



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

«ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ: ΜΕΛΕΤΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΤΟΥ COMPLEX I ΤΗΣ ΟΧΡΟΣ ΚΑΙ ΟΙ ΣΥΝΕΠΕΙΕΣ
ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΣΤΗΝ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΑΡΣΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2018

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)	Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
ΘΕΟΛΟΓΙΑ ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ	Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών
ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ	Διδάκτωρ Γενετικής, Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π)

ΤΙΤΛΟΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

«ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ: Μελέτη γονιδίων του Complex I της OXPPOS και οι συνέπειες μεταλλάξεων στην γονιμότητα.»

THESIS TITLE:

“MALE INFERTILITY: Analysis of OXPPOS Complex I genes and correlation of mutations with male infertility”

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας στο Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το διάστημα 03/2018-06/2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ζήση Μαμούρη. Θα ήθελα, λοιπόν, να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ζήση Μαμούρη για την ευκαιρία που μου έδωσε να περατώσω τις σπουδές μου κάνοντας την διπλωματική μου εργασία στο συγκεκριμένο εργαστήριο, ενασχολούμενη με ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα. Έπειτα, ευχαριστώ την Επίκουρο Καθηγήτρια κα. Θεολογία Σαραφίδου αλλά και τον διδάκτορα κ. Κωνσταντίνο Σταμάτη για τη συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή. Οφείλω, ακόμη, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα κα. Μαρία Μαρκαντώνη που καθ'όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας με καθοδηγούσε, με συμβούλευε, με βοηθούσε καθιστώντας δυνατή την πραγματοποίησή της. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες κ. Θεμιστοκλή Γιαννουλή και κ. Ανδρέα Τσιπουρλιάνο για τις συμβουλές που μου έδωσαν αλλά και τη βοήθεια. Τέλος, ευχαριστώ όλα τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου αλλά και τα παιδιά που πραγματοποίησαν τις διπλωματικές τους την ίδια χρονική περίοδο για το ευχάριστο κλίμα και τη συνεργασία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παγκοσμίως, υπολογίζεται πως το 15% των ζευγαριών δεν μπορεί να τεκνοποιήσει και φαίνεται πως η συμβολή του ανδρικού παράγοντα στην υπογονιμότητα αγγίζει το 30%. Πρόσφατες έρευνες δείχνουν πως γενετικές βλάβες είναι υπεύθυνες για το 20% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Συγκεκριμένα, έχουν βρεθεί μικρές περιοχές γονιδίων αλλά και πολυμορφισμοί μίας βάσης (SNPs) σε μιτοχονδριακά γονίδια που πιθανώς να επηρεάζουν το φαινότυπο. Η οξειδωτική φωσφορυλίωση (OXPHOS) είναι μία διαδικασία πολύ σημαντική για το κύτταρο που συμβαίνει στα μιτοχόνδρια και προσδίδει την απαιτούμενη για τις διαδικασίες του κυττάρου ενέργεια μέσω της παραγωγής ATP. Συνεπώς, μεταλλάξεις σε γονίδια της OXPHOS μπορεί να καταστούν καταλυτικές και για τα σπερματοκύτταρα, εφ'όσον απαιτούν ενέργεια για την κίνησή τους. Μελετήθηκαν, λοιπόν, δύο γονίδια (*MTND2*, *MTND4*) του συμπλόκου I της OXPHOS από δείγματα σπέρματος 84 υπογόνιμων ανδρών (νορμοσπερμικών και μη) για να εντοπιστούν τυχόν μεταλλάξεις. Με την μέθοδο SSCP επιλέχθηκαν 16 δείγματα (7 για το *MTND2* και 9 για το *MTND4*) που εμφάνιζαν διαφορετικά πρότυπα και έπειτα ακολούθησε αλληλούχηση των δειγμάτων. Στο γονίδιο *MTND2* βρέθηκαν οι πολυμορφισμοί: i) 4769A>G, ii) 5005T>A, iii) 5007G>C και στο γονίδιο *MTND4* οι πολυμορφισμοί: i) 11864T>C, ii) 11947A>G, iii) 11914G>A.

ABSTRACT

It is estimated that 15% of couples, globally, are not able to give birth to children and the male factor seems to contribute to approximately 30% of all infertility conditions. Recent findings indicate that genetic abnormalities are responsible for 20% of male infertility. More specifically, mutations in small genomic regions or single nucleotide polymorphisms of mtDNA may cause phenotypical changes. The oxidative phosphorylation is a very important process that takes place in mitochondria and produces ATP, which provides energy to drive many processes in living cells. Consequently, mutations that may occur in OXPHOS genes probably are, also, vital for the sperm cells since the sperm cells require energy in order to be motile. Therefore, two OXPHOS complex I genes (*MTND2*, *MTND4*) from sperm DNA samples of 84 infertile men were studied. Firstly, PCR and SSCP methods were conducted in order to identify differences in the sequences and 16 samples (7 samples of *MTND2* and 9 samples of *MTND4*) seemed to have polymorphic sites. Then, the samples were sequenced and the results showed that three different polymorphisms: i) 4769A>G, ii) 5005T>A, iii) 5007G>C were identified in three samples of *MTND2* and three different polymorphisms of *MTND4*: i) 11864T>C, ii) 11947A>G, iii) 11914G>A were detected in two samples.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
Ανδρική υπογονιμότητα.....	7
Μορφολογία και κίνηση του σπερματοζωαρίου	8
Μιτοχόνδρια σπερματοζωαρίων.....	10
Οξειδωτική φωσφορυλίωση.....	11
Συσχέτιση ανδρικής υπογονιμότητας με πολυμορφισμούς σε μιτοχονδριακά γονίδια	15
Σύμπλοκο I: Μεταλλάξεις γονιδίων και υπογονιμότητα	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	18
1. Πληθυσμός υπό μελέτη.....	18
2. Απομόνωση DNA από σπέρμα.....	18
2.1. Απομόνωση	18
2.2. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο	19
2.3. Κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη.....	20
3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης	20
4. PCR για ενίσχυση του DNA και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	21
5. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας- SSCP.....	22
5.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	23
5.2. Αποδιάταξη δειγμάτων	24
5.3. Χρώση για SSCP	24
6. Καθαρισμός δειγμάτων και αλληλούχιση	24
7. Bioedit και Blast.....	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	34

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανδρική υπογονιμότητα

Ως υπογονιμότητα ορίζεται η αδυναμία απόκτησης απογόνων μετά από ένα χρόνο σεξουαλικών επαφών του ζευγαριού χωρίς προφύλαξη. Υπολογίζεται πως το 15% των ζευγαριών παγκοσμίως σήμερα δεν καταφέρνουν να τεκνοποιήσουν. (Agarawl et al., 2015). Σε ένα ποσοστό που φτάνει το 20-30% , η μη επίτευξη σύλληψης σχετίζεται μόνο με τον ανδρικό παράγοντα, ενώ σε άλλες περιπτώσεις οφείλεται στη γυναίκα ή και σε συνδυασμό προβλημάτων που αντιμετωπίζει το ζευγάρι (Agarawl et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα στην Ευρώπη και κυρίως στο Ανατολικό της μέρος, το ποσοστό των ανδρών που χαρακτηρίζονται ως υπογόνιμοι αγγίζει το 12% (Agarawl et al., 2015).

Με ποιον τρόπο όμως μπορεί ένας άνδρας να χαρακτηριστεί ως υπογόνιμος; Ουσιαστικά, αυτό επιτυγχάνεται με την ανάλυση σπέρματος (σπερμοδιάγραμμα). Το σπέρμα αποτελείται από τα σπερματοζωάρια και το σπερματικό υγρό και τα φυσικά του χαρακτηριστικά είναι ο όγκος, το pH, το χρώμα, το ιξώδες, η υγροποίηση (Patel et al., 2017). Έτσι λοιπόν, πριν την ανάλυση, συλλέγεται σπέρμα από άνδρα που απέχει από σεξουαλική επαφή ή εκσπερμάτιση τουλάχιστον δύο ημέρες. Με την επικείμενη ανάλυση του δείγματος μπορεί να υπολογιστεί ο αριθμός των σπερματοζωαρίων , να δειχθεί η ζωτικότητα (το ποσοστό των σπερματοζωαρίων που είναι ζωντανά), η μορφολογία (το ποσοστό του σπέρματος που έχει φυσιολογική κυτταρική δομή) και η κινητικότητα του (το ποσοστό του σπέρματος που φαίνεται να έχει κίνηση) (WHO, 2010). Σύμφωνα με την Πέμπτη έκδοση του εργαστηριακού εγχειριδίου του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (WHO, 2010), οι κατώτατες τιμές αναφοράς για το σπέρμα είναι οι παρακάτω (Πίνακας 1):

Πίνακας 1. Κατώτατες τιμές αναφοράς όπως δίνονται στο εγχειρίδιο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για ανάλυση ανθρώπινου σπέρματος

Χαρακτηριστικά σπέρματος	Τιμή αναφοράς
Συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων ($\times 10^6$)	15
Συγκέντρωση σπέρματος ($\times 10^6/\text{mL}$)	39
Όγκος (mL)	1.5
Συνολική κινητικότητα (%)	40
Ζωτικότητα (%)	58
Μορφολογία (%)	4
pH	≥ 7.2

Συνεπώς, ένας άνδρας που εμφανίζει τις προαναφερθείσες φυσιολογικές τιμές σε μία ανάλυση σπέρματος θεωρείται νορμοσπερμικός, ενώ αποκλίσεις από τα όρια που δίνονται οδηγούν σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις (WHO, 2010). Κάθε μία πάθηση είναι αποτέλεσμα αλλαγών μιας ή περισσότερων παραμέτρων (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Παθοφυσιολογικές καταστάσεις σπέρματος.

Πάθηση	Χαρακτηριστικά
Ασθenoσπερμία	Χαμηλή κινητικότητα σπερματοζωαρίων
Ολιγοσπερμία	Μικρός αριθμός σπερματοζωαρίων
Τερατοσπερμία	Μη φυσιολογική μορφή σπερματοζωαρίων
Ασθenoτερατοσπερμία	Χαμηλή κινητικότητα, μη φυσιολογική μορφή σπερματοζωαρίων
Ολιγοασθenoσπερμία	Μικρός αριθμός και χαμηλή κινητικότητα σπερματοζωαρίων
Ολιγοασθenoτερατοσπερμία	Μικρός αριθμός, χαμηλή κινητικότητα και μη φυσιολογική μορφή σπερματοζωαρίων
Αιμοσπερμία	Παρουσία ερυθροκυττάρων στο σπέρμα
Νεκροσπερμία	Μικρός αριθμός ζωντανών σπερματοζωαρίων

Πολλοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανδρική γονιμότητα όπως ο σύγχρονος τρόπος ζωής, η παχυσαρκία και ο διαβήτης, ορμονικές διαταραχές, η κισσοκήλη, διάφορες μολύνσεις του ουροποιητικού και γενετικού συστήματος, χειρουργικές επεμβάσεις, χημειοθεραπείες (Pizzol et al., 2014; Singh, Jaiswal, 2011; Tahmasbpour et al., 2014). Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια έχουν βρεθεί γενετικά αίτια (χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y, μονογονιδιακές μεταλλάξεις στο πυρηνικό αλλά και μιτοχονδριακό DNA) που είναι υπεύθυνα για το 10-15% των περιπτώσεων ανδρικής υπογονιμότητας (Pizzol et al., 2014; Singh, Jaiswal, 2011; Tahmasbpour et al., 2014). Πιο λεπτομερώς, οι δομικές και αριθμητικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες όπως το σύνδρομο Klinefelter με καρυότυπο 47, XXY, οι μεταθέσεις κατά Robertson κλπ. εμφανίζονται στο 5% των υπογόνιμων ανδρών (Pizzol et al., 2014; Singh, Jaiswal, 2011). Έπειτα, τα μικροελλείμματα στο χρωμόσωμα Y, ιδιαίτερα στις περιοχές του παράγοντα αζωοσπερμίας (AZFa, AZFb, AZFc), έχουν σαν αποτέλεσμα την απουσία γονιμότητας. Τέλος, μονογονιδιακές γενετικές βλάβες στο γονίδιο CFTR ή στο γονίδιο του υποδοχέα GnRH και άλλων μπορεί να προκαλέσουν υπογονιμότητα (Pizzol et al., 2014; Singh, Jaiswal, 2011; Tahmasbpour et al., 2014).

Εστιάζοντας στις μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και λαμβάνοντας υπ' όψιν τη δομή του σπερματοζωαρίου, το «ταξίδι» που κάνει μέχρι να γονιμοποιήσει το ωάριο και τις πιο συχνά εμφανιζόμενες ανωμαλίες του σπέρματος, μπορεί κανείς στη συνέχεια να προβεί στη συσχέτιση της υπογονιμότητας και του ρόλου του μιτοχονδρίου σε αυτή.

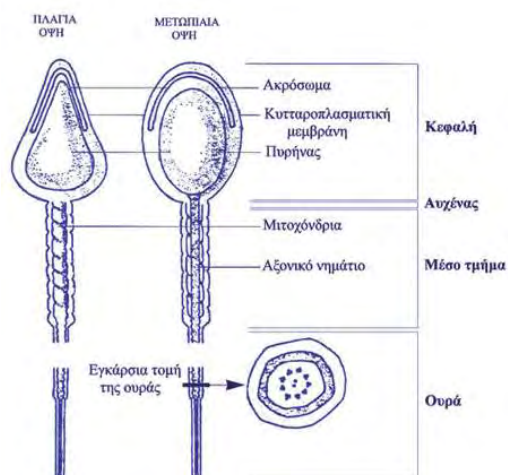
Μορφολογία και κίνηση του σπερματοζωαρίου

Ένα σπερματοζωάριο είναι απλοειδές κύτταρο με 23 χρωμοσώματα, έχει ολικό μήκος 50 μm και αποτελείται από δύο μορφολογικά και λειτουργικά διακριτές περιοχές:

i) την κεφαλή και ii) την ουρά ή μαστίγιο. Το τμήμα που συνδέει κεφαλή και ουρά λέγεται αυχένας.

i) Η κεφαλή (Εικόνα 1) του φυσιολογικού σπερματοζωαρίου έχει σχήμα ωοειδές, μήκος 3-5 μm , πλάτος 2-3 μm και πάχος 1,5 μm . Αποτελείται από τον πυρήνα και το ακρόσωμα, τα οποία καλύπτονται από την πυρηνική μεμβράνη και το μετακροσωματικό έλυτρο. Ο πυρήνας περιέχει το γενετικό υλικό του άνδρα. Το DNA των σπερματοζωαρίων έχει λίγο διαφορετική δομή από το DNA των σωματικών κυττάρων: το DNA βρίσκεται συμπυκνωμένο στον μικρότερο δυνατό όγκο, έτσι ώστε να εξοικονομείται χώρος. Το ακρόσωμα καλύπτει τα πρόσθια δύο τρίτα του πυρήνα και αποτελείται από δύο τμήματα, το πρόσθιο και το τμήμα του ισημερινού (Georgadaki et al., 2016).

ii) Η ουρά (Εικόνα 1) έχει μήκος 40-50 μm , αποτελείται από δέκα συνολικά ζεύγη ινιδίων (ένα κεντρικό και εννέα περιφερικά) και προσδίδει στο σπερματοζωάριο τη χαρακτηριστική κινητικότητα του. Το μεσαίο τμήμα, που βρίσκεται στην αρχή της ουράς, έχει μήκος 5-7 μm και πλάτος 1 μm . Περιέχει το αξονικό νημάτιο που περιβάλλεται από ινίδια και 1-2 κεντροσωμάτια. Επίσης, περιλαμβάνει μιτοχόνδρια, ενζυμικά συστήματα γλυκολύσεως και οξειδώσεως και προσδίδει την απαραίτητη ενέργεια για την επιβίωση και την κινητικότητα (Georgadaki et al., 2016).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας του σπερματοζωαρίου

(Πηγή: <http://www.eugonia.com.gr/anthropini-anaparagogi/embryologia/spermatogenei/morfologia/>)

Όσον αφορά το ταξίδι του σπέρματος από την εκσπερμάτιση μέχρι τη γονιμοποίηση του ωαρίου είναι το εξής:

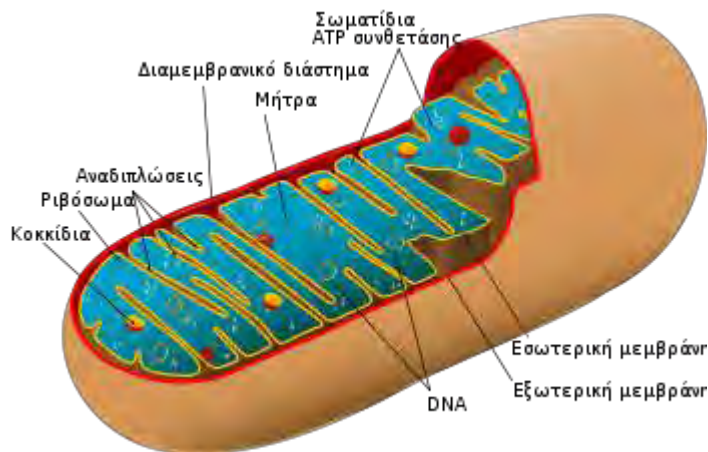
- Αρχικά, εναποτίθεται στον κόλπο ωστόσο δεν είναι έτοιμο να γονιμοποιήσει το ωάριο παρ'όλο που μπορεί να κινηθεί. Το σπέρμα βρίσκεται σε ζελατινώδη μορφή, περιέχει άφθονη χοληστερόλη στις μεμβράνες, γλυκοπρωτεΐνες και άλλους ανασταλτικούς για τη γονιμοποίηση παράγοντες (Ikawa et al., 2010).
- Ξεκινάει η διαδικασία της ενεργοποίησής του με την απομάκρυνση της χοληστερόλης και των πρωτεϊνών και άλλων γεγονότων. Το τελικό στάδιο είναι η υπερενεργοποίηση, ενεργοβόρα διαδικασία που χαρακτηρίζεται από

έντονη κίνηση της ουράς και μεγάλη ικανότητα «κολύμβησης» του σπέρματος (Ikawa et al., 2010; Georgadaki et al., 2016).

- Πολλά σπερματοζωάρια πεθαίνουν πριν φτάσουν να γονιμοποιήσουν το ωάριο λόγω του αντίξοου όξινου περιβάλλοντος στον κόλπο και την μήτρα (Georgadaki et al. 2016).
- Όσα επιζούν πρέπει να κολυμπήσουν μια απόσταση περίπου ίση με 15-18cm (Sandra, 2018) μέσα στην τραχηλική βλέννη για να φτάσουν στη μήτρα και έπειτα στις σάλπιγγες, όπου γίνεται η γονιμοποίηση ενός ωαρίου από ένα σπερματοζωάριο (Georgadaki et al. 2016).

Μιτοχόνδρια σπερματοζωαρίων

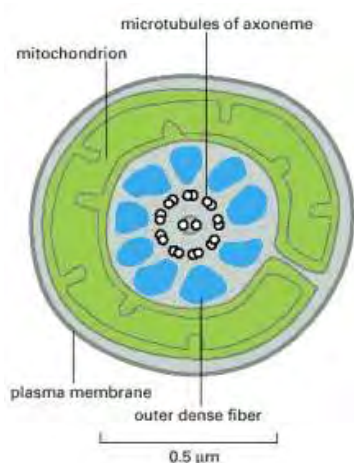
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, στο μεσαίο τμήμα της ουράς του σπερματοζωαρίου υπάρχουν 72-80 μιτοχόνδρια (Rajender et al., 2010). Τα μιτοχόνδρια είναι υποκυτταρικά ημιαυτόνομα οργανίδια που βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα όλων των ανθρώπινων κυττάρων και έχουν το δικό τους DNA (16569bp) (Mitomap, 2018). Αποτελούνται από δύο μεμβράνες, την εσωτερική και την εξωτερική που διαχωρίζονται από ένα διαμεμβρανικό διάστημα. Η εσωτερική μεμβράνη είναι αναδιπλωμένη, σχηματίζει πτυχωσείς (ακρολοφίες) και φέρει οξυσώματα που αποτελούνται από πολυενζυμικά συστήματα (Εικόνα 2). Εκεί πραγματοποιείται η οξειδωτική φωσφορυλίωση, ενώ στη μήτρα (περιβάλλεται από την εσωτερική μεμβράνη) βρίσκεται το γενετικό υλικό που κωδικοποιεί 2 rRNAs, 22 tRNAs και 13 γονίδια από τα 67 των υπομονάδων που δημιουργούν τα αναπνευστικά σύμπλοκα (Rajender et al., 2010; Amaral et al., 2013).



Εικόνα 2. Το μιτοχόνδριο (Πηγή: el.wikipedia.org/wiki/%CE%9C%CE%B9%CF%84%CE%BF%CF%87%CF%8C%CE%BD%CE%B4%CF%81%CE%B9%CE%BF)

Τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων συγκεκριμένα εμφανίζουν κάποια διαφορετικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά. Κατά τη διαδικασία της σπερματογένεσης, τα ώριμα σπερματοζωάρια καταλήγουν να έχουν λιγότερα (λόγω της μείωσης του κυτταροπλάσματος) αλλά πιο μεταβολικά ενεργά μιτοχόνδρια από ότι τα σπερματογόνια και τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα (Amaral et al., 2013). Τα μιτοχόνδρια βρίσκονται μόνο στο μεσαίο τμήμα (εμπλουτισμένο με πολλά γλυκολυτικά ένζυμα), τυλιγμένα γύρω από το αξονικό νημάτιο (Εικόνα 3). Το ATP

που παράγεται στα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων μεταφέρεται στο κέντρο κινητικότητας στην ουρά μέσω μεταφορέων της φωσφορικής κρεατίνης ή μέσω οριζόντιας διάχυσης (Shamsi et al., 2008). Είναι πολύ δύσκολο να απομονωθούν με συμβατικές μεθόδους λόγω της κοντινής απόστασής μεταξύ τους. Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια των σπερματοζωαρίων έχουν πολλά ισοένζυμα ή ειδικές ισομορφές πρωτεϊνών που διαφέρουν από τα ένζυμα των μιτοχονδρίων των σωματικών κυττάρων, όπως το κυτόχρωμα c, η υπομονάδα VIb της οξειδάσης του κυτοχρώματος c κλπ (Piomboni et al., 2011).



Εικόνα 3. Εγκάρσια τομή της ουράς του σπερματοζωαρίου

Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Η διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης συμβαίνει στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων, στην οποία υπάρχουν οι ακρολοφίες και έτσι αυξάνεται μεν η επιφάνεια και συνεπώς οι θέσεις για την αντίδραση. Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, ηλεκτρόνια από το NADH και το FADH₂ χρησιμοποιούνται για την αναγωγή μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η πολύ εξώεργη αναγωγή του μοριακού οξυγόνου από το NADH και το FADH₂ πραγματοποιείται μέσω ενός αριθμού αντιδράσεων μεταφοράς ηλεκτρονίων, που λαμβάνουν χώρα σε ένα σύνολο μεμβρανικών πρωτεϊνών, γνωστών ως αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η ροή των ηλεκτρονίων από NADH/FADH₂ στο O₂ μέσω πρωτεϊνικών συμπλόκων στην εσωτερική μεμβράνη, οδηγεί στην άντληση πρωτονίων από τη μήτρα. Η προκύπτουσα ανισοκατανομή πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μεμβράνης δημιουργεί μια βαθμίδωση pH και μια διαμεμβρανική διαφορά δυναμικού ώστε να παραχθεί μια πρωτονιοκίνητη δύναμη. Η σύνθεση του ATP λαμβάνει χώρα όταν τα πρωτόνια ρέουν προς τη μήτρα δια μέσου ενός ενζυμικού συμπλόκου. Άρα η οξείδωση καύσιμων μορίων και η φωσφορυλίωση του ADP είναι συζευγμένες μέσω μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης πρωτονίων μεταξύ των δύο πλευρών της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, η οξείδωση λιπαρών οξέων και η μετατροπή του πυροσταφυλικού οξέος, προωθούν τη παραγωγή του ακετυλο-συνενζύμου Α το οποίο και εισάγεται στον κύκλο του Krebs και από εκεί

σχηματίζονται τρία μόρια NADH, ένα FADH₂ και ένα μόριο GTP. Με τη σειρά τους τα NADH/FADH₂ μεταφέρουν ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας από τα οποία προκύπτει η ηλεκτρονιοκίνητη δύναμη που μετατρέπεται σε πρωτονιοκίνητη και η τελευταία με τη σειρά της σε δυναμικό μεταφοράς φωσφορικής ομάδας. Η μετατροπή της ηλεκτρονιοκίνητης δύναμης σε πρωτονιοκίνητη επιτελείται από τρεις ηλεκτρονιοκίνητες αντλίες, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH- συνενζύμου Q, την οξειδοαναγωγή του ζεύγους συνενζύμου Q- κυτοχρώματος c και την οξειδάση του κυτοχρώματος c. Η τελική φάση της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης επιτελείται από τη συνθάση του ATP και η σύνθεση ωθείται από τη ροή πρωτονίων πίσω προς τη μιτοχονδριακή μήτρα.

Τα σύμπλοκα των πρωτεϊνών που παίρνουν μέρος στην OXPHOS

- Σύμπλοκο I: Οξειδοαναγωγή του ζεύγους NADH-Q

Το σύμπλοκο I είναι ένα τεράστιο ένζυμο, με το σύμπλοκο των θηλαστικών να διαθέτει 44 υπομονάδες και μάζα περίπου 1000kDa. Διαθέτει 44 γονίδια, από τα οποία τα 7 είναι μιτοχονδριακής προέλευσης ενώ τα υπόλοιπα 37 πυρηνικής προέλευσης. (Lenaz , et al. (2006). Η αντίδραση που καταλύεται από αυτό το ένζυμο είναι η οξείδωση του NADH από το συνένζυμο Q10 ή ουβικινόνη και η αντίδραση είναι η εξής:

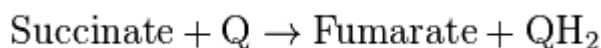


Αρχικά, το NADH προσδένεται στο σύμπλοκο και προσφέρει δύο ηλεκτρόνια τα οποία εισέρχονται στο σύμπλοκο μέσω μιας προσθετικής ομάδας η οποία είναι συνδεδεμένη με το σύμπλοκο, το φλαβινο- μονονουκλεοτιδίο (FMN). Η προσθήκη ηλεκτρονίων στο FMN το ανάγει στη μορφή FMNH₂. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω μιας σειράς συμπλόκων σιδήρου- θείου, τα οποία είναι επίσης προσθετικές ομάδες. Καθώς τα ηλεκτρόνια διέρχονται μέσα από το σύμπλοκο, τέσσερα πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα προς το διαμεμβρανικό χώρο μέσω δομικών αλλαγών οι οποίες προκαλούν την πρωτεΐνη να προσδέσει πρωτόνια στην N πλευρά της μεμβράνης και να τα απελευθερώσει στην P πλευρά. Τέλος, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την αλυσίδα συμπλόκων σιδήρου- θείου σε ένα μόριο ουβικινόνης στη μεμβράνη. Η αναγωγή της ουβικινόνης επίσης συνεισφέρει στην δημιουργία μιας βαθμίδωσης πρωτονίων, καθώς δύο πρωτόνια αντλούνται από τη μήτρα για να μετατραπεί στη ανηγμένη μορφή της ουβικινόλης (QH₂).

- Σύμπλοκο II: ηλεκτρική αφυδρογονάση

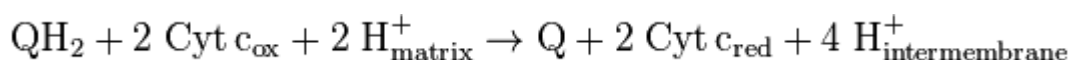
Η ηλεκτρική αφυδρογονάση είναι το μόνο ένζυμο που είναι μέρος και του κύκλου του κιτρικού οξέως αλλά και της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Το δεύτερο σύμπλοκο αποτελείται από 4 υπομονάδες και περιέχει έναν προσδεδεμένο συμπαραγόνα (FAD), σύμπλοκα σιδήρου- θείου, και μία ομάδα αίμης (Yankovskaya

V et al 2003). Είναι το μόνο σύμπλοκο της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης το οποίο δεν διαθέτει καθόλου μιτοχονδριακά γονίδια αλλά 4 πυρηνικής προέλευσης. Το σύμπλοκο οξειδώνει το ηλεκτρικό σε φουμαρικό και ανάγει την ουβικινόνη. Αυτή η αντίδραση απελευθερώνει λιγότερη ενέργεια από την οξείδωση του NADH και ως εκ τούτου, το σύμπλοκο II δεν μεταφέρει πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης και δε συνεισφέρει στη βαθμίδωση πρωτονίων. Η αντίδραση είναι η εξής:



- Σύμπλοκο III: οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q- κυτοχρώματος c

Η δεύτερη από τις τρεις αντλίες πρωτονίων της αναπνευστικής αλυσίδας είναι η οξειδοαναγωγή του ζεύγους Q- κυτοχρώματος c. Το ένζυμο είναι διμερές, με το κάθε κομμάτι να περιέχει 11 πρωτεϊνικές υπομονάδες, ένα σύμπλοκο σιδήρου- θείου και τρία κυτοχρώματα: ένα κυτόχρωμα c₁ και δύο κυτοχρώματα b. Το σύμπλοκο έχει συνολικά 10 γονίδια από τα οποία τα 9 είναι πυρηνικής προέλευσης και ένα μόνο μιτοχονδριακό. Τα κυτοχρώματα είναι πρωτεΐνες μεταφοράς ηλεκτρονίων που περιέχουν τουλάχιστον μια ομάδα αίμης. Η αντίδραση που καταλύεται από το σύμπλοκο III είναι η οξείδωση ενός μορίου ουβικινόλης και η αναγωγή δυο μορίων του κυτοχρώματος c. Αντίθετα με το συνένζυμο Q το οποίο διαθέτει δύο ηλεκτρόνια, το κυτόχρωμα c διαθέτει ένα ηλεκτρόνιο.

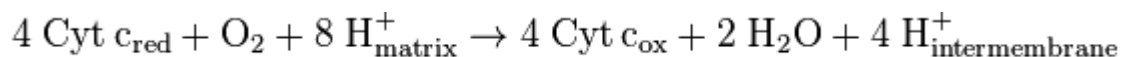


Στο πρώτο βήμα της αντίδρασης, το ένζυμο προσδένει τρία υποστρώματα, πρώτον το QH₂ το οποίο στη συνέχεια οξειδώνεται, με το ένα ηλεκτρόνιο να περνάει στο δεύτερο υπόστρωμα, το κυτόχρωμα c. τα δύο πρωτόνια που απελευθερώνονται από το QH₂ περνάνε στο διαμεμβρανικό χώρο. Το τρίτο υπόστρωμα είναι το Q, το οποίο δέχεται το δεύτερο ηλεκτρόνιο από το QH₂ και ανάγεται. Στο δεύτερο βήμα, ένα δεύτερο μόριο QH₂ προσδένεται και ξαναδίνει το πρώτο του ηλεκτρόνιο σε ένα κυτόχρωμα c. Καθώς το συνένζυμο Q ανάγεται σε ουβικινόλη στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης και οξειδώνεται σε ουβικινόνη στο άλλο μέρος της μεμβράνης, συμβαίνει η βαθμίδωση πρωτονίων λόγω μεταφοράς τους κατά μήκος της μεμβράνης (Schultz et al 2001).

- Σύμπλοκο IV: οξειδάση κυτοχρώματος c

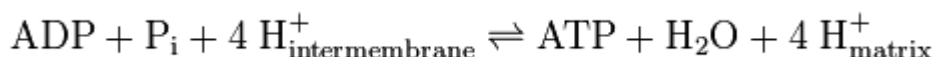
Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι το τελευταίο πρωτεϊνικό σύμπλοκο στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (Calhoun et al.1994). Το ένζυμο των θηλαστικών έχει μια πολύ περίπλοκη δομή και περιέχει 19 υπομονάδες, δύο ομάδες αίμης και πολλούς συμπαραγόντες μεταλλικών ιόντων. Από τα 19 γονίδια που διαθέτει, υπάρχουν 3 μιτοχονδριακής προέλευσης και τα υπόλοιπα 16 είναι πυρηνικά. Το ένζυμο πραγματοποιεί την τελευταία αντίδραση στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και

μεταφέρει ηλεκτρόνια στο οξυγόνο ενώ αντλεί πρωτόνια κατά μήκος της μεμβράνης (Yoshikawa et al 2006). Ο τελευταίος δέκτης ηλεκτρονίων, το O₂ ανάγεται σε νερό σε αυτό το βήμα. Η άντληση πρωτονίων και η κατανάλωση των πρωτονίων της μήτρας κατά την αναγωγή του οξυγόνου, συνεισφέρουν στην βαθμίδωση πρωτονίων. Η αντίδραση που καταλύεται είναι η οξειδωση του κυτοχρώματος c και η αναγωγή του οξυγόνου.

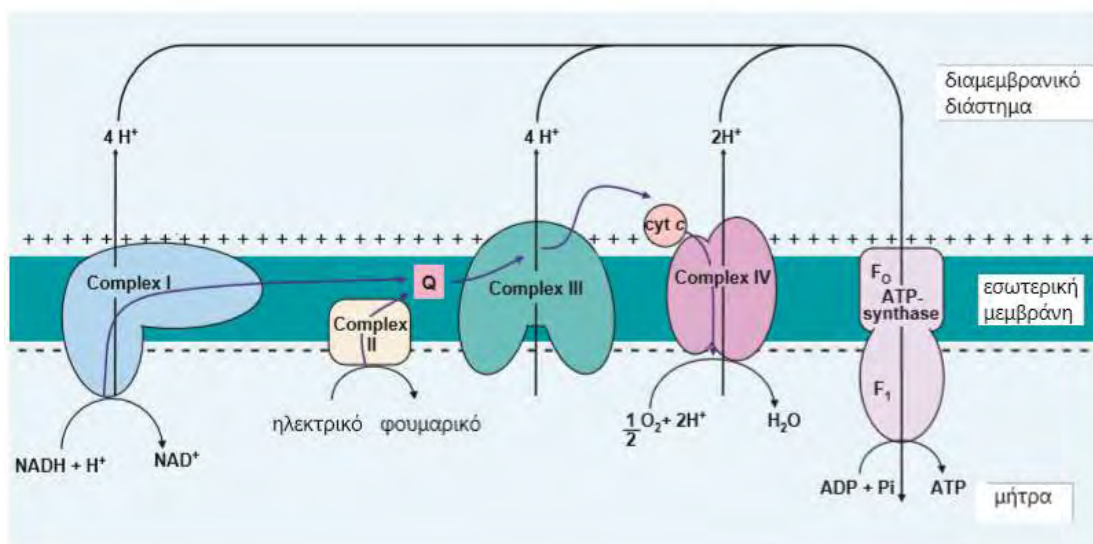


- Σύμπλοκο V: ATP συνθάση

Η ATP συνθάση είναι το τελευταίο ένζυμο στο μονοπάτι της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό το ένζυμο βρίσκεται σε όλες τις μορφές ζωής και λειτουργεί με τον ίδιο τρόπο σε προκαρυώτες και ευκαρυώτες (Boyer et al 1997). Διαθέτει 19 γονίδια από τα οποία τα 17 είναι πυρηνικά και τα 2 μιτοχονδριακά. Χρησιμοποιεί την ενέργεια που είναι αποθηκευμένη στη βαθμίδωση πρωτονίων κατά μήκος της μεμβράνης για να οδηγήσει στη σύνθεση ATP από ADP και φωσφορικό (P_i). Η αντίδραση που καταλύεται είναι η εξής:



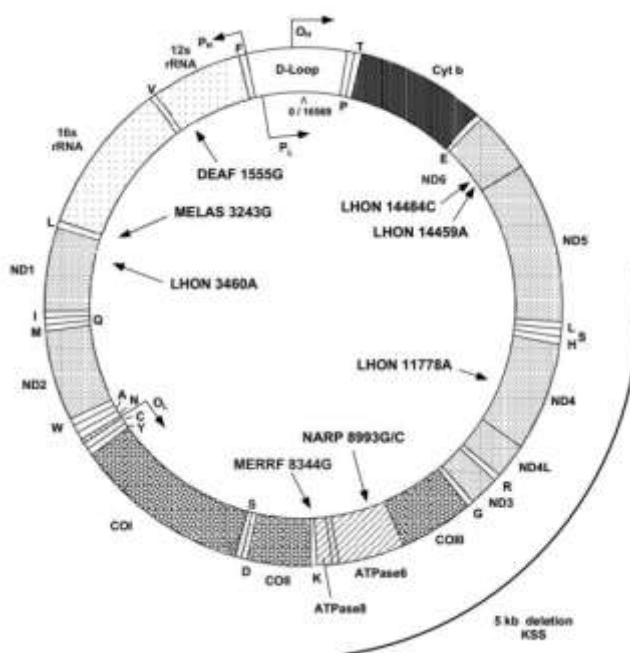
Η ATP συνθάση είναι ένα μεγάλο πρωτεϊνικό σύμπλοκο με σχήμα μανιταριού και περιέχει 19 υπομονάδες. Η περιοχή που βρίσκεται βυθισμένη στη μεμβράνη ονομάζεται F_o και περιέχει ένα δαχτυλίδι υπομονάδων και το κανάλι πρωτονίων. Η σφαίρα στην κορυφή του συμπλόκου ονομάζεται F₁ και είναι η περιοχή της σύνθεσης του ATP. Η υπομονάδα F₁ περιέχει 6 πρωτεΐνες δυο διαφορετικών ειδών (τρεις α υπομονάδες και τρεις β υπομονάδες), ενώ η F_o περιέχει μια πρωτεΐνη, τη γ υπομονάδα. Οι υπομονάδες α και β προσδένουν νουκλεοτίδια αλλά μόνο οι β υπομονάδες καταλύουν την αντίδραση της σύνθεσης ATP. Καθώς πρωτόνια διατρέχουν τη μεμβράνη μέσω του διαύλου στη βάση της συνθάσης, η υπομονάδα F₁ περιστρέφεται και έτσι γίνεται η σύνθεση του ATP. Πιο συγκεκριμένα, η αντίδραση της σύνθεσης του ATP συμπεριλαμβάνει τη συμμετοχή του ενεργού κέντρου μιας υπομονάδας β η οποία υπάρχει σε τρεις καταστάσεις. Στην «ανοιχτή» κατάσταση, το ADP και το φωσφορικό μπαίνουν στο ενεργό κέντρο. Η πρωτεΐνη στη συνέχεια κλείνει γύρω από τα μόρια αυτά και τα προσδένει χαλαρά. Στη συνέχεια το ένζυμο αλλάζει σχήμα ξανά και φέρνει τα μόρια ακόμη πιο κοντά και το ενεργό κέντρο προσδένει το παραγόμενο μόριο ATP με πολύ υψηλή συγγένεια. Τέλος, το ενεργό κέντρο γυρνάει και πάλι στην ανοιχτή κατάσταση, απελευθερώνοντας το ATP και προσδένοντας εκ νέου ADP και φωσφορικά (Markantoni, 2016).



Εικόνα 4. Σχηματική περιγραφή του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης (Πηγή: Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V., 2011)

Συσχέτιση ανδρικής υπογονιμότητας με πολυμορφισμούς σε μιτοχονδριακά γονίδια

Οι μεταλλάξεις (Εικόνα 5) που συμβαίνουν στο μιτοχόνδριο είναι: α) ενθέσεις ή ελλείμματα, και β) αντικατάσταση μίας βάσης. Μεταλλάξεις που συμβαίνουν σε μεγάλο τμήμα του DNA έχουν συσχετιστεί με κώφωση, το σύνδρομο Kearns-Sayre, διαβήτη κλπ, ενώ παρανοσηματικές μεταλλάξεις οδηγούν σε διαταραχές όπως η LHON (Leber hereditary optic neuropathy), εγκεφαλοπάθειες κλπ (Spiropoulos, Chinnery, Turnbull, 1999).



Εικόνα 5. Μιτοχόνδριο και ασθένειες (Πηγή: mitomap.org)

Λαμβάνοντας υπ' όψη πως τα μιτοχόνδρια είναι σημαντικά οργανίδια για την σωστή λειτουργία του σπέρματος και την γονιμότητα λόγω της ιδιότητας τους να παράγουν χημική ενέργεια, μεταλλάξεις που συμβαίνουν στο mtDNA επηρεάζουν και την γονιμότητα. Θα πρέπει να σημειωθεί, επίσης, πως η απουσία ιντρονίων, ιστονών και πολύπλοκων μηχανισμών επιδιόρθωσης του mtDNA καθιστά αυτομάτως τις μεταλλάξεις στα μιτοχόνδρια πιο πιθανές αιτίες για εμφάνιση παθολογικής κατάστασης (Shamsi et al., 2008). Μάλιστα, ο μικρός αριθμός των μιτοχονδρίων στα σπερματοζώαρια έχει ως αποτέλεσμα τη γρήγορη φαινοτυπική εμφάνιση διαταραχών που σχετίζονται κυρίως με την κινητικότητα του σπέρματος (Shamsi et al., 2008). Υπήρξαν, βέβαια, μελέτες στις οποίες φάνηκε πως η οξειδωτική φωσφορυλίωση δεν είναι η μόνη πηγή ενέργειας για τα σπερματοζώαρια (παραγωγή ATP από γλυκόλυση) και άρα δεν μπορεί να θεωρηθεί ως ο κύριος παράγοντας πρόκλησης διαταραχών (Rajender et al., 2010; Amaral et al. 2013). Ωστόσο, πειράματα που έγιναν σε ασθενοσπερμικούς άνδρες έδειξαν δομικές και λειτουργικές αλλαγές στο μιτοχόνδριο, στο μικρότερο μεσαίο τμήμα όπου βρίσκονται τα μιτοχόνδρια και αυτό επιβεβαιώνει το ρόλο των μιτοχονδρίων στην κινητικότητα των σπερματοζωαρίων (Baklouti-Gargouri et al., 2013; Tahmasbpour, Balasubramanian, Agarwal, 2014). Μάλιστα, η ασθενοσπερμία φαίνεται να αποτελεί την κύρια αιτία υπογονιμότητας στο 30% των ανδρών (Moore, Reijo-Pera, 2000). Σε μια μελέτη των Carra et al. (2004) με δείγματα ιδιοπαθών ολιγοασθενοσπερμικών ασθενών με διαφορετική συγκέντρωση σπέρματος και κινητικότητα ο καθένας, φάνηκε πως μόνο το σπέρμα που κινείται έχει λειτουργικά μιτοχόνδρια.

Σύμπλοκο I: Μεταλλάξεις γονιδίων και υπογονιμότητα

Μεταλλάξεις αντικατάστασης μίας βάσης σε κωδικές περιοχές μιτοχονδριακών γονιδίων όπως τα *COXII*, *ATP6* και *ATP8* προκαλούν παθολογικό φαινότυπο που σχετίζεται με κακής ποιότητας και χαμηλής κινητικότητας σπέρμα (Holyoake et al., 2008).

Εστιάζοντας στο σύμπλοκο I που είναι το μεγαλύτερο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας, φαίνεται πως η δυσλειτουργία του αποτελεί την πιο συχνή διαταραχή της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Το σύμπλοκο I έχει 44 υπομονάδες εκ των οποίων μόνο οι 7 κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια (*MTND1*, *MTND2*, *MTND3*, *MT-ND4L*, *MTND4*, *MTND5*, *MTND6*). Σχηματίζει μία δομή σχήματος L και χωρίζεται σε υδρόφιλο περιφερειακό τμήμα και στο υδρόφοβο τμήμα. Στο υδρόφοβο μέρος του συμπλόκου (P module) βρίσκονται τρεις υπομονάδες, οι ND2 (κωδικοποιεί πολυπεπίδιο 347 αμινοξέων), ND4 (459 αμινοξέα) και ND5 που είναι εξαιρετικά υδρόφοβες πρωτεΐνες και εμπλέκονται στην άντληση πρωτονίων. Πολλές μεταλλάξεις σε αυτές τις πρωτεΐνες είναι υπεύθυνες για ασθένειες όπως η LHON και η μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια (MELAS) (Mimaki, Wang, McKenzie, Thorburn, Ryan, 2012).

Επιπροσθέτως, μεταλλάξεις στο γονίδιο *MTND4* φαίνεται πως είναι παράγοντας πρόκλησης ανδρικής υπογονιμότητας. Οι Holyoake et al. (2001) εντόπισαν σε δείγματα υπογόνιμων ανδρών 3 σημειακές μεταλλάξεις στις θέσεις **11719G>A**,

11812A>G, **11914G>A**. Σε μελέτες που έγιναν σε υπογόνιμους άνδρες στην Κίνα η μετάλλαξη **11084A>G** θεωρείται υποψήφια αιτία ασθενοσπερμίας, αφού η πρωτεϊνική δομή της ND4 καταστρέφεται και έχει ήδη συσχετιστεί και με άλλες ασθένειες όπως Alzheimer, Parkinson (Ni, Zhou, Zhang, Wang, Song, Jiang, 2016). Επιπλέον, η μετάλλαξη **11696G>A** βρέθηκε και αυτή να είναι υπαίτια για ασθενοσπερμία στον Κινέζικο πληθυσμό αφού κωδικοποιεί για ισολευκίνη αντί για βαλίνη (Val⇒Ile) και ήδη ήταν παράγοντας για ασθένειες όπως η LHON (Ji et al., 2017). Ενώ, στον Ινδικό πληθυσμό, μελέτη που είχε συσχετίσει τη μετάλλαξη **11994C>T** στο MTND4 με χαμηλή κινητικότητα του σπέρματος αποδείχθηκε πως είχε ανεπαρκή στοιχεία για να προβεί σε τέτοια συσχέτιση (Palanichamy, Zhang, 2011). Μάλιστα, για την συγκεκριμένη μετάλλαξη μελετήθηκαν και άτομα στην Πορτογαλία και φάνηκε να μην υφίσταται σε υπογόνιμους άνδρες (Pereira, Goncalves, Bandelt, 2008). Οι Kumar et al. (2009) ανίχνευσαν με ανάλυση του mtDNA τη μετάλλαξη που είχαν ανιχνεύσει και οι Holyoake et al. (2001) στο MTND4 (**11719G>A**) ολιγοασθενοσπερμικών ανδρών. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη είχε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης στα δείγματα ασθενών από ότι στα δείγματα ελέγχου (Kumar et al., 2009).

Όσον αφορά το MTND2 στη μελέτη των Kumar et al. (2009) επίσης βρέθηκαν μεταλλάγματα στην ομάδα control. Στη θέση **4769**, υπήρχε αντικατάσταση A από T που ήταν σιωπηλή μετάλλαξη και στη θέση **5400** υπήρξε αλλαγή G>C (βαλίνη>λευκίνη) που οδήγησε σε παρανοηματική μετάλλαξη. Φαίνεται πως η μετάλλαξη **5400G>C** είναι ειδική για τον πληθυσμό, δηλαδή συναντάται κυρίως στον Ινδικό πληθυσμό (Kumar et al., 2009). Οι Barbhuiya et al. (2016) σε μια μελέτη τους για την υπογονιμότητα στην Βορειανατολική Ινδία βρήκαν 12 SNPS στο γονίδιο MTND2. Κάποια από αυτά τα SNPs έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες, όπως **4769A>G** (βρέθηκε και σε control και σε υπογόνιμους άνδρες), **4917A>G** (ασθενοσπερμία), **5186A>T** (αζωοσπερμία), ενώ υπήρξαν και νέες μεταπτώσεις όπως **4993T>C** (ασθενοσπερμία), **5046G>A** (ολιγοσπερμία), **5054G>A**(ολιγοσπερμία), **5250T>G** (ασθενοτερατοσπερμία) (Barbhuiya et al., 2016). Επιπλέον, συνώνυμες μεταλλάξεις A>G στη νουκλεοτιδική θέση **4514** και G>A στη θέση **4580** παρατηρήθηκαν σε περιπτώσεις ασθενοσπερμίας (Khan, 2006). Αυτές οι μεταλλάξεις δεν επηρεάζουν την λειτουργία της ND2 υπομονάδας αλλά μπορεί να επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μετάφρασης (Khan, 2006). Επίσης, σε ολιγοασθενοσπερμικούς άνδρες βρέθηκε η μετάλλαξη **5263C>T** να σχετίζεται πιθανώς με τον παθολογικό φαινότυπο (Ji et al., 2017).

Ολοένα και περισσότερες μελέτες συσχετίζουν το ρόλο του μιτοχονδρίου με την αιτιότητα της υπογονιμότητας. Κυρίως, η χαρακτηριστική κινητικότητα του σπερματοζωαρίου ώστε να φτάσει να γονιμοποιήσει το ωάριο φαίνεται να εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την παραγωγή ενέργειας με την διαδικασία της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια των σπερματοκυττάρων. Ο στόχος, λοιπόν, της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι, αρχικά, η επιβεβαίωση ύπαρξης της προαναφερθείσας αλληλοσυσχέτισης. Αυτό θα επιτευχθεί με τη μελέτη δειγμάτων

υπογόνιμων ανδρών αλλά και δειγμάτων ελέγχου (control) σύμφωνα με παγκόσμια κριτήρια, ώστε να υπάρξει σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Έπειτα, με την χρήση κατάλληλων τεχνικών, στόχο αποτελεί η επιβεβαίωση εμφάνισης πολυμορφισμών που έχουν προηγουμένως συσχετιστεί στη βιβλιογραφία με oligospermia, teratospermia και asthenospermia στα γονίδια *MTND2* και *MTND4* του complex I της OXPHOS αλλά και πιθανώς η εύρεση νέων πολυμορφισμών που εμφανίζονται σε Έλληνες υπογόνιμους άνδρες και ίσως να αποτελούν πληθυσμιακό χαρακτηριστικό.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Πληθυσμός υπό μελέτη

Στην παρούσα πτυχιακή τα άτομα υπό μελέτη είναι ανδρικού φύλου, ελληνικής καταγωγής. Ουσιαστικά, δείγματα σπέρματος από 84 άνδρες που ήταν χαρακτηρισμένοι από την Embryolab, πρότυπη Μονάδα Ιατρικώς Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής, ως νορμοσπερμικοί (38 δείγματα) ή εμφάνιζαν παθοφυσιολογική κατάσταση (46 δείγματα) στον αριθμό, στην κινητικότητα ή/και τη μορφολογία των σπερματοζωαρίων (Πίνακας 3) σύμφωνα με τον WHO αναλύθηκαν για την εύρεση πολυμορφισμών στα *MTND2* και *MTND4* γονίδια του complex I της OXPHOS.

Πίνακας 3. Χαρακτηρισμός των δειγμάτων ως προς την κατάσταση του σπέρματος και ο αριθμός των δειγμάτων σε κάθε κατηγορία.

Χαρακτηρισμός δειγμάτων	Αριθμός δειγμάτων
Νορμοσπερμικοί	38
Ολιγοσπερμικοί	6
Τερατοσπερμικοί	5
Ολιγοασθενοτερατοσπερμικοί	7
Ολιγοασθενοσπερμικοί	17
Ολιγοτερατοσπερμικοί	11

2. Απομόνωση DNA από σπέρμα

2.1. Απομόνωση

Για την πραγματοποίηση της απομόνωσης του DNA χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο "Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm" (Weyrich, 2012). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση γενετικού υλικού από σπέρμα **84 ανδρών**.

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

Διαδικασία

1. Πλύση 100 μ l σπέρματος με προσθήκη 500 μ l 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 μ l διαλύματος ομογενοποίησης, Lysis Buffer.
5. Προσθήκη 2,5 μ l Triton-X100 (0,5%), 200 μ l DTT (0,1M) και 40 μ l 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. Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη/χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας.

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 eppendorf.
5. Έπειτα, το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

2.3. Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με αιθανόλη

Η κατακρήμνιση με αιθανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων.

Υλικά

- Αιθανόλη 75%
- Νερό

Διαδικασία

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα αιθανόλης 75% όγκου 2V.
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται -80°C για 1-2 ώρες ή στους 20°C overnight 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 ή στο φούρνο στους 37°C και επαναδιαλύεται σε 100μl νερό.

3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια ευρέως διαδεδομένη τεχνική για τον διαχωρισμό νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA) και πρωτεϊνών. Στηρίζεται στην κίνηση φορτισμένων μορίων κατά μήκος ενός στερεού πορώδους υποστρώματος (gel) στα άκρα του οποίου εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση. Ο διαχωρισμός των μορίων γίνεται κατά κύριο λόγο ανάλογα με το μέγεθός τους. Στην προκειμένη περίπτωση, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της απομόνωσης (DNA) έγινε για να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του επιθυμητού DNA σε όλα τα δείγματα.

Υλικά

- 0,3 gr αγαρόζης
- 45ml TAE 1x
- 1μl χρωστικής

Διαδικασία

1. Σε κωνική φιάλη αναμιγνύεται το TAE και σκόνη αγαρόζης που ζυγίστηκε για να φτιαχτεί πήκτωμα με την κατάλληλη συγκέντρωση με βάση το μέγεθος του DNA (1% w/v).
2. Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου γίνει διαυγές και έπειτα ψύχθηκε με νερό.

3. Προστίθεται χρωστική για την παρατήρηση του DNA και το ρευστό μίγμα τοποθετείται σε εκμαγείο που έχει ήδη προετοιμαστεί με χαρτοταινία στα άκρα ώστε να πήξει. Ακόμη, μπαίνουν ειδικά χτένια για τη δημιουργία θέσεων υποδοχής των δειγμάτων. Το πήκτωμα σχηματίζεται σε περίπου 10 λεπτά και αφαιρούνται τα χτένια.
4. Ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων: 3μl διαλύματος φορτώματος (loading buffer) + 3μl δείγματος DNA αναμιγνύονται και τοποθετούνται στα ειδικά διαμορφωμένα «πηγαδάκια».
5. Το εκμαγείο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που περιέχει TAE.
6. Εφαρμόζεται τάση 100V για 15 λεπτά και έπειτα παρατηρείται το πήκτωμα σε λάμπα UV.

4. PCR για ενίσχυση του DNA και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ενίσχυση των γονιδίων *MTND2* και *MTND4* έγινε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) που ανακαλύφθηκε το 1983 από τον Kary Mullis. Η PCR είναι μία μέθοδος βιοχημείας και μοριακής βιολογίας για την απομόνωση και τον πολλαπλασιασμό μίας γνωστής αλληλουχίας DNA, μέσω της ενζυμικής αναπαραγωγής του DNA χωρίς τη χρήση ζωντανών μικροοργανισμών. Γνωρίζοντας την αλληλουχία του κάθε γονιδίου, σχεδιάστηκαν εκκινητές (primers) συμπληρωματικοί για κάθε μία αλυσίδα κάθε γονιδίου. Οι αλληλουχίες των εκκινητών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο $V_{\text{τελ}}=50\mu\text{l}$ προσθέτοντας τα αντιδραστήρια που φαίνονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια στην αντίδραση της PCR

Εκκινητές	Αλληλουχίες
Πρόσθιος εκκινητής (<i>MTND2</i>)	5' CTCTTCAACAATATACTCTC 3'
Ανάστροφος εκκινητής (<i>MTND2</i>)	5' GGAGTATGCTAAGATTTTGC 3'
Πρόσθιος εκκινητής (<i>MTND4</i>)	5' CAAACCCCTGAAGCTTCAC 3'
Ανάστροφος εκκινητής (<i>MTND4</i>)	5' GAGTGAGCCCCATTGTGTTG 3'

Πίνακας 5. Αντιδραστήρια της PCR

Αντιδραστήρια και συστατικά	Ποσότητες	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση
DNA	1μl	0,5μl	
Buffer	5μl	10x (15mM MgCl ₂)	1x
MgCl ₂	1μl	25mM	0,5mM
dNTPs	1μl	40mM	0,8mM
Forward primer	1μl	50pmol/μl	1pmol/μl
Reverse primer	1μl	50pmol/μl	1pmol/μl
KAPA Taq	0,2μl	5U/μl	0,02U/μl
ddH ₂ O	39,8μl		



Εικόνα 6. Εξοπλισμός για την πραγματοποίηση της PCR.

Για το γονίδιο *MTND2*:

Οι συνθήκες της αντίδρασης είναι: αρχική αποδιάταξη (initial denaturation) στους 95°C για 5 λεπτά, ακολουθούμενη από 35 κύκλους αποδιάταξης στους 94°C για 40 δευτερόλεπτα, προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) στους 52°C για 40 δευτερόλεπτα, επιμήκυνση των εκκινητών (extension) στους 72°C για 40 δευτερόλεπτα και τελική επιμήκυνση (final extension) στους 72°C για 5 λεπτά.

Για το γονίδιο *MTND4*:

Ακολουθούνται οι ίδιες συνθήκες με μόνη διαφορά τη θερμοκρασία προσαρμογής των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing) που ήταν 53°C για όλα τα δείγματα.

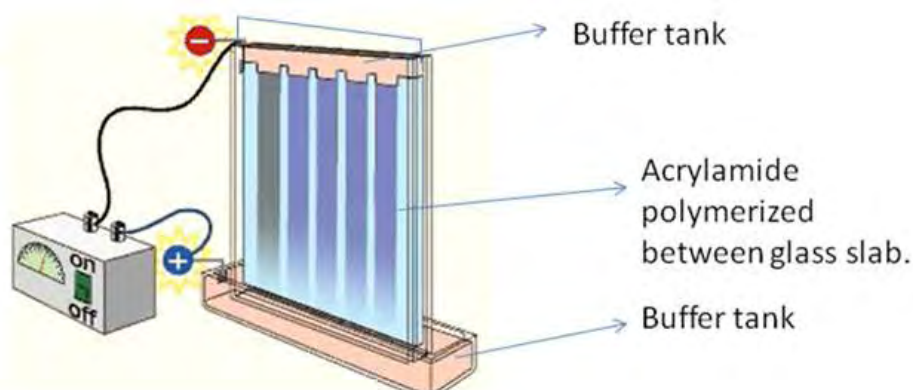
Ηλεκτροφόρηση

Για να επιβεβαιωθεί πως η PCR είναι επιτυχής, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v (0,6gr αγαρόζης και 45ml TAE c=1x) γιατί έχουν μέγεθος περίπου 200bp.

5. Πολυμορφισμός διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας- SSCP

Αυτή η μέθοδος μπορεί να ανιχνεύσει μεταλλάξεις σε βάσεις μονόκλωνης αλυσίδας. Η βασική αρχή αυτής της δοκιμής είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιατάσσεται, παίρνει μια ειδική διαμόρφωση. Αυτή η διαμόρφωση είναι μοναδική και εξαρτάται από την αρχική ακολουθία νουκλεοτιδίων. Αυτή η μέθοδος είναι αρκετά ευαίσθητη

για να ανιχνεύσει ακόμη και διαφορά στις μονόκλωνες νουκλεοτιδικές αλυσίδες που καταλαμβάνουν μια διαφορετική διαμόρφωση. Όταν ηλεκτροφορούνται, λοιπόν, σε πήκτωμα ακρυλαμίδης που έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από την αγαρόζη, η παραλλαγή των νουκλεοτιδίων καταλαμβάνει μια διαφορετική θέση. Η ακρυλαμίδα (prop-2-enamide) είναι μια μονομερής χημική ένωση που χρησιμοποιείται για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών ή μικρών μορίων DNA(5-500bp). Για τον σχηματισμό του πηκτώματος χρησιμοποιούνται η ακρυλαμίδα και η N,N-μεθυλεν-δισ-ακρυλαμίδα (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

5.1. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης που παρασκευάζεται είναι 10% w/v διότι τα προϊόντα της PCR είχαν μέγεθος 200bp.

Πίνακας 6. Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.

Συστατικά	Polyacrylamide gel 10%
Acrylamide	6,25gr
Bis-acrylamide	0,16gr
Glycerol 50%	6,25ml
TBE 10x	3,2ml
TEMED*	62,5μl
APS 20%*	375μl
ddH ₂ O έως	65ml

Σημείωση: Το TEMED και το APS προστίθενται τελευταία γιατί χρησιμοποιούνται για την πήξη του gel.

1. Σε ποτήρι ζέσεως τοποθετούνται όλα τα παραπάνω εκτός από το TEMED και το APS και αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν οι σκόνες.
2. Έπειτα, το διάλυμα διηθείται, ογκομετρείται μέχρι $V_{\text{τελ}}=65\text{ml}$ και τοποθετείται σε κωνική φιάλη.
3. Προστίθενται το TEMED και το APS και αμέσως το διάλυμα αποχύνεται στο ειδικά διαμορφωμένο εκμαγείο τζαμιών που έχει ήδη προετοιμαστεί.
4. Το πήκτωμα σχηματίζεται έπειτα από 30 λεπτά.

5.2. Αποδιάταξη δειγμάτων

Ακολουθεί αποδιάταξη των δειγμάτων με προσθήκη 10μl αποδιατακτικού σε 7μl δείγμα, η οποία λαμβάνει χώρα σε συσκευή PCR ρυθμισμένη στο πρόγραμμα αποδιάταξης για 10 λεπτά. Τα δείγματα αμέσως μετά τοποθετούνται στον πάγο και έπειτα φορτώνονται στο gel και ο χρόνος που χρειάζεται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία είναι 19 ώρες.

5.3. Χρώση για SSCP

1. Μεταφορά του gel σε μεμβράνη πάνω σε έναν μεταλλικό δίσκο.
2. Δύο πλύσεις με διάλυμα οξικού οξέος: 400ml H₂O+1ml CH₃COOH. Την πρώτη φορά ρίψη 200ml διαλύματος, πλύση για δύο λεπτά και έπειτα επαναλαμβάνεται η διαδικασία.
3. Πλύση για οκτώ-εννέα λεπτά με διάλυμα AgNO₃: 1gr στερεού AgNO₃ + 200ml H₂O (καλή ανάδευση)
4. Δύο πλύσεις με H₂O που διαρκούν δύο λεπτά η κάθε μία.
5. Πλύση με διάλυμα που περιέχει: 200ml H₂O + 3gr NaOH + 0,02gr NaBH₄ + 1ml CH₂O (καλή ανάδευση) έως ότου εμφανιστούν οι ζώνες (περίπου 30 λεπτά).

6. Καθαρισμός δειγμάτων και αλληλούχηση

Επιλέγονται 16 δείγματα στα οποία έχει πραγματοποιηθεί PCR και SSCP και άρα εμφανίζουν διαφορετικά πρότυπα. Συγκεκριμένα, 7 δείγματα για το γονίδιο *MTND2* και 9 δείγματα για το γονίδιο *MTND4* καθαρίζονται με το Sure Clean Plus της Biotline.

Στο γονίδιο *MTND2* όλα τα tubes για την αντίδραση της PCR είχαν όγκο V=50μl, όμως αφαιρώντας V'=14μl που χρησιμοποιήθηκε για την ηλεκτροφόρηση και την SSCP, πλέον ο τελικός όγκος είναι V_{τελ}=36μl. Άρα ακολουθώντας το πρωτόκολο:

1. Προστίθεται ίσος όγκο Sure Clean buffer με τον V_{τελ} και 6μl Co-Precipitant Pink σε κάθε tube και γίνεται vortex για 30 δευτερόλεπτα.
2. Επωάζονται τα δείγματα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Τα δείγματα μεταφέρονται στον φούρνο για 10 λεπτά και τέλος προστίθενται 25μl H₂O.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 16 λεπτά σε 14.000g και αφαίρεση του υπερκειμένου.
5. Προστίθενται 72μl (V''=2V_{τελ}) αιθανόλης 70% και γίνεται vortex για 10 δευτερόλεπτα.
6. Φυγοκεντρούνται και πάλι τα δείγματα για 10 λεπτά σε 14.000g και αφαιρείται η αιθανόλη.

Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα 9 δείγματα του *MTND4*. Όμως, επειδή στο δείγμα 42 ο $V'_{\text{τελ}}=10\mu\text{l}$ και στα δείγματα 125,153,163 είναι $V''_{\text{τελ}}=6\mu\text{l}$ προστίθενται οι ανάλογες ποσότητες αντιδραστηρίων.

Έπειτα, τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2%w/v για να επιβεβαιωθεί πως ο καθαρισμός είναι επιτυχής. Ακολουθεί προετοιμασία των δειγμάτων για το *MTND2* ώστε να σταλούν για αλληλούχηση.

1. Αρχικά, χρησιμοποιούνται 2,5μl πρόσθιων και ανάστροφων εκκινητών αντίστοιχα για κάθε δείγμα, αραιωμένα κατά δέκα φορές. Για 9 δείγματα *MTND2* (7+2 που υπολογίζονται παραπάνω) απαιτούνται $V_{\text{ολ}}=22,5\mu\text{l}$ εκκινητών ($V_{\text{prim}}=2,25\mu\text{l}$ και $V'=20,25\mu\text{l}$).
2. Εφ'όσον οι εκκινητές είναι έτοιμοι, τοποθετούνται ποσότητες DNA ανάλογες με την ένταση των μπαντών που παρατηρήθηκε στην ηλεκτροφόρηση (πολλαπλασιασμένες επί 2 γιατί χρησιμοποιούμε πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή) από τα προϊόντα PCR σε tubes και προστίθεται H_2O μέχρι $V_{\text{τελ}}=20\mu\text{l}$.

Πίνακας 7. Δείγματα του γονιδίου *MTND2* που θα σταλούν για αλληλούχηση.

Δείγματα <i>MTND2</i>	Ποσότητες DNA (μl)
52	4
67	4
70	4
123	4
165	16
174	16
204	16

3. Στο plate, σε κάθε θέση, τοποθετούνται $V=10\mu\text{l}$ από το DNA και $V''=2,5\mu\text{l}$ του πρόσθιο ή ανάστροφο εκκινητή.

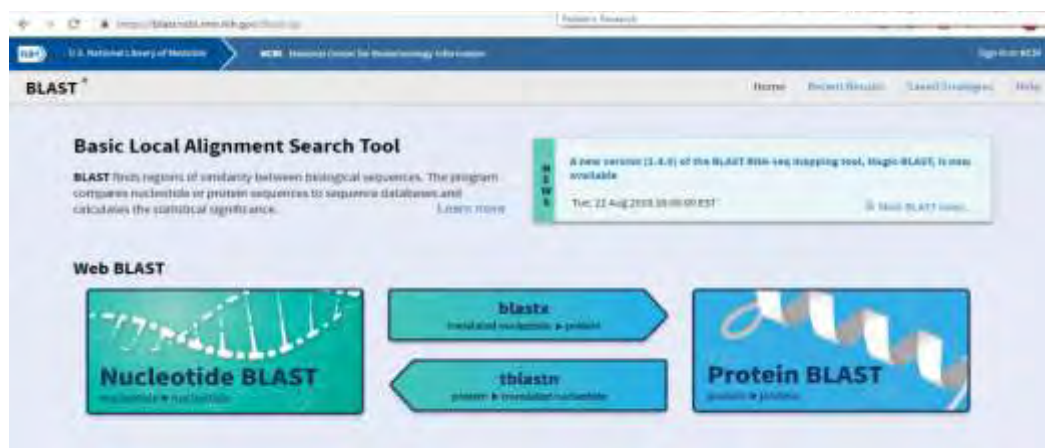
Η ίδια διαδικασία ακολουθείται και για τα δείγματα του *MTND4* και χρησιμοποιούνται οι εξής ποσότητες:

Πίνακας 8. Δείγματα του γονιδίου *MTND4* που θα σταλούν για αλληλούχηση.

Δείγματα <i>MTND4</i>	Ποσότητες DNA (μl)
42	10
44	4
54	16
66	6
106	8
119	4
125	16
153	16
163	16

7. Bioedit και Blast

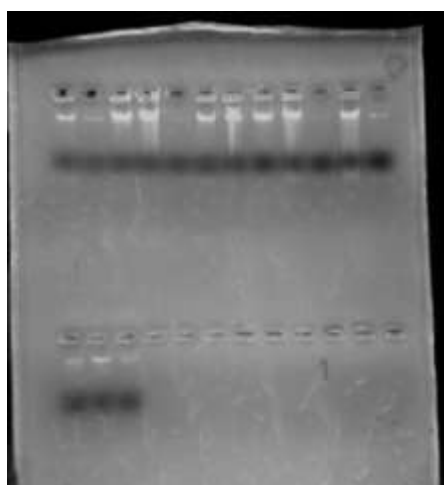
Με τη χρήση του προγράμματος “Bioedit” που παρέχει δυνατότητες επεξεργασίας αλληλουχιών, επεξεργάζονται οι αλληλουχίες των δειγμάτων που επιλέχθηκαν αφού εμφάνιζαν διαφορετικά πρότυπα. Έτσι, με κατάλληλους χειρισμούς γίνεται στοίχιση των εμπρόσθιων και ανάστροφων αλληλουχιών και προκύπτει η μοναδική αλληλουχία του γονιδίου. Στη συνέχεια με τη χρήση του “Nucleotide BLAST” (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) που είναι αλγόριθμος για τη σύγκριση αλληλουχιών με άλλες που βρίσκονται ήδη σε βάσεις δεδομένων (Εικόνα 8), εντοπίζονται μεταλλάξεις που ίσως υπάρχουν στα δείγματα.



Εικόνα 8. Η ιστοσελίδα που χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί το Blast.

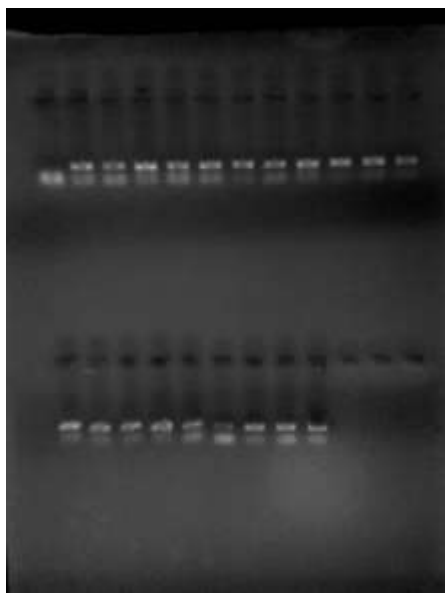
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική, αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από 100 δείγματα σπέρματος υπογόνιμων ανδρών. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 9), φαίνεται ενδεικτικά η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης DNA από απομόνωση 15 δειγμάτων που ακολούθησε για να επιβεβαιωθεί ότι ήταν επιτυχής η απομόνωση.



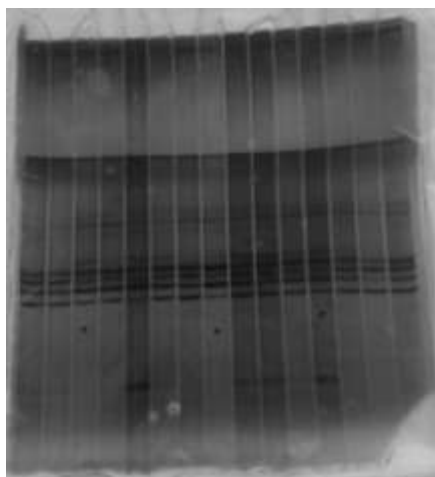
Εικόνα 9. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης DNA από απομόνωση που έγινε σε δείγματα (Δείγματα 164-186) σπέρματος.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR με κατάλληλους εκκινητές για το *MTND2* και το *MTND4* και σε κατάλληλη θερμοκρασία για κάθε γονίδιο για ενίσχυση όλων των δειγμάτων DNA που απομονώθηκαν από το σπέρμα. Ακολούθησε και πάλι ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων PCR, έτσι ώστε να οπτικοποιηθούν τα αποτελέσματα (Εικόνα 10).



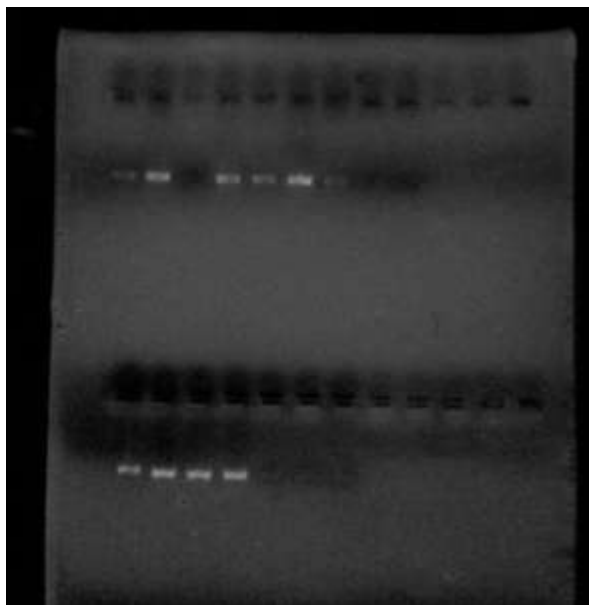
Εικόνα 10. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR (Δείγματα 64-68, 106-120).

Μετά την ενίσχυση των δειγμάτων με την μέθοδο της PCR ακολούθησε η μέθοδος SSCP για τα 84 δείγματα που ενισχύθηκαν για το γονίδιο *MTND2* και τα 84 για το γονίδιο *MTND4*, ώστε να βρεθούν πιθανώς διαφορετικά πρότυπα και άρα πολυμορφισμοί στις αλληλουχίες των γονιδίων. Πράγματι, εφαρμόζοντας την μέθοδο SSCP εντοπίστηκαν 7 διαφορετικά πρότυπα και άρα πιθανές μεταλλάξεις για πρόκληση παθολογικού φαινοτύπου στο γονίδιο *MTND2*. Στο γονίδιο *MTND4* εντοπίστηκαν 9 διαφορετικά πρότυπα, δηλαδή ενδεχόμενοι πολυμορφισμοί στην αλληλουχία. Στην εικόνα 11, καθίσταται φανερή η ύπαρξη διαφορετικών προτύπων στο γονίδιο *MTND4* σε ένα από τα πηκτώματα πολυακρυλαμίδης.



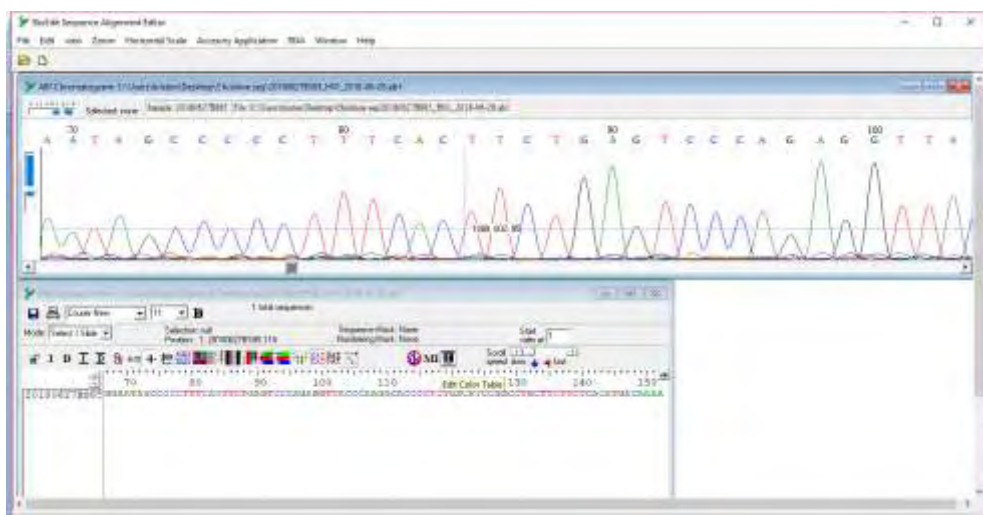
Εικόνα 11. Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης μετά από χρώση με νιτρικό άργυρο για τα δείγματα 68-70 και 106-118.

Όλα τα δείγματα (συνολικά 16 δείγματα) στα οποία παρατηρήθηκαν διαφορετικά πρότυπα κατά τη μέθοδο SSCP, για κάθε γονίδιο αντίστοιχα, στάλθηκαν για αλληλούχηση, αφού πρώτα έγινε η διαδικασία καθαρισμού για να μπορεί να αλληλουχηθεί το DNA (Εικόνα 12).

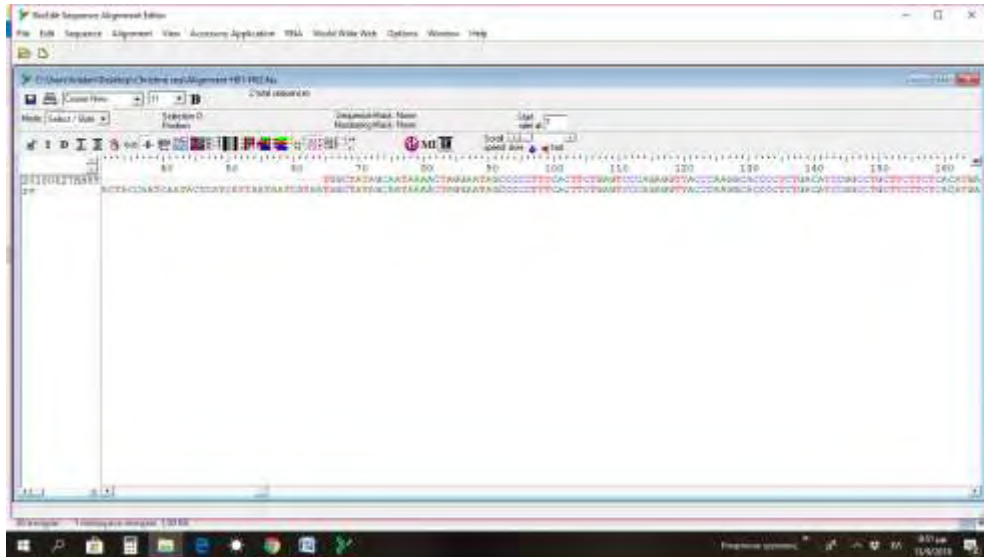


Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR μετά από καθαρισμό.

Έπειτα, η επεξεργασία των δεδομένων που προέκυψαν από την αλληλούχηση έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος “Bioedit”. Στην εικόνα 13 φαίνονται το χρωματογράφημα και η αλληλουχία του πρόσθιου εκκινητή για το δείγμα 67 του γονιδίου *MTND2* ενώ στην εικόνα 14 η στοιχίση των αλληλουχιών ως αποτέλεσμα αλληλούχησης με τον πρόσθιο και τον ανάστροφο εκκινητή του παραπάνω δείγματος.

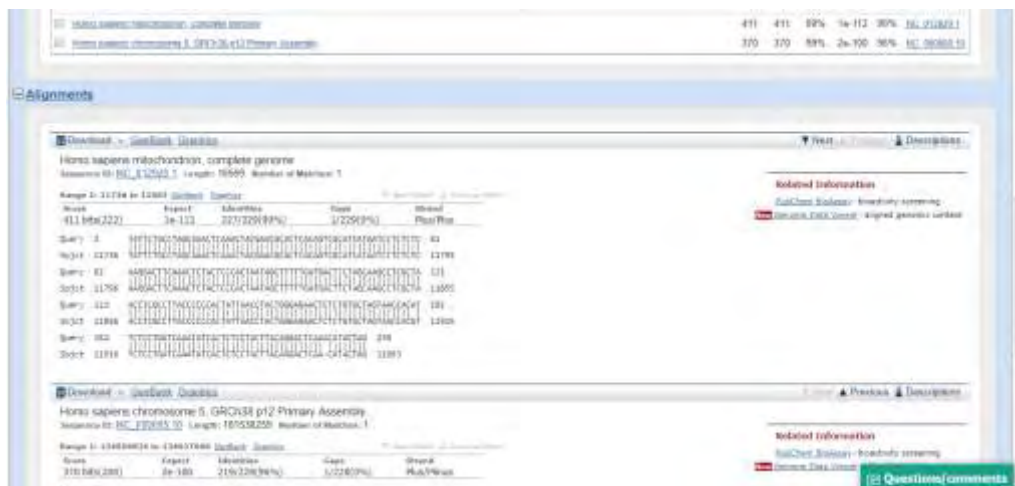


Εικόνα 13. Χρωματογράφημα και αλληλουχία του δείγματος 67 (*MTND2*) με τον πρόσθιο εκκινητή.



Εικόνα 14. Στοιχισή αλληλουχιών του δείγματος 67 (MTND2) με βάση τον πρόσθιο και ανάστροφο εκκινητή.

Αφού, πρώτα, όλα τα δείγματα επεξεργάστηκαν και στοιχήθηκαν, έπειτα με το “Nucleotide BLAST” έγινε έρευνα για πιθανές μεταλλάξεις που υπάρχουν στις αλληλουχίες των μιτοχονδριακών γονιδίων *MTND2* και *MTND4*.

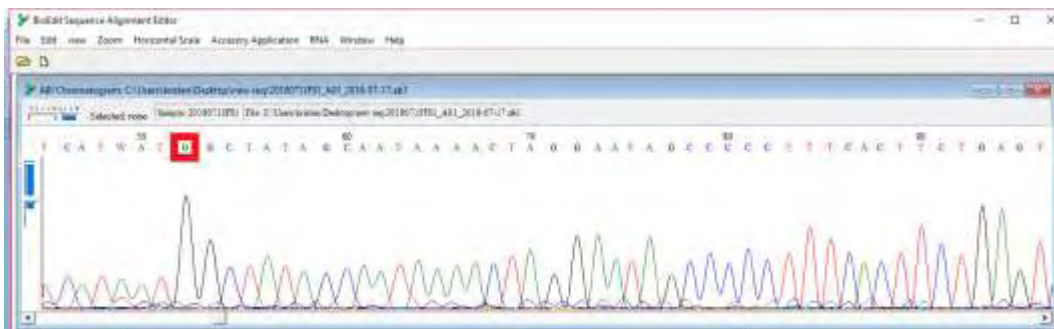


Εικόνα 15. Αποτελέσματα του nucleotide Blast για το δείγμα 44 του *MTND4*.

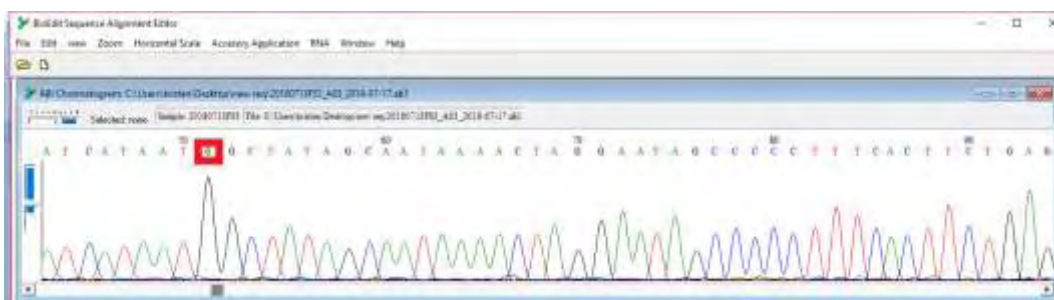
Βρέθηκαν, λοιπόν, μεταλλάξεις στα δείγματα 67, 70, 123 του *MTND2* και στα δείγματα 42 και 44 του *MTND4*. Πιο συγκεκριμένα, για το γονίδιο *MTND2* στο δείγμα 67 εντοπίστηκαν οι εξής πολυμορφισμοί: i) **4769A>G**, ii) **5005T>A**, iii) **5007G>C**, ενώ στα δείγματα 70, 123 εντοπίστηκε η κοινή μετάλλαξη **4769A>G**. Το δείγμα 67 εμφάνισε ίδιο πρότυπο με άλλα 9 δείγματα στο πηκτωμα πολυακρυλαμίδης. Το δείγμα 70, ενώ φαινόταν να εμφανίζει διαφορετικό πρότυπο από το δείγμα 123, τελικά κατά την αλληλούχηση εμφανίζει τον ίδιο κοινό πολυμορφισμό και άρα συνολικά 15 δείγματα έχουν την μετάλλαξη **4769A>G**. Στις εικόνες 16, 17 και 18 φαίνονται οι θέσεις που εντοπίστηκαν οι πολυμορφισμοί στα δείγματα του *MTND2*.



Εικόνα 16. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *MTND2*. Με το κόκκινο πλαίσιο σημειώνονται οι πολυμορφισμοί 4769>A (πάνω), 5005T>A και 5007G>C (κάτω) στο δείγμα 67.



Εικόνα 17. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *MTND2*. Με το κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται ο πολυμορφισμός 4769>A στο δείγμα 70.



Εικόνα 18. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου *MTND2*. Με το κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται ο πολυμορφισμός 4769>A στο δείγμα 123.

Μόνο στο δείγμα 42 για το γονίδιο *MTND4* βρέθηκαν οι πολυμορφισμοί **11864T>C** και **11947A>G**. Στην εικόνα 19, παρουσιάζεται η αλληλουχία του γονιδίου του δείγματος 42 στις περιοχές που εντοπίζονται οι προαναφερθέντες πολυμορφισμοί, ενώ στην εικόνα 20 παρατηρείται ο πολυμορφισμός **11914G>A** που βρέθηκε μόνο στο δείγμα 44.



Εικόνα 19. Χρωματογραφήματα της περιοχής του γονιδίου MTND4 στο δείγμα 42. Στο πρώτο χρωματογράφημα με το κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται ο πολυμορφισμός 11864T>C, ενώ στο δεύτερο χρωματογράφημα σημειώνεται ο πολυμορφισμός 11947A>G.



Εικόνα 20. Χρωματογράφημα της περιοχής του γονιδίου MTND4. Με το κόκκινο πλαίσιο σημειώνεται ο πολυμορφισμός 11914G>A στο δείγμα 44.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πρόσφατες μελέτες για την ανδρική υπογονιμότητα ολοένα και περισσότερο φαίνεται να εστιάζουν στο μιτοχόνδριο. Ελλείμματα μεγάλων περιοχών του mtDNA για παράδειγμα 4977 (πιο συχνό) 7345 και 7599 βάσεων αλλά ακόμη και πολυμορφισμοί μίας βάσης των γονιδίων *ATP6*, *ATP8* είναι δυνατό να προκαλέσουν παθοφυσιολογικό φαινότυπο (Tahmasbpoor, Balasubramanian, Agarwal, 2014). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η κινητικότητα του σπερματοζωαρίου σχετίζεται άμεσα με

την παραγωγή ενέργειας μέσω OXPHOS και ATP στα σπερματοκύτταρα, γι' αυτό και οι μεταλλάξεις σε γονίδια των συμπλόκων στα οποία γίνεται η OXPHOS φαίνεται να είναι σημαντικές για το φαινότυπο (Tahmasbrou, Balasubramanian, Agarwal, 2014). Στην παρούσα διπλωματική, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν δύο γονίδια του complex I της OXPHOS, το *MTND2* και το *MTND4* από δείγματα υπογόνιμων ανδρών, τα οποία ήδη σε προηγούμενες μελέτες φαίνεται να εμφανίζουν πολυμορφισμούς που σχετίζονται με την υπογονιμότητα (Barbhuiya et al., 2016; Holyoake et al., 2001).

Αναφορικά με το γονίδιο *MTND4*, μόνο 2/84 δείγματα εμφάνισαν πολυμορφισμούς. Συγκεκριμένα, στο δείγμα 42 που είναι χαρακτηρισμένο ως «ολιγοασθενοτερατοσπερμικό», δηλαδή εμφανίζει και στα τρία χαρακτηριστικά που μελετούνται παθοφυσιολογική κατάσταση, υπάρχουν δύο μεταλλάξεις: i) **11864T>C** και ii) **11947A>G**. Ο πολυμορφισμός **11864T>C** υπάρχει ήδη στην βιβλιογραφία (Mitomap, 2018) και προκαλεί συνώνυμη μετάλλαξη (Leu⇒Leu), αλλά δεν έχει προηγουμένως συσχετιστεί με την υπογονιμότητα. Ωστόσο, έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις εγκεφαλοπαθειών μικρών παιδιών (Chae et al., 2007). Ο πολυμορφισμός **11947A>G** οδηγεί σε συνώνυμη μετάλλαξη (Thr⇒Thr), έχει βρεθεί σε ασθενείς που πάσχουν από LHON και σε μελέτη που έγινε σε Φινλανδικές οικογένειες αλλά και σε μελέτη για γονιδιακή θεραπεία της ασθένειας, χωρίς να έχει συσχετιστεί με υπογονιμότητα (Lam et al., 2010; Ruomila et al., 2007). Αυτές οι δύο μεταλλάξεις, ωστόσο, δεν εμφανίστηκαν στα υπόλοιπα 6 άτομα, τα οποία είναι χαρακτηρισμένα με τα 3 παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονα (ολιγοασθενοτερατοσπερμία).

Στο δείγμα 44, το οποίο είναι «νορμοσπερμικό», βρέθηκε ένας διαφορετικός πολυμορφισμός: **11914G>A**, που οδηγεί, επίσης, σε συνώνυμη μετάλλαξη (Thr⇒Thr). Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός έχει αναφερθεί και πάλι σε μελέτες για την ασθένεια LHON, η οποία αποδεδειγμένα είναι μια πάθηση που οφείλεται σε μιτοχονδριακές μεταλλάξεις (Howell et al., 2002; Lam et al., 2010; Sudoyo et al., 2002).

Στο γονίδιο *MTND2* ανιχνεύθηκε ο πολυμορφισμός **4769A>G** που οδηγεί σε συνώνυμη μετάλλαξη (Met⇒Met) χωρίς να προκαλεί αλλαγή στη δομή της πρωτεΐνης, όπως έχει αναφερθεί στη μελέτη των Kumar et al. (2009). Επιπλέον, σε αντίστοιχη μελέτη στη Βορειοανατολική Ινδία (Barbhuiya et al., 2016) ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός εμφανίστηκε σε όλα τα δείγματα υπογόνιμων ανδρών που μελετήθηκαν και στα 5/20 δείγματα ελέγχου. Μάλιστα, ο πολυμορφισμός σε αυτή τη θέση του γονιδίου έχει μελετηθεί και σε έρευνες που έγιναν για την ασθένεια LHON (Liang et al., 2009). Στην παρούσα μελέτη, εμφανίστηκε σε 10 δείγματα που εμφάνισαν άλλους δύο πολυμορφισμούς, αλλά και σε 15 δείγματα στα οποία βρέθηκε ως μοναδικός πολυμορφισμός. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό διότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι ήδη συσχετισμένη με την υπογονιμότητα. Μελετώντας την παθοφυσιολογία που εμφανίζουν τα 15 δείγματα στα οποία εντοπίστηκε μόνο ο πολυμορφισμός **4769A>G**:

- τα 6/15 δείγματα είναι χαρακτηρισμένα ως «νορμοσπερμικά», ενώ τα 9/15 εμφανίζουν παθοφυσιολογική κατάσταση,
- τα 4/15 δείγματα είναι «ολιγοσπερμικά»,
- μόνο 1/15 δείγμα είναι χαρακτηρισμένο ως «τερατοσπερμικό»,
- τα 2/15 δείγματα είναι «ολιγοασθενοσπερμικά»,
- τα 2/15 δείγματα είναι «ολιγοασθενοτερατοσπερμικά».

Συνεπώς, το 60% των δειγμάτων με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό είναι παθοφυσιολογικά και σε συνδυασμό με προηγούμενες μελέτες (Kumar et al., 2009; Barbhuiya et al., 2016) μπορεί να υπάρξει συσχέτιση της μετάλλαξης αυτής με την υπογονιμότητα.

Τα 10 δείγματα που εμφάνισαν 3 πολυμορφισμούς στην αλληλουχία τους είναι:

- 3/10 δείγματα χαρακτηρισμένα ως «νορμοσπερμικά»,
- 2/10 τα οποία εμφανίζουν «τερατοσπερμία»,
- 3/10 τα οποία είναι «ολιγοτερατοσπερμικά»,
- 1/10 που εμφανίζει ολιγοασθενοσπερμία,
- και 1/10 εμφανίζει «ολιγοασθενοτερατοσπερμία»,

δηλαδή το 70% των παραπάνω δειγμάτων εμφανίζουν παθοφυσιολογικά χαρακτηριστικά. Μάλιστα, κοινό παθοφυσιολογικό χαρακτηριστικό αποτελεί η «τερατοσπερμία». Όσον αφορά τις μεταλλάξεις που εμφανίζουν, η μετάλλαξη **4769A>G** αναφέρθηκε παραπάνω και σχετίζεται με την υπογονιμότητα. Ωστόσο, οι άλλες δύο μεταλλάξεις **5005T>A** και **5007G>C** είναι νέες, δηλαδή δεν έχουν καταγραφεί ξανά και γι' αυτό δεν υπάρχει κάποια βιβλιογραφική αναφορά. Το γεγονός πως τα περισσότερα δείγματα εμφανίζουν «τερατοσπερμία» θα μπορούσε να συσχετιστεί με την ύπαρξη αυτών των δύο πολυμορφισμών στην αλληλουχία Ελλήνων υπογόνιμων ανδρών.

Συγκεντρωτικά, οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 9. Μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν στα δείγματα υπό μελέτη.

Αριθμός δειγμάτων (Σύνολο=84)	Γονίδιο	SNP	Τύπος μετάλλαξης	Ασθένεια
1	<i>MTND4</i>	11864T>C	Συνώνυμη	Εγκεφαλοπάθεια
1	<i>MTND4</i>	11914G>A	Συνώνυμη	LHON
1	<i>MTND4</i>	11947A>G	Συνώνυμη	LHON
25	<i>MTND2</i>	4769A>G	Συνώνυμη	Υπογονιμότητα, LHON
10	<i>MTND2</i>	5005T>A	Novel	-
10	<i>MTND2</i>	5007G>C	Novel	-

Συμπερασματικά, διαφορετικά δείγματα εμφάνισαν μεταλλάξεις στα δύο γονίδια που μελετήθηκαν. Στο γονίδιο MTND4, μόνο 2/84 έχουν πολυμορφικές θέσεις, όμως στο γονίδιο MTND2 τα δείγματα που εμφανίζουν πολυμορφισμούς είναι 25/84. Μελλοντικά, λοιπόν, θα πρέπει να μελετηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων και να διερευνηθεί περαιτέρω η ύπαρξη των δύο νέων μεταλλάξεων που ίσως αποτελεί πληθυσμιακό χαρακτηριστικό σε υπογονίμους άνδρες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 13, 37. <http://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Amaral, A., Lourenco, B., Marques, M., Ramalho-Santos, J., (2013). Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction*. 146(5), 163-174. doi: 10.1530/REP-13-0178.
- Baklouti-Gargouri, S., Ghorbel, M., Mahmoud, A.B., Mkaouar-Rebai, E., Cherif, M., Chakroun, N., Sellami, A., Fakhfakh, F., Ammar-Keskes, L. (2013). Mitochondrial DNA mutations and polymorphisms in asthenospermic infertile men. *Molecular Biology Reports*. 40:4705–4712 DOI 10.1007/s11033-013-2566-7
- Barbhuiya, P.N., Gogoi, A., Ahmed, G., Mahanta, R. (2016). Prevalence of Mitochondrial DNA Nucleotide Substitution Mutations in Male Infertile Cases of Northeast India. *Journal of Infertility and Reproductive Biology*. 4(1), 265-275. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/303562919_Prevalence_of_Mitochondrial_DNA_Nucleotide_Substitution_Mutations_in_Male_Infertile_Cases_of_Northeast_India
- Carra, E., Sangiorgi, D., Gattuccio, F., Rinaldi, A.M. (2004). Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 322(1), 333-339. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.07.112>
- Chae, J.H., Lee, J.S., Kim, K.J., Hwang, Y.S., Bonilla, E., Tanji, K., Hirano, M., (2007). A Novel ND3 Mitochondrial DNA Mutation in Three Korean Children With Basal Ganglia Lesions and Complex I Deficiency. *Pediatric Research*. 61, 622-624. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/pr2007121>
- Georgadaki, K., Khoury, N., Spandidos, D. A., & Zoumpourlis, V. (2016). The molecular basis of fertilization (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 979–986. <http://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2723>
- Holyoake, A.J., McHugh, P., Wu, M., O'Carroll, S., Benny, P., Sin, I.L., Sin, F.Y.T. (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *International Journal of Andrology*. 24, 175-182. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2001.00292.x>
- Howell, N., Miller, N.R., Mackey, D.A., Arnold, A., Herrnsstadt, C., Williams, I.M, Kubacka, I., (2002). Lightning Strikes Twice: Leber Hereditary Optic Neuropathy

- Families with Two Pathogenic mtDNA Mutations. *Journal of Neuro-Ophthalmology*. 22, 262-269. Retrieved from <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=12464729>
- Ikawa, M., Inoue, N., Benham, A. M., & Okabe, M. (2010). Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(4), 984–994. <http://doi.org/10.1172/JCI41585>
- Ji, J., Xu, M., Huang, Z., Li, L., Zheng, H., Yang, S., ... Wang, X. (2017). Mitochondrial DNA sequencing and large-scale genotyping identifies *MT-ND4* gene mutation m.11696G>A associated with idiopathic oligoasthenospermia. *Oncotarget*, 8(32), 52975–52982. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.17675>
- Khan S.J. (2006). *Mitochondrial ND Genes: Relevance of Codon Usage to Semen Quality in Men*. (Master's thesis). Retrieved from https://ir.canterbury.ac.nz/bitstream/handle/10092/1434/thesis_fulltext.pdf?sequence=1
- Kumar, R., Venkatesh, S., Kumar, M., Tanwar, M., Shasmsi, 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 men. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*. 46, 172-177. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/26284122_Oxidative_stress_and_sperm_mitochondrial_DNA_mutation_in_idiopathic_oligoasthenozoospermic_OA_infertile_men
- Lam, B. L., Feuer, W. J., Abukhalil, F., Porciatti, V., Hauswirth, W. W., & Guy, J. (2010). Leber Hereditary Optic Neuropathy Gene Therapy Clinical Trial Recruitment: Year 1. *Archives of Ophthalmology*, 128(9), 1129–1135. <http://doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.201>
- Liang, M., Guan, M., Zhao, F., Zhou X., Yuan, M., Tong, Y., Yang, L., Wei, Q.P., Sun Y.H., Lu, F., Qu, J., Guan M.X., (2009) Leber's hereditary optic neuropathy is associated with mitochondrial ND1 T3394C mutation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 383(3), 286-292. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.097
- Markantoni, M. (2016). Polymorphisms and co-evolution of nuclear and mitochondrial genes of oxidative phosphorylation (OXPHOS) in humans. (Master's Thesis)
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T., (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica e Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1817(6), 851-862. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2011.08.010>
- MITOMAP. (2018). Morbid Map of the Human mtDNA Genome. Retrieved from <https://mitomap.org/foswiki/pub/MITOMAP/MitomapFigures/mitomapgenome.pdf>
- Moore, F. L., & Reijo-Pera, R. A. (2000). Male Sperm Motility Dictated by Mother's mtDNA. *American Journal of Human Genetics*, 67(3), 543–548.
- Ni, F., Zhou, Y., Zhang, W., Wang, X., Song, X., Jiang, H. (2017). Mitochondrial variations in the MT-ND4 and MTTL1 genes are associated with male infertility. *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 63(1), 2-6. doi: 10.1080/19396368.2016.1256451

- Palanichamy, M. G., & Zhang, Y.-P. (2011). Identifying potential pitfalls in interpreting mitochondrial DNA mutations of male infertility cases. *The Indian Journal of Medical Research*, *134*(4), 447–451. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237241/>
- Patel, A.S., Leong, J.Y., Ramasamy, R. (2018). Prediction of male infertility by the World Health Organization laboratory manual for assessment of semen analysis: A systematic review. *Arab Journal of Urology*. *16*(1), 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.10.005>
- Pereira, L., Goncalves, J., Bandelt, H. (2008). Mutation C11994T in the mitochondrial ND4 gene is not a cause of low sperm motility in Portugal. *Fertility and Sterility*. *89*(3), 738-741 doi:10.1016/j.fertnstert.2007.03.048
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V. (2011). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology*. *35*, 109–124. doi:10.1111/j.1365-2605.2011.01218.x
- Pizzol, D., Ferlin, A., Garolla, A., Lenzi, A., Bertoldo, A., Foresta, C., (2014). Genetic and molecular diagnostics of male infertility in the clinical practice. *Frontiers in Bioscience*. *19*, 291-303. <http://dx.doi.org/10.2741/4208>
- Puumila, A., Hämäläinen, P., Kivioja S., Savontaus, M.L., Koivumaki, S., Huoponen, K., Nikoskelainen, E., (2007). Epidemiology and penetrance of Leber hereditary optic neuropathy in Finland. *European Journal of Human Genetics*. *15*, 1079-1089. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/5201828>
- Rajender, S., Rahul, P., Mahdi, A. A. (2010). Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. *Mitochondrion*. *10*(5),419-28. doi: 10.1016/j.mito.2010.05.015
- Singh, K., Jaiswal, D. (2011) Human male infertility: A complex multifactorial phenotype. *Reproductive Sciences*. *18*(5), 418-425. doi: 10.1177/1933719111398148
- Shasmsi, M. B., Kumar, R., Bhatt, A., Bamezai, R. N. K., Kumar, R., Gupta, N. P., ... Dada, R. (2008). Mitochondrial DNA Mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*, *24*(2), 150–154.
- Spiropoulos, J., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M. (1999). Pathogenic mitochondrial DNA mutations and human reproduction. *Human Fertility*. *2*, 133-137 [dx.doi.org/10.1080/1464727992000198511](https://doi.org/10.1080/1464727992000198511)
- Sudoyo, H., Suryadi, H., Lertrit, P., Pramoongago, P., Lyrawati, D., Marzuki, S., (2002). Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber’s hereditary optic neuropathy. *Journal of Human Genetics*. *47*, 594-604. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/jhg200298.pdf>
- Tahmasbpour, E., Balasubramanian, D., Agarwal, A. (2014). A multi-faceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. *31*, 1115–1137. DOI 10.1007/s10815-014-0280-6

World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen (Fifth Edition). Retrieved from <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>