναν αυτόνομο ενδοσυμβιώτη σε ένα εξαρτώμενο από τον ξενιστή μιτοχόνδριο (Lynch, 2007). Τα μιτοχόνδρια ωστόσο διατήρησαν ορισμένα γονιδιά τους, τα οποία διασφαλίζουν την εύρυθμη λειτουργία του "αιρετικού" ως ένα βαθμό γενετικού τους κώδικα (Αλαχιώτης, 2007).

Είναι γνωστό ότι, το μιτοχονδριακό γονιδίωμα χαρακτηρίζεται από υψηλό ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, καθώς συσσωρεύει 10-17 φορές περισσότερες νουκλεοτιδικές αντικαταστάσεις σε σχέση με το πυρηνικό (Wallace et al. 1997). Αυτός ο διαφορετικός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης είναι που υποκινεί την εξέλιξη του πυρηνικού DNA στα πλαίσια της ενδοσυμβίωσης (Blieher et al. 2001). Η επικοινωνία μεταξύ μιτοχονδριακού και πυρηνικού γονιδιώματος έχει διαμορφωθεί στο πέρασμα της εξέλιξης έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων η οποία είναι απαραίτητη για την επιβίωση των οργανισμών (Yaacov et al. 2011). Υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν την συνεξέλιξη των δυο γονιδιωμάτων (Yaacov et al. 2011). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πυρηνικών και μιτοχονδριακών πρωτεϊνών για τη σύσταση των συμπλεγμάτων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Ακόμα, τα ένζυμα τα οποία είναι απαραίτητα για την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφραση του μιτοχονδριακού DNA κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, ενώ πρωτεΐνες πυρηνικής προέλευσης συμμετέχουν στη δημιουργία των μιτοχονδριακών ριβοσωμάτων. Ωστόσο, όταν η επικοινωνία μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων διαταραχθεί μπορεί να οδηγήσει σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, στην εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται άμεσα με τη λειτουργία τους και στη δημιουργία αναπαραγωγικών φραγμών (Yaacov et al. 2011).



Εικόνα 5. Το ανθρώπινο μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί για 13 πρωτεΐνες οι οποίες φαίνεται να είναι κατάλοιπα του πρωτεύοντος των πρωτοβακτηρίων. Το πυρηνικό γονιδίωμα κωδικοποιεί για 1.100 μιτοχονδριακές πρωτεΐνες, από τις οποίες οι 400 έχουν προέλευση από τα πρωτοβακτήρια του γένους *Rickettsia prowazekii* ενώ οι υπόλοιπες χάθηκαν κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Ωστόσο, το σύνολο των 1,100 μιτοχονδριακών πρωτεϊνών φαίνεται να ολοκληρώνεται με 400 πρωτεΐνες που προέρχονται από άλλα βακτηριακά είδη ενώ 300 είναι ευκαρυωτικής καταγωγής.

6. Ασυμβατότητα πυρήνα-μιτοχονδρίου

Όπως αναφέρθηκε, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πυρηνικού και μιτοχονδριακού γονιδιώματος είναι ζωτικής σημασίας για τη σωστή λειτουργία του κυττάρου. Πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι η ασυμβατότητα μεταξύ των δυο γονιδιωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ανάπτυξη και αρμοστικότητα στη *Drosophila*. Συγκεκριμένα, στη *Drosophila Melanogaster* μελετήθηκε ένας αμινοξικός πολυμορφισμός σε μια κωδικοποιούμενη από τον πυρήνα συνθετάση του tRNA της τυροσίνης η οποία αλληλεπιδρά επιστατικά με έναν αμινοξικό πολυμορφισμό του κωδικοποιούμενου από το μιτοχόνδριο tRNA της τυροσίνης στη *Drosophila Simulans*. Μετά από τη δημιουργία των υβριδικών σειρών, βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί αυτοί δρουν συνεργειακά, επηρεάζοντας δραματικά την ανάπτυξη, τη μεταμόρφωση και τη γονιμότητα του εντόμου. Η ασυμβατότητα μεταξύ των δύο γονιδιωμάτων έγκειται στην αδυναμία αλληλεπίδρασης μεταξύ του tRNA και της αντίστοιχης tRNA συνθετάσης με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία του μεταφραστικού μηχανισμού των μιτοχονδρίων. Άμεση συνέπεια αυτής της δυσλειτουργίας είναι η μειωμένη απόδοση του μηχανισμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας επισημαίνουν τη σπουδαιότητα της αλληλεπίδρασης μεταξύ πυρήνα και μιτοχονδρίου και θέτουν τα θεμέλια για την κατανόηση της μοριακής βάσης των ανθρώπινων μιτοχονδριακών ασθενειών (Meiklejohn et al. 2013).

7. Μιτοχονδριακές ασθένειες

Ο όρος “μιτοχονδριακές ασθένειες” αναφέρεται σε μια μεγάλη και ετερογενή ομάδα γενετικών νοσημάτων, τα οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA ή

δευτερογενώς του πυρηνικού γονιδιώματος (Chinnery, 2010). Ασθένειες που προκαλούνται από μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα αναφέρθηκαν για πρώτη φορά το 1988 και από τότε έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 300 παθογόνες μεταλλάξεις (Wallace et al. 1988, Holt et al. 1998, Ruiz-Pesini et al. 2007). Οι μιτοχονδριακές ασθένειες έχουν έναν ιδιαίτερα μεταβλητό φαινότυπο και μπορούν να εμφανιστούν σε κάθε ηλικία (McFarland et al. 2010). Η χρόνια αδυναμία παραγωγής ενέργειας σε επίπεδο κυττάρου φαίνεται να είναι ο κύριος λόγος που προκαλεί την εμφάνιση των μιτοχονδριακών ασθενειών. Τα κύτταρα που δε μπορούν να παράξουν αρκετή ενέργεια μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, παράγουν ATP μέσω της μετατροπής του πυροσταφυλικού σε γαλακτικό οξύ, γεγονός που οδηγεί σε γαλακτική οξείδωση. Η αδυναμία κάλυψης των ενεργειακών απαιτήσεων οδηγεί σε πολυσυστημικές διαταραχές οι οποίες παρατηρούνται σε κλινικό επίπεδο. Τα κλινικά χαρακτηριστικά, συνήθως εμφανίζονται σε ιστούς που απαιτούν την παραγωγή μεγάλων ποσών ενέργειας όπως είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, οι σκελετικοί μύες και η καρδιά. Παρόλα αυτά και άλλοι ιστοί μπορούν να επηρεασθούν, όπως τα β κύτταρα του παγκρέατος οδηγώντας στην εμφάνιση διαβήτη, τα τριχωτά κύτταρα του κοιλιακού οδηγώντας σε κώφωση ή τα κύτταρα των νεφρικών σωληναρίων με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία των νεφρών (Greaves et al. 2012).

Ο ακριβής επιπολασμός των μιτοχονδριακών νοσημάτων είναι δύσκολο να προσδιορισθεί λόγω της κλινικής ετερογένειας και του αριθμού των παθογόνων μεταλλάξεων. Ωστόσο, θεωρείται ότι ένα στα 200 υγιή άτομα φέρει μια παθογόνο μιτοχονδριακή μετάλλαξη που ενδεχομένως προκαλεί ασθένεια στους απογόνους των θηλυκών φορέων (Greaves et al. 2012). Η πλειονότητα των ατόμων δε θα εκδηλώσει την νόσο καθώς η μιτοχονδριακή μετάλλαξη μπορεί να είναι παρούσα σε χαμηλά επίπεδα, λόγω του φαινομένου της ετεροπλασμίας (Bitner-Glindzic et al. 2009). Η αναλογία του μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA πρέπει να υπερβαίνει ένα κρίσιμο επίπεδο κατωφλίου πριν ένα κύτταρο εκφράσει μια βιοχημική ανωμαλία της αναπνευστικής αλυσίδας (Schon et al. 1997). Το ποσοστό του μεταλλαγμένου μιτοχονδριακού DNA μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ατόμων που ανήκουν στην ίδια οικογένεια, αλλά και μεταξύ των οργάνων και ιστών στο ίδιο το άτομο (Macmillan et al. 1993).

7.1. Μιτοχονδριακά Ελλείμματα

Οι περισσότερες αναδιατάξεις του μιτοχονδριακού DNA αφορούν μεγάλης κλίμακας ελλείμματα, όπου περισσότερα από 120 έχουν ταυτοποιηθεί και συσχετισθεί με την εκδήλωση ασθενειών (Ruiz-Pesini et al. 2007). Μεγάλο μέρος των μιτοχονδριακών ελλειμμάτων παρατηρείται σε περιοχές που περιβάλλονται από διαδοχικές επαναλήψεις και πιθανόν προκύπτουν κατά την προσπάθεια επιδιόρθωσης του μιτοχονδριακού DNA (Schon et al. 1989, Krishnan et al. 2008). Πολλά από τα μιτοχονδριακά ελλείμματα είναι σποραδικά και δε μεταβιβάζονται στην επόμενη γενιά. Τρεις κλινικοί φαινότυποι που έχουν συσχετισθεί με μιτοχονδριακά ελλείμματα είναι: το σύνδρομο Pearson το οποίο χαρακτηρίζεται κυρίως από ανθεκτική σιδηροβλαστική αναιμία και δυσλειτουργία της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος και το σύνδρομο Kearns-Sayre, ένα πολυσυστηματικό νόσημα χαρακτηριζόμενο από την πρόωρη έναρξη των συμπτωμάτων, την εξελισσόμενη εξωτερική οφθαλμοπληγία και την εκφυλιστική αμφιβληστροειδοπάθεια (Rotig et al. 1990, Zeviani et al. 1988).

7.2. Σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια tRNA και rRNA

Είναι γνωστό ότι ένας αριθμός μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA προκαλεί ανωμαλίες στα μεταφορικά και ριβοσωμικά μόρια RNA, τα οποία είναι μέρος του μηχανισμού σύνθεσης πρωτεϊνών στα μιτοχόνδρια. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε διατάραξη της φυσιολογικής σύνθεσης διάφορων

μιτοχονδριακών πρωτεϊνών προκαλώντας έτσι τη μείωση της σύνθεσης της ATP. Περισσότερο από το 50% των σημειακών μεταλλάξεων που σχετίζονται με ασθένειες έχει αναφερθεί ότι εντοπίζονται σε tRNA γονίδια παρόλο που τα γονίδια αυτά εκπροσωπούν το 5% του μιτοχονδριακού γονιδιώματος. Άτομα που είναι φορείς τέτοιων μεταλλάξεων υποφέρουν από σοβαρές ασθένειες που αφορούν το κεντρικό νευρικό σύστημα και τις μυϊκές ανωμαλίες (Greaves et al. 2012). Μια από τις πιο συχνές ασθένειες που προκαλούνται από σημειακές μιτοχονδριακές μεταλλάξεις είναι η νουκλεοτιδική αντικατάσταση A 3243 G στο γονίδιο του tRNA της λευκίνης (UUR). Η πιο συχνή εκδήλωση αυτής της μετάλλαξης είναι ο μητρικά κληρονομήσιμος διαβήτης και η κώφωση (van den Ouweland et al. 1992). Ωστόσο, άτομα που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη μπορεί να εκδηλώσουν ένα πιο σοβαρό σύνδρομο, τη μιτοχονδριακή εγκεφαλομυοπάθεια με γαλακτική οξέωση και επεισόδια παρόμοια με εκείνα του εγκεφαλικού (MELAS) (Goto et al. 1990). Μια δεύτερη συχνή μετάλλαξη που έχει συσχετισθεί με συγκεκριμένη νόσο είναι η A 8344 G, η οποία έχει εντοπισθεί στο γονίδιο του tRNA της λυσίνης. Τα άτομα που φέρουν αυτή τη μετάλλαξη πάσχουν από μυοκλωνική επιληψία σχετιζόμενη με ρακώδεις ίνες (MERRF) (Wallace et al. 1988).

7.3. Σημειακές μεταλλάξεις σε μιτοχονδριακά γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας

Σε αντίθεση με τις μεταλλάξεις των RNA γονιδίων που επηρεάζουν το σύνολο των πρωτεϊνών που συντίθενται στα μιτοχόνδρια, οι μεταλλάξεις των μιτοχονδριακών γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες επηρεάζουν ειδικά τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται ορισμένες από τις πιο συχνές ασθένειες που σχετίζονται με σημειακές μεταλλάξεις σε γονίδια της αναπνευστικής αλυσίδας (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων της αναπνευστικής αλυσίδας και η συσχέτισή τους με μιτοχονδριακά νοσήματα

Μιτοχονδριακές ασθένειες	Μετάλλαξη	Γονίδιο	Φαινότυπος	Αναφορά
LHON	m.3460 G→A m.11778 G→A m.14484 T→C	MT-ND1 MT-ND4 MT-ND6	Αμφοτερόπλευρη απώλεια της κεντρικής όρασης και οπτική ατροφία	Johns et al. 1992 Wallace et al. 1988
Leigh syndrome	m.8993 T→C	MT -ATP6	Δυστονία, επιληπτικές κρίσεις, αναπνευστική ανεπάρκεια	Shoffner et al. 1992
NARP	m.8993 T→G	MT-ATP6	Μελαγχρωματική αμφιβληστροειδοπάθεια	Holt et al. 1995
CPEO	m.11232 T→C	MT-ND4	Μυϊκή αδυναμία, εξωτερική οφθαλμοπληγία, επεισοδιακό κώμα & πρόωμο θάνατο	Pulkes et al. 2003

7.4. Πυρηνικές μεταλλάξεις που προκαλούν δευτερογενώς μιτοχονδριακές ασθένειες.

Υπολογίζεται ότι περίπου 1.500 πρωτεΐνες συνιστούν το μιτοχονδριακό πρωτέωμα. Καθώς το μιτοχονδριακό γονιδίωμα κωδικοποιεί μόνο για 13 πολυπεπτίδια, είναι πιθανό μεγάλο μέρος των μιτοχονδριακών ανωμαλιών να οφείλεται σε μεταλλάξεις των πυρηνικών γονιδίων. Ένας αριθμός πυρηνικών μεταλλάξεων λοιπόν ασκεί τη δράση του παρεμβαίνοντας στην εύρυθμη λειτουργία του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Calvo et al. 2010). Οι μεταλλάξεις αυτές μπορούν να εντοπισθούν σε γονίδια που ελέγχουν την έκφραση και διατήρηση του μιτοχονδριακού DNA. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι μεταλλάξεις που έχουν εντοπισθεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί για την πολυμεράση γ (POLG), η οποία επιτελεί την αντιγραφή και επιδιόρθωση του μιτοχονδριακού DNA αλλά και στην ελικάση του μιτοχονδριακού DNA (Twinkle) (Van Goethem et al. 2001, Spelbrink et al. 2001). Επιπλέον, σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται γονίδια που κωδικοποιούν για ριβοσωμικές πρωτεΐνες, αμινο-άκυλο tRNA συνθετάσες και tRNA τροποποιητικά ένζυμα. Ακόμα, μεταλλάξεις μπορούν να εντοπισθούν σε γονίδια που εμπλέκονται στη νουκλεοσιδική μεταφορά, διάσωση ή σύνθεση καθώς και σε γονίδια που είναι απαραίτητα για την ακεραιότητα των μεμβρανών (Greaves et al. 2012). Κοινό γνώρισμα των παραπάνω μεταλλάξεων είναι ότι ακολουθούν μεντελικό τρόπο κληρονομής (St. John et al. 2000).

7.5. Μιτοχόνδρια και ανδρική υπογονιμότητα

Αρκετές έρευνες υποστηρίζουν ότι τα μιτοχόνδρια παίζουν σημαντικό ρόλο στη φυσιολογική διεξαγωγή της σπερματογένεσης, της διαφοροποίησης και της εύρυθμης λειτουργίας των γαμετικών κυττάρων (Venkatesh et al. 2009). Ένα ώριμο σπερματοζωάριο φέρει περίπου 72-80 μιτοχόνδρια τα οποία εδράζονται στο μέσο σώμα σε ελικοειδή διάταξη. Η θέση και ο προσανατολισμός των μιτοχονδρίων είναι καταλυτικής σημασίας, καθώς μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης παράγουν ενέργεια που είναι απαραίτητη για την κίνηση της ουράς του σπερματοζωαρίου (Zamboni, 1991). Πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση αναστολέων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης έδειξαν ότι η μειωμένη ενεργότητα της αναπνευστικής αλυσίδας συνεπάγεται μείωση της κινητικότητας των σπερματοζωαρίων (Ruiz-Pesini et al. 1998). Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι η κίνηση των σπερματοζωαρίων είναι άμεσα εξαρτώμενη από τη λειτουργία των μιτοχονδρίων. Ακόμα, έχει παρατηρηθεί ότι η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων μπορεί να οδηγήσει σε μερική ή πλήρη αναστολή της σπερματογένεσης και κατ' επέκταση στην πρόκληση υπογονιμότητας (Frank, 1996). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων σε σπερματοζωάρια πραγματοποιούνται πολλές αλλαγές στη δομή, την οργάνωση, τον αριθμό και τη θέση των μιτοχονδρίων οι οποίες υποκινούνται από την παραγωγή ATP. Έτσι λοιπόν, η παρεμπόδιση του μηχανισμού παραγωγής ενέργειας μπορεί να έχει ως τελικό αποτέλεσμα την αδυναμία συγκρότησης λειτουργικού πληθυσμού σπερματοζωαρίων (Meinhardt et al. 1995). Τέλος, η αδυναμία μετανάστευσης των μιτοχονδρίων γύρω από το αξόνημα κατά τη φάση διαφοροποίησης των σπερματοζωαρίων μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία λεπτού και κυρτού μέσου σώματος, ενώ σε άλλες περιπτώσεις το μαστίγιο των σπερματοζωαρίων μπορεί να είναι κοντό, παχύ με ανώμαλη διαμόρφωση. Και στις δυο περιπτώσεις οι δομικές ανωμαλίες οδηγούν σε αδυναμία κίνησης των σπερματοζωαρίων (Hector et al. 2003).

Επομένως, γενετικές ανωμαλίες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, ελλείμματα και σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν τη λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι δυνατό να συσχετισθούν με την ανδρική υπογονιμότητα. Πιο αναλυτικά, σε κλάσμα βραδέως κινούμενων σπερματοζωαρίων, εντοπίστηκε σε μεγάλο ποσοστό η νουκλεοσιδική αντικατάσταση A 3243 G του γονιδίου tRNA της λευκίνης (UUR). Παρόλο που η μετάλλαξη αυτή έχει συσχετισθεί και με άλλες μιτοχονδριακές ασθένειες φαίνεται να απαντάται σε άτομα με υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένου DNA και με μειωμένη κινητικότητα

σπερματοζωαρίων (Spiropoulos et al. 2002). Επίσης, η μετάλλαξη T 9098 C που εντοπίστηκε στο γονίδιο ATP6, παρατηρήθηκε μόνο σε περιπτώσεις υπογόνιμων ατόμων (Kumar et al 2009). Νουκλεοτιδικές υποκαταστάσεις έχουν αναφερθεί και σε άλλα γονίδια του μιτοχονδριακού DNA όπως είναι το COX1. Η σημειακή μετάλλαξη A 6307 G έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή του αμινοξέος ασπαραγίνη στη θέση 135 σε σερίνη επηρεάζοντας τη δομή της πρωτεΐνης (Baklouti-Gargouri et al. 2013). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε μια ομάδα υπογόνιμων ανδρών στην Ινδία, διαπιστώθηκε ότι η μετάλλαξη C 11944 T στο γονίδιο ND4 ήταν ο κύριος αιτιολογικός παράγοντας ολιγοασθενοζωοσπερμίας σε πληθυσμό υπογόνιμων ανδρών στην Ινδία. Η μετάλλαξη αυτή έχει αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός αμινοξέος θρεονίνης σε ισολευκίνη στη θέση 142 (Selvi Rani et al. 2006). Ωστόσο, η συσχέτιση αυτή δεν επιβεβαιώθηκε όταν έγινε έλεγχος σε μια ομάδα υπογόνιμων ανδρών στην Πορτογαλία, οπότε μπορεί να θεωρηθεί ότι αυτή η μετάλλαξη είναι ειδική του πληθυσμού όπου εντοπίστηκε (Pereira et al. 2008).

Επιπλέον, έχει γίνει συσχέτιση συγκεκριμένων απλότυπων του μιτοχονδριακού DNA με την μειωμένη γονιμότητα. Αναλυτικότερα, ο απλότυπος T εντοπίστηκε με μεγάλη συχνότητα σε άτομα με ασθενοζωοσπερμία ενώ ο απλότυπος H παρατηρήθηκε σε άνδρες με άλλα προβλήματα υπογονιμότητας. Σπερματοζωάρια με τον απλότυπο H εμφανίζουν μεγαλύτερη κινητικότητα και έχουν υψηλότερη ενεργότητα κυτοχρωμικής οξειδάσης σε σχέση με όσα φέρουν τον απλότυπο T (Ruiz-Pesini et al. 2000).

Όσον αφορά τις δομικές ανωμαλίες, σύμφωνα με τους Kao et al., το έλλειμμα 4977 bp του μιτοχονδριακού DNA σχετίζεται με μειωμένη γονιμότητα και κινητικότητα των σπερματοζωαρίων και ότι όσο αυξάνεται η συχνότητα του ελλείμματος τόσο μειώνεται η κινητικότητα των σπερματοζωαρίων. Επιπλέον, παρατηρήθηκαν τα ελλείμματα 7345 bp και 7599 bp, των οποίων τα σημεία θραύσης εδράζονται σε θερμές περιοχές του μιτοχονδριακού DNA που είναι επιρρεπείς σε ελλείψεις μεγάλης κλίμακας (Kao et al. 1998, Hou and Wei, 1996). Πολλαπλά ελλείμματα παρατηρούνται σε άτομα με μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων και χαμηλή ποιότητα σπέρματος (Kao et al. 1998). Τέλος, έχει αναφερθεί ότι ο αριθμός των αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA μπορεί να συσχετισθεί με την ανδρική υπογονιμότητα. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερα αυξημένος αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA έχει παρατηρηθεί σε άτομα με χαμηλή ποιότητα σπέρματος (May-Panloup et al. 2003, Amaral et al. 2007).

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται δημοσιευμένες μελέτες που έχουν συνδέσει την ανδρική υπογονιμότητα με ανωμαλίες στην αλληλουχία και τη δομή του μιτοχονδριακού γονιδιώματος (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Μιτοχονδριακές ανωμαλίες και η συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα

Σημειακές Μεταλλάξεις	Γονιδιωματική περιοχή	Περιγραφή	Αναφορές
m.6307 A>G	MT-COX1	Ασθενοζωοσπερμία	Baklouti-Gargouri et al. (2013)
m.11994 C>T	MT-ND4	Ολιγοασθενοζωοσπερμία	Selvi Rani et al. (2006)
m.9098 T>C	MT-ATP6	Υπογόνιμα άτομα	Kumar et al 2009
m.3243 A>G	MT-TL1	Μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων & υψηλά επίπεδα μεταλλαγμένου DNA	Spiropoulos et al. (2002)
8821 T > C	MT-ATP6	Σοβαρή ολιγοασθενοτερατοσπερμία	Holyoake et al. (2001)
Δομικές Ανωμαλίες			
Έλλειμμα 4977bp		Αδυναμία σπερματογένεσης	Cummins et al. (1994)
Ελλείμματα 7345bp και 7599bp		Μειωμένη κινητικότητα σπερματοζωαρίων & χαμηλή ποιότητα σπέρματος	Kao et al. (1998)
Ανωμαλίες στον αριθμό των αντιγράφων mtDNA			
Περισσότερα αντίγραφα μιτοχονδριακού DNA σε σχέση με το φυσιολογικό		Χαμηλή ποιότητα σπέρματος	May-Panloup et al. (2003) Amaral et al. (2007)

8. Σπερματογένεση

Η σπερματογένεση είναι μια διαδικασία πολλαπλασιασμού και κυτταρικής διαφοροποίησης, όπου τα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα μετατρέπονται σταδιακά σε αρσενικούς γαμέτες, τα σπερματοζωάρια. Η διαδικασία αυτή λαμβάνει χώρα στα σπερματοφόρα σωληνάκια του όρχι και ολοκληρώνεται στην επιδιδυμίδα με την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων (O'Donnell et al. 2001, Bedford et al. 1979). Μετά τον καθορισμό του φύλου, στα αρσενικά άτομα, τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα εισέρχονται στο πρώτο στάδιο της σπερματογένεσης, το οποίο χαρακτηρίζεται από συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις. Μετά τη γέννηση ακολουθεί μια περίοδος μιτωτικής αδράνειας, μέχρι την εφηβική ηλικία όπου η αυξημένη παραγωγή γοναδοτρόπων ορμονών, επάγει την τελική φάση της σπερματογένεσης η οποία συνεχίζεται μέχρι το γήρας. Η καθημερινή παραγωγή πλήρως διαφοροποιημένων σπερματοζωαρίων στον άνθρωπο ανέρχεται στα 200 εκατομμύρια περίπου (De Jonge and Barratt, 2006). Ο χρόνος που απαιτείται για την εξέλιξη ενός πρόδρομου γαμετικού κυττάρου σε ώριμο σπερματοζωάριο είναι ένας κύκλος σπερματογένεσης. Η διάρκεια του κύκλου αυτού ποικίλλει στα διάφορα είδη, στον άνθρωπο διαρκεί περίπου 70 ημέρες (Vander, 2011).

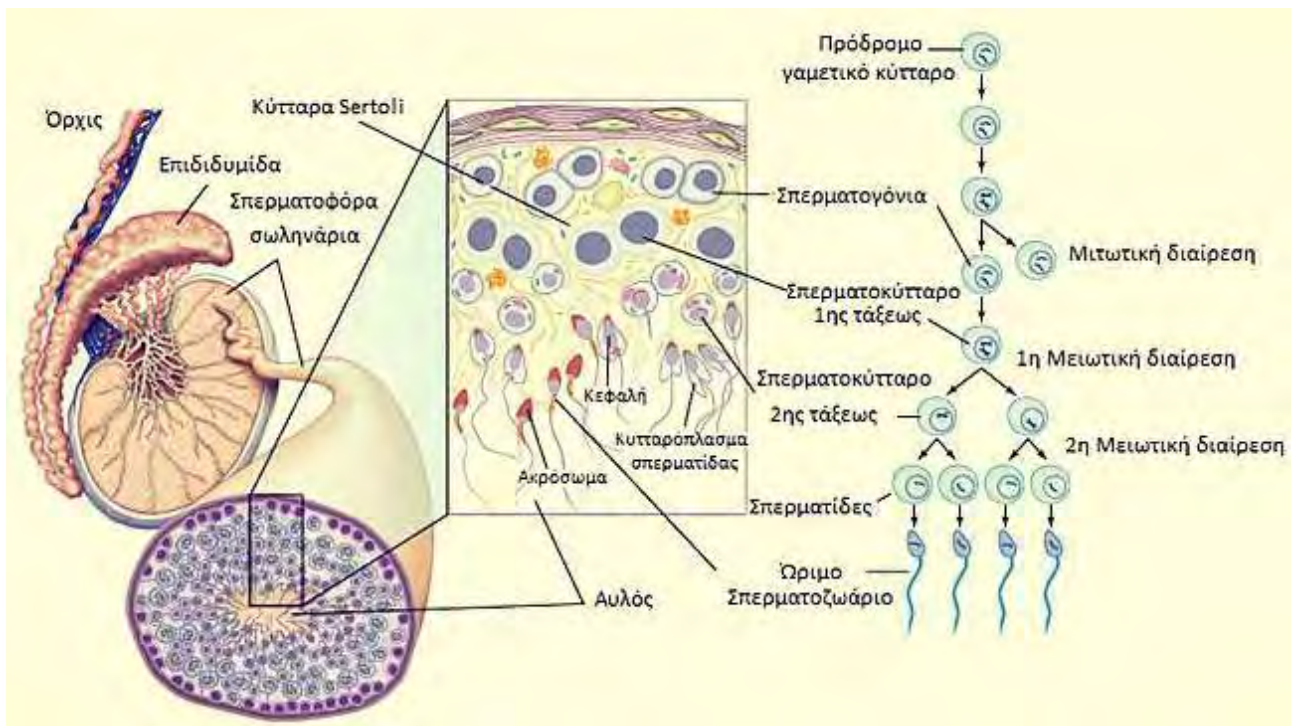
Η σπερματογένεση χαρακτηρίζεται από μιτωτικά, μειωτικά και μετα-μειωτικά γεγονότα τα οποία

εμφανίζουν χρονική και τοπική εξειδίκευση (Vander, 2011). Συγκεκριμένα, τα μιτωτικά γαμετικά κύτταρα του όρχι είναι τα σπερματογόνια, τα οποία συνιστούν την εφεδρεία του σπερματικού πληθυσμού (Russell et al. 1990). Εντοπίζονται στην περιφέρεια των σπερματοφόρων σωληναρίων, κοντά στη βασική μεμβράνη, μεταξύ των κυττάρων Sertoli (Vander, 2011). Τα σπερματογόνια είναι βλαστικά κύτταρα τα οποία έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, παράγοντας είτε περισσότερα αντίγραφα του εαυτού τους είτε κύτταρα τα οποία θα διαφοροποιηθούν τελικά σε σπερματοζωάρια (Slack, 2007). Διακρίνονται σε σπερματογόνια τύπου Α τα οποία διατηρούν τα χαρακτηριστικά των αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων και σε σπερματογόνια τύπου Β, τα οποία έχουν δεσμευθεί προς διαφοροποίηση (O'Donnell et al. 2001).

Μετά την τελευταία μίτωση των σπερματογονίων τύπου Β, σχηματίζονται τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξεως (2n), τα οποία αυξάνονται σε μέγεθος και διπλασιάζουν το γενετικό τους υλικό πριν πραγματοποιηθεί η πρώτη μειωτική διαίρεση (Clermont, 1972). Η μείωση είναι ισομερής και από κάθε πρωτογενές σπερματοκύτταρο παράγονται δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα τα οποία φέρουν 23 χρωμοσώματα με δυο χρωματίδες το καθένα. Στη συνέχεια, κάθε σπερματοκύτταρο δεύτερης τάξης, υποβάλλεται στη δεύτερη μειωτική διαίρεση ώστε να παραχθούν τέσσερα απλοειδή κύτταρα, οι σπερματίδες (Slack, 2007). Σε αυτό το στάδιο οι σπερματίδες βρίσκονται εγκλωβισμένες σε κοιλώματα που σχηματίζονται από εγκολπώματα της μεμβράνης των κυττάρων Sertoli. Όσο η διαδικασία της σπερματογένεσης εξελίσσεται, τα πρόδρομα γαμετικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται ενώ ταυτόχρονα μετακινούνται προς το επάνω μέρος των σωληναρίων, κοντά στον αυλό. (Vander, 2011).

Έπειτα, ακολουθεί η μετατροπή των σφαιρικών σπερματίδων σε ώριμες, επιμηκυσμένες σπερματίδες μέσω της διαδικασίας της σπερμιογένεσης. Η σπερμιογένεση περιλαμβάνει το σχηματισμό του ακροσώματος, την ανάπτυξη του μαστιγίου, τη συμπύκνωση της χρωματίνης, το μετασχηματισμό και επιμήκυνση του πυρήνα καθώς και την σταδιακή απώλεια του κυτταροπλάσματος (Leblond and Clermont, 1952, Russell et al. 1990). Όταν οι σπερματίδες φθάσουν σε ένα ώριμο στάδιο απελευθερώνονται από τα κύτταρα Sertoli στον αυλό του σπερματοφόρου σωληναρίου μέσω της διαδικασίας της σπερμίας (Russell, 1993 (a), O'Donnell, et al.2011). Τέλος τα σπερματοζωάρια μέσω του ορχικού δικτύου μεταφέρονται στην επιδιδυμίδα όπου ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους, αποκτούν την τελική τους μορφολογία, καθίστανται ικανά για γονιμοποίηση και αποθηκεύονται (Bedford, 1979).

Η ομαλή διεξαγωγή της σπερματογένεσης είναι άμεσα συνυφασμένη με τη λειτουργία των κυττάρων Sertoli. Τα κύτταρα Sertoli δημιουργούν έναν κυτταρικό φραγμό ο οποίος εμποδίζει τη μεταφορά χημικών ουσιών από το αίμα στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, διασφαλίζοντας έτσι τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των γαμετικών κυττάρων. Ταυτόχρονα, είναι υπεύθυνα για την παροχή θρεπτικών ουσιών, διαλυτών πρωτεϊνών και αυξητικών παραγόντων, τα οποία είναι απαραίτητα για την αύξηση και διαφοροποίηση των σπερματογονίων. Εκτός από τον υποστηρικτικό τους ρόλο, τα κύτταρα Sertoli επιτελούν τη φαγοκυττάρωση των ελαττωματικών σπερματοζωαρίων. Η επικοινωνία μεταξύ των γαμετικών κυττάρων και των κυττάρων Sertoli γίνεται μέσω της παρακρινούς οδού καθόλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης, γεγονός που αντικατοπτρίζει την ικανότητα των κυττάρων Sertoli να προσαρμόζονται στις συνεχώς εναλλασσόμενες ανάγκες των γαμετικών κυττάρων (Russell, 1993 (b), Parvinen, 1982, O'Donnell et al.2011) (Εικόνα 6).

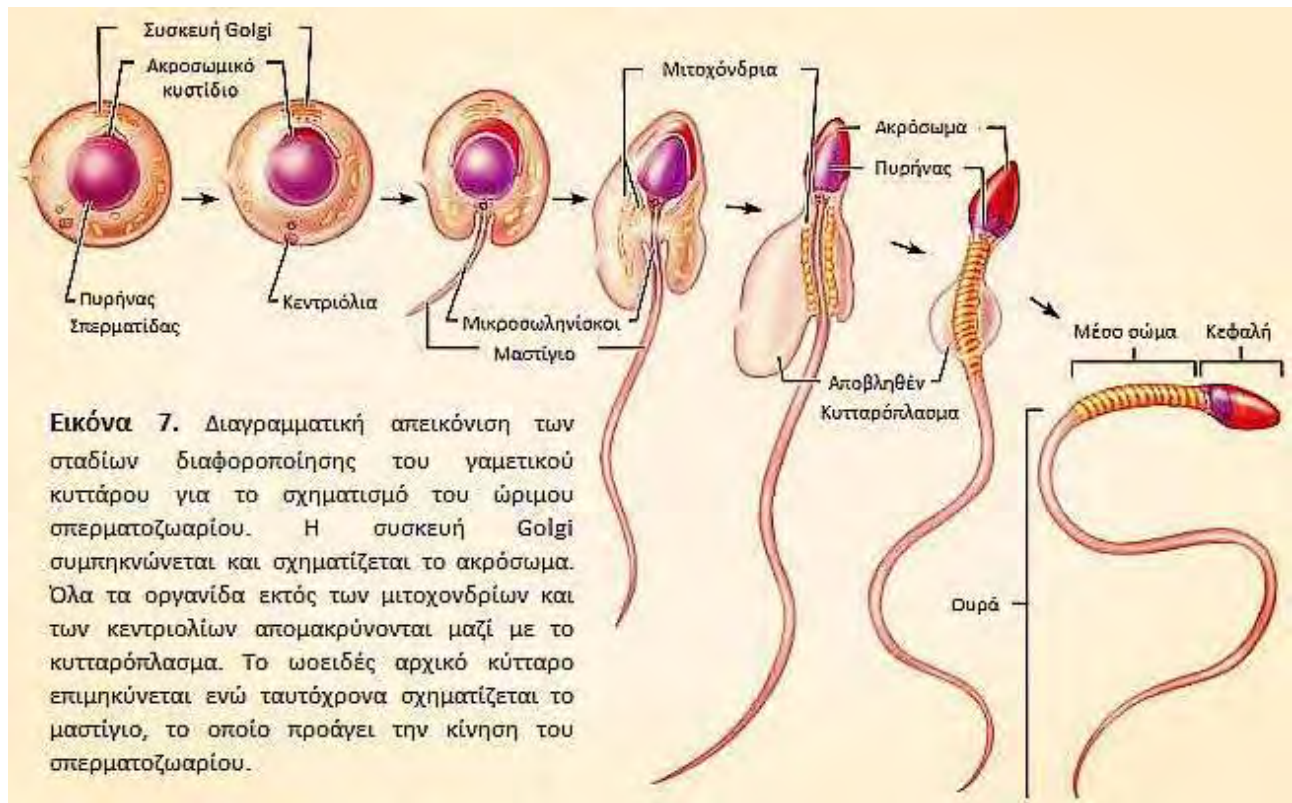


Εικόνα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της διαδικασίας της σπερματογένεσης. Παρουσιάζονται τα στάδια της σπερματογένεσης όπως λαμβάνουν χώρα στον όρχι καθώς και τα στάδια διαφοροποίησης των γαμετικών κυττάρων ώστε να μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζωάρια.

9. Δομή Σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζωάριο είναι ένα πλήρως διαφοροποιημένο και ιδιαίτερα εξειδικευμένο κύτταρο που σχηματίζεται στο τελικό στάδιο της σπερματογένεσης (Slack, 2007, Ramalho-Santos et al. 2007). Τα ανθρώπινα σπερματοζωάρια έχουν μικρό μέγεθος (60μm) και αποτελούνται κυρίως από τρεις μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές : την κεφαλή, το μέσο σώμα και την ουρά (Ramalho-Santos et al. 2007, Eddy and O'Brien, 1994, Yanagamachi, 1994). Η κεφαλή έχει ωοειδές σχήμα, μήκος 3,0-5,0 μm και πλάτος 2,0-3,0 μm (Menkveld et al. 2011). Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα τα οποία περιβάλλονται από την πλασματική μεμβράνη (Buffone et al. 2012). Εντός του πυρήνα βρίσκεται πακεταρισμένο το γενετικό υλικό. Το απλοειδές γονιδίωμα του σπερματοζωαρίου είναι ιδιαίτερα συμπαγές και μεταγραφικά ανενεργό λόγω της αντικατάσταση των ιστονών από πρωταμίνες (Ramalho-Santos et al. 2007, Barratt et al. 2009). Οι πρωταμίνες, είναι πρωτεΐνες που απαντώνται ειδικά στον πυρήνα των σπερματοζωαρίων και δημιουργούν ισχυρές διασυνδέσεις με τα μόρια του DNA (Jini and James, 2006). Ο υψηλός βαθμός συμπύκνωσης του πυρήνα σε συνδυασμό με την απώλεια του κυτταροπλάσματος και των υποκυτταρικών οργανιδίων, μειώνουν τον όγκο του κυττάρου και αυξάνουν το υδροδυναμικό του σχήμα (Ramalho-Santos et al. 2007). Μπροστά από τον πυρήνα βρίσκεται το ακρόσωμα, ένα εκκριτικό κυστίδιο το οποίο αποτελεί προέκταση της συσκευής Golgi (Abou-Haila, 2000). Το ακρόσωμα περιέχει υδρολυτικά ένζυμα και πρωτεΐνες, που συμβάλλουν στο σχηματισμό των κατάλληλων δομών οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν για τη διείσδυση στο ωάριο (Slack, 2007). Η σύνδεση της κεφαλής με το υπόλοιπο σώμα του σπερματοζωαρίου γίνεται μέσω του αυχένα. Ο αυχένος περιλαμβάνει το κεντριόλιο, από το οποίο θα προκύψει το αξόνημα της ουράς (Chemes et al. 1999). Ακολουθεί το μέσο σώμα, το οποίο έχει μήκος 5,0-7,0 μm και πλάτος 1μm (Menkveld et al. 2011). Το ενδιάμεσο αυτό τμήμα είναι πλούσιο σε μιτοχόνδρια τα οποία βρίσκονται διατεταγμένα σε μορφή σπειράματος γύρω από το αξόνημα. Η παρουσία των μιτοχονδρίων εξασφαλίζει την παραγωγή ATP ώστε

να είναι δυνατή η επιβίωση και η κίνηση των σπερματοζωαρίων (Oko and Clermont, 1990). Η δομή του σπερματοζωαρίου ολοκληρώνεται με το σχηματισμό της ουράς η οποία έχει μήκος περίπου 45μm (Menkveld et al. 2011). Πρόκειται για ένα ενισχυμένο μαστίγιο με χαρακτηριστική οργάνωση από δέσμες μικροσωληνίσκων, εννέα ζεύγη ινιδίων διατάσσονται περιφερικά του αξονήματος και ένα ζεύγος βρίσκεται στο κέντρο. Επιπλέον πρωτεϊνικές δομές όπως οι βραχίονες δυνεΐνης περιβάλλουν το αξόνημα, ενισχύοντας την κίνηση του μαστιγίου (Inaba, 2003, Turner, 2003) (Εικόνα 7).



10. Αλληλεπίδραση Σπερματοζωαρίου-ωοκυττάρου

10.1. Ενεργοποίηση

Στα περισσότερα θηλαστικά τα σπερματοζωάρια που απελευθερώνονται κατά τη σύζευξη δεν είναι ικανά για γονιμοποίηση. Προκειμένου να καταστούν ικανά, παραμένουν για κάποιο χρονικό διάστημα στην αναπαραγωγική οδό του θηλυκού όπου υποβάλλονται στη διαδικασία της ενεργοποίησης (Chang, 1955, Austin, 1951). Η ενεργοποίηση περιλαμβάνει μια σειρά από μοριακές, βιοχημικές και δομικές αλλαγές (Gadella et al. 2006). Συγκεκριμένα, ένα από τα γεγονότα που λαμβάνουν χώρα, είναι η απώλεια της χοληστερόλης από την πλασματική μεμβράνη του σπερματοζωαρίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και διαπερατότητας της μεμβράνης με αποτέλεσμα τη μεταφορά ιόντων Ca^{2+} και HCO_3^- στο εσωτερικό του κυττάρου (Ickowicz et al. 2012). Η αυξημένη εισροή ιόντων πυροδοτεί το μονοπάτι μεταγωγής σήματος της αδενυλικής κυκλάσης (Garbers et al. 1982). Η ενεργοποιημένη αδενυλική κυκλάση οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα cAMP και κατ' επέκταση σε ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης pKA, η οποία φωσφορυλιώνει άλλες πρωτεΐνες-υποστρώματα (Visconti et al. 1998). Οι κυριότερες πρωτεΐνες που υφίστανται φωσφορυλίωση κατά τη φάση της ενεργοποίησης εντοπίζονται

στην ουρά του σπερματοζωαρίου και σε πολύ μικρότερο ποσοστό στην κεφαλή (Petrunkina et al. 2001). Η φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών της ουράς, συνδυάζεται με την υπερκινητικότητα των σπερματοζωαρίων (hyperactivation), που τους προσδίδει την ικανότητα να διασχίσουν την τραχηλική βλέννα ώστε να προσδεθούν στη διαφανή ζώνη του ωαρίου (Rajesh et al. 2004). Επίσης, κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης παρατηρείται μεταβολή του δυναμικού της μεμβράνης (υπερπόλωση), γεγονός που διευκολύνει το άνοιγμα των διαύλων ασβεστίου. Η παροδική αύξηση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου προετοιμάζει το σπερματοζωάριο για την ακροσωμική αντίδραση (Zeng et al. 1995).

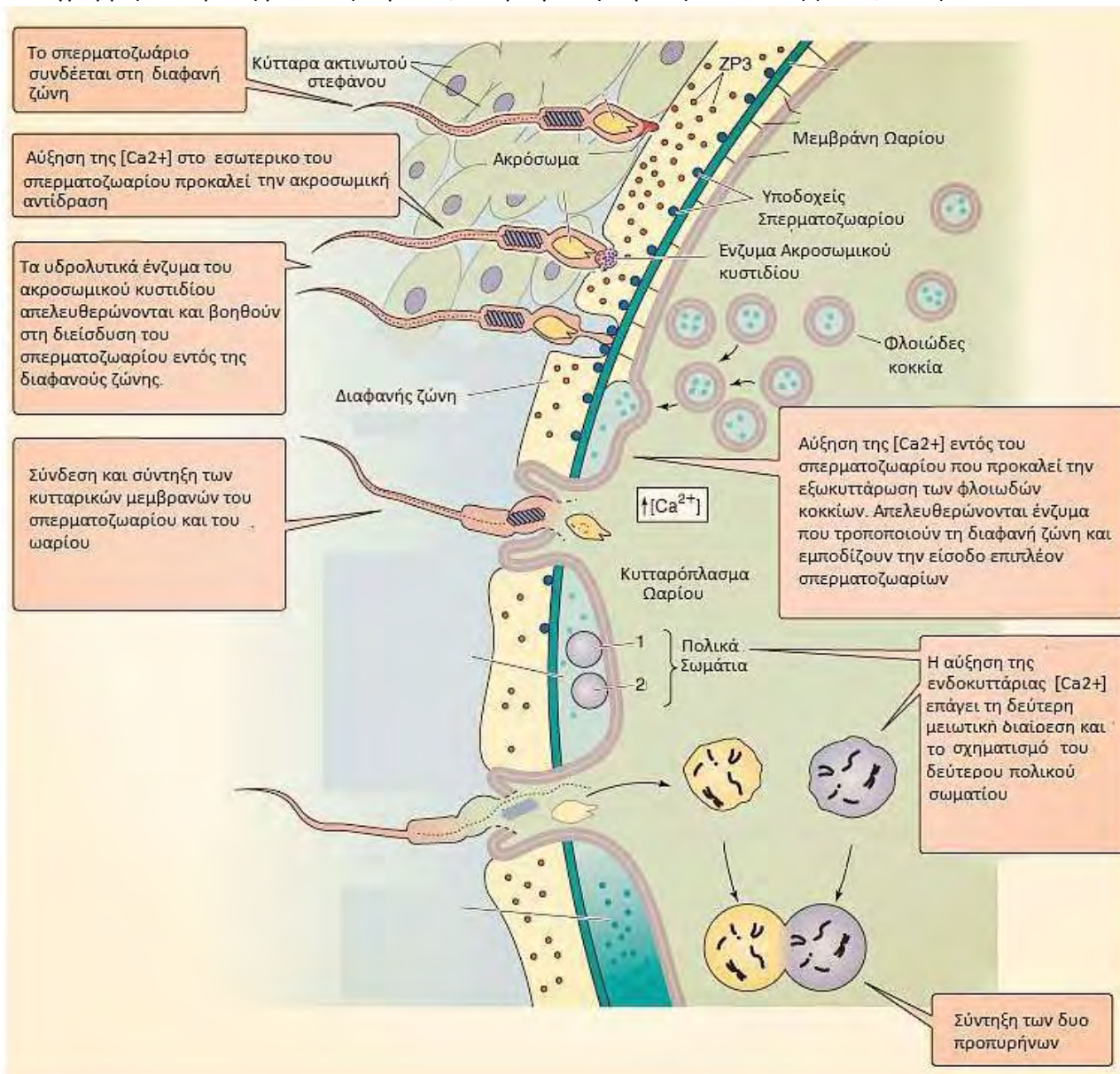
10.2. Ακροσωμική αντίδραση

Στα θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, το ωκύτταρο που απελευθερώνεται από την ωθήκη περιβάλλεται από τα ωθηλακικά κύτταρα (κύτταρα ακτινωτού στεφάνου) και από μια διαφανή στιβάδα εξωκυττάρου υλικού η οποία ονομάζεται διαφανής ζώνη (Keisuke et al. 2004). Η διαφανής ζώνη περιβάλλεται από τα κύτταρα του ακτινωτού στεφάνου, τα οποία είναι βυθισμένα σε εξωκυττάριο στρώμα πλούσιο σε υαλουρονικό οξύ (Slack, 2007). Για να γίνει η γονιμοποίηση του ωαρίου, το ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο θα πρέπει πρώτα να διεισδύσει στο εξωκυττάριο στρώμα και έπειτα να προσδεθεί στη διαφανή ζώνη. Για το λόγο αυτό τα σπερματοζωάρια φέρουν στη μεμβράνη τους ένα ένζυμο με ενεργότητα υαλουρονιδάσης η οποία διευκολύνει το πέρασμά τους από την στιβάδα των κυττάρων του ακτινωτού στεφάνου (Ying Lin et al. 1994). Ακολουθεί η σύνδεση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη, στάδιο κατά το οποίο εξασφαλίζεται η ειδο-ειδικότητα της γονιμοποίησης (Ganguly et al. 2010). Η διαφανής ζώνη αποτελείται από τέσσερεις γλυκοπρωτεΐνες που ονομάζονται ZP1, ZP2, ZP3, ZP4 και φέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο, ένα κοινό μοτίβο πεπτιδικής αλληλουχίας "ZP" (Hughes and Barratt, 1999, Lefievre et al. 2004). Το ενεργοποιημένο σπερματοζωάριο συνδέεται στις γλυκοπρωτεΐνες ZP1, ZP3 και ZP4 και επάγεται η ακροσωμική αντίδραση ενώ η ZP2 φαίνεται να έχει δευτερεύοντα ρόλο (Gupta et al. 2012). Κατά την ακροσωμική αντίδραση παρατηρείται ταχεία εξωκυττάρωση του ακροσωμικού κυστιδίου η οποία συνοδεύεται από την απελευθέρωση υδρολυτικών ενζύμων όπως οι σερίνο-πρωτεάσες και η ακροσίνη που βοηθούν στην διείσδυση του σπερματοζωαρίου στη διαφανή ζώνη (Abou-Haila & Tulsiani, 2000).

10.3. Αναγνώριση & Σύντηξη σπερματοζωαρίου-ωκυττάρου

Η πρόσδεση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο αποτελεί το πρώτο στάδιο της σύντηξης των κυτταρικών μεμβρανών η οποία επιτελείται στην περιοχή του ωαρίου που εφάπτεται στην πλευρική επιφάνεια της κεφαλής του σπερματοζωαρίου (Slack, 2007). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο κυττάρων πραγματοποιείται μέσω της σύνδεσης των ιντεγκρινών του ωαρίου και των πρωτεϊνών της οικογένειας ADAM (φερτιλίνη α,β, κυριτεστίνη) του σπερματοζωαρίου (Keisuke et al. 2004). Το ζεύγος ADAM/ιντεγκρίνη α6β1 θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνδεση σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Barraud-Lange and Boucheix, 2013). Ωστόσο, για την σύντηξη των δύο κυτταρικών μεμβρανών απαιτείται μια πρωτεΐνη του ωαρίου η οποία καλείται τετρασπανίνη, CD9 καθώς και η πρωτεΐνη Izumo που εντοπίζεται στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου μετά την ακροσωμική αντίδραση (Inoue et al. 2005). Τη σύντηξη των δυο γαμετών ακολουθεί η αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης ασβεστίου (Lawrence et al. 1997). Το γεγονός αυτό επάγει την εξωκυττάρωση των φλοιωδών κοκκίων, την ολοκλήρωση της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης και το σχηματισμό του δεύτερου πολικού σωματίου (Alberio et al. 2001). Τα φλοιώδη κοκκία περιέχουν ένζυμα όπως γλυκοσιδάσες και πρωτεάσες οι οποίες τροποποιούν τους υποδοχείς της διαφανούς ζώνης, εμποδίζοντας την είσοδο επιπλέον σπερματοζωαρίων (Stein et al. 2004). Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου αποσυμπυκνώνεται μέσω της μείωσης των δισουλφιδικών δεσμών των

πρωταμινών, ενώ τα μιτοχόνδρια εκφυλίζονται και δε συμμετέχουν στη μετέπειτα ανάπτυξη (Slack, 2007). Το κεντριόλιο που αρχικά αποτελεί το κέντρο οργάνωσης μικροσωληνίσκων του σπερματικού αστέρα διαιρείται προκειμένου να σχηματιστεί στο ζυγωτό η πρώτη αυλακωτική άτρακτος (Slack, 2007). Τέλος, οι δυο προπυρήνες μεταναστεύουν αργά ο ένας προς τον άλλο, ενώ παράλληλα λαμβάνει χώρα η αντιγραφή του DNA. Οι προπυρηνικοί φάκελοι αποσυγκροτούνται κατά τη συνάντησή τους και τα χρωμοσώματα ευθυγραμμίζονται με τη μιτωτική άτρακτο, έτοιμα για την πρώτη αυλάκωση (Slack, 2007).



Εικόνα 8. Διαγραμματική απεικόνιση των σταδίων αλληλεπίδρασης ωοκυττάρου-σπερματοζωαρίου.

11. Ανδρική υπογονιμότητα

Στη σύγχρονη κοινωνία, η αδυναμία τεκνοποίησης αποτελεί πολυδιάστατο πρόβλημα με ποικίλες κοινωνικές, ψυχολογικές και οικονομικές προεκτάσεις. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO), ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία επίτευξης εγκυμοσύνης μετά από προσπάθεια ενός τουλάχιστον χρόνου χωρίς κανένα μέτρο αντισύλληψης. Η αδυναμία αυτή μπορεί να αφορά τη γονιμοποίηση ή την ολοκλήρωση της κύησης μετά από αυτή (WHO, 2000). Η υπογονιμότητα επηρεάζει το 15% των ζευγαριών, με τον ανδρικό παράγοντα να ευθύνεται σε ποσοστό 50% περίπου (Bhasin et al.

1994). Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί ένα από τα κλινικά χαρακτηριστικά κάποιων συνδρόμων ή το μεμονωμένο εύρημα μιας γενετικής βλάβης (Poongothai et al. 2009). Σε περιπτώσεις όπου τα αίτια δεν έχουν διευκρινιστεί, η υπογονιμότητα χαρακτηρίζεται ως ιδιοπαθής (Sherins, 1995). Ωστόσο, η ανάπτυξη νέων μεθόδων στον τομέα της γενετικής, πρωτεομικής και μεταβολομικής, ίσως να αποτελέσουν το κλειδί για την ακριβή διάγνωση και αντιμετώπιση της υπογονιμότητας (Konac et al. 2013).

12. Διάγνωση Υπογονιμότητας

12.1. Ανάλυση Σπέρματος

Το σπέρμα αποτελείται από σπερματοζωάρια και σπερματικό υγρό. Τα σπερματοζωάρια παράγονται στους όρχεις και αποτελούν το 3-5% του όγκου του σπέρματος, ενώ το σπερματικό υγρό, προέρχεται από την ανάμιξη των εκκρίσεων των επικουρικών γεννητικών αδένων και αποτελεί το 95-97% (Polakoski et al. 1976). Ο έλεγχος του σπέρματος είναι ο ακρογωνιαίος λίθος της εργαστηριακής αξιολόγησης της ανδρικής υπογονιμότητας (Poongothai et al 2009). Για το λόγο αυτό η ανάλυση του σπέρματος βασίζεται σε λεπτομερή εργαστηριακά πρωτόκολλα που έχει δημοσιεύσει ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO). Σύμφωνα με αυτά, ο έλεγχος πρέπει να περιλαμβάνει την εκτίμηση των κύριων παραμέτρων του σπέρματος και ανάλογα με την περίπτωση, τη βιοχημική, την ανοσολογική και τη μικροβιολογική εξέταση. Οι κύριες παράμετροι που αξιολογούνται είναι η κινητικότητα, η μορφολογία και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων (WHO, 1999). Επιπρόσθετα, γίνεται αξιολόγηση του pH το οποίο φυσιολογικά θα πρέπει να είναι ελαφρώς αλκαλικό. Στην περίπτωση που η τιμή του pH είναι μικρότερη από 7 και ο αριθμός των σπερματοζωαρίων είναι περιορισμένος τότε αυτό υποδηλώνει την απόφραξη της εκσπερματικής οδού (de la Taille et al. 1998). Η εκκριτική ικανότητα των επικουρικών αδένων μπορεί να εκτιμηθεί από τα επίπεδα της φρουκτόζης και του κιτρικού οξέος, καθώς χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να είναι ενδεικτικές της ύπαρξης φλεγμονής (Cooper et al. 1990). Τέλος, η υψηλή συγκέντρωση λευκοκυττάρων στο δείγμα μειώνει τη γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος και αποτελεί ένδειξη βλάβης του αναπαραγωγικού συστήματος (WHO, 2010) (Πίνακας 3.)

Όταν οι παράμετροι που μελετώνται, αποκλίνουν από τα φυσιολογικά όρια τότε το δείγμα χαρακτηρίζεται ως παθολογικό. Έτσι δείγματα με χαμηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων χαρακτηρίζονται ως ολιγοζωοσπερμικά, ενώ δείγματα στα οποία δεν εντοπίζονται καθόλου σπερματοζωάρια κατατάσσονται ως αζωοσπερμικά. Δείγματα στα οποία περισσότερα από το 40% των σπερματοζωαρίων έχουν παθολογική μορφολογία χαρακτηρίζονται ως τερατοζωοσπερμικά (Εικόνα 9.), ενώ δείγματα στα οποία η πλειοψηφία των σπερματοζωαρίων εμφανίζουν μειωμένη κινητικότητα χαρακτηρίζονται ως ασθενοζωοσπερμικά (WHO, 2010) (Πίνακας 4.).

12.2. Λειτουργικές Δοκιμές

Σε πολλές περιπτώσεις η συμβατική ανάλυση των παραμέτρων του σπέρματος δεν αρκεί για τη διάγνωση της πιθανής υπογονιμότητας. Για το λόγο αυτό απαιτούνται επιπλέον λειτουργικές δοκιμές, οι οποίες στοχεύουν στον εντοπισμό διαταραχών στην επιβίωση των σπερματοζωαρίων, τη μετακίνηση τους εντός του θήλεος γεννητικού συστήματος και στα επιμέρους βήματα της γονιμοποίησης. (Aitken, 2006). Η γονιμοποιητική ικανότητα των σπερματοζωαρίων μπορεί να αξιολογηθεί με: τη δοκιμασία διείσδυσης των σπερματοζωαρίων στην τραχηλική βλέννα (Aitken, 1985), τη δοκιμασία "ενεργοποίησης" των σπερματοζωαρίων (Sukcharoen et al 1995), τη δοκιμασία σύνδεσης σπερματοζωαρίου-διαφανούς ζώνης (Oehninger et al., 1992), τη δοκιμασία ακροσωμικής αντίδρασης (Aitken, 1993) και τη δοκιμασία εισόδου

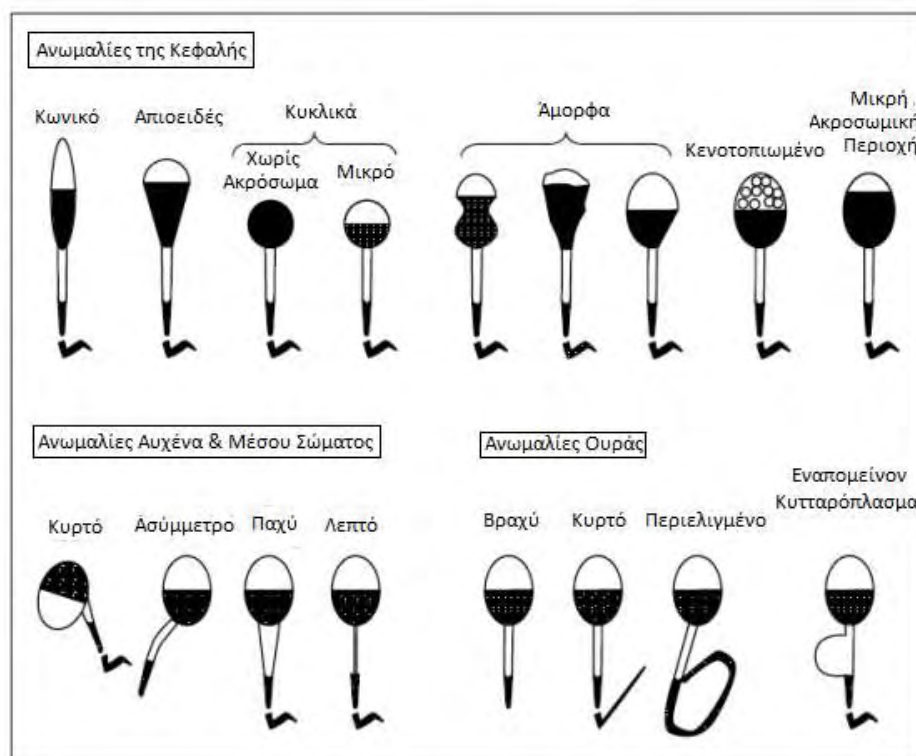
των σπερματοζωαρίων σε ώρια χάμστερ (Aitken, 2006).

Πίνακας 3. Παράμετροι του σπέρματος που μελετώνται κατά την ανάλυσή του και οι κατώτερες τιμές που μπορούν να λάβουν (WHO, 2010).

Παράμετρος	Κατώτερες τιμές αναφοράς
Όγκος (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Ολικός αριθμός σπερματοζωαρίων (10 ⁶ ανά εκσπερμάτιση)	39 (33-46)
Συγκέντρωση σπέρματος (10 ⁶ ανά ml)	15 (12-16)
Συνολική κινητικότητα (προοδευτική & μη προοδευτική, %)	40 (38-42)
Προοδευτική κινητικότητα	32 (31-34)
Βιωσιμότητα (ζωντανά σπερματοζωάρια %)	58 (55-63)
Μορφολογία (φυσιολογικές μορφές %)	4 (3,0-4,0)
pH	>7,2
Περοξιδάση-θετικά λευκοκύτταρα (10 ⁶ per ml)	<1,0
Ψευδάργυρος σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>2,4
Φρουκτόζη σπέρματος (μmol/εκσπερμάτιση)	>13
Ουδέτερη γλυκοσιδάση (mU/εκσπερμάτιση)	>20
MAR test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σωματίδια, %)	<50
Immunobead test (κινητά σπερματοζωάρια με δεσμευμένα σφαιρίδια %)	<50

Πίνακας 4. Κατηγορίες διαταραχών του σπέρματος σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO, 2010).

Ιατρική ονομασία	Χαρακτηριστικά
Αζωοσπερμία	Απουσία σπερματοζωαρίων στο σπέρμα
Ασπερμία	Πλήρης έλλειψη σπέρματος κατά την εκσπερμάτωση
Ολιγοζωσπερμία	< 10 εκατομμύρια σπερματοζωάρια/ml σπέρματος
Ασθενοζωσπερμία	> 40% των σπερματοζωαρίων με μειωμένη κινητικότητα
Τερατοζωσπερμία	> 40% των σπερματοζωαρίων με ανώμαλη μορφολογία
Νεκροσπερμία	Μη βιώσιμα/ νεκρά σπερματοζωάρια
Ολιγοασθενοζωσπερμία	Μειωμένη κινητικότητα & συγκέντρωση σπερματοζωαρίων, λιγότερο από 8 εκατομμύρια/ml σπέρματος
Ολιγοασθενοζοτερατοσπερμία	Μειωμένη κινητικότητα, συγκέντρωση και ανώμαλη μορφολογία σπερματοζωαρίων
Αιματοσπερμία	Παρουσία ερυθροκυττάρων στο σπέρμα
Πυοσπερμία	Παρουσία λευκοκυττάρων στο σπέρμα
Πολυζωσπερμία	Υπερβολικά υψηλή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων στο σπέρμα



Εικόνα 9. Διαγραμματική απεικόνιση ανώμαλων διαμορφώσεων των σπερματοζωαρίων (Kruger et al. 1993)

13. Αίτια ανδρικής υπογονιμότητας

Η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια πολύπλοκη διαταραχή η οποία οφείλεται τόσο σε γενετικούς όσο και σε μη γενετικούς παράγοντες. Οι κυριότεροι από αυτούς συνοψίζονται παρακάτω (WHO 2000):

- Γενετικές ανωμαλίες
- Συγγενείς ή επίκτητες ανωμαλίες του ουρογεννητικού συστήματος
- Μολύνσεις ουρογεννητικού συστήματος
- Αυξημένη θερμοκρασία του όσχεου
- Ενδοκρινολογικές διαταραχές
- Ανοσοβιολογικοί παράγοντες

13.1. Γενετικοί Παράγοντες

Εκτιμάται ότι οι γενετικές ανωμαλίες αποτελούν τον κύριο αιτιολογικό παράγοντα της ανδρικής υπογονιμότητας, συμβάλλοντας σε ένα ποσοστό 15-30% (Ferlin et al. 2007). Το γενετικό υπόβαθρο της υπογονιμότητας περιλαμβάνει κυρίως χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείμματα στο Y χρωμόσωμα και γονιδιακές μεταλλάξεις, που μπορούν να επηρεάσουν ένα εύρος φυσιολογικών διαδικασιών όπως η ορμονική ομοιοστάση, η σπερματογένεση και η ποιότητα του σπέρματος (Poongothai et al. 2009, Ferlin et al. 2007).

13.2. Χρωμοσωμικές Ανωμαλίες

Όσον αφορά τις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μπορεί να πρόκειται για κάποια ανευπλοειδία όπως το σύνδρομο Klinefelter (47, XXY) ή για κάποια δομική ανωμαλία όπως είναι η μετάθεση κατά Robertson. Το σύνδρομο Klinefelter προκαλεί υπογοναδισμό και υπογονιμότητα με αποτέλεσμα το 75-90% των ανδρών που πάσχουν να εμφανίζουν αζωοσπερμία (Selice et al. 2010, Wisser et al. 2012). Ακόμα, άτομα που φέρουν ένα επιπλέον Y χρωμόσωμα (47, XYY) μπορεί να εμφανίσουν ανωμαλίες στη σπερματογένεση (Shefi and Turek, 2006). Από την άλλη πλευρά, η μετάθεση κατά Robertson μπορεί να οδηγήσει σε μια ποικιλία φαινοτύπων, από φυσιολογική σπερματογένεση μέχρι αδυναμία παραγωγής σπερματογόνιων. Η χρωμοσωμική αυτή ανωμαλία απαντάται μόνο στο 0,8 % των υπογόνιμων ανδρών (O'Flynn O'Brien et al. 2010).

13.3. Μικροελλείμματα στο Y χρωμόσωμα

Το 1976, οι Tierpolo και Zuffardi, ήταν οι πρώτοι που έδειξαν ότι υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της ανδρικής υπογονιμότητας και των μικροελλειμμάτων στο μακρύ βραχίονα του Y χρωμοσώματος. Συγκεκριμένα, υποστήριξαν ότι στο βραχίονα q του Y χρωμοσώματος εδράζεται ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για ένα παράγοντα που σχετίζεται με τη διαδικασία της σπερματογένεσης. Ο παράγοντας αυτός ονομάστηκε AZF (azospermia factor) καθώς βρέθηκε ότι απουσιάζει σε άνδρες που έπασχαν από αζωοσπερμία (Tierpolo and Zuffardi, 1976). Ωστόσο, επιπλέον έρευνες, έδειξαν ότι δεν πρόκειται για ένα γονίδιο αλλά για μια ευρύτερη AZF περιοχή η οποία διακρίνεται σε τρεις μη επικαλυπτόμενες υποπεριοχές τις AZFa, AZFb, AZFc. Εντός αυτών των χρωμοσωμικών τμημάτων εδράζονται γονίδια που

είναι απαραίτητα για τη φυσιολογική διεξαγωγή της σπερματογένεσης (Vogt et al. 1996). Μικροελλείμματα στις περιοχές AZF του Y χρωμοσώματος έχουν εντοπισθεί στο 5-15% των ανδρών που παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα. Ο φαινότυπος των υπογόνιμων ανδρών ποικίλει ανάλογα με την περιοχή AZF που απουσιάζει και κυμαίνεται από ήπια ολιγοσπερμία μέχρι πλήρη απουσία γαμετικών κυττάρων (Huynh et al., 2002, Kent-First et al., 1999, Kuroda-Kawaguchi et al. 2001, Pryor et al. 1997, Reijo et al. 1996) (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Χαρακτηρισμός των μικροελλειμμάτων του Y χρωμοσώματος

AZF περιοχή	Γονίδια	Μήκος Περιοχής	Συχνότητα Ελλείμματος	Φαινότυπος
AZFa	USP9Y, DBY, UTY, TB4Y	1–3 Mb	4,90%	Sertoli only cells syndrome, μερική ή πλήρης απουσία γαμετικών κυττάρων
AZFb	HSFY, eIF-1Y, CDY SMCY, BPY2, DAZ, RBMY, PRY	6.–7.7 Mb	16,00%	Αδυναμία ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων, αζωοσπερμία
AZFc	DAZ, CDY1, BPY2, PRY, TTY2	3.5 Mb	60,00%	Ήπια έως σοβαρή ολιγοσπερμία

13.4 Γονιδιακές Διαταραχές

Μεταλλάξεις, πολυμορφισμοί και ελλείμματα που έχουν ταυτοποιηθεί σε αυτοσωμικά και φυλετικά γονίδια, διερευνώνται για την πιθανή συμβολή τους στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας. Συγκεκριμένα, σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο CFTR (Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 7, έχουν εντοπισθεί στο 60-90% των ασθενών με συγγενή απουσία σπερματικών πόρων (Radpour et al. 2007). Επίσης, πιθανή είναι η συμβολή του γονιδίου SHBG (sex hormone-binding globulin), το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 17 και είναι κυρίως υπεύθυνο για την ρύθμιση των επιπέδων των ανδρογόνων στους όρχεις. Τα ανδρογόνα έχουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του φύλου και στη διαδικασία της σπερματογένεσης, η ενδεχόμενη διατάραξη των επιπέδων τους μπορεί να επηρεάσει τη γονιμότητα (Lazaros et al. 2008). Ένα ακόμη υποψήφιο γονίδιο είναι το FSHR (FSH receptor). Το γονίδιο αυτό, κωδικοποιεί για τον υποδοχέα της ωθηλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), η οποία είναι σημαντική για τη φυσιολογική λειτουργία των γονάδων. Ελλείμματα στην αλληλουχία του γονιδίου έχουν συσχετισθεί με ελαττωματική σπερματογένεση (Tapanainen et al. 1997). Τέλος, το γονίδιο USP26 εδράζεται στο μακρύ βραχίονα του X χρωμοσώματος και εκφράζεται στους όρχεις στα πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης (Stouffs et al. 2005). Σύμφωνα με εύρυνες, πολυμορφισμοί του γονιδίου φαίνεται να σχετίζονται με μειωμένη γονιμότητα. Οι παραπάνω αναφορές αποτελούν μόνο ένα μικρό μέρος από το σύνολο των γονιδίων τα οποία θεωρούνται υποψήφια για την ανδρική υπογονιμότητα.

13.5. Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες

Οι συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες οι οποίες οδηγούν στην εκδήλωση της ανδρικής υπογονιμότητας συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6) (WHO, 2000).

Πίνακας 6. Συγγενείς και επίκτητες ανωμαλίες που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Συγγενείς ανωμαλίες	Ανορχία
	Δυσγενεσία όρχεων
	Κρυψορχία
	Απουσία σπερματικού πόρου
	Απλασία των γαμετικών κυττάρων (Sertoli cell only syndrome)
	Αδυναμία ωρίμανσης σπερματογόνιων
Επίκτητες ανωμαλίες	Τραύμα
	Συστροφή όρχεως
	Καρκίνος των όρχεων
	Συστημικές διαταραχές (κίρρωση του ήπατος)
	Κιρσοκήλη
	Εξωγενείς παράγοντες (φαρμακευτική αγωγή, κυτταροτοξικοί

13.6. Μολύνσεις ουρογεννητικού συστήματος

Οι λοιμώξεις της ανδρικής ουρογεννητικής οδού μπορούν να προκαλέσουν μείωση της γονιμότητας αν και είναι δυνητικά ιάσιμες (Weidner et al. 1999, Purvis et al. 1993). Συνήθως πρόκειται για λοιμώξεις των επικουρικών γεννητικών αδένων όπως είναι η ουρηθρίτιδα, η προστατίτιδα, η επιδιδυμίτιδα και η ορχίτιδα (WHO 2000). Υπάρχουν ενδείξεις ότι τα βακτήρια, *Ureoplasma urelyticum*, *Chlamydia trachomatis* και *Neisseria gonorrhoea* μπορούν να προκαλέσουν τέτοιου είδους μολύνσεις (Schiefer, 1998).

13.7. Ενδοκρινολογικές Διαταραχές

Ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα ορμονικής διαταραχής που οδηγεί σε υπογονιμότητα. Στην περίπτωση αυτή, ο υπογοναδισμός οφείλεται σε έλλειψη γοναδοτροπινών χωρίς να υπάρχει φανερή ανατομική βλάβη στην περιοχή της υπόφυσης. Τα επίπεδα

γοναδοτροπινών είναι συνήθως ελαττωμένα όπως και η έκκριση της απελευθερωτικής ορμόνης των γοναδοτρόπων ορμονών (GnRH). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αδυναμία ανάπτυξης γονάδων, την ελαττωμένη παραγωγή ανδρογόνων και την ελαττωματική σπερματογένεση (Seminar et al. 2000). Ακόμα, ο υπογοναδοτροφικός υπογοναδισμός μπορεί να είναι αποτέλεσμα συγγενών ανωμαλιών όπως το σύνδρομο Kallmann (Fechner et al. 2008), επίκτητων ανωμαλιών όπως οι επίκτητες υποθαλαμικές/υπόφυσης ασθένειες (υπερπρολακτιναιμία) και εξωγενών παραγόντων όπως η χρήση φαρμάκων (αναβολικά στεροειδή) (Wiser et al. 2012).

13.8. Υπερθερμία όσχεου

Γενικά θεωρείται ότι, μια θερμοκρασία μεταξύ 33-36°C είναι ιδανική για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και την παραγωγή φυσιολογικού σπέρματος (Hjollund et al. 2002). Αντίθετα, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλεί βλάβες στο γενετικό υλικό των γαμετικών κυττάρων και έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη παραγωγή σπέρματος (Ivell, 2007). Το εργασιακό περιβάλλον και ο τρόπος ζωής είναι παράγοντες που μπορούν να συμβάλλουν στην αύξηση της θερμοκρασίας του όσχεου (Jung et al. 2007). Επίσης η κρυσορκία και η κισσοκήλη αποτελούν χαρακτηριστικές περιπτώσεις υπογονιμότητας που συνδέονται με την περίπτωση της υπερθερμίας (Zorgniotti et al. 1973, Mieusset et al. 1995).

13.9. Ανοσοβιολογικοί Παράγοντες

Ο αιματο-ορχικός φραγμός εμποδίζει τις πρωτεΐνες του σπέρματος να αλληλεπιδράσουν με το ανοσοποιητικό σύστημα και έτσι αποτρέπεται η ανάπτυξη ανοσολογικής απόκρισης κατά αυτών. Ένας τραυματισμός, μια μόλυνση ή μια φλεγμονή μπορούν να προκαλέσουν ρήξη του προστατευτικού φραγμού, οδηγώντας στην δημιουργία αντισωμάτων έναντι των σπερματοζωαρίων (Wiser et al 2012). Τα αντισώματα αυτά παρουσιάζουν ετερογένεια και μπορεί να αναγνωρίζουν πρωτεΐνες της κεφαλής των σπερματοζωαρίων, επηρεάζοντας έτσι την ικανότητα σύνδεσής τους με το ωάριο ή πρωτεΐνες στην ουρά του σπερματοζωαρίου, με αποτέλεσμα να προκαλούν μειωμένη κινητικότητα (Walsh et al. 2009).

14. Θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας

14.1. Εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF)

Το πρώτο “παιδί του σωλήνα”, γεννήθηκε το 1978 γεγονός που αποτέλεσε ορόσημο στο πεδίο της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Steptoe και Edwards και ακολουθείται όταν το σπέρμα δεν παρουσιάζει σοβαρά προβλήματα. Πριν την εφαρμογή της IVF προκαλείται διέγερση των ωοθηκών με ορμονική θεραπεία με σκοπό την παραγωγή περισσότερων του ενός ωαρίων. Όταν η διαδικασία παρακολούθησης της ωρίμανσης των ωαρίων δείξει ότι τα ωάρια έχουν ωριμάσει παραλαμβάνονται από τις ωοθήκες και μεταφέρονται σε ειδικό καλλιεργητικό μέσο. Το σπέρμα υφίσταται επεξεργασία και συλλέγονται τα καλύτερα σπερματοζωάρια, τα οποία τοποθετούνται μαζί με τα ωάρια για να επιτευχθεί γονιμοποίηση των ωαρίων *in vitro* (Edwards and Broody, 1995). Ωστόσο, η μέθοδος αυτή δεν ενδείκνυται σε περιπτώσεις όπου τα σπερματοζωάρια παρουσιάζουν μικρό αριθμό και κινητικότητα.

14.2. Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπερματοζωαρίων (ICSI)

Η εισαγωγή της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπερματοζωαρίων (ICSI) από τους Palermo et al, το 1992 αποτέλεσε καθοριστικό βήμα για τη θεραπευτική αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού υπογόνιμων ζευγαριών με σοβαρό ανδρικό παράγοντα υπογονιμότητας. Η θεραπευτική αυτή προσέγγιση ενδείκνυται στην περίπτωση ατόμων που πάσχουν από ολιγοζοασθενοτεροσπερμία και εφαρμόζεται όταν η μέθοδος της εξωσωματικής γονιμοποίησης δεν είναι αποτελεσματική. Κατά την ICSI, ένα και μόνο υγιές σπερματοζώαριο εισάγεται μέσα στο ώριμο ωάριο μέσω της διαδικασίας της μικροέγχυσης επιτυγχάνοντας τη γονιμοποίησή του (Palermo et al. 1992) (Εικόνα 10.).



Εικόνα 10. Ενδοκυτταροπλασματική έγχυση σπέρματος (ICSI). Με τη βοήθεια ειδικού μικροσκοπίου και ειδικών διατάξεων γίνεται έγχυση ενός επιλεγμένου σπερματοζωαρίου μέσα στο ωάριο

Σκοπός

Τα τελευταία χρόνια, παρατηρείται αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη διάγνωση, πρόγνωση και θεραπεία της ανδρικής υπογονιμότητας. Δεδομένου ότι, η ομαλή διεξαγωγή της σπερματογένεσης, της κίνησης και της λειτουργίας των σπερματοζωαρίων είναι άμεσα συνυφασμένη με τον μηχανισμό παραγωγής ενέργειας στα μιτοχόνδρια, θεωρείται πιθανό βλάβες του μιτοχονδριακού γονιδιώματος να σχετίζονται με τη μειωμένη γονιμότητα στον άνθρωπο.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού γονιδιώματος όσον αφορά την επίδρασή τους στην ποιότητα και γονιμοποιητική ικανότητα του σπέρματος. Η βαθύτερη κατανόηση των παραγόντων που οδηγούν σε προβλήματα γονιμότητας, μπορούν να οδηγήσουν στη στοχευμένη διερεύνηση, διάγνωση και κατάλληλη αντιμετώπιση των διαταραχών ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα της αναπαραγωγικής επιτυχίας. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα αίματος και σπέρματος υπογόνιμων και γόνιμων ανδρών με προβλήματα τεκνοποίησης οι οποίοι είχαν καταφύγει στη λύση της εξωσωματικής γονιμοποίησης.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε γενετικό υλικό που απομονώθηκε από βιολογικό δείγμα αίματος και σπέρματος υπογόνιμων και φυσιολογικών ανδρών. Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο κέντρο εξωσωματικής γονιμοποίησης "EMBRYOLAB". Τα δείγματα που μέχρι τώρα παραλήφθηκαν και αναλύθηκαν είναι 33 (18 φυσιολογικοί και 15 με διάφορους μη φυσιολογικούς φαινοτύπους σπέρματος). Τα δείγματα σπέρματος μετά τη συλλογή τους αναλύθηκαν και κατατάχθηκαν σύμφωνα με τα κριτήρια του WHO (Πίνακας 1). Επίσης δίνονται πληροφορίες για τον τρόπο της θεραπείας που έχει ακολουθηθεί μέχρι τώρα καθώς και των επιπέδων της β-χοριακής γοναδοτροπίνη (B-HCG) τα οποία μπορεί να είναι ενδεικτικά μιας πιθανής κύησης. Πρέπει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τον κώδικα δεοντολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, η έρευνα στο ανθρώπινο βιολογικό υλικό δεσμεύεται από τις αρχές της συναίνεσης ύστερα από πληροφόρηση του δότη, και της προστασίας των ευαίσθητων προσωπικών δεδομένων που συλλέγονται και υπόκεινται σε επεξεργασία.

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων σπέρματος βάσει των κριτηρίων του WHO

Δείγμα	Ηλικία	Αριθμός	Κινητικότητα	Μορφολογία	Θεραπεία	B-HCG
1	39	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
2	43	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
3	42	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
4	40	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογικός	IVF	Θετική
5	37	Ολιγοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογικός	IVF	Θετική
6	45	Φυσιολογικός	Φυσιολογική	Φυσιολογική		
7	44	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
8	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
9	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
10	42	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
11	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
12	35	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
13	30	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
14	31	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
15	43	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
16	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
17	46	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Τερατοσπερμία	IVF	Αρνητική
18	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
19	36	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
20	38	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
21	39	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
22	47	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	
23	39	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
24	35	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
25	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Θετική
26	38	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
27	37	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική
28	41	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
29	31	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Θετική
30	41	Ολιγοζωοσπερμία	Ασθενοζωοσπερμία	Τερατοζωοσπερμία	IVF	
31	35	Φυσιολογική	Ασθενοζωοσπερμία	Φυσιολογική	IVF	Θετική
32	37	Ολιγοζωοσπερμία	Φυσιολογική	Τερατοζωοσπερμία	IVF	Αρνητική
33	40	Φυσιολογική	Φυσιολογική	Φυσιολογική	IVF	Αρνητική

2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

2.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από σπέρμα

Υλικά

- Αιθανόλη 70%
- Lysis Buffer: 10Mm Tris-HCl pH 8.0, 100Mm NaCl, 10Mm EDTA, 0,5% SDS
- Triton-X100 (0,5%)
- DTT 0,1M
- Πρωτεΐνάση K 100mg/ml

Μεθοδολογία

Για την απομόνωση του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm" (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα. Το ανθρώπινο σπέρμα αποτελείται από σπερματικό υγρό και σπερματοζώαρια. Το σπερματικό υγρό περιλαμβάνει πρωτεϊνικά και μη πρωτεϊνικά συστατικά όπως είναι η φρουκτόζη, τα οποία μπορούν να μειώσουν την ποιότητα και την καθαρότητα του DNA. Για το λόγο αυτό συνίσταται η απομάκρυνση του σπερματικού υγρού με τη χρήση αιθανόλης. Από την άλλη πλευρά, τα σπερματοζώαρια περιβάλλονται από μια λιπιδική μεμβράνη πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς. Η δομή της μεμβράνης εμποδίζει τη λύση των κυττάρων και δυσχεραίνει την απομόνωση του γενετικού υλικού. Προκειμένου να παρακαμφθεί αυτό το εμπόδιο χρησιμοποιείται ένας ισχυρός αντιοξειδωτικός παράγοντας, το DDT. Επιπλέον, η σύσταση του διαλύματος ομογενοποίησης (Lysis Buffer) επιτρέπει την ρήξη των κυτταρικών /πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Ακόμα, το διάλυμα ομογενοποίησης (Lysis Buffer) περιέχει EDTA έναν χηλικό υποκαταστάτη, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Τα μεταλλικά ιόντα αποτελούν συμπαράγοντα για τη δράση των δεσοξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επίσης, η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή. Τέλος, το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η πρωτεΐνάση K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όμως, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο, ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

1. Πλύση 100 μl σπέρματος με προσθήκη 500 μl αιθανόλης (70%)
2. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.000 rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Το υπερκείμενο απομακρύνεται.
3. Τα στάδια (1),(2) επαναλαμβάνονται και συλλέγεται το ίζημα.
4. Προσθήκη 500 μl διαλύματος ομογενοποίησης, Lysis Buffer.
5. Προσθήκη 2,5 μl Triton-X100 (0,5%), 200 μl DTT (0,1M) και 40 μl πρωτεΐνάσης K (10mg/ml).
6. Ανάδευση του μίγματος και επώαση για 2-3 ώρες στους 50°C (υπό ανάδευση).
7. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 13.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου eppendorf.

2.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από αίμα

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από δείγματα αίματος πραγματοποιήθηκε με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen).

3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

3.1. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Μεθοδολογία

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη /χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται φαινόλη για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δυο διακριτών φάσεων, της υδατικής φάσης που βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης που βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, προσδίδοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης /χλωροφορμίου και ακολουθεί ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 13,000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C ώστε να γίνει διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση.
3. Η υδατική φάση, στην οποία βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 ml), αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 13,000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
4. Στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Έπειτα, το DNA επανακάτается με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3.2. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

Υλικά

- CH₃COONa (3M)
- Αιθανόλη
- TE-buffer

Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na^+ , τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων.

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου (CH_3COONa), όγκου V/10, συγκέντρωσης 3M και αιθανόλη όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται -80°C για 1-2 ώρες και έπειτα φυγοκεντρείται στις 13,000 rpm για 20 λεπτά στους 4°C .
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 500μl αιθανόλης 75%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000 στροφές για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξεραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε TE-buffer ή υδατικό διάλυμα.

4. Ποσοτικός Προσδιορισμός του DNA

4.1. Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή της οπτικής απορρόφησης 1 ($\text{OD}_{260} = 1$) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ δίκλωνου DNA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ μονόκλωνου DNA ή και $\sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ για μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA και RNA ο λόγος $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0.

4.2. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ενδείκνυται σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης ή καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την ένωση βρωμιούχο αιθίδιο, με τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή και η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder). Η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος αγαρόζης 1% είναι περίπου 10 ng DNA.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR

Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης εφαρμόστηκε για πρώτη από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Faloona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών. Το 1993 απονεμήθει στον Δρ Κ.Mullis το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

Στάδια της αντίδρασης

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Την αποδιάταξη του DNA που πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα.
2. Την υβριδοποίηση των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση (T_a) ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m).
3. Την επιμήκυνση από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος κι τη συγκέντρωση της αλληλουχίας του στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72°C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

Συστατικά της αντίδρασης

Μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

1. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Ωστόσο για την κάθε αντίδραση απαιτείται συγκεκριμένης ποσότητας και ποιότητας DNA.
2. Την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al. 1988) και επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης.
3. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα.

- Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος $MgCl_2$. Η παρουσία των ιόντων Mg^{+2} είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.
- Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0,2mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου.
- Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR.

Εκκινητές	Αλληλουχία (5'→3')	Θερμοκρασία αποδιάταξης (Tm)	Μέγεθος PCR προϊόντος	Θέση υβριδοποίησης στο γονιδίωμα
ATP6_F	CAACCGACTAATCACCAC	52.75 °C	332 bp	8644
ATP6_R	AGTAGGCTGATGGTTTCG	53.95 °C		8976
ATP8_F	TCTAGAGCCCACTGTAAAGC	57,3 °C	380 bp	8286
ATP8_R	TTGGGTGGTGATTAGTCGG	56 °C		8664
ND2_F	CTCTTCAACAATATACTCTC	51,1 °C	324 bp	4692
ND2_R	GGAGTATGCTAAGATTTTGC	53,2 °C		5016
ND4_F	CAAACCCCTGAAGCTTCAC	59,4 °C	347 bp	11670
ND4_R	GAGTGAGCCCCATTGTGTTG	59,4 °C		12017
COI_F	CATAAGCTTCTGACTCTTAC	53,2 °C	170 bp	6200
COI_R	GAGACACCTGCTAGGTGTAA	57,3 °C		6370
COII7601_F	CAAGTAGGTCTACAAGACGC	57,3 °C	343 bp	7601
COII7944_R	GAGTTGAAGATTAGTCCGCCG	59,8 °C		7944
COII7982_F	CTGCGACTCCTTGACGTTGA	59,4 °C	291 bp	7982
COII8273_R	GGTGCTATAGGGTAAATACG	55,3 °C		8273
ND512498_F	CATGTGCCTAGACCAAGAAG	57,3 °C	360 bp	12498
ND512858_R	GTATAGGATTGCTTGAATGC	53,2 °C		12858
ND513588_F	CTGACAAGCGCCTATAGC	56 °C	260 bp	13588
ND513848_R	GAGGTCTAGGGCTGTTAG	56 °C		13848
tRNA ^{leu} _F	CACGTTGGGGCCTTTGCGTA	61,4 °C	274 bp	3130
tRNA ^{leu} _R	AGGACAAGAGAAATAAGGCC	55,3 °C		3404

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για τις αντιδράσεις PCR παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 5.2. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR

	Ποσότητες	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική Συγκέντρωση
DNA*	2μL DNA από σπέρμα 0,5 μL DNA από αίμα		
Buffer	5 μL	10X (Mg ²⁺ 15mM)	1X (Mg ²⁺ 1.5mM)
MgCl₂	1 μL	25 mM	0.5 mM
dNTPs	1 μL	40 mM	0.8 mM
Εκκινητής Fw	1 μL	50 pmol/μL	1 pmol/μL
Εκκινητής Rv	1 μL	50 pmol/μL	1 pmol/μL
KAPA Taq	0.2 μL	5 U/μL	0.02 U/μL
ddH₂O	Έως τα 50 μL	-	-

- Το πρωτόκολλο αυτό χρειάστηκε να τροποποιηθεί όσον αφορά την ποσότητα του DNA που χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να παραχθεί το επιθυμητό προϊόν.

Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε , με τις θερμοκρασίες και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται παρακάτω.

Πίνακας 5.3. Το πρόγραμμα της PCR που εφαρμόστηκε

Πρόγραμμα PCR	
Initial denaturation	95°C, 4min
Denaturation	94°C, 40 sec
Primer annealing	54 °C, 40 sec
Extension	72°C, 40 sec
Final extension	72°C, 10 min

6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό κομματιών DNA. Βασίζεται στην αρχή της μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους.

- Την συγκέντρωση της αгарόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αгарόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πηκτώματα αгарόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση αгарόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από την III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.
- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση η κινητικότητα των γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Σε υψηλότερη ένταση η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή σε κάθε κομμάτι DNA.
- Την παρουσία χρωστικών. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αναιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και η κινητικότητά της. Στο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξηθεί ακόμα περισσότερο η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Οι κινητικότητες των μορφών II και III μειώνονται με διαφορετικό βαθμό η καθεμία.
- Τη σύσταση και την ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται με πολύ αργό ρυθμό ή καθόλου. Διαλύματα με υψηλό βαθμό ιοντισμού δημιουργούν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα που σαν αποτέλεσμα έχει την ανάπτυξη θερμότητας στη συσκευή. Στη χειρότερη περίπτωση, το πήκτωμα λειώνει και το DNA αποδιατάσσεται.

Υλικά

- Loading Buffer
- TAE 0,5X
- Αγαρόζη
- Βρωμιούχο αιθίδιο
- Ladder

Μεθοδολογία

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 0,5 x TAE. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0.1 µg/ml.
3. Πριν τη στερεοποίηση του πηκτώματος, το διάλυμα εισάγεται σε ένα γυάλινο καλούπι συγκεκριμένων διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής). Οι θέσεις των δειγμάτων DNA (πηγαδάκια) σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading buffer.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

7. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο διαχωρισμό μονόκλωνων τμημάτων DNA βάσει των διαφορών της κινητικότητάς τους σε πηκτή ηλεκτροφόρησης. Η διαφορετική κινητικότητα των τμημάτων αντανακλά διαφορές στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία. Συγκεκριμένα, κατά την ηλεκτροφόρηση τα μονόκλιωνα τμήματα DNA αποκτούν μια συγκεκριμένη δευτεροταγή διαμόρφωση η οποία τους προσδίδει χαρακτηριστική κινητικότητα. Η μέθοδος αυτή έχει καλή διακριτική ικανότητα καθώς, διαφορετικά τμήματα DNA μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους ακόμα και όταν διαφέρουν κατά ένα μόνο νουκλεοτίδιο. Έτσι, τμήματα DNA του ίδιου γονιδίου που έχουν ενισχυθεί μέσω PCR, από διαφορετικά άτομα και που παρουσιάζουν νουκλεοτιδικές διαφορές, θα έχουν και διαφορετική κινητικότητα κατά την ηλεκτροφόρηση και επομένως θα είναι δυνατή η διάκρισή τους (Melcher, 2000), Orita et al. (1989).

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια:

- Αποδιάταξη των προϊόντων της PCR
- Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης
- Χρώση της πηκτής

7.1. Αποδιάταξη των προϊόντων της PCR

Υλικά

Αποδιατακτικό διάλυμα: Formamide 95%, Bromophenol blue 0,05%, Xylene Cyanol 0,05%, NaOH 10 mM

Μεθοδολογία

Σε 5-7 μl προϊόντος PCR (ανάλογα με την συγκέντρωσή του) προστίθενται 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τα δείγματα αποδιατάσσονται για 7 min στους 99°C. Σκοπός της αποδιάταξης είναι η μετατροπή των δίκλωνων τμημάτων DNA σε μονόκλινα. Ακολούθως τα δείγματα τοποθετούνται σε πάγο όπου διατηρούνται σε μονόκλινη κατάσταση.

7.2. Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Υλικά

- Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% (100ml) : Ακρυλαμίδα 37,5g, Bis-acrylamide 1g, ddH₂O έως τα 100ml
- TBE 10x (2lt): Tris Base 0,5 M, Boric acid 0,04 M, EDTA 0,02 M, ddH₂O έως τα 2lt
- Glycerol 50% v/v
- APS 20% w/v: Ammonium Persulfate 2gr, ddH₂O έως τα 10ml
- TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 10% και 12%

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 10% αναγράφονται στον πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1. Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 10%

	Ποσότητα	Τελικές Συγκεντρώσεις
Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5%	16 ml	10%
Glycerol 50%	6,25 ml	5%
TBE 10x	5 ml	0,8%
TEMED	62,5 ml	
APS 20%	310 ml	0,1 %
ddH ₂ O	Έως τα 62,5 ml	
Συνολικός όγκος	62,5 ml	

7.3. Χρώση πηκτής πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφόρησης γίνεται χρώση των πηκτών με νιτρικό άργυρο. Η τεχνική αυτή βασίζεται στο γεγονός ότι ο άργυρος συνδέεται στο DNA και στη συνέχεια αντιδρά με την φορμαλδεΐδη, παρουσία βάσης. Οι ζωνώσεις του DNA εμφανίζονται με καφέ χρώμα σε κίτρινο φόντο (Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Υλικά

- Διάλυμα 1 (400ml): EtOH 2%, Acetic Acid 0,125%, ddH₂O ως τα 400ml
- Διάλυμα 2 (200ml)
- Διάλυμα AgNO₃: 1gr/lit
- Διάλυμα 3 (200ml): NaOH 0,015 M, NaBH₄ 50 μM, Formaldehyde 0,2%, ddH₂O έως τα 200ml

Μεθοδολογία

Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, οι πηκτές εμβαπτίζονται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύονται για 3 λεπτά. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση των πηκτών με αποσταγμένο νερό για 1 min υπό ανάδευση. Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και οι πηκτές επωάζονται για 15 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δυο πλύσεις με αποσταγμένο νερό, διάρκειας 1 min η κάθε μία υπό ανάδευση. Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι την εμφάνιση ορατών ζωνών στις πηκτές.

8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Ταq πολυμεράση και τα υπόλοιπα συστατικά της αντίδρασης εκτός του PCR προϊόντος.

Στη συνέχεια πραγματοποιείται αλληλούχηση των PCR προϊόντων η οποία βασίζεται στη μέθοδο Sanger. Η αλληλούχηση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) έχει σημειωθεί με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική με αποτέλεσμα όταν διεγερθούν από κατάλληλη δεσμίδα laser να εκπέμπουν φθορισμό σε διαφορετικό μήκος κύματος. Ο φθορισμός που παράγεται καταγράφεται και μέσω ειδικών υπολογιστικών συστημάτων, η αλληλουχία του DNA λαμβάνεται με τη μορφή χρωματογραφήματος.

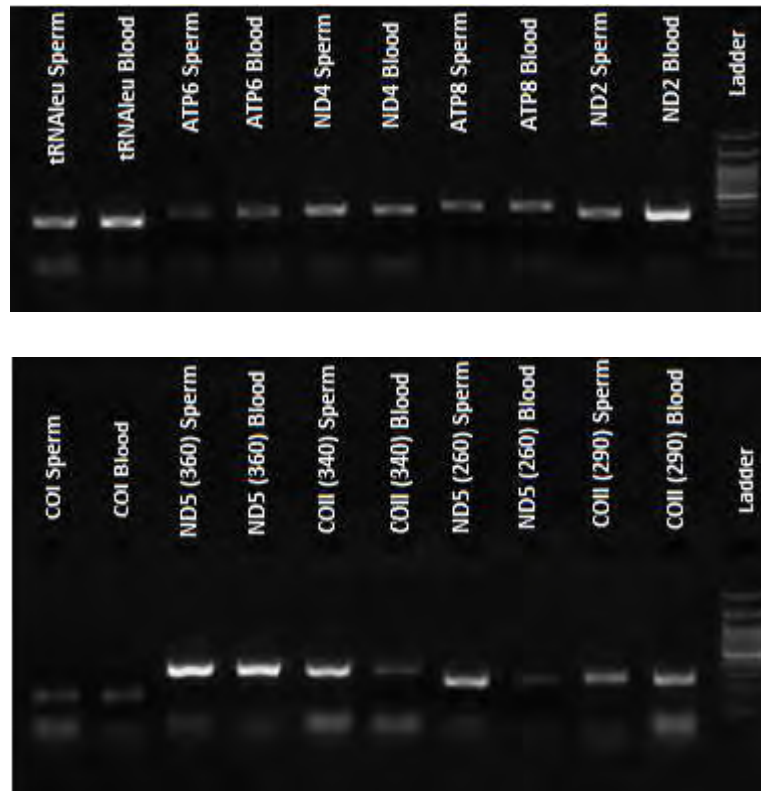
Η ανάλυση των χρωματογραφήματων της αλληλούχησης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δυο αλυσίδες (με διαφορετικό εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δυο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαράτιθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (Thompson et al, 1997) (ClustalX) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή. Με τη χρήση του ίδιου υπολογιστικού προγράμματος είναι δυνατή η ομοπαράθεση και σύγκριση πολλαπλών αλληλουχιών για την εύρεση πολυμορφικών, συντηρημένων θέσεων καθώς και πιθανών μεταλλάξεων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. PCR ενίσχυση επιλεγμένων μιτοχονδριακών γενετικών τόπων

Οι μιτοχονδριακοί γενετικοί τόποι που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, ενισχύθηκαν μέσω της αντίδρασης PCR, με τη χρήση κατάλληλων ζευγών εκκινητών (Πίνακας 5.1) και σύμφωνα με το κατάλληλο πρωτόκολλο (Πίνακας 5.2) και πρόγραμμα (Πίνακας 5.3).

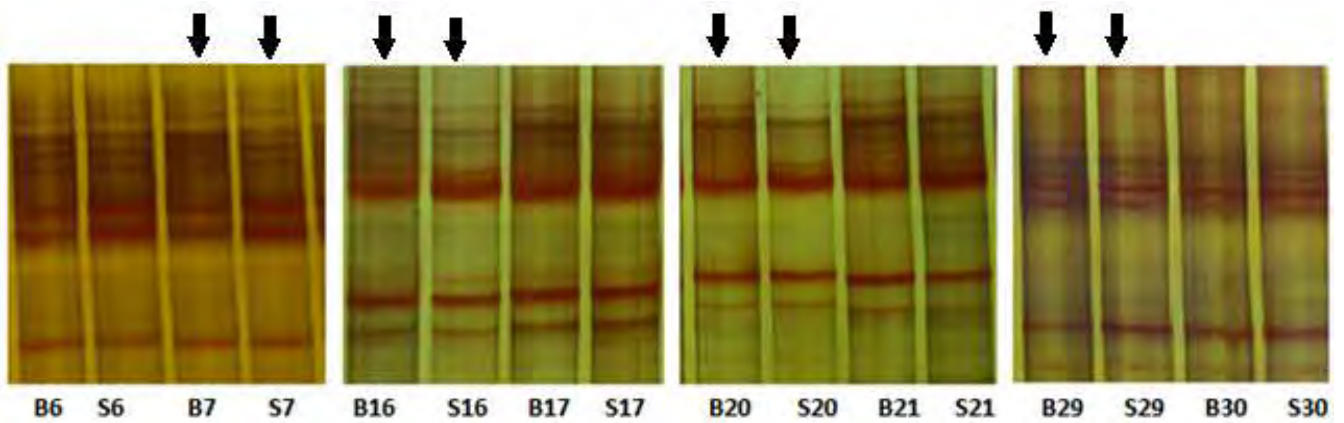
Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτη αγαρόζης 1,5% παράλληλα με μάρτυρα τμημάτων γνωστών μοριακών μεγεθών (ladder), για τον έλεγχο της ενίσχυσης του επιθυμητού γονιδιακού τμήματος και την εκτίμηση του μεγέθους του προϊόντος PCR. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζονται τα διάφορα γονιδιακά τμήματα που ενισχύθηκαν τόσο από δείγματα αίματος όσο και σπέρματος.



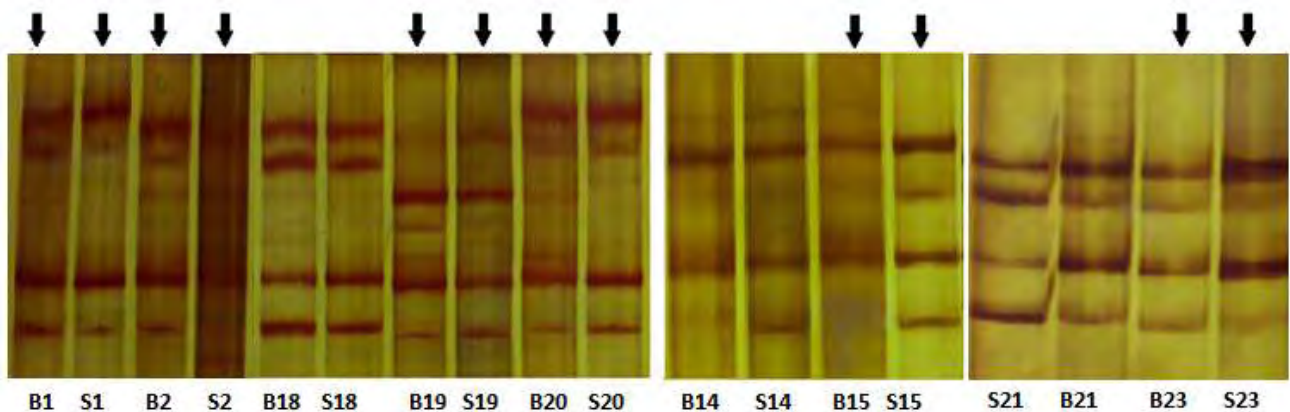
Εικόνα 1.1. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%).

2. Έλεγχος πολυμορφισμού εντός των επιλεγμένων μιτοχονδριακών γενετικών τόπων

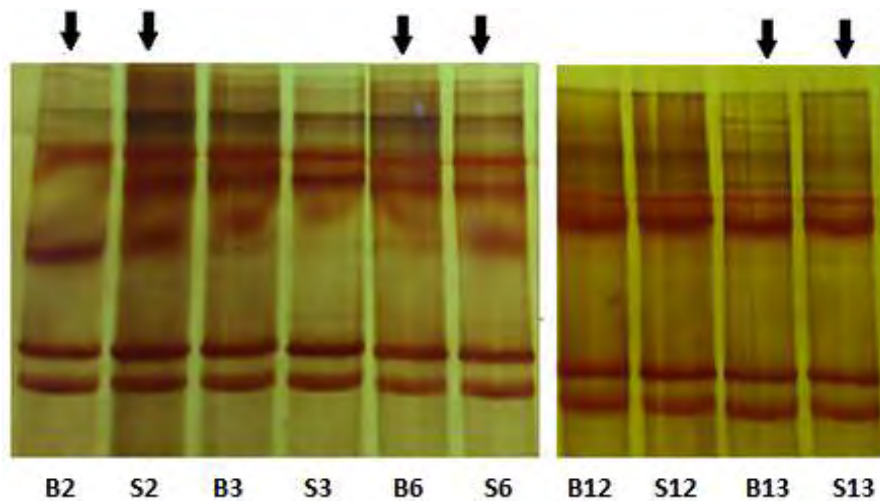
Ο έλεγχος για την ύπαρξη πολυμορφισμών εντός των γονιδιακών τμημάτων που ενισχύθηκαν, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της τεχνική SSCP. Η τεχνική αυτή επέτρεψε τον κατάλληλο διαχωρισμό των τμημάτων βάσει της διαφορετικής αλληλουχίας τους. Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνών που δημιουργήθηκε κατά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.



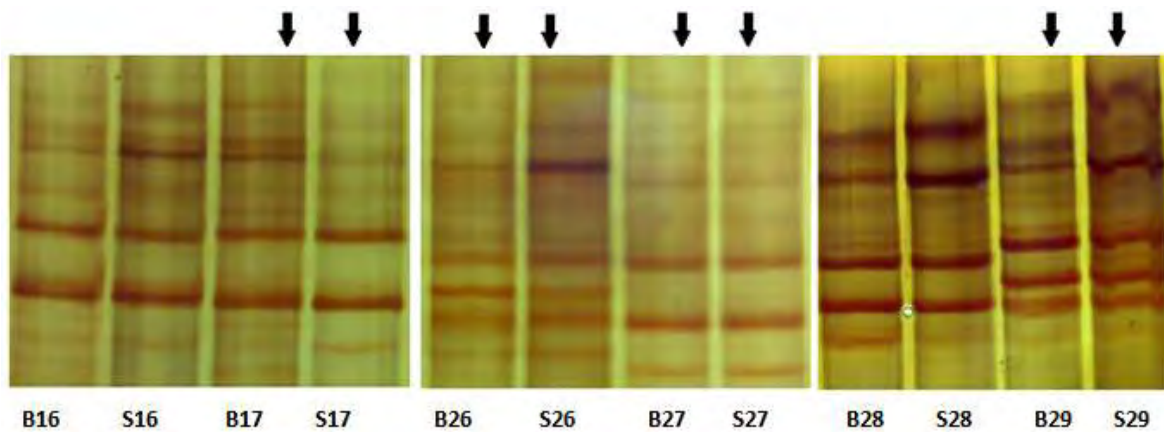
Εικόνα 2.1. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής ND2 (324 bp) του μιτοχονδρίου. Με το γράμμα "B" συμβολίζονται τα δείγματα αίματος (Blood) ενώ με το γράμμα "S" συμβολίζονται τα δείγματα σπέρματος (Sperm). Ο αριθμός δίπλα στο γράμμα αναφέρεται στον αριθμό του κάθε δείγματος. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B7, S7, B17, S17, B21, S21, B30, S30) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B6, S6, B17, S17, B21, S21, B30, S30).



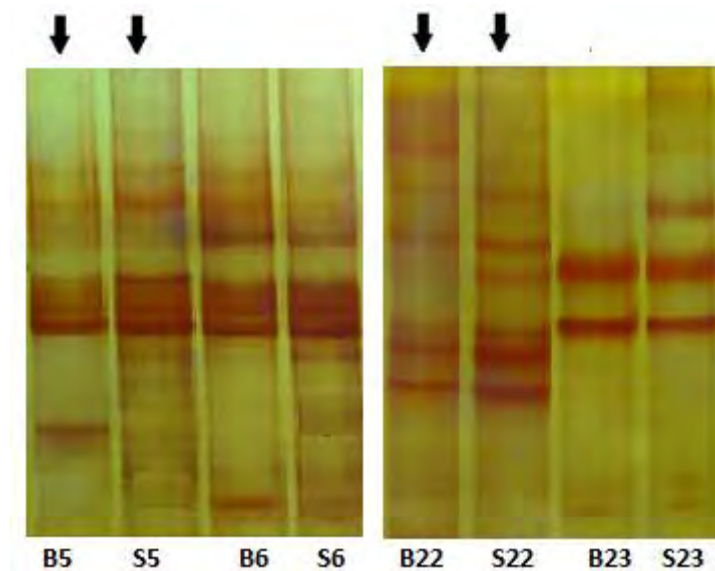
Εικόνα 2.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής ND4 (347 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B1, S1, B19, S19, B20, S20, B15, S15) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B18, S18, B14, S14).



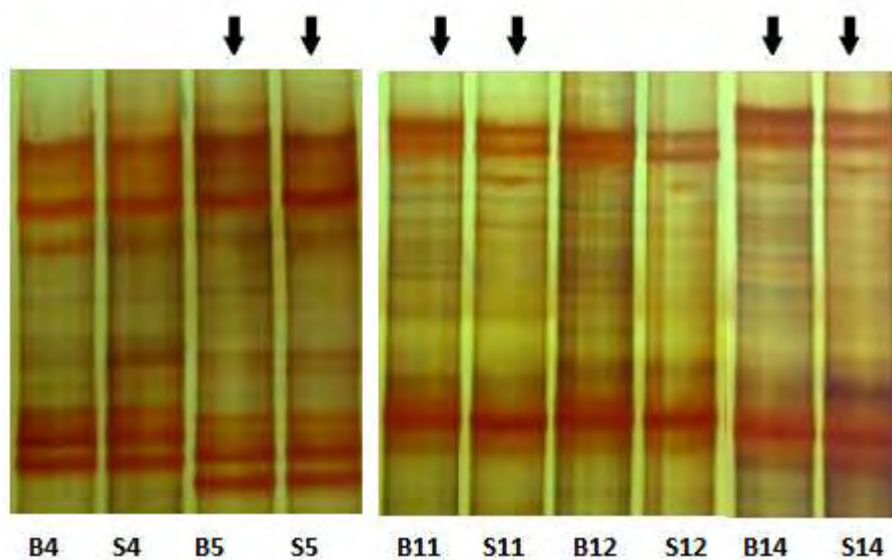
Εικόνα 2.3. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής ND5 (360 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B2, S2, B6, S6, B13, S13) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B3, S3, B12, S12).



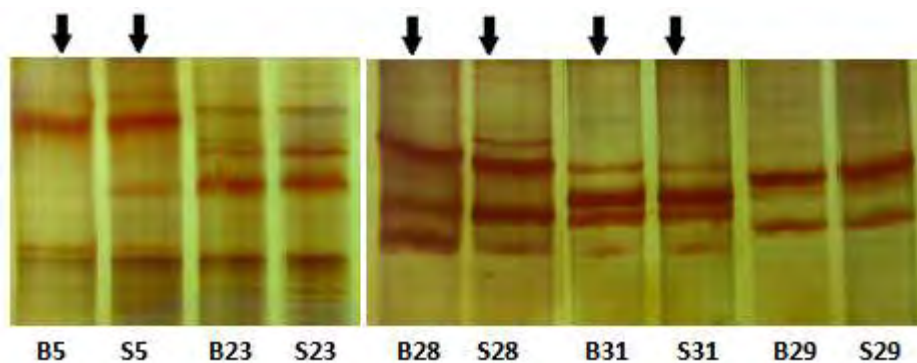
Εικόνα 2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής ND5 (260 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B17, S17, B26, S26, B27, S27, B29, S29) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B16, S16, B28, S28).



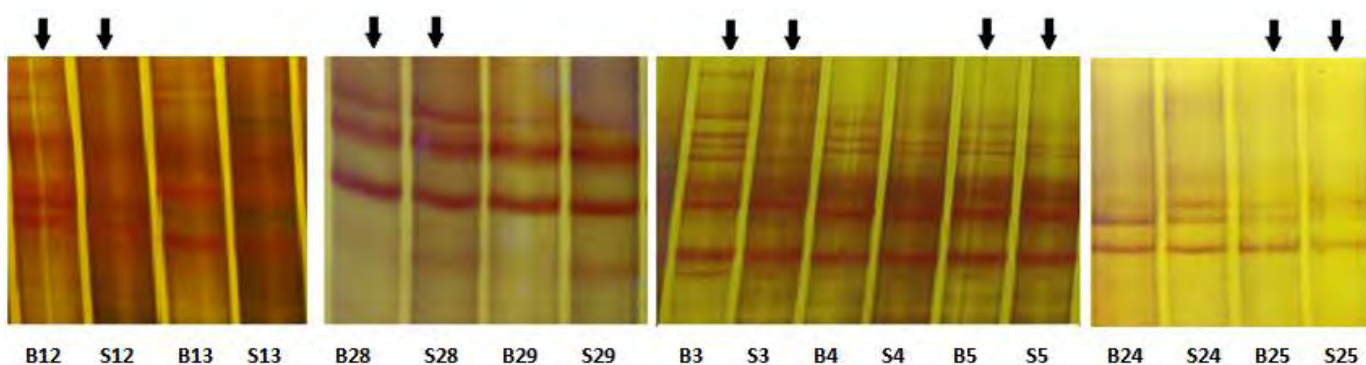
Εικόνα 2.5. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (12%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής COI (170 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B5, S5, B22, S22) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B6, S6, B23, S23).



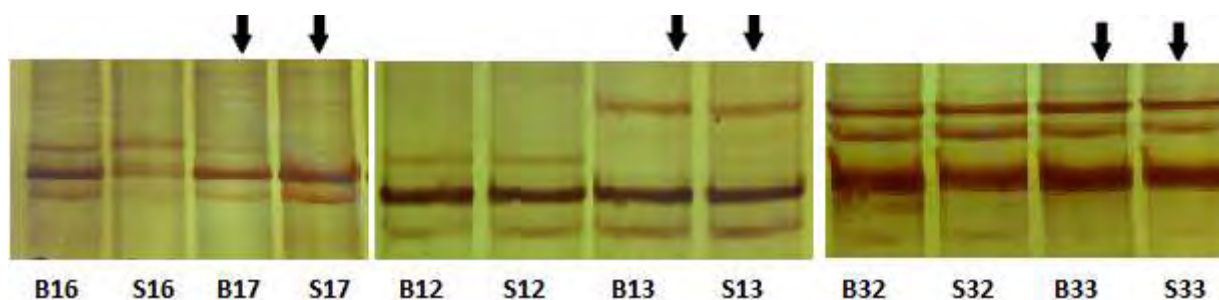
Εικόνα 2.6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής COII (290 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B5, S5, B11, S11, B14, S14) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B4, S4, B12, S12).



Εικόνα 2.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής COII (340 bp) του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B5, S5, B28, S28, B31, S31) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B23, S23, B29, S29).



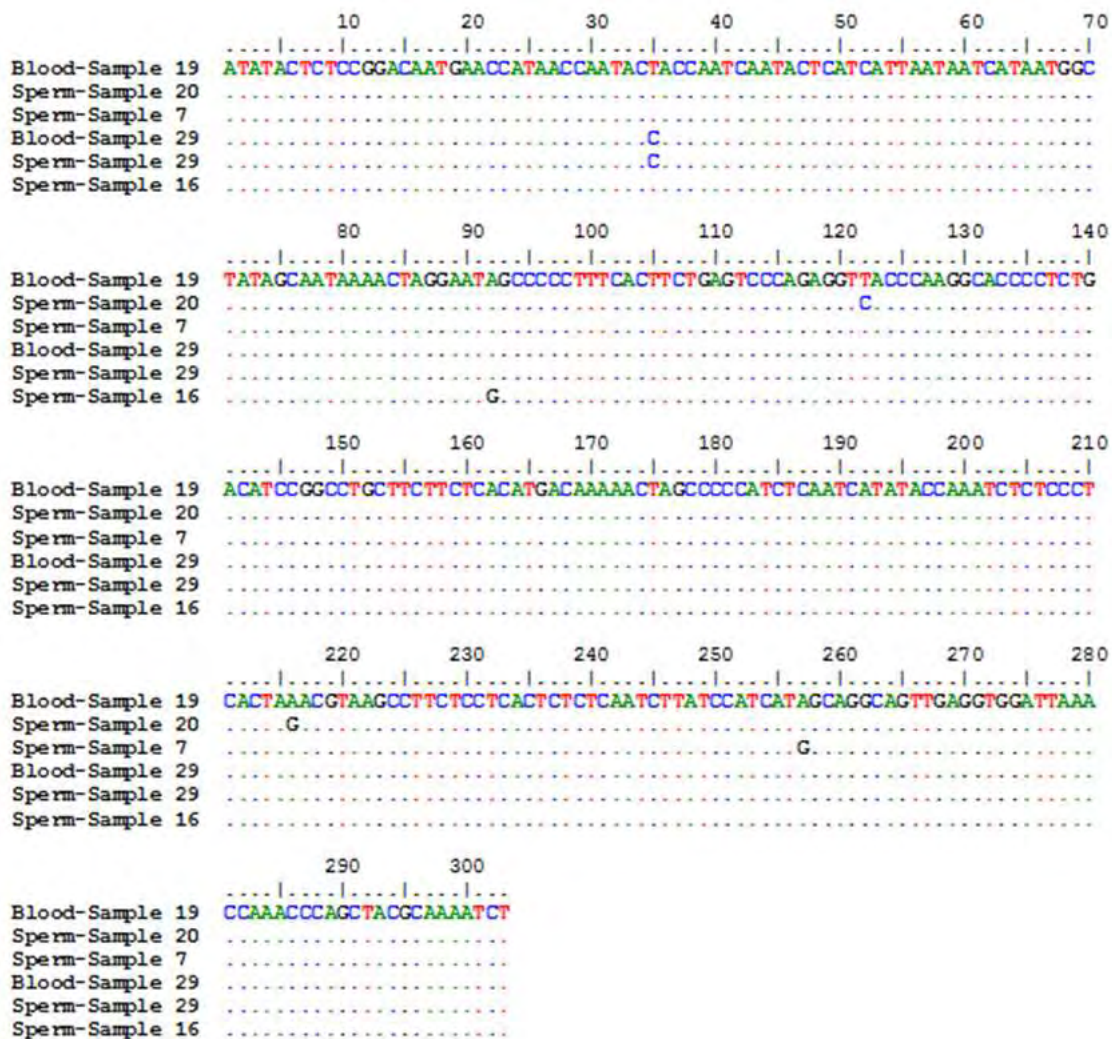
Εικόνα 2.7. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA που περιλαμβάνει το γονίδιο tRNA leu (UUR) και αλληλουχίες των γονιδίων ND1 και rRNA 16S. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B5, S5, B3, S3, B12, S12, B25, S25, B28, S28) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B13, S13, B24, S24, B29, S29).



Εικόνα 2.8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης (10%) τμημάτων της γονιδιωματικής περιοχής ATP6 του μιτοχονδρίου. Με το βέλος συμβολίζονται τα διαφορετικά πρότυπα (B13, S13, B17, S17, B33, S33) συγκριτικά με το συνηθέστερο (B12, S12, B16, S16, B32, S32).

3. Αλληλούχιση επιλεγμένων γονιδιακών τμημάτων

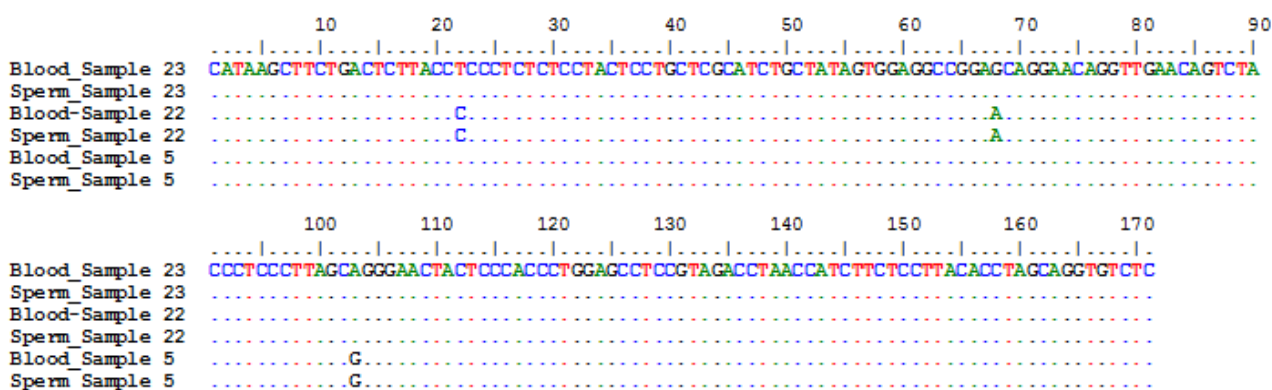
Πολυμορφικά αλλά και μη γονιδιακά τμήματα επιλέχθηκαν και αφού καθαρίστηκαν με τη χρήση κατάλληλου kit, στάλθηκαν για αλληλούχιση, με τους ίδιους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Οι αλληλουχίες που προέκυψαν από την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων καθώς και οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν παρουσιάζονται παρακάτω. Επίσης, αναφέρεται η συχνότητα με την οποία απαντάται η μετάλλαξη στη βάση δεδομένων GenBank καθώς και η συντήρηση της νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (MITOMAP).



Εικόνα 3.1. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής ND2 (324 bp).

Πίνακας 3.1. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδωματικής περιοχής ND2 στα δείγματα που αναλύθηκαν.

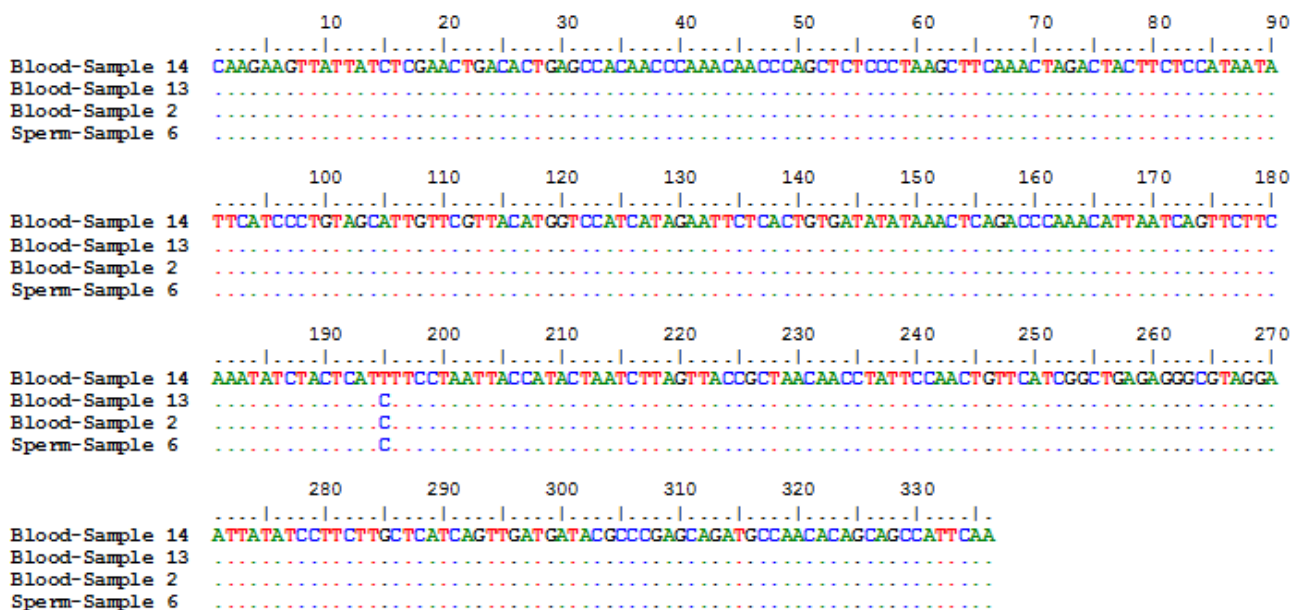
ND2	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	T4736C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,13	15,56
	A4793G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,93	37,78
	T4823C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,44	97,78
	A4917G	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη Asn→Asp	5,21	91,11
	A4958G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,44	20,00



Εικόνα 3.2. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής COI (170 bp).

Πίνακας 3.2. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδωματικής περιοχής COI στα δείγματα που αναλύθηκαν.

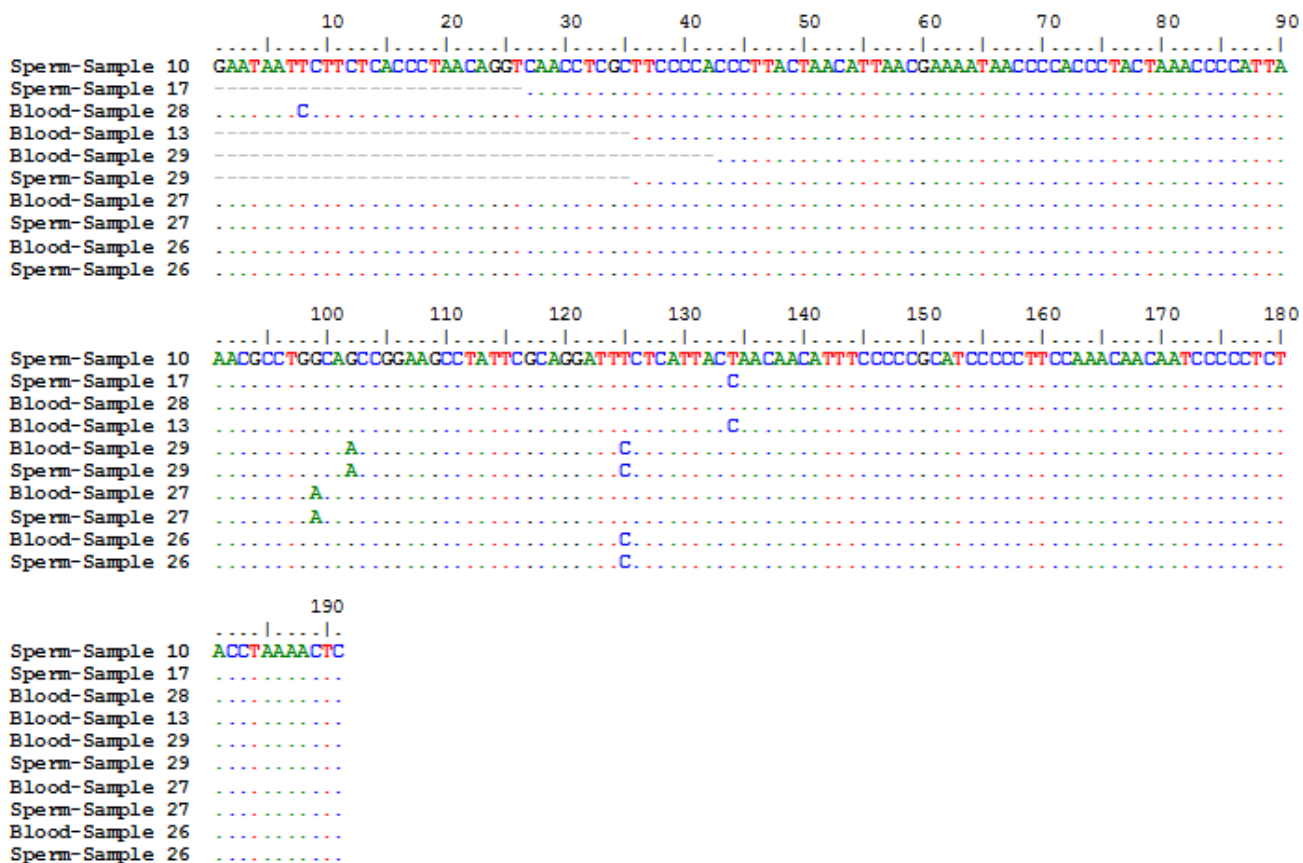
COI	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	G6261A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,52	97,78
	G6267A	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη Ala→Thr	0,17	91,11
	A6302G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,02	95,56



Εικόνα 3.3. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής ND5 (360 bp).

Πίνακας 3.3. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής ND5 (360 bp) στα δείγματα που αναλύθηκαν.

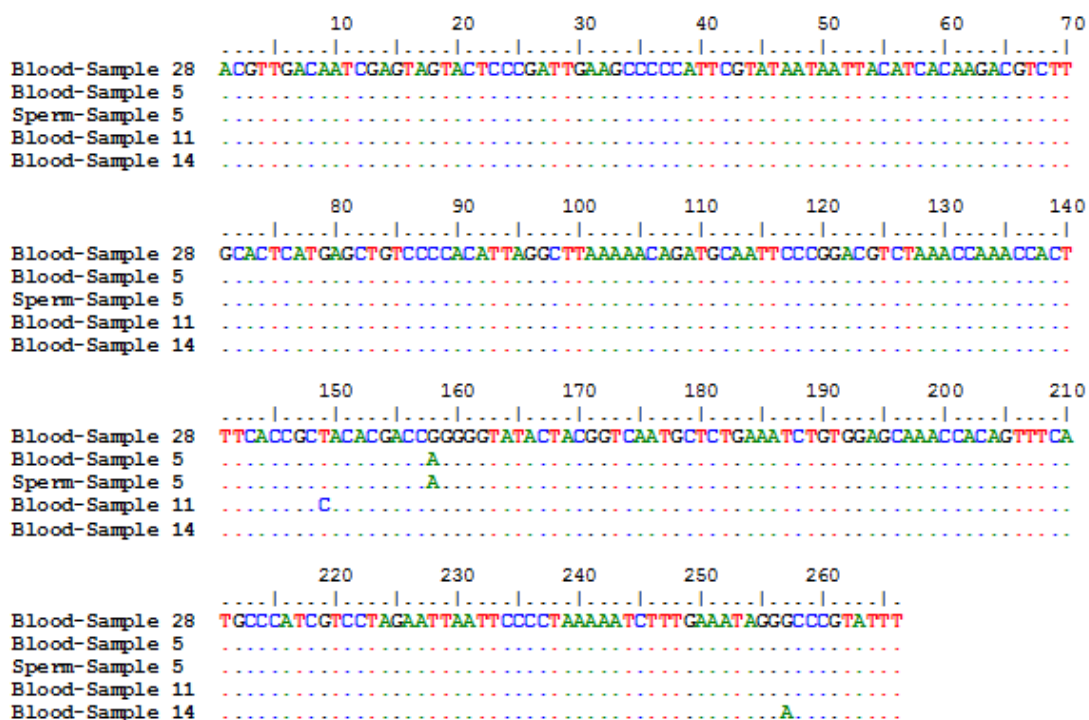
ND5 (360 bp)	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	C12705T	Συνώνυμη Μετάλλαξη	38,90	28,89



Εικόνα 3.4. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής ND5 (260 bp).

Πίνακας 3.4. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής ND5 (260 bp) στα δείγματα που αναλύθηκαν.

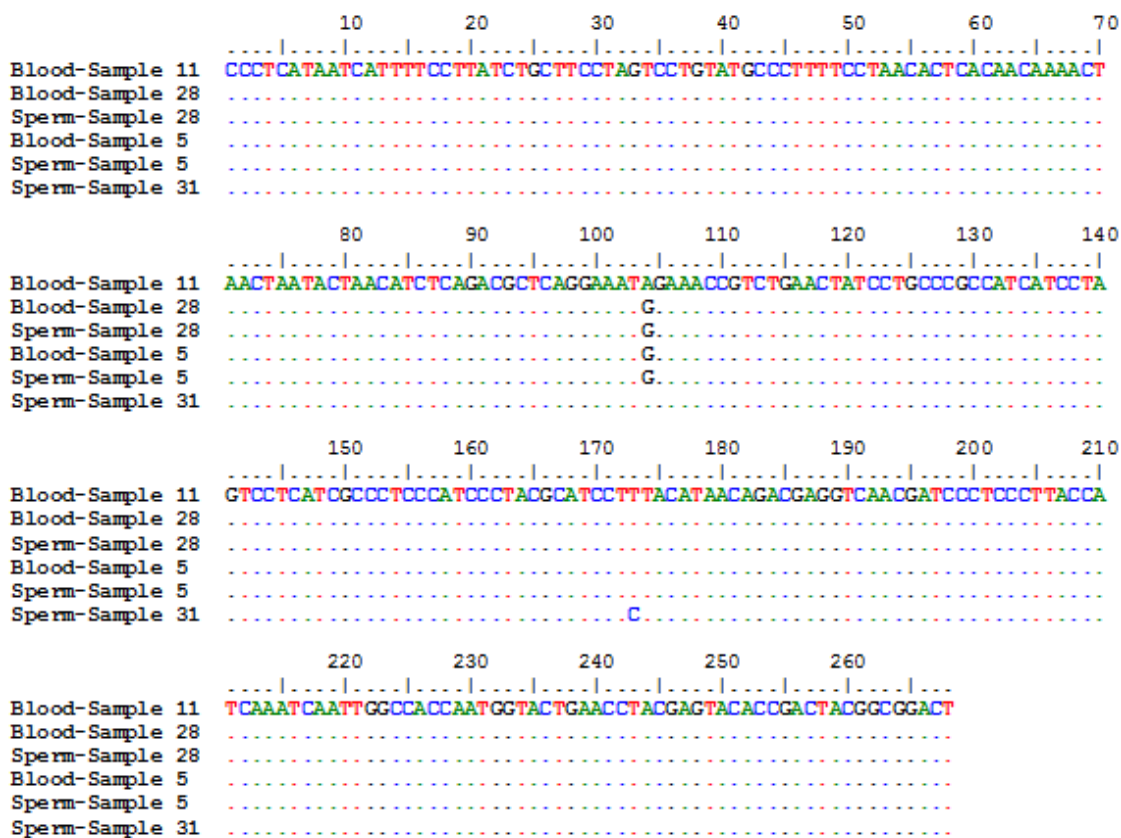
ND5 (260 bp)	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	T13734C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,70	73,33
	T13743C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,23	31,11
	G13711A	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη Ala→Thr	0,13	6,67
	G13708A	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη Ala→Thr	7,39	33,33
	T13617C	Συνώνυμη μετάλλαξη	4,43	80,00



Εικόνα 3.5. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής COII (290 bp).

Πίνακας 3.5. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής COII (290 bp) στα δείγματα που αναλύθηκαν.

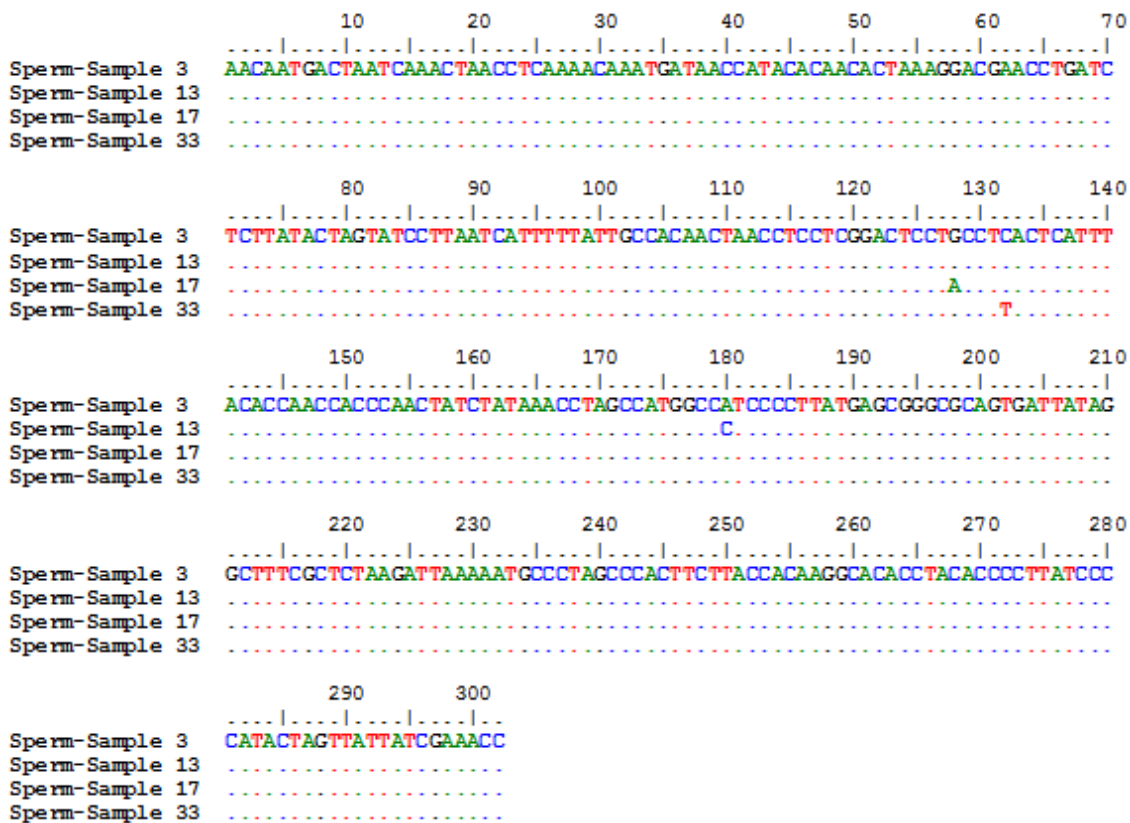
COII (290)	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	T8143C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,03	37,78
	G8152A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	2,53	100
	G8251A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	6,13	20,00



Εικόνα 3.6. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής COII (340 bp).

Πίνακας 3.6. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής COII (340 bp) στα δείγματα που αναλύθηκαν.

COII (340)	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	A7768G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	2,13	22,22
	T7837C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,05	100



Εικόνα 3.7. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής ATP6 (332 bp).

Πίνακας 3.7. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής ATP6 στα δείγματα που αναλύθηκαν.

ATP6	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	G8790A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,68	91,11
	C8794T	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη His→Tyr	2,91	73,33
	A8842C	Μη Συνώνυμη Μετάλλαξη Ile→Leu	0,01	86,67

100 10 20 30 40 50 60 70 80 90

Sperm-Sample 6
AGCTTCACCGGGGCAGTCATTCTCATAAATCGCCCACGGGCTTACATCCCTCATTACTATTTCTGCCTAGCAAACCTCAAACCTACGAACCCACTCACAGTCGCA
Sperm-Sample 1
.....A.....
Blood-Sample 2
.....
Blood-Sample 21
.....
Sperm-Sample 21
.....
Blood-Sample 23
.....A.....
Sperm-Sample 23
.....A.....
Sperm-Sample 20
.....A.....
Blood-Sample 20
.....A.....
Blood-Sample 19
.....
Blood-Sample 15
.....A.....

200 110 120 130 140 150 160 170 180 190

Sperm-Sample 6
TCATAATCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTGTGACTTCAGCAAGCCTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAA
Sperm-Sample 1
.....G.....C.....
Blood-Sample 2
.....
Blood-Sample 21
.....
Sperm-Sample 21
.....
Blood-Sample 23
.....
Sperm-Sample 23
.....
Sperm-Sample 20
.....G.....
Blood-Sample 20
.....G.....C.....
Blood-Sample 19
.....
Blood-Sample 15
.....C.....

```

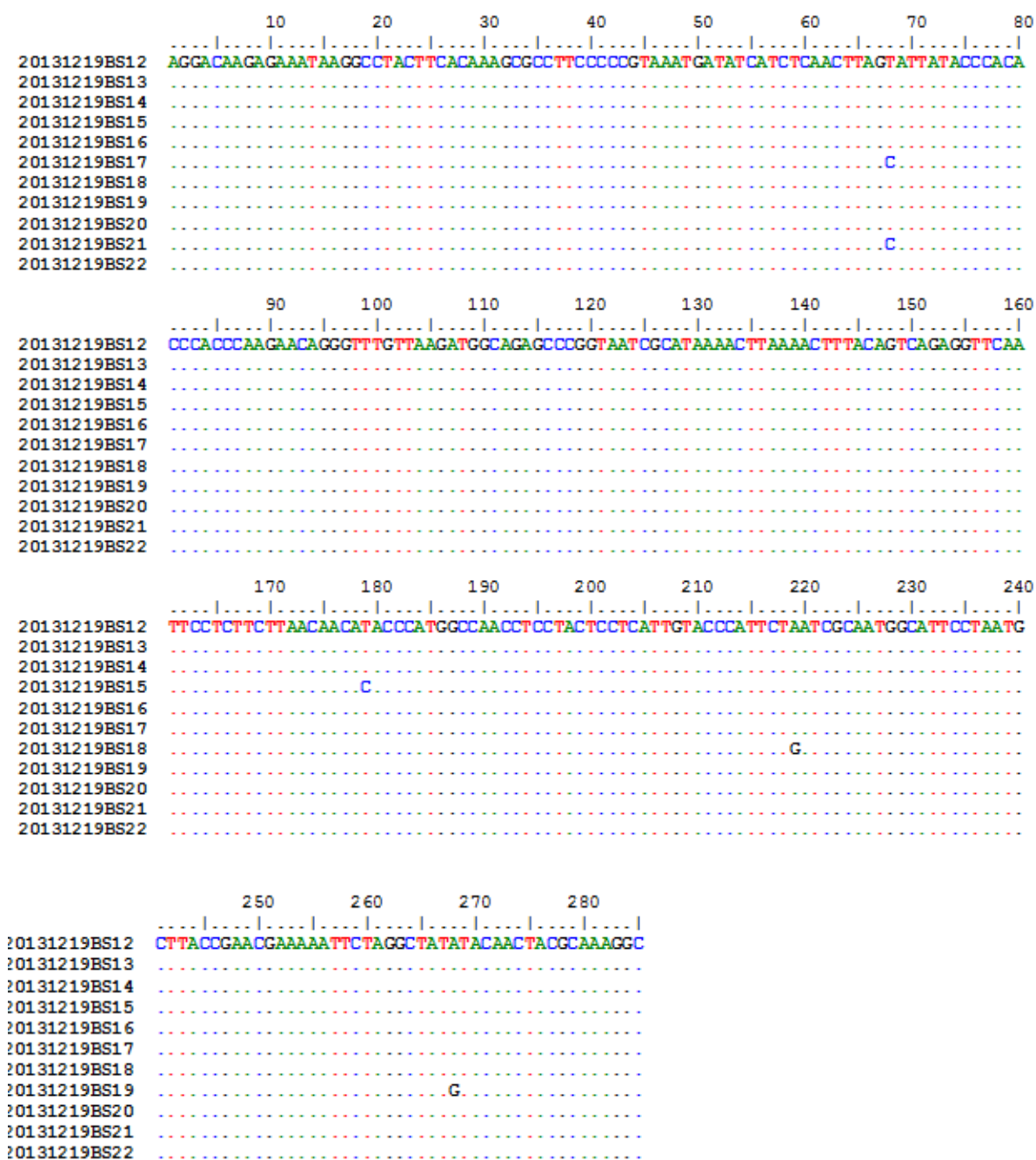
300          210      220      230      240      250      260      270      280      290
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 6
CCTACTGGCAGAACTCTCTGCTAGTAACCCAGTTCTCCTGATCAAAATATCACTCTCCTACTTACAGGACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCC
Sperm-Sample 1
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 2
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 21
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 21
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 23
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 23
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 20
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 20
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 19
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 15
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          310      320
Sperm-Sample 6  CTCTACATATTACCACAACAC
Sperm-Sample 1  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 2  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 21 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 21 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 23 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 23 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Sperm-Sample 20 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 20 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 19 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Blood-Sample 15 .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

```

Εικόνα 3.8. Αλληλουχίες των τμημάτων της γονιδιακής περιοχής ND4 (347 bp).

Πίνακας 3.8. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής ND4 στα δείγματα που αναλύθηκαν.

ND4	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	G11719A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	73,09	97,78
	A11812G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	3,62	66,67
	A11818C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,02	100
	T11827C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,20	75,56
	T11854C	Συνώνυμη Μετάλλαξη	0,71	33,33
	G11914A	Συνώνυμη Μετάλλαξη	10,72	20,00



Εικόνα 3.9. Αλληλουχίες των τμημάτων της μιτοχονδριακής περιοχής που περιλαμβάνει το γονίδιο tRNA leu (UUR) και αλληλουχίες των γονιδίων ND1 και rRNA 16S

Πίνακας 3.9. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν εντός της γονιδιωματικής περιοχής ND1 και rRNA 16S στα δείγματα που αναλύθηκαν.

ND1	Μετάλλαξη	Αμινοξική αλλαγή	Συχνότητα GenBank (%)	Συντήρηση νουκλεοτιδικής θέσης μεταξύ των ειδών (%)
	T3308C	Μη συνώνυμη Μετάλλαξη Met→Thr	1,00	84,44
	A3397G	Μη συνώνυμη Μετάλλαξη Met→Val	0,20	91,11
	A3348G	Συνώνυμη Μετάλλαξη	1,20	95,56
rRNA 16S	T3197C	-	4,54	35,56

4. Αξιολόγηση αποτελεσμάτων

Οι μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα 15 μη φυσιολογικά δείγματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.1).

Πίνακας 4.1. Μεταλλάξεις των μη φυσιολογικών δειγμάτων και ο φαινότυπος αυτών.

Δείγμα	Φαινότυπος	Μεταλλάξεις								
		ND2	COI	ND5 (260)	COII (290)	COII (340)	ATP6	ND4	ND1	rRNA 16S
1	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία							G11719A syn, A11812G syn, T11827C syn		
3	Ολιγοζωοσπερμία									
4	Ολιγοζωοσπερμία									
5	Ολιγοζωοσπερμία		A6302G syn		G8152A syn	A7768G syn				
7	Ολιγοζωοσπερμία	A4958G syn								
15	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία							G11719A syn, T11854C syn	T3308C non syn	
17	Τερατοζωοσπερμία			T13743C syn			G8790A syn			T3197C
20	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία	T4823C syn, A4917G non syn						G11719A syn, A11812G Syn, A11818C syn		
23	Ολιγοζωοσπερμία							G11719A syn		
24	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία									
28	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία			T13617C syn		A7768G syn				
29	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία	T4736C syn		G13711A non syn, T1373C syn						
30	Ολιγοασθενο- τερατοζωοσπερμία									
31	Ασθενοζωοσπερμία					T7837C syn				
32	Ολιγο- τερατοζωοσπερμία									

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι παθολογικοί φαινότυποι και οι μεταλλάξεις που μπορούν να συσχετισθούν με αυτούς (Πίνακας 4.2).

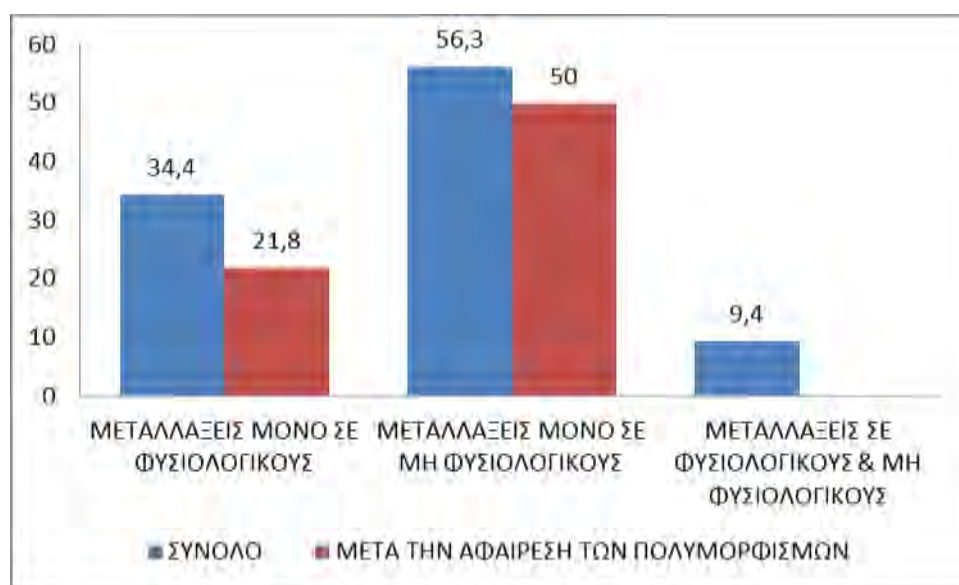
Πίνακας 4.2. Παθολογικοί φαινότυποι και μεταλλάξεις που παρατηρήθηκαν

Φαινότυπος	Μεταλλάξεις							
	ND2	COI	ND5	COII	ATP6	ND4	ND1	rRNA 16S
Ολιγοζωοσπερμία	A4958G syn	A630G syn		G8152A syn A7768G syn		G11719A syn		
Ασθενοζωοσπερμία				T7837C syn				
Τερατοζωοσπερμία			T1374C syn		G879A syn			T3197C
Ολιγοασθενοζωοτερατοσπερμία	T4823C syn, A4917G non syn T4736C syn		T1361C syn G13711A non syn, T1373C syn	A7768G syn		G11719A syn, A11812G syn, T11827C syn T11854C syn A11818C syn	T3308C non syn	

Η συχνότητα των μεταλλάξεων που παρατηρήθηκαν σε φυσιολογικούς και μη φυσιολογικούς φαινοτύπους παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 4.3, Εικόνα 4.1).

Πίνακας 4.3. Συχνότητα μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν σε φυσιολογικούς και μη φυσιολογικούς φαινοτύπους.

Μεταλλάξεις μόνο σε φυσιολογικούς φαινοτύπους	Μεταλλάξεις μόνο σε μη φυσιολογικούς φαινοτύπους	Μεταλλάξεις και σε φυσιολογικούς και σε μη φυσιολογικούς φαινοτύπους	Σύνολο Μεταλλάξεων
11	18	3	32
οι 4 θεωρούνται πολυμορφισμοί και ανιχνεύονται σε μεγάλα ποσοστά παγκοσμίως	Οι 2 θεωρούνται πολυμορφισμοί και ανιχνεύονται σε μεγάλα ποσοστά παγκοσμίως		
Ποσοστό	Ποσοστό	Ποσοστό	
34,4% (21,8% μετά την αφαίρεση των πολυμορφισμών)	56,3% (50% μετά την αφαίρεση των πολυμορφισμών)	9,4	

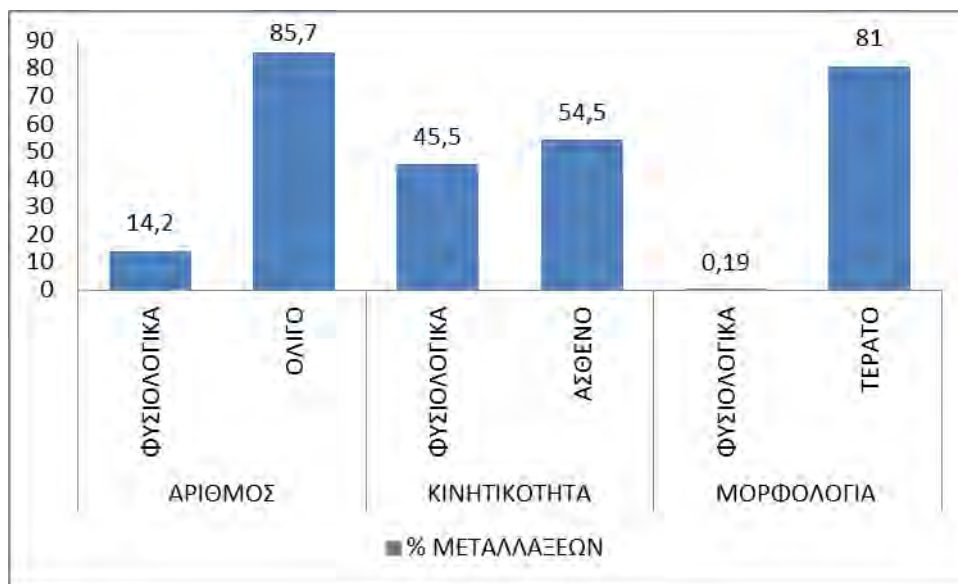


Εικόνα 4.1. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των μεταλλάξεων σε φυσιολογικούς και μη φυσιολογικούς φαινοτύπους

Από την ανάλυση των επιμέρους παραμέτρων (αριθμός, κινητικότητα, μορφολογία) των 15 μη φυσιολογικών φαινοτύπων προέκυψαν τα εξής (Πίνακας 4.4, Εικόνα 4.2) :

Πίνακας 4.4. Συχνότητα μεταλλάξεων σε άτομα που παρουσιάζουν ολιγοζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία και τερατοζωοσπερμία αντίστοιχα.

	ΑΡΙΘΜΟΣ		ΚΙΝΗΤΙΚΟΤΗΤΑ		ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ	
	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	ΟΛΙΓΟ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	ΑΣΘΕΝΟ	ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΑ	ΤΕΡΑΤΟ
ΑΤΟΜΑ	2	13	8	7	6	9
% ΑΤΟΜΩΝ	13,3	86,7	53,3	46,7	40	60
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ	3	18	10	12	4	17
% ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ	14,2	85,7	45,5	54,5	0,19	81



Εικόνα 4.2. Διαγραμματική απεικόνιση του ποσοστού των μεταλλάξεων που εντοπίζονται σε άτομα με ολιγοζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία και τερατοζωοσπερμία.

5. Συζήτηση

Η διερεύνηση των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων όσον αφορά τη συσχέτισή τους με την ανδρική υπογονιμότητα οδήγησε σε ένα σύνολο αποτελεσμάτων τα οποία επεξεργάστηκαν και αξιολογήθηκαν. Ένα από τα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι ότι δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση ως προς τις μεταλλάξεις ανάμεσα στο DNA που απομονώθηκε από αίμα και σε εκείνο που απομονώθηκε από σπέρμα και δεν παρατηρήθηκαν φαινόμενα ετεροπλασμίας. Επιπλέον, η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων οδήγησε στο συμπέρασμα ότι αν και ο αριθμός των ατόμων είναι ακόμη πολύ μικρός υπάρχουν σαφείς ενδείξεις για τη συσσώρευση μεταλλάξεων στους μη φυσιολογικούς φαινοτύπους (Εικόνα 4.1). Ακόμα, υπάρχουν γονίδια για τα οποία η συντριπτική πλειοψηφία των μεταλλάξεών τους εμφανίζεται μόνο σε μη φυσιολογικούς φαινοτύπους. Συγκεκριμένα, τα γονίδια ND2, ND4, ND5 και COII φαίνεται να συγκεντρώνουν τις περισσότερες μεταλλάξεις οι οποίες απαντώνται κυρίως σε άτομα τα οποία εμφανίζουν μη φυσιολογικές και τις τρεις παραμέτρους του σπέρματος (μορφολογία, αριθμό, κινητικότητα) (Πίνακας 4.2). Οι περισσότερες μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν δεν έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες διερεύνησης του γενετικού υπόβαθρου της υπογονιμότητας (Πίνακας 4.2). Ωστόσο, η ακριβής συσχέτισή τους με έναν συγκεκριμένο παθολογικό φαινότυπο απαιτεί την ανάλυση επιπλέον φυσιολογικών και μη φυσιολογικών ατόμων. Έτσι, η ανάλυση σε μεγαλύτερη κλίμακα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία μιας ολοκληρωμένης εικόνας για τη συσσώρευση και τη συσχέτιση μεταλλάξεων με συγκεκριμένους φαινοτύπους.

Μέχρι τώρα, δεν υπάρχει κάποια μιτοχονδριακή μετάλλαξη που να έχει επιβεβαιωθεί η συσχέτισή της με κάποιο παθολογικό φαινότυπο και πολλά δεδομένα που προέρχονται από τη διεθνή βιβλιογραφία φαίνεται να αλληλοσυγκρούονται. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η νουκλεοτιδική αντικατάσταση T4823C, η οποία σύμφωνα με πρόσφατη έρευνα παρατηρήθηκε σε άτομα που εμφάνιζαν ασθενοζωοσπερμία (Barbhuiya et al. 2012). Στην παρούσα μελέτη, η μετάλλαξη αυτή εντοπίστηκε σε άτομο που εμφανίζει ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία. Η συχνότητα της μετάλλαξης αυτής στη βάση δεδομένων GenBank είναι μικρή (0,44%), γεγονός που αποδεικνύει ότι δεν πρόκειται για μια συχνή μετάλλαξη. Ωστόσο, απαιτείται επιπλέον έρευνα ώστε να διεξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την εμφάνισή της σε συγκεκριμένες παθολογικές καταστάσεις. Επίσης, πριν την οποιαδήποτε συσχέτιση κάποιας μετάλλαξης με ένα συγκεκριμένο φαινότυπο, θα πρέπει να αποκλεισθεί το γεγονός η μετάλλαξη αυτή να είναι ειδική του πληθυσμού όπου μελετάται ή το ενδεχόμενο να είναι συχνή στο γενικό πληθυσμό. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, οι μεταλλάξεις G11719A και C12705T συσχετίστηκαν με την εμφάνιση της ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμίας σε υπογόνιμα άτομα (Kumar et al. 2007, Shamsi et al. 2008). Στην παρούσα μελέτη, η μετάλλαξη G11719A πράγματι παρατηρήθηκε μόνο σε άτομα τα οποία παρουσίαζαν ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία αλλά η συχνότητά της στη βάση δεδομένων Genbank απέδειξε ότι πρόκειται για πολυμορφισμό που απαντάται με συχνότητα 73,09% στο γενικό πληθυσμό, γεγονός που αποτρέπει τη συσχέτιση αυτής της μετάλλαξης με την ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία. Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη, η μετάλλαξη C12705T, παρατηρήθηκε μόνο σε άτομα τα οποία παρουσίαζαν φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος και σε κανέναν άτομο με ολιγοασθενοτερατοζωοσπερμία. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο γενικό πληθυσμό (38,90%) αποδεικνύει ότι πρόκειται για πολυμορφισμό που δε μπορεί να συσχετισθεί με την υπογονιμότητα.

Συμπερασματικά, στο επίπεδο που διεξήχθη η έρευνα, τα στοιχεία οδηγούν στην ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ της ανδρικής υπογονιμότητας και των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων. Ωστόσο, η διερεύνηση των μεταλλάξεων του μιτοχονδριακού DNA σε μεγαλύτερη κλίμακα τόσο σε επίπεδο δειγμάτων αλλά και σε επίπεδο γονιδιώματος παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον και μπορεί να εξελιχθεί σε ένα διαγνωστικό

εργαλείο κυρίως στην περίπτωση της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και να οδηγήσει στην αποτελεσματική της θεραπεία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Adams K.L. and Palmer J.D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol. Phylogenet. Evol.* 29: 380–395.
2. Abou-Haila A. and Tulsiani R. (2000). Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Biochemistry and Biophysics.* 379: 173–182.
3. Aitken R. J. (2006). Sperm function tests and fertility. *International journal of andrology.* 29: 69–75.
4. Aitken R. J., Buckingham D.W. and Fang H.G. (1993). Analysis of the responses of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *J A.* 14: 132–141
5. Aitken R. J., Sutton M., Warner P. & Richardson D.W. (1985). Relationship between the movement characteristics of human spermatozoa and their ability to penetrate cervical mucus and zona-free hamster oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility.* 73: 441–449.
6. Alberio R., Zakhartchenko V., Motlik J. and Wolf E. (2001). Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. *Int. J. Dev. Biol.* 45: 797 – 809
7. Amaral A., Ramalho-Santos J. and St John J.C. (2007). The expression of polymerase gamma and mitochondrial transcription factor A and the regulation of mitochondrial DNA content in mature human sperm. *Hum Reprod.* 22: 1585-1596
8. Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young, I.G. (1981). Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290: 457–465.
9. Anderson S., Bankier A.T., de Barrell B.G., Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G. (1982). Comparison of the human and bovine mitochondrial genomes. *Mitochondrial Genes.* 12: 51–57.
10. Austin C.R. (1951). Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust J Sci Res B.* 4: 581-596.
11. Baklouti-Gargouri S., Ghorbel M., Mahmoud A. B., Mkanouar-Rebai E., Cherif M., Chakroun N., Sellami A., Fakhfakh F., Ammar-Keskesi A.L. (2013). A Novel m.6307A>G Mutation in the Mitochondrial COXI Gene in Asthenozoospermic Infertile Men. *Mol Reprod Dev.* 80:581–587
12. Barratt C., Kay V. and Oxenham S. (2007). The human spermatozoon – a stripped down but refined machine. *J.B.* 8:63
13. Barraud-Lange V., Boucheix C. (2013). The Role of Tetraspanin Complexes in Egg-Sperm Fusion. *Tetraspanins.* 9: 203-231
14. Bedford J.M. (1979). Evolution of sperm maturation and sperm storage functions of the epidymis. *The spermatozoon.* Inc. 7-21.
15. Blier PU, Dufresne F. and Burton R.S. (2001). Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet.* 17: 400-6.
16. Bitner-Glindzicz M., Pembrey M., Duncan A., et al. (2009). Prevalence of mitochondrial 1555A→G mutation in European children. *N Engl J Med.* 360: 640-642.
17. Bhasin S., de Kretser D.M., Baker H.W. (1994). *Clin. Endocrinol. Metab.* 79, 1525–1529.
18. Bohr V.A and Dianov G.L (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie.* 81:155-160.
19. Brandvain Y., Barker M.S. and Wade M. J. (2007). Gene coinheritance and gene transfer. *Science* 315: 1685–1685.
20. Buffone G.M., Ijiri W.T., Cao W., Merdiushev T., Aghajanian K. H., Gerton L. G. (2012). Heads or Tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Mol Reprod Dev.* 79: 4–18.
21. Calvo S.E., Mootha V.K. (2010). The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genom Hum Genet.* 11: 25–44.
22. Chang M.C. (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature* 168: 697-698.

23. Chemes H.E., Puigdomenech E.T., Carizza C., Brugo O.S., Zanchetti F., et al.(1999). Acephalic spermatozoa and abnormal development of the head–neck attachment. A human syndrome of genetic origin. *Hum Reprod.* 14: 1811–8
24. Chinnery F. P. (2010). Mitochondrial Disorders Overview. Gene Reviews.
25. Clayton D.A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reprod.* 15: 11–17.
26. Clermont Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 52: 198–236
27. Croteau D.L., Stierum R.H. and Bohr V.A., (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mut. Res.*, 434: 137-148.
28. Cummins J. (1998) Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. *Reviews of Reproduction.* 3: 172–182
29. Bar-Yaacov D., Blumberg A., Mishmar D. (2012). Mitochondrial-nuclear co-evolution and its effects on OXPHOS activity and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 9-1: 1107-1
30. De Jonge J.C. and Barratt C. (2006). The sperm cell (Production, Maturation, Fertilization, Regeneration). *Cambridge University Press.*
31. de la Taille A. et al. (1998). Correlation of genitourinary abnormalities, spermiogram and CFTR genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8:370-376
32. Eddy E.M., O'Brien D. (1994). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction.* 2nd ed. New York, USA: Raven Press p.29–78.
33. Edwards R.G. and Broody S.A. (1995). Principles and Practice of Assisted Human Reproduction.
34. Fechner A., Fong S., McGovern P.A. (2008). Review of Kallmann syndrome: genetics, pathophysiology, and clinical management. *Obstet Gynecol Surv.* 63(3):189–94.
35. Ferlin A., Raicu F., Gatta V., Zuccarello D., Palka G., Foresta C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed* 14(6):734–45.
36. Fogg C. V., Lanning J. N. and MacKeigan P. J. (2011). Mitochondria in cancer: at the crossroads of life and death. *Chin J Cancer.* 30: 526-539.
37. Frank S.A., Hurst L.D. (1996). Mitochondria and male disease. *Nature* 1996; 38 : 224.
38. Fruehauf J.P., Meyskens F.L. (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.* 13: 789-794.
39. Gadella B.M., Visconti A. (2006). Regulation of capacitation. *The Sperm Cell. Cambridge.* 134–69.
40. Ganguly A., Bukovsky A., Sharma K. R., Bansal P., Bhandari B. and Gupta K. S. (2010). In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human Reproduction.* 25: 1643–1656.
41. Garbers D.L., Tubb D.J. and Hyne R.V. (1982) A requirement of bicarbonate for Ca²⁺-induced elevations of cyclic AMP in guinea pig spermatozoa. *J Biol Chem.* 257: 8980-8984.
42. Cooper T.G., et al. (1990). The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *IJA.* 13:329-335.
43. Goto Y., Nonaka I., Horai S.(1990). A mutation in the tRNA (Leu) (UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature.* 348: 651–653.
44. Gray K.A., Daugherty L.C., Gordon S.M., Seal R.L., Wright M.W., Bruford E.A. (2013). genenames.org: the HGNC resources in 2013. *Nucleic Acids Res.*
45. Greaves C. L. , Reeve K. A., Taylor W. R. and Turnbull M. D. (2012). Mitochondrial DNA and disease. *J Pathol.* 226: 274–286
46. Gupta K. S., Bhandari B., Shrestha A., Biswal K.B., Palaniappan C., Malhotra S.S., Gupta N. (2012). Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell and Tissue Research.* 349: 665-678
47. Hector E.C. and Vanesa Y. R. (2003). Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction.* 9: 405±428
48. Hjollund N.H., Storgaard L., Ernst E., et al. (2002). The relation between daily activities and

- scrotal temperature. *Reprod Toxicol.* 16: 209–14.
49. Holt I.J., Harding A.E., Morgan-Hughes J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature.* 331: 717–719
 50. Holt I.J., Harding A.E., Petty R.K., et al (1990). A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet* 1990. 46: 428–433.
 51. Hou J.H., Wei Y.H. (1996). The unusual DNA structures of the hotregions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. *Biochem. J.* 318: 1065–1070.
 52. Hughes D.C., Barratt C.L. (1999). Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida? *Biochim Biophys Acta.* 1447: 303–306.
 53. Huynh, T., Mollard, R., Trounson, A. (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod.* 8: 183–198.
 54. Ickowicz D., Finkelstein M., and Breitbart H. (2012). Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. *Asian J Androl.* 14: 816–821.
 55. Inaba K. (2003.) Molecular Architecture of the Sperm Flagella: Molecules for Motility and Signaling. *Z.S.J.* 20: 1043–1056
 56. Inoue N., Ikawa M., Isotani A., Okabe M. (2005). The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature.* 10: 434: 234–8.
 57. Ivell R. (2007). Lifestyle impact and the biology of the human scrotum. *Reprod Biol Endocrinol.* 5: 15.
 58. Johns D.R., Neufeld M.J., Park R.D. (1992). An ND-6 mitochondrial DNA mutation associated with Leber hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun* 187: 1551–1557.
 59. Jung A., Schuppe H.C. (2007) Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia.* 39: 203–15
 60. Justin C. St. J. (2012). Transmission, inheritance and replication of mitochondrial DNA in mammals: implications for reproductive processes and infertility. *Cell Tissue Res* 349:795–808.
 61. Kao S.H., Chao H.T., Wci, Y.H. (1995). Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol. Reprod.* 52: 729–736
 62. Keisuke K. and Akira K. (2004). The mechanism of sperm–oocyte fusion in mammals. *Reproduction.* 127: 423–429
 63. Kent-First M., Muallem A., S., Pryor, J., Roberts K., Nolten W., et al. (1999). Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol. Reprod. Dev.* 53: 27–41.
 64. Kirkinezos I. G. and Moraesa C. T. (2001). Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. *Cell & Develop. Biology.* 12: 449–457.
 65. Kovac J., Pastuszak A., Lamb D. (2013). The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril.* 99:998–1007.
 66. Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F., Vercesi A.E. (2009). *Free Radic Biol Med.* 47:333–343
 67. Krishnan K.J., Reeve A.K., Samuels D.C., et al. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet.* 40: 275–279.
 68. Kruger T.F., et al. (1993). The self teaching programme for strict sperm morphology. *Bellville, South Africa. MQ Medical.*
 69. Kumar R, Bhat A, Sharma RK, Bamezai RN, Dada R. (2007). Mitochondrial DNA mutations and polymorphism in idiopathic asthenozoospermic men of Indian origin Proceedings of the 57th Annual Meeting of American Society of Human Genetics. San Diego: California.
 70. Kumar R., Venkatesh S., Kumar M., Tanwar M., Shamsi M.B., Kumar R., Gupta N.P., Sharma R.K., Talwar P., Dada R. (2009). Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic (OA) infertile men. *Indian J Biochem Biophys.* 46:172 177
 71. Kuroda-Kawaguchi T., Skaletsky H., Brown L.G., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., et al. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat. Genet.* 29: 279–286.

72. Kuznetsov V.A., Kehrer I., Kozlov V.A., Haller M., Redl H., Hermann M., Grimm M., Troppmair J. (2011). Mitochondrial ROS production under cellular stress: comparison of different detection methods. *Anal Bioanal Chem.* 400: 2383–2390
73. Lawrence Y., Whitaker M. and Swann K. (2007). Sperm-egg fusion is the prelude to the initial Ca²⁺ increase at fertilization in the mouse. *Development.* 124: 233-241.
74. Lazaros L., Xita N., Kaponis A., Zikopoulos K., Sofikitis N., Georgiou I. (2008). Evidence for association of sex hormone-binding globulin and androgen receptor genes with semen quality. *Andrologia.* 40: 186–191.
75. Leblond C.P., Clermont Y. (1952). Spermiogenesis of rat, mouse and guinea pig as revealed by the 'periodic acid-fuchsin sulfuric acid' technique. *Am J Anat.* 90: 167–206
76. Lefievre L., Conner S.J., Salpekar A., Olufowobi O., Ashton P., Pavlovic B., Lenton W., Afnan M., Brewis I.A., Monk M., Hughes D.C., Barratt C.L. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod.* 19: 1580-1586
77. Linnane A.W., Marzuki S., Ozawa T., et al. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1: 642–645
78. Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P. and Darnell J. (1995). *Molecular Cell Biology*. 3rd ed. W.H. Freeman and Company, New York
79. Lynch, M. (2007). *The Origins of Genome Architecture*. Sinauer Associates, Sunderland, MA
80. Macmillan C., Lach B., Shoubridge E.A. (1993). Variable distribution of mutant mitochondrial DNAs (tRNA Leu (3243)) in tissues of symptomatic relatives with MELAS: the role of mitotic segregation. *Neurology.* 43: 1586–90.
81. Margoulis L. (1970). Origin of Eukaryotic Cells. *JBM.* 13: 186.
82. May-Panloup P., Vignon X., Chretien M.F., Heymen Y., Tamassia M., Malthiery Y., Reynier P. (2005) Increase of mitochondrial DNA content and transcripts in early bovine embryogenesis associated with upregulation of mtTFA and NRF1 transcription factors. *Reprod Biol Endocrinol.* 3:65
83. McFarland R., Taylor R.W., Turnbull D.M. (2010). A neurological perspective on mitochondrial disease. *Lancet Neurol.* 9:829–840.
84. Meiklejohn C.D., Holmbeck M.A., Siddiq M.A., Abt D.N., Rand D.M., et al. (2013). An Incompatibility between a mitochondrial tRNA and Its nuclear-encoded tRNA Synthetase Compromises Development and Fitness in Drosophila. *PLoS Genet.* 9: e1003238.
85. Meinhardt A., Wilhelm B., Seitz J. (1999). New aspect of spermatogenesis. Expression of mitochondrial marker proteins during spermatogenesis. *Hum Reprod.* 5 : 108-19.
86. Melcher, U. (2003). SSCs. <<http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html>>.
87. Menkveld R., Holleboom A.G., Rhemrev J. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *A J A.* 13: 59–68.
88. Mieusset R., Bujan L., Massat G., Mansat A., Pontonnier F. (1995). Clinical and biological characteristics of infertile men with a history of cryptorchidism. *Hum. Reprod* 10: 613-619.
89. Mokranjac D, Neupert W. Protein import into mitochondria.(2005). *Biochem Soc Trans.* 33: 1019–1023.
90. O'Donnell L., Nicholls K. P., O'Bryan K. M., McLachlan I., Stanton G. (2011). The process of sperm release. *Spermatogenesis.* 1:14-35
91. O'Donnell L., Robertson M.K., Jones M., Simpson R. E. (2001). Estrogen and Spermatogenesis. *Endocrine Reviews.* 22: 289–318
92. Oehninger S., Franken D., Alexander N. & Hodgen G. D. (1992) Hemizona assay and its impact on the identification and treatment of human sperm dysfunctions. *Andrologi.* 24: 307–321.
93. O'Flynn O'Brien L. K., Varghese C. A., Agarwal A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertil Steril.* 93: 1–12
94. Ojala D., Montoya J. and Attardi G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature.* 290: 470–474.
95. Oko R. and Clermont Y. (1990). Mammalian spermatozoa: structure and assembly of the tail: *Biol Clin Asp.* 3-28.
96. Orita, M., et al. (1989). Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as

- SSCPs. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86: 2766-70.
97. Ott M., Gogvadze V., Orrenius S., et al.(2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12: 913-922
 98. Pagliarini D. J. et al. (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell*. 134: 112–123.
 99. Palermo G., Joris H., Devroe P., van Sterteghem A.C. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 340: 17-18
 100. Parvinen M. (1982). Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev*. 3: 404–417
 101. Pereira L., Goncalves J., Bandelt H.J. (2008). Mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene is not a cause of low sperm motility in Portugal. *Fertil Steril*. 89:738 741.
 102. Pesole G., Gissi C., de Chirico A. and Saccone C. (1999). Nucleotide substitution rate of mammalian mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol*. 48: 427-343.
 103. Petrunkina A.M., Friedrich J., Drommer W., Bicker G., Waberski D., Topfer-Petersen E. (2001). Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca²⁺ concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells. *Reproduction*. 122: 469-480
 104. Polakoski K.L., Syner F.N., Zaneveld L.D. (1976). Biochemistry of human seminal plasma. Human semen and fertility regulation in man. *St Louis The Mosby Co.*133-1334
 105. Poongothai J., Gopenath T.S., Manonayaki S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Med J*. 50: 336
 106. Pryor J.L., Kent-First M., Muallem A., Van Bergen A.H., Nolten W.E., Meisner L., et al. (1997). Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N. Engl. J. Med*. 336: 534–539.
 107. Pulkes T., Liolitsa D., Nelson I.P., Hanna M.G. (2003). Classical mitochondrial phenotypes without mtDNA mutations: the possible role of nuclear genes. *Neurology* 61: 1144-7
 108. Barbhuiya P., Gogoi A., Ahmed G., Mahanta R. (2012). A study on genetic aspects of male infertility in North-east Indian population. *India. BMC Proceedings*. 6: P31.
 109. Purvis K., Christiansen E. (1993). Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int J Androl*. 16: 1-13
 110. Radpour R., Gourabi H., Gilani M.A., Dizaj A.V. (2007). Molecular study of (TG) m(T)n polymorphisms in Iranian males with congenital bilateral absence of the vas deferens. *J Androl*. 28: 541–547
 111. Rajesh K. N. and Preeti B.R. (2004). Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2:75
 112. Ramalho-Santos J., Amaral A., Paula S.A., Rodrigues A. S., Martins L., Baptista M., Mota C. P., Tavares R., Amaral S. and Gamboa S. (2007). Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*.
 113. Reijo R., Alagappan R.K., Patrizio P., Page D.C. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*. 347: 1290–1293.
 114. Rotig A., Cormier V., Blanche S., et al (1990). Pearson’s marrow–pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest* 86: 1601–1608.
 115. Ruiz-Pesini E., Diez C., Lapen A.C., Perez-Martos A., Montoya J., Alvarez E., Arenas J., Lopez-Perez M. (1998). Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. *Clin Chem* 44: 1616–1620
 116. Ruiz-Pesini E., Lapena A.C., Sanchez- C. D., Martos A. P., Montoya J., Alvarez E., et al. (2000) Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet*. 67: 682–696.
 117. Ruiz-Pesini, E., Lott M.T., Procaccio V., Poole J., Brandon M.C., Mishmar D., Yi, C., Kreuziger J., Baldi P., and Wallace D.C. (2007). An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Research* 35 (Database issue):D823-D828. URL: <http://www.mitomap.org>.

118. Russell L.D. (1993). Role in spermiation. In: Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, Florida: 269–304 (a)
119. Russell L.D. (1993). “The Sertoli Cell,” eds. by Russell L. D., Griswold M.D., Cache River Press, Clearwater, pp. 365–390 (b)
120. Russell L.D., Ettlin R.A., Sinha Hikim A.P., Clegg E.D. (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Cache River Press, Clearwater, FL.
121. Russel J. P. (2009). iGenetics - Μια μεντελική προσέγγιση (Τόμος II). Πρώτη ελληνική έκδοση Ακαδημαϊκές εκδόσεις Μπάσδρα. Αλεξανδρούπολη.
122. Saiki, R.K. et al. (1988). The polymerase chain reaction can synthesize millions of copies of a specific DNA sequence in a brief in vitro reaction. (Thermostable DNA polymerase from *Thermus aquaticus* improves the technique.) *Science*. 230: 1350-4.
123. Sambrook J., et al. (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Third Edition)
124. Shamsi M.B., Kumar R., Bhatt A., Bamezai R.N., Kumar R., Gupta N.P., et al. (2008). Mitochondrial DNA mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian J Urol*. 24:150–4
125. Schiefer H.G. (1998). Microbiology of male urethroadnexitis: diagnostic procedures and criteria for aetiologic classification. *Andrologia*. 30: 7-13.
126. Schon E.A., Rizzuto R., Moraes C.T., et al. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science*. 244: 346–349.
127. Schon E.A., Bonilla E., Di Mauro S. (1997). Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr*. 29: 131–49
128. Selice R., Di Mambro A., Garolla A., Ficarra V., Iafrate M., Ferlin A., Foresta C. Spermatogenesis in Klinefelter syndrome. *J Endocrinol Invest*. 33: 789-93
129. Selvi Rani D., Vanniarajan A., Gupta J.N., Chakravarty B., Singh L.i, Thangaraj K. (2006) A novel missense mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene as a cause of low sperm motility in the Indian subcontinent. *Fertil Steri*. 86:1783–5.
130. Seminara S.B, Oliveira L.M.B, Beranova M., Hayes F.J., Crowley W.F. (2000). Genetics of hypogonadotropic hypogonadism, *Journal of endocrinological investigation*, vol.23,pp.560-565
131. Shadel G.S. and Clayton D. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrate. *Annual Review of Biochemistry*. 66: 409–435
132. Sherins R.J. (1995). How is male infertility defined? *Handook of Andrology*. The American Society of Andrology, Allen Press, Lawrence, KS. 48-51
133. Shefi S. and Turek J. P. (2006). Sex chromosome abnormalities and male infertility: a clinical perspective: In *The sperm cell* (Production, Maturation, Fertilization, Regeneration). Cambridge University Press.
134. Shoffner J.M., Wallace D.C. (1992). Mitochondrial genetics: principles and practice. *Am. J. Human Genet*. 51: 1179–1186.
135. Shoffner J.M., Fernhoff P.M., Krawiecki N.S., et al. (1992). Subacute necrotising encephalopathy: oxidative phosphorylation defects and the ATPase 6 point mutation. *Neurology*. 42: 2168–2174.
136. Shoffner J.M., Brown M.D., Torroni A., Lott M.T., Cabell M.R., Mirra S.S., Beal M.F., Yang C., Gearing M., Salvo R. et al. (1993) MtDNA variants observed in Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease patients. *Genomics*. 17: 171-184.
137. Spelbrink J.N., Li F.Y., Tiranti V., et al. (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*. 28: 223–231
138. Slack J.M.W. (2007). Βασικές Αρχές Βιολογίας Ανάπτυξης. Δεύτερη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε.
139. Spiropoulos J., Turnbull D.M., Chinnery P.F. (2002). Can mitochondrial DNA mutations cause sperm dysfunction? *Mol Human Reprod* 8:719-721.
140. Stein KK, Primakoff P and Myles D (2004) Sperm-egg fusion: events at the plasma membrane. *J Cell Sci*. 117: 6269-6274.
141. St. J.C., Sakkas D., Barratt C.L. (2000). A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J. Androl*. 21:189–199

142. Stouffs K., Lissens W., Tournaye H., Van Steirteghem A., Liebaers I. (2005). Possible role of USP26 in patients with severely impaired spermatogenesis. *Eur J Hum Genet.* 13: 336–340
143. Stryer L. (2007). Βιοχημεία (Τόμος Ι). Τρίτη ελληνική έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
144. Sukcharoen N., Keith J., Irvine D. S. & Aitken R. J. (1995). Definition of the optimal criteria for identifying hyperactivated spermatozoa at 25 Hz using in vitro fertilization as a functional end-point. *Human Reproduction.* 10: 2928–2937.
145. Tapanainen J.S., Aittomaki K., Min J., Vaskivuo T., Huhtaniemi I.T. (1997). Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet,* 15 pp. 205–206
146. Taylor R.W., Turnbull D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* 6: 389–402.
147. Thompson J., Gibbson T., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins, D. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic acid research.* 25: 4876.
148. Thompson H.J., Strange H., Schedin P. (1992). Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *J Cancer Epidem Biomarkers and Prevention.* 1: 597-602.
149. Tiepolo L. and Zuffardi O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Gene.* 34: 119–124.
150. Turner M. R. (2003). Tales from the tail: What do we really know review about sperm motility? *J Androl.* 24: 790-803.
151. Vander A. (2011). Φυσιολογία του ανθρώπου. Όγδοη ελληνική έκδοση. Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Π.Χ Πασχαλίδης.
152. van der Giezen M, Tovar J.(2005). Degenerate mitochondria. *EMBO Rep.* 6: 525–530
153. van den Ouweland J.W.M, Lemkes H.H.P.J, Ruitenbeek K. (1992). Mutation in mitochondrial tRNA^{Leu} (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1: 368–371.
154. Van Goethem G., Dermaut B., Lofgren A., et al. (2001). Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nat Genet* 28: 211–212.
155. Venkatesh S., Deecaraman M., Kumar R., Shamsi M.B. & Dada R. (2009). Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. *Indian J Med Res.* 129: 127-137.
156. Visconti E. P. and Kopf S. G. (1998). Regulation of Protein Phosphorylation during Sperm Capacitation. *BOR.* 59: 1–6.
157. Vogt P.H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter F., et al. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5: 933–943.
158. Wallace D.C., Zheng X.X., Lott M.T., Shoffner J.M., Hodge A.J., Kelley R.I., Epstein M.C., Hopkins C.L. (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* 55: 601–610.
159. Wallace D.C., Singh G., Lott M.T., Hodge J.A., Schurr T.G., Lezza A.M., Elsas L.J., Nikoskelainen E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242: 1427–1430.
160. Walsh T., Turek P. (2009). Immunologic infertility. Infertility in the male. 4th ed. New York City, NY: Cambridge University.
161. Weinberg F., Chandel N.S. (2009). Reactive oxygen species dependent signaling regulates cancer. *Cell Mol Life Sc.* 66:3663-3673
162. Weidner W., Krause W., Ludwig M. (1999). Relevance of male accessory gland infection for subsequent fertility with special focus on prostatitis. *Hum Reprod Update.* 5:421-32.
163. Weyrich A. (2012). Preparation of genomic DNA from mammalian sperm. *Curr Protoc Mol Biol.* 98:2.13.1–2.13.3.
164. Wisner H.J., Sandlow J., and Köhler Tobias S. (2012). Causes of Male Infertility. *Male Infertil.* 3-14

165. World Health Organization. (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus penetration. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press.
166. World Health Organization. (2000). WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge: Cambridge University Press.
167. World Health Organization (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. 5th ed. Cambridge: Cambridge University Press.
168. Yaacov- Dan B., Blumberg A., Mishmar D. (2011). Mitochondrial-nuclear co-evolution and its effects on OXPHOS activity and regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1819: 1107–1111
169. Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. The physiology of reproduction. 2nd edition. New York, USA: Raven Pres. 189–317.
170. Ying L., Kimberly M., William E.L., Diana G. M., and Primakoff P. (1994). A Hyaluronidase Activity of the Sperm Plasma Membrane Protein PH-20 Enables Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg. *JBC*. 125: 1157-1163.
171. Zamboni L. (1991). Physiology and pathophysiology of the human spermatozoon: the role of electron microscopy. *J Electron Microsc Tech* 17: 412-36.
172. Zeviani M., Moraes C.T., DiMauro S., et al. (1988). Deletions of mitochondrial DNA in Kearns–Sayre syndrome. *Neurology* 38:1339–1346.
173. Zini A., Jamie L. (2006). Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *CMAJ*. 175: 495-500.
174. Zeng Y., Clark N.E., Florman M.H. (1995). Sperm Membrane Potential: Hyperpolarization during Capacitation Regulates Zona Pellucida-Dependent Acrosomal Secretion. *Develop. Biology*. 171: 554–563.
175. Zorngiotti A.W., MacLeod J. (1973). Studies in temperature, human semen quality, and varicocele. *Fertil Steril*. 24: 854–63.
176. Αλαχιώτης Ν. Σ. (2007). Εισαγωγή στην εξέλιξη. Εκδοτικός Οργανισμός Λιβάνη. Αθήνα.
177. Μαργαρίτης Λ, Γαλανόπουλος Β, Κεραμάρης Κ, Μαρίνος Ε, Παπασιδέρης Ι, Στραβοπόδης Δ, Τρουγκάκος Ι. (2008). Βιολογία Κυττάρου. Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας. Αθήνα.