

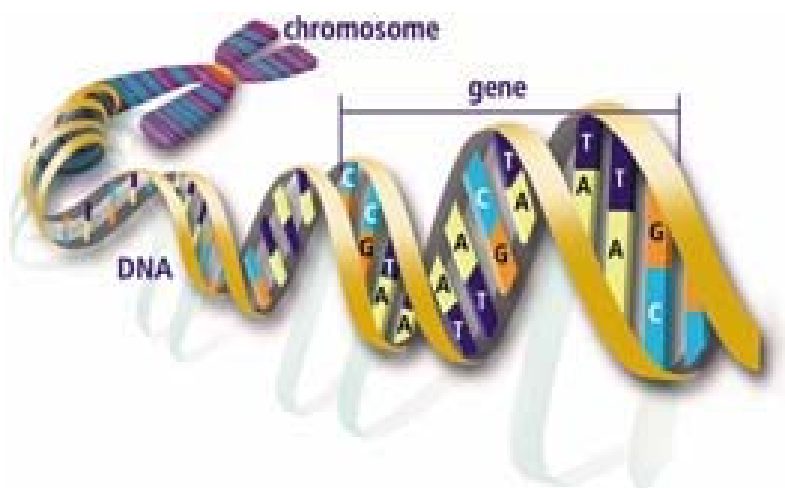


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
Στις Βασικές Ιατρικές Επιστήμες

Διπλωματική Εργασία

Διευρέυση των περιοχών AZF του Y χρωμοσώματος και του
πολυμορφισμού SNP G197T του γονιδίου της πρωταμίνης-1 σε
υπογόνιμους άνδρες της Δυτικής Ελλάδας



Σοφία Παπαδημητρίου

Βιολόγος

Πάτρα, 2008

**** Περιεχόμενα**

Ευχαριστίες.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
<u>Α΄ ΜΕΡΟΣ</u>	
1. Ορισμός υπογονιμότητας	6
1.1 Κατηγορίες υπογονιμότητας	6
2. Σπερματογένεση	
2.1 Η πορεία δημιουργίας του άρρενος αναπαραγωγικού συστήματος	10
2.2 Στάδια της Σπερματογένεσης	11
<u>Β΄ ΜΕΡΟΣ</u>	
3. Η δομή του Y χρωμοσώματος.....	16
4. Γονίδια που απαντώνται στο Y χρωμόσωμα.....	17
5. Παράγοντες αζωοσπερμίας (Azoospermia Factors) και ανδρική υπογονιμότητα.....	18
5.1 Γονίδια που απαντώνται σε κάθε AZF περιοχή.....	19
5.2 Η προέλευση των ελλειμμάτων στις AZF περιοχές.....	25
5.3 Μηχανισμοί μέσω των οποίων προκύπτουν ελλείμματα στις AZF περιοχές	25
5.4 Τύποι Ελλειμμάτων και συσχέτισή τους με τον φαινότυπο.....	27
5.5 Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και Ελλείμματα στις AZF περιοχές	29
<u>Γ΄ ΜΕΡΟΣ</u>	
6. Μεταβατικές πρωτεΐνες (Transition proteins - TPs)	31
6.1 Τα γονίδια των μεταβατικών πρωτεϊνών	31
6.2 Δομικά χαρακτηριστικά των μεταβατικών πρωτεϊνών	31
6.3 Η λειτουργία των μεταβατικών πρωτεϊνών	32
7. Πρωταμίνες (Protamines - PRMs)	32
7.1 Ο γενετικός τόπος των πρωταμινών	33
7.2 Τα μέλη της Οικογένειας των πρωταμινών.....	35
7.3 Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια των πρωταμινών	36
7.4 Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των πρωταμινών.....	38
7.4.1 Η μεταγραφική ρύθμιση	39

7.4.2 Η ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης.....	40
7.5 Η Προέλευση των πρωταμινών.....	41
7.6 Οι λειτουργίες των πρωταμινών	42
7.7 Το μοντέλο πακεταρίσματος της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου	43
7.8 Το σύμπλοκο DNA – πρωταμινών.....	46
8. Πρωταμίνες και Υπογονιμότητα	
8.1 Ο λειτουργικός ρόλος των πρωταμινών (Διαγονιδιακά και knock-out μοντέλα).....	48
8.2 Μεταβολές στο περιεχόμενο σε πρωταμίνες σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών	49
8.3 Η δομή και η ακεραιότητα της χρωματίνης και ο ρόλος τους στα ποσοστά επιτυχίας της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF).....	50
8.4 Πολυμορφισμοί στα γονίδια των πρωταμινών.....	52
2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	54
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
1. Συλλογή δειγμάτων	56
2. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα	57
3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γονιδιώματος.....	59
4. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος	
4.1 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR) για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος	59
4.2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης.....	64
5. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του SNP G197T	
5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για τον προσδιορισμό του SNP G197T.....	66
5.2 Καθαρισμός των δειγμάτων της PCR – “ PCR Purification Kit ”	68
5.3 Κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού BseRI (<i>RFLP assay</i>).....	69
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
4.1 Προσδιορισμός ελλειμμάτων στις AZF περιοχές	

4.1.1 Εφαρμογή της Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Multiplex PCR) για την ανίχνευση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος.....	72
4.2 Προσδιορισμός του νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού SNP G197T	
4.2.1 Εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση του γονιδίου της πρωταμίνης-1.....	81
4.2.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR.....	82
4.2.3 Κατάτμηση των προϊόντων της PCR με το ένζυμο περιορισμού BseRI (RFLP assay).....	82
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	85
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	90
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	
1. Αλληλουχίες	
1.1 Αλληλουχία γονιδίου πρωταμίνης-1 (Human).....	92
1.2 Η αλληλουχία της πρωτεΐνης πρωταμίνης-1.....	93
1.3 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης πρωταμίνης-1.....	93
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	94

Ευχαριστίες

Η παρούσα Διπλωματική Εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Διονύσιου Σπάθα .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή μου κ. Διονύσιο Σπάθα για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος της ερευνητικής του ομάδας και να εκπονήσω την διπλωματική μου εργασία στο εργαστήριο Γενικής Βιολογίας. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη και την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε καθ ' όλη την διάρκεια της εργασίας μου , η οποία ήταν καίρια για την ολοκλήρωση της Διπλωματικής μου εργασίας .

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τον Διευθυντή της Ουρολογικής Κλινικής Καθηγητή κ.Πέτρο Περιμένη για την διάθεση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Θερμές ευχαριστίες οφείλω και στην Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Αδαμαντία Παπαχατζοπούλου για τις χρήσιμες και εποικοδομητικές συμβουλές της σε θέματα που αφορούσαν την παρούσα εργασία .

Θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την στήριξη και τη βοήθεια που μου παρείχαν όποτε την χρειάστηκα. Ιδιαίτερα, τον κ.Ν. Δάβανο για την συμμετοχή του στην ανάλυση των ΑΖF περιοχών σε δείγματα ασθενών και την κ.Μ. Κεραμυδά για την διάθεση ορισμένων δειγμάτων προς ανάλυση.

Τέλος, θα ήθελα να αφιερώσω αυτή την εργασία στους γονείς μου και τον αδελφό μου που με εμπνέουν και μου συμπαραστέκονται όλα αυτά τα χρόνια.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α΄ ΜΕΡΟΣ

1. Ορισμός υπογονιμότητας

Ο όρος υπογονιμότητα αναφέρεται στην αδυναμία ενός ζεύγους να τεκνοποιήσει μετά, τουλάχιστον, ενός έτους σεξουαλικών επαφών χωρίς προφυλάξεις (Gianotten et al., 2004; Ioulianos et al., 2004). Η αδυναμία αυτή μπορεί να αφορά είτε τη γονιμοποίηση είτε την ολοκλήρωση της κύησης, μετά από αυτή. Μετά τους 24 μήνες, το 5–10% των ζευγαριών, μετά από κατάλληλη θεραπεία, μπορούν να τεκνοποιήσουν. Πρόσφατες εκτιμήσεις δείχνουν ότι 15-20% των ζευγαριών αντιμετωπίζουν προβλήματα υπογονιμότητας, εκ των οποίων το 40%-50% οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Η ανδρική υπογονιμότητα μπορεί να εκδηλωθεί με διάφορους τρόπους, από την πλήρη απουσία των γεννητικών κυττάρων μέχρι την παραγωγή σχεδόν φυσιολογικού σπέρματος (Foresta et al., 2001; Gianotten et al., 2004; Ferlin et al., 2006).

1.1 Κατηγορίες υπογονιμότητας

Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας ταξινομούνται σε προ-ορχικά αίτια, μετά-ορχικά αίτια και ορχικά αίτια (de Krestet et al., 1999; Gianotten et al., 2004; Μπαρμπαλιάς Γ.Α., 2004).

Α) Προ-ορχικά αίτια

Σε αυτές τις περιπτώσεις υπογονιμότητας παρατηρούνται ενδοκρινολογικές διαταραχές, είτε σε επίπεδο υποθαλάμου είτε σε επίπεδο υπόφυσης (παράγοντες FSH, LH), με άμεσο αποτέλεσμα την μη φυσιολογική παραγωγή των φυλετικών ορμονών οι οποίες συντελούν στην ωρίμανση του αναπαραγωγικού συστήματος και τελικά την εκδήλωση υπογοναδισμού. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το σύνδρομο Kallman, το σύνδρομο του γόνιμου ευνούχου όσον αφορά διαταραχές σε επίπεδο υποθαλάμου (Cadman et al., 2007) και τα σύνδρομα Prader Willi και Bardet-Biedl τα οποία χαρακτηρίζονται από δευτεροπαθή υπογοναδοτρόφο υπογοναδισμό και αφορούν διαταραχές σε επίπεδο υπόφυσης (Μπαρμπαλιάς Γ.Α., 2004; Rosa Maduro et al., 2003; Feinberg A.P. et al., 2007).

Β) Μετα-ορχικά αίτια (αφορούν την εκφορητική συσκευή του όρχεως)

Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται τρεις επιμέρους ομάδες αιτιών υπογονιμότητας:

i) Απόφραξη γεννητικής οδού

Η υπογονιμότητα αποφρακτικής αιτιολογίας, η οποία απαντάται σε ένα ποσοστό 7% των υπογόνιμων ανδρών, περιλαμβάνει μια ομάδα καταστάσεων, οι οποίες δεν επιδρούν στην παραγωγή των σπερματοζωαρίων στον όρχι, αλλά στο σχηματισμό του σπερματικού υγρού και στην προώθησή του κατά μήκος της έσω γεννητικής οδού. Η πλέον γνωστή περίπτωση είναι η κυστική ίνωση, η οποία προκαλείται από μεταλλάξεις στο γονίδιο της μεμβρανικής πρωτεΐνης CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator). Σε ποσοστό >95% ασθενείς με κυστική ίνωση είναι στείροι, παρουσιάζουν αζωοσπερμία εκκριτικού τύπου και αμφοτερόπλευρη απουσία των σπερματικών πόρων (CBAVD - Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens) (Chillon et al., 1995; Ferlin et al., 2006)

ii) Ανοσολογικές διαταραχές

Σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας ανοσοσφαιρίνες (IGG, IGA) έχουν βρεθεί στο τοίχωμα του σπερματικού σωληναρίου και στα κύτταρα που αποβάλλονται στον αυλό του σωληναρίου. Τα αντισώματα αυτά προσκολλώνται στην κυτταρική μεμβράνη των σπερματοζωαρίων με αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της διέλευσης αυτών κατά μήκος της έσω γεννητικής οδού ενώ παράλληλα δυσχαιραίνεται η σύντηξή τους με το ωοκύτταρο. Προβλήματα συγκολλησεως απαντώνται στο 4% των περιπτώσεων (Μπαρμπαλιάς Γ.Α., 2004).

Γ) Ορχικά αίτια

Σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες καθώς και περιβαλλοντικοί παράμετροι.

i) Χρωμοσωμικές ανωμαλίες

Περίπου το 15% και 10% των υπογόνιμων ανδρών και γυναικών αντίστοιχα εμφανίζουν γενετικές ανωμαλίες όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Η εμφάνιση χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι συχνότερη στα αρσενικά άτομα εξαιτίας της παραγωγής μεγάλου αριθμού σπερματοζωαρίων (Ferlin et al., 2006). Τέτοιες περιπτώσεις είναι οι παρακάτω:

α) Σύνδρομο Klinefelter (47,XXY)

Το σύνδρομο αυτό αποτελεί την πιο συχνή αριθμητική ανωμαλία των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε αρσενικά άτομα με μια συχνότητα η οποία κυμαίνεται από 0,1-0,2%. Τα άτομα αυτά παρουσιάζουν σοβαρή υπογονιμότητα η οποία οφείλεται σε ατροφία των όρχεων και αυξημένα επίπεδα γοναδοτροπινών στο

πλάσμα (>5% παρουσιάζει σοβαρή олиγοσπερμία και >10% παρουσιάζει αζωοσπερμία) (Ferlin et al., 2006).

β) Ρομπερτιανές διαμεταθέσεις (Robertsonian translocations)

Οι ρομπερτιανές διαμεταθέσεις (συχνότητα ~1/1000 νεογέννητα) αποτελούν τις πιο συχνές δομικές χρωμοσωμικές ανωμαλίες οι οποίες επηρεάζουν την γονιμότητα των ανδρών με ποικίλους τρόπους. Οι φορείς τέτοιων διαμεταθέσεων έχουν φυσιολογικό φαινότυπο, όμως η παρουσία διαμετάθεσης επηρεάζει την γονιμότητα εξαιτίας διατάραξης της σπερματογένεσης κατά το στάδιο των μειωτικών διαιρέσεων. Στον γενικό πληθυσμό περίπου 0,8% υπογόνιμων ανδρών είναι φορείς μιας ρομπερτιανής διαμεταθέσης (Ferlin et al., 2006).

γ) Διαμεταθέσεις μεταξύ αυτοσωμικών και Y χρωμοσώματος

Η συχνότητα εμφάνισης τέτοιου είδους μετατοπίσεων υπολογίζεται ~1/2000. Σημεία θραύσης του Y χρωμοσώματος εντοπίζονται στον μεγάλο (q) βραγχίονα και ιδιαίτερα στην q11 περιοχή. Σύμφωνα με μελέτη των Vogt et al.,(1995) σε γόνιμους άνδρες σημεία θραύσης στο Y χρωμόσωμα εντοπίζονται στην Yq12 περιοχή (ετεροχρωματινική περιοχή) σε αντίθεση με στείρους άνδρες στους οποίους σημεία θραύσης εντοπίζονται στην απομακρυσμένη Yq11 ευχρωματινική περιοχή των περιοχών AZF (Azoospermia Factor) (**Εικόνα 6, Κεφ.3**) (Ferlin et al., 2006).

δ) Μωσαϊκισμός 45,XO/46,XY ή δυσγενεσία των γονάδων

Ο φαινότυπος των ατόμων αυτών ποικίλει από άρρεν έως θήλυ. Εμφανίζουν υποπλασμένες γονάδες και υποτιπώδη φυλετικά όργανα. Τα περισσότερα άτομα είναι στείρα, και περίπου το 1/3 αυτών εμφανίζουν συμπτώματα όμοια με αυτά του συνδρόμου Turner (Τριανταφυλίδης Κ. και Κουβάτση Α., 2003).

ε) Άνδρες με καρυότυπο 46,XX

Οι ασθενείς αυτοί μπορεί να χαρακτηριστούν ως παραλαγές του συνδρόμου Klinefelter. Η συχνότητα εμφάνισης υπολογίζεται σε 1/ 25000 γεννήσεις αγοριών. Η ανατομία των γεννητικών οργάνων είναι σαν του κανονικού άνδρα, αλλά οι όρχεις είναι μικρότεροι και παρουσιάζουν τις ίδιες ιστολογικές ανωμαλίες με τα άτομα του συνδρόμου Klinefelter. Τα άτομα αυτά είναι στείρα (Τριανταφυλίδης Κ. και Κουβάτση Α., 2003).

ii) Περιβαλλοντικές παράμετροι

Μια σειρά από περιβαλλοντικούς παράγοντες εμπλέκονται στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας, είτε με τη μορφή της πρωτοπαθούς βλάβης είτε με τη μορφή της επιδείνωσης μιας προϋπάρχουσας δυσλειτουργίας.

- Θερμότητα

Η θερμοκρασία μεταξύ 32,5-35°C είναι ιδανική για την ωρίμανση των σπερματοζωαρίων και την παραγωγή φυσιολογικού σπέρματος. Αντίθετα, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αυξημένη απόπτωση των κυττάρων του Sertoli και των κυττάρων της γεννητικής σειράς, με αποτέλεσμα τον περιορισμό της γονιμότητας (η παρατεταμένη έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες μπορεί να λάβει και μόνιμο χαρακτήρα οδηγώντας σε στειρότητα) (<http://male-subfertility.tripod.com>).

- Παρουσία ελεύθερων δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS)

Τα υψηλά επίπεδα ROS που ανιχνεύονται στο σπέρμα των υπογόνιμων ανδρών συνδιάζονται με ανωμαλία του μέσου τμήματος της ουράς των σπερματοζωαρίων, ελλατωμένη κινητικότητα, απώλεια της ικανότητας εκτέλεσης της αντίδρασης του ακροσώματος, μειωμένη ικανότητα διείσδυσης του σπερματοζωαρίου στο ωοκύτταρο καθώς και μειωμένη γονιμότητα τόσο in vivo όσο και in vitro (Iwasaki et al., 1992; Agarwal et al., 2003).

- Καρκίνος

Ο καρκίνος των όρχεων συνοδεύεται πολύ συχνά με αναστολή της σπερματογένεσης. Επίσης, στην περίπτωση του καρκίνου παρατηρείται και ποιοτική υποβάθμιση των σπερματοζωαρίων που τελικώς παράγονται (Gianotten et al., 2004; Agarwal et al., 2003; Paduch D.A., 2006)

Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η κισσοκήλη, η οποία αποτελεί το πιο συχνό αίτιο υπογονιμότητας, δεν υπάγεται στις παραπάνω κατηγορίες. Η κισσοκήλη είναι η διάταση (διόγκωση) των εσωτερικών σπερματικών φλεβών που αρδεύουν τους όρχεις. Είναι μια αρκετά συνηθισμένη κατάσταση καθώς εμφανίζεται στο 15%-20% του συνολικού ανδρικού πληθυσμού και στο 40% - 45% των υπογόνιμων ανδρών. Η παρουσία κισσοκήλης συνοδεύεται από ελλειμματική σπερματογένεση και μικρό όγκο σπέρματος (de Krester et al., 1999; Jarro J.P., 2001; Μπαρμπαλιάς Γ.Α., 2004).

4) Ιδιοπαθής υπογονιμότητα

Η Ιδιοπαθής υπογονιμότητα αναφέρεται σε εκείνες τις περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας στις οποίες το αίτιο δεν έχει διευκρινιστεί και αφορά το 15% των υπογόνιμων ανδρών (de Krester et al., 1999; Seshagiri P.B., 2001). Τα άτομα αυτά

εμφανίζουν ποικίλλουσα εικόνα ως προς τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, ενώ και ο γυναικείος παράγων (η σύντροφος) έχει ελεγχθεί και δεν ενοχοποιείται.

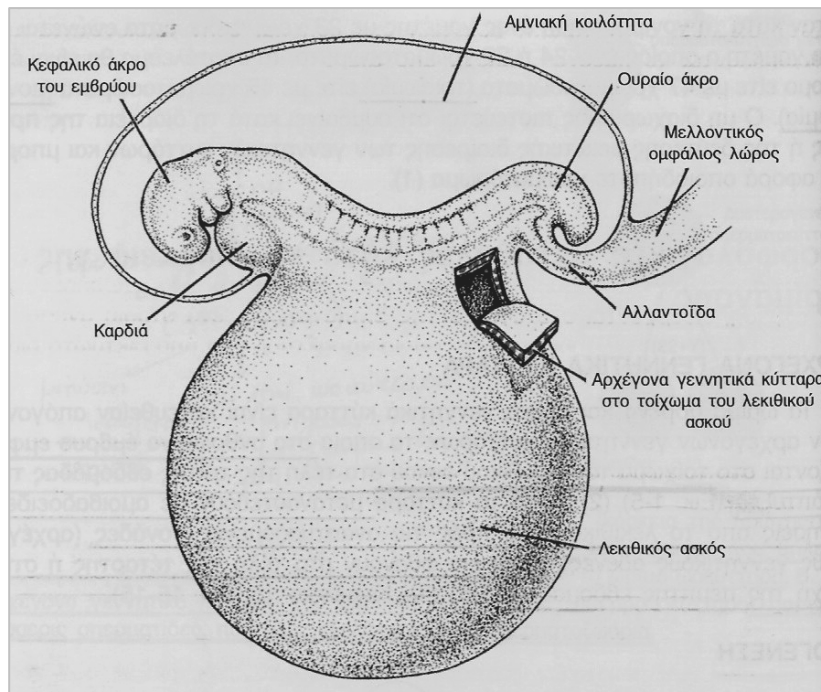
Η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου υπογόνιμων ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα έχει αποκτήσει κλινικό ενδιαφέρον από την στιγμή που η ταχεία ανάπτυξη των μεθοδολογιών της Τεχνητής Γονιμοποίησης και ειδικότερα της ενδοκυτταρικής σπερματέγχυσης (Intracytoplasmic Sperm Injection) δίνει τη δυνατότητα σε άνδρες με βεβαρημένο γενετικό υπόβαθρο (π.χ. ελλείμματα στις AZF περιοχές, αλλαγές μιας βάσης – SNPs-) να τεκνοποιήσουν, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα μεταβίβασης ανωμαλιών στους απογόνους τους (Foresta et al., 2001; Ferlin et al., 2006; Zini et al., 2006). Κατά συνέπεια, κρίνεται αναγκαία, η γνώση του γενετικού υπόβαθρου της ανδρικής υπογονιμότητας ώστε να δοθεί η κατάλληλη γενετική συμβουλή στα ζευγάρια αυτά, σχετικά με την διαχείριση της υπογονιμότητά τους (Krausz et al., 1999).

2. Σπερματογένεση

2.1 Η πορεία δημιουργίας του άρρενος αναπαραγωγικού συστήματος

Στον άνθρωπο, τα αρχέγονα κύτταρα των γονάδων (Primordial Germ Cells, PGCs) πρωτοεμφανίζονται στην περιοχή του λεκιθικού ασκού (**Εικόνα 1**). Τα αρχέγονα κύτταρα στα τέλη της τρίτης εβδομάδας της κύησης μεταναστεύουν με αμοιβαδοειδείς κινήσεις από τον λεκιθικό ασκό στην περιοχή των αδιαφοροποιητών γονάδων (αρχέγονοι γεννητικοί αδένες), όπου και φθάνουν στα τέλη της τέταρτης ή στην αρχή της πέμπτης εβδομάδας, όπου και παραμένουν σε ηρεμία (cell cycle arrest). Στην περιοχή των γονάδων παρατηρούνται και μη μεταναστεύοντα προγονικά κύτταρα τα οποία ονομάζονται γονοκύτταρα (gonocytes).

Στον άνδρα, η διαδικασία ωρίμανσης των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων σε ώριμο γαμέτη αρχίζει κατά την ήβη. Κατά τη γέννηση τα γεννητικά κύτταρα του άρρενος μπορούν να αναγνωρισθούν στις γεννητικές δοκίδες του όρχεως ως κύτταρα ευμεγέθη που περιβάλλονται από στηρικτικά κύτταρα. Τα στηρικτικά κύτταρα προέρχονται πιθανόν από το βλαστικό επιθήλιο του αδένα και εξελίσσονται σε στηρικτικά κύτταρα ή κύτταρα Sertoli. Λίγο πριν την ήβη, οι γεννητικές δοκίδες αποκτούν αυλό και δημιουργούνται τα σπερματικά σωληνάκια, ενώ την ίδια περίπου περίοδο τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια (Okabe et al., 1998; Tanaka et al., 2005).



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση εμβρύου ηλικίας 3 εβδομάδων, η οποία δείχνει τη θέση των αρχέγονων γεννητικών κυττάρων στο τοίχωμα του λεκιθικού ασκού, κοντά στην πρόσφυση του μελλοντικού ομφάλιου λώρου (Sadler T.W., 1999).

2.2 Στάδια της Σπερματογένεσης

Η διαδικασία της σπερματογένεσης διαρκεί 64 ημέρες και περιλαμβάνει όλες εκείνες τις διεργασίες με τις οποίες τα σπερματογόνια μεταμορφώνονται σε σπερματοζωάρια. Η διαδικασία της σπερματογένεσης υποδιαιρείται σε δύο διακριτές φάσεις, (α) την σπερματοκυττογένεση και (β) στην σπερμιογένεση (**Εικόνες 2,3**).

(α) Σπερματοκυττογένεση

Η σπερματοκυττογένεση διαρκεί ~40 ημέρες. Ο πληθυσμός των διπλοειδών σπερματογονίων ($N = 1 \times 10^6$ /όρχι) που έχει προκύψει, υποδιαιρείται σε δυο υποπληθυσμούς, τα σπερματογόνια τύπου Α και τα σπερματογόνια τύπου Β. Τα σπερματογόνια τύπου Α διαιρούμενα μέσω διαδοχικών μιτωτικών διαιρέσεων συμβάλλουν στην διατήρηση του αριθμού των σπερματογονίων στον όρχι (ομόνυμη διαίρεση – homonymous division). Από τα σπερματογόνια τύπου Β μέσω μιτωτικών διαιρέσεων προκύπτουν τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα.

Κατά τη φυσιολογική εξέλιξη των διεργασιών ορισμένα από τα σπερματογόνια τύπου Α εγκαταλείπουν τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων και παράγουν διαδοχικές γενεές σπερματογονίων [έναρξη των ετερόνυμων διαιρέσεων (heteronymous division)] , κάθε μια από τις οποίες είναι περισσότερο διαφοροποιημένη από την προηγούμενη. Με την ολοκλήρωση της τελευταίας

διαίρεσης των σπερματογονίων τύπου Α σχηματίζονται σπερματογόνια τύπου Β. Όταν στη συνέχεια, αυτά τα κύτταρα υποστούν μίτωση προκύπτουν τα σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξης.

Τα σπερματοκύτταρα 1^{ης} τάξης εισέρχονται εν συνεχεία σε παρατεταμένη φάση (22 ημέρες) η οποία ακολουθείται από ταχεία ολοκλήρωση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και σχηματισμό των σπερματοκυττάρων 2^{ης} τάξης. Έπειτα, τα σπερματοκύτταρα 2^{ης} τάξης εισέρχονται απευθείας στην 2^η μειωτική διαίρεση, η οποία διαρκεί λίγες ώρες, και έχει σαν αποτέλεσμα από ένα σπερματοκύτταρο 2^{ης} τάξης να προκύψουν δυο απλοειδείς σπερματίδες.

Κατά τη διάρκεια όλων αυτών των σταδίων, κι ειδικότερα από τη στιγμή που τα σπερματογόνια τύπου Α εγκαταλείψουν τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων μέχρι τον σχηματισμό των σπερματίδων, η κυτταροκίνηση είναι ατελής με αποτέλεσμα τα κύτταρα διαδοχικών γενεών να συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες. Με αυτόν τον τρόπο οι απόγονοι καθενός ξεχωριστά σπερματογονίου τύπου Α σχηματίζουν ένα άθροισμα γεννητικών κυττάρων που διατηρούν την επικοινωνία μεταξύ τους καθόλη τη διάρκεια της διαφοροποίησης. Επιπλέον, τα σπερματογόνια και οι σπερματίδες παραμένουν καθηλωμένα σε βαθιές εγκολπώσεις των κυττάρων Sertoli σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Με αυτό τον τρόπο τα κύτταρα Sertoli προσφέρουν στήριξη και προστασία στα γεννητικά κύτταρα, συμμετέχουν στη διατροφή τους και βοηθούν στην απελευθέρωση των ώριμων σπερματοζωαρίων (Sadler T.W., 1999; Carlos Junqueira et al., 1991).

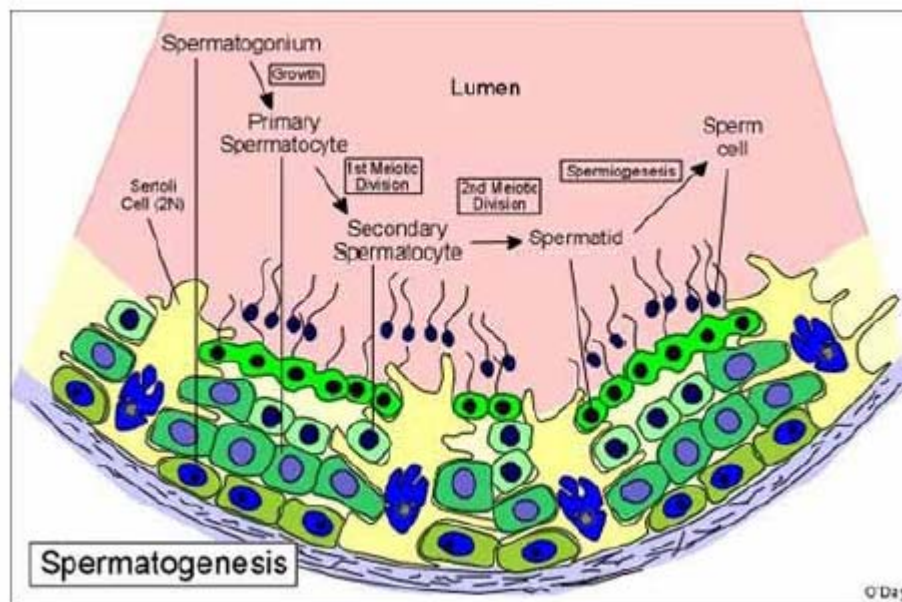
(β) Σπερμιογένεση

Η σπερμιογένεση διαρκεί ~24 ημέρες και περιλαμβάνει όλες εκείνες τις διεργασίες οι οποίες οδηγούν στον μετασχηματισμό των κυκλικών σπερματίδων σε ώριμα, κινούμενα, επιμηκυσμένα σπερματοζωάρια. Ειδικότερα, τα επιμέρους στάδια αυτής της διαδικασίας ακολουθούν:

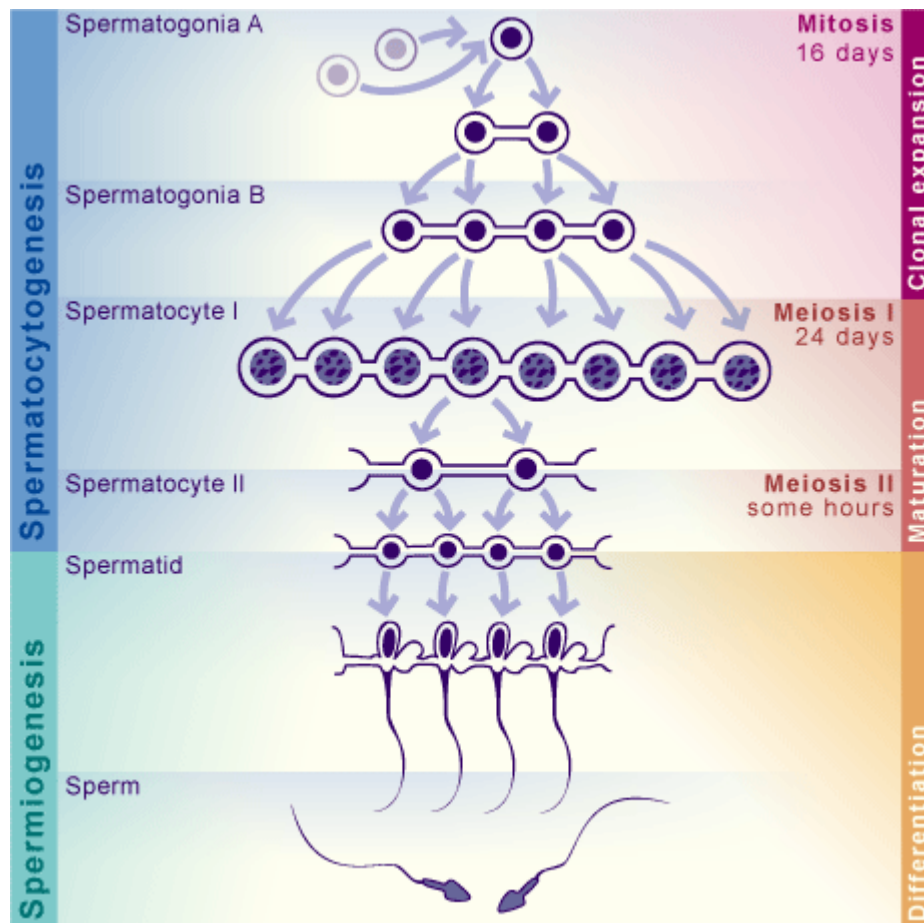
1. Η Φάση Golgi, κατά την οποία οι κυκλικού σχήματος σπερματίδες αρχίζουν να αποκτούν πολικότητα. Έτσι, στο ένα άκρο σχηματίζεται η κεφαλή, και από το άλλο άκρο θα σχηματιστεί το μεσαίο τμήμα του σπερματοζωαρίου καθώς και το αξόνημα. Παράλληλα, σε αυτή την φάση το απλοειδές γενετικό υλικό των σπερματίδων υφίσταται δραματικές αλλαγές, εφόσον οι ιστόνες αντικαθίστανται από τις βασικές πρωτεΐνες πρωταμίνες οι οποίες συμβάλλουν στο υψηλού βαθμού πακετάρισμα του DNA στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.

2. Η φάση Cap, κατά την οποία κυστίδια της συσκευής Golgi που περιβάλλουν την κεφαλή σχηματίζουν το ακρόσωμα, το οποίο καλύπτει πάνω από το ήμισυ της επιφάνειας του πυρήνα και περιέχει ένζυμα που βοηθούν το σπερματοζώαριο κατά την γονιμοποίηση να διεισδύσει στο ωάριο μέσω των στιβάδων που το περιβάλλουν.
3. Η ακροσωμική φάση, κατά την οποία ένα από τα κεντριόλια επιμηκύνεται με αποτέλεσμα τον σχηματισμό της ουράς του σπερματοζωαρίου (καθορισμός του προσανατολισμού του σπερματοζωαρίου). Σε αυτό το στάδιο, τα σχηματισθέντα σπερματοζώαρια προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι ουρές αυτών να εκτείνονται προς τον αυλό του σωληναρίου.
4. Η φάση ωρίμανσης, κατά την οποία απομακρύνεται το πλεονάζον κυτταροπλασματικό υλικό από τα σπερματοζώαρια και φαγοκυτταρώνεται από τα γειτονικά κύτταρα Sertoli.

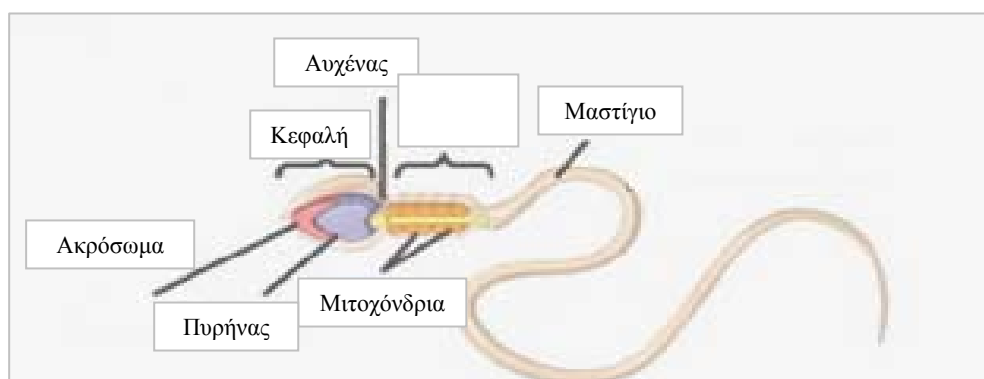
Μετά τον σχηματισμό τους τα σπερματοζώαρια (**Εικόνα 4**) εισέρχονται στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Από εκεί ωθούνται προς την επιδιδυμίδα από τα συσταλτικά στοιχεία του τοιχώματος των σπερματικών σωληναρίων. Αν και αρχικά τα σπερματοζώαρια παρουσιάζουν ελάχιστη κινητικότητα, στην επιδιδυμίδα αποκτούν πλήρη κινητικότητα (**Εικόνες 2,3**) (Sadler T.W., 1999; Carlos Junqueira et al., 1991).



Εικόνα 2. Διαγραμματική απεικόνιση εγκάρσιας τομής ορχικού σπερματικού σωληναρίου στην οποία απεικονίζονται τόσο οι διαφορετικοί κυτταρικοί τύποι όσο και σχετική θέση τους στο σπερματικό σωληνάριο (www.wikipedia.com/spermatogenesis)



Εικόνα 3. Σχηματική απεικόνιση της κλωνικής προέλευσης των γεννητικών κυττάρων του άρρενος. Μόνο τα πλέον αρχέγονα σπερματογόνια τύπου Α υφίστανται πλήρη κυτταροκίνηση, προκειμένου να αναπληρώσουν τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων. Από την στιγμή κατά την οποία κύτταρα τύπου Α εγκαταλείπουν τον πληθυσμό των βλαστικών κυττάρων μέχρι τη στιγμή που ανεξάρτητα σπερματοζωάρια αποχωρίζονται από τα υπολειμματικά κύτταρα των διαδοχικών διαιρέσεων συνδέονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες (www.wikipedia.com/spermatogenesis).



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση ώριμου ανθρώπινου σπερματοζωαρίου (www.wikipedia.com/spermatogenesis)

Η σπερματογένεση λοιπόν είναι μια πολύπλοκη διαδικασία η οποία εξαρτάται από την χρονικά ελεγχόμενη ενεργοποίηση γονιδίων που καθορίζουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των σπερματογονίων, την μείωση για την παραγωγή του απλοειδούς γονιδιώματος κάθε θυγατρικού κυττάρου και τελικά την μορφολογική διαφοροποίηση των κυλινδρικού σχήματος σπερματιδίων στα επιμηκυσμένου σχήματος σπερματοζωάρια. Μεταλλαγές σε οποιαδήποτε από τα γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην παραπάνω διαδικασία μπορούν να έχουν επιζήμια αποτελέσματα στην φυσιολογική λειτουργία των όρχεων (Krausz et al., 1999).

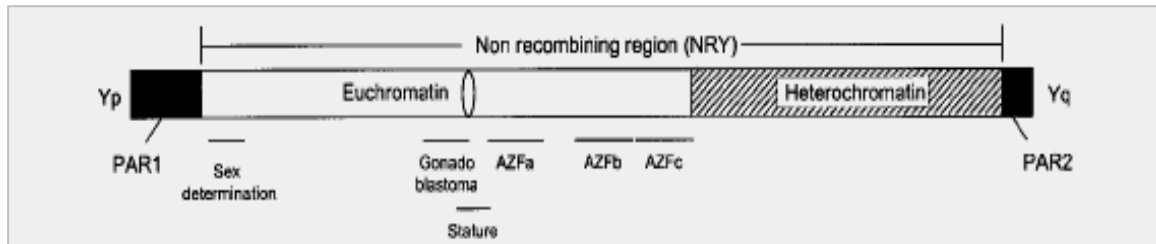
Ορισμένα παραδείγματα στα οποία αποδεικνύεται το παραπάνω είναι : (i) η παρουσία χρωμοσωμικών ανευπλοειδίων κατά τις μειωτικές διαιρέσεις μπορεί να προκαλέσει στειρότητα εξαιτίας μη φυσιολογικής σύναψης των ομολόγων χρωμοσωμάτων (Chaganti et al., 1980), (ii) ο ρόλος γονιδίων που εδράζονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα και τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της σπερματογένεσης έχει τονιστεί σε διάφορες δημοσιευμένες οικογενείς περιπτώσεις αρσενικής στειρότητας καθώς και από knock-out μοντέλα γονιδίων σε ποντίκια (Lilford et al., 1994; Kastner et al., 1996; Baker et al., 1996), (iii) μελέτες συσχετίζουν την ανδρική στειρότητα με την παρουσία ελλειμμάτων στο Y χρωμόσωμα, σε περιοχές που περιέχουν γονίδια απαραίτητα για τη σπερματογένεση (Vogt et al., 1995).

3. Η δομή του Y χρωμοσώματος

Το Y χρωμόσωμα (60Mb) αποτελεί το 2%-3% του απλοειδούς γονιδιώματος. Είναι ένα ακροκεντρικό χρωμόσωμα που αποτελείται από τον μικρό (p) βραχίονα, τον μεγάλο (q) βραχίονα και την ενδιάμεση των δύο, περιοχή του κεντομέρους (Εικόνα 5). Ειδικότερα, μέσω κυτταρογενετικών μελετών έχουν προσδιοριστεί οι παρακάτω περιοχές από τις οποίες δομείται το Y χρωμόσωμα:

1. Ψευδοαυτοσωμικές περιοχές (Pseudoautosomal region – PAR1, PAR2) οι οποίες εντοπίζονται στα άκρα των δυο βραχιόνων του Y χρωμοσώματος και καταλαμβάνουν μια έκταση 2,6Mb και 320bp, αντίστοιχα (Zheng Li et al., 2008). Οι περιοχές αυτές έχουν ομολογία με τα άκρα του X χρωμοσώματος και μέσω αυτών πραγματοποιείται η σύναψη των X και Y χρωμοσωμάτων και ο ανασυνδυασμός τους κατά την μείωση. Απώλεια της PAR1 περιοχής οδηγεί σε στειρότητα, εξαιτίας της μη σύναψης των φυλετικών χρωμοσωμάτων (Mangs et al., 2007).
2. Μη ανασυνδιαζόμενη περιοχή του Y χρωμοσώματος (Non-recombining region / NRY ή Male Specific Y/MSY) η οποία συνιστά την περιοχή του Y χρωμοσώματος που περιλαμβάνεται μεταξύ των δυο ψευδοαυτοσωμικών περιοχών και συνιστά το 95% του μήκους του Y χρωμοσώματος. Καταλαμβάνει μια έκταση 63Mb, εκ των οποίων οι 23Mb περιλαμβάνουν ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια (Krausz et al., 2006). Αυτή η περιοχή εμπεριέχει αλληλουχίες οι οποίες μπορεί να έχουν ομόλογες στο X χρωμόσωμα ή να είναι και ειδικές του Y χρωμοσώματος. Η NRY περιοχή υποδιαιρείται στα παρακάτω επιμέρους τμήματα:
 - i) Το μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
 - ii) Την περιοχή του κεντρομέρους
 - iii) Την κεντρική περιοχή του μεγάλου βραχίονα του Y χρωμοσώματος (ευχρωματινική περιοχή)
 - (iv) Την ετεροχρωματινική περιοχή η οποία καταλαμβάνει την απομακρυσμένη Yq περιοχή. Αυτή η περιοχή είναι πολυμορφική (σε μήκος) σε διαφορετικούς πληθυσμούς ανδρών και μπορεί να συνιστά το $\frac{1}{2}$ - $\frac{2}{3}$ του μεγέθους της Yq περιοχής. Θεωρείται ότι είναι γενετικά ανενεργή και συνίσταται από δυο οικογένειες επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, τις DYZ1 και DYZ2 κάθε μια από τις οποίες διαθέτει από 5000-2000 αντίγραφα, αντίστοιχα.

Η πλειονηφία των γονιδίων που απαντώνται στην NRY/MSY περιοχή του Y χρωμοσώματος εμπλέκονται στον καθορισμό και την διαφοροποίηση του φύλου (SRY) και στην διαδικασία της σπερματογένεσης (γονίδια των AZF περιοχών) (Krausz et al., 1999; Foresta et al., 2001; Krausz et al., 2006; Zheng Li et al., 2008).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του Y χρωμοσώματος και των επιμέρους περιοχών από τις οποίες αποτελείται (Foresta et al., 2001).

4. Γονίδια που απαντώνται στο Y χρωμόσωμα

Σε σύγκριση με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, το Y χρωμόσωμα διαθέτει τον μικρότερο αριθμό γονιδίων αλλά τον μεγαλύτερο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Ειδικότερα, έχουν προσδιοριστεί 220 γονίδια, εκ των οποίων τα 104 κωδικοποιούν πρωτεϊνικά μόρια, τα 111 είναι ψευδογονίδια και τα υπόλοιπα 5 δεν έχουν κατηγοριοποιηθεί (<http://www.gdb.org/hugo/chrY/geneMaps.html>, Απρίλιος 2007). Μεταξύ αυτών, 16 πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στις AZF περιοχές και εμπλέκονται στην διαδικασία της σπερματογένεσης (Zheng Li et al., 2008).

Σύμφωνα με τον Yen H. το 1999, τα γονίδια αυτά ταξινομούνται σε τρεις διακριτές ομάδες με βάση την θέση τους στο Y χρωμόσωμα, τον αριθμό των αντιγράφων τους και το πρότυπο έκφρασής τους (Yen H., 1999):

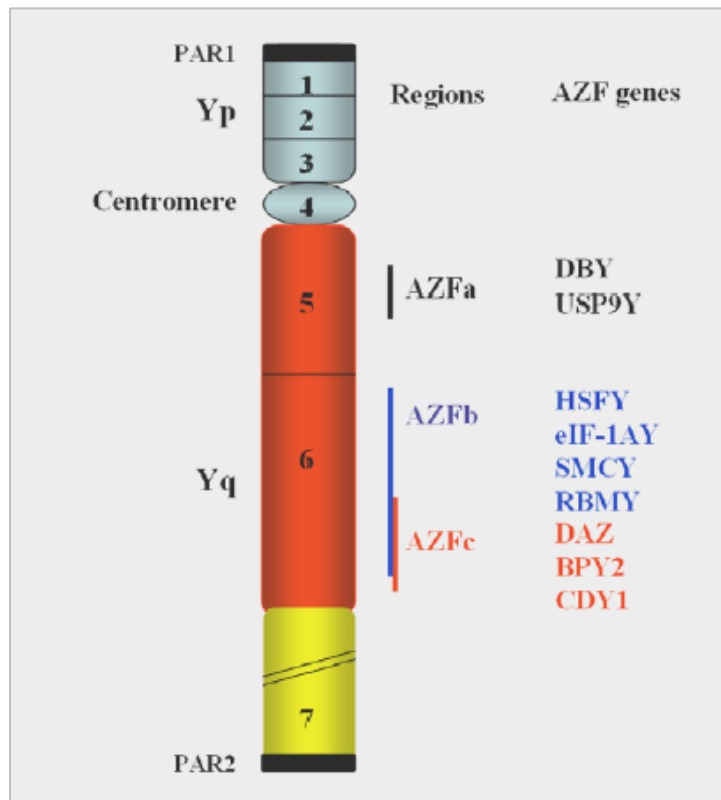
1. Ψευδοαυτοσωμικά γονίδια (όπως ASMTL, MIC2 και IL9R) των οποίων η αλληλουχία είναι όμοια στο X και το Y χρωμόσωμα και με ορισμένες εξαιρέσεις, εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς.
2. Γονίδια τα οποία εδράζονται στην NRY περιοχή (όπως USP9Y, DBY και UTY). Αυτά τα γονίδια έχουν ομόλογα στο X χρωμόσωμα, κωδικοποιώντας πρωτεϊνικά μόρια με υψηλό βαθμό ταυτοσημίας. Επίσης, τα γονίδια αυτά εκφράζονται σε όλους τους ιστούς ενώ ορισμένα εκφράζονται και ιστοειδικά στους όρχεις.

3. Οικογένειες γονιδίων ειδικών για το Y χρωμόσωμα (Y specific) (όπως DAZ, CDY και TSPY). Αποτελούν γονίδια τα οποία απαντώνται σε πολλαπλά αντίγραφα, τα οποία μπορεί να είναι είτε διασπαρμένα είτε ομαδοποιημένα στο Y χρωμόσωμα και εκφράζονται αποκλειστικά στους όρχεις. Εξαίρεση στην παραπάνω ομαδοποίηση αποτελεί το γονίδιο SRY το οποίο είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη των όρχεων, βρίσκεται μόνο σε ένα αντίγραφο και παρουσιάζει διαφορετικό πρότυπο έκφρασης (εκφράζεται στα κύτταρα της γενετικής ακρολοφίας (genital ridge), στο έμβρυο και στα κύτταρα Sertoli του ενήλικα και στα προγονικά κύτταρα των γονάδων) (Jeske et al., 1995; Koopman et al., 1999; Salas-Cortes et al., 1999).

5. Παράγοντες αζωοσπερμίας (Azoospermia Factors) και ανδρική υπογονιμότητα

Για πρώτη φορά οι Tiepolo και Zuffardi, το 1976, πρότειναν πιθανή συσχέτιση μεταξύ ελλειμμάτων του Y χρωμοσώματος και ανδρικής υπογονιμότητας. Ειδικότερα, εξέτασαν τον καρυότυπο 1170 ανδρών, εκ των οποίων, έξι στείροι – αζωοσπερμικοί άνδρες διαπιστώθηκε ότι έφεραν μεγάλα ελλείμματα στο Y χρωμόσωμα, τα οποία περιελάμβαναν ολόκληρη την ετεροχρωματινική περιοχή (Yq12) και ένα τμήμα της γειτονικής ευχρωματινικής περιοχής (Yq11). Επίσης,δείχθηκε ότι οι πατέρες δύο εκ των παραπάνω ατόμων έφεραν φυσιολογικό Y χρωμόσωμα, γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτά τα ελλείμματα αποτελούν *de novo* μεταλλαγές. Βασιζόμενοι λοιπόν στα παραπάνω συμπεράναν ότι αυτά τα ελλείμματα αποτελούσαν το αίτιο της αζωοσπερμίας και γι'αυτό το λόγο πρότειναν την ύπαρξη ενός «γενετικού παράγοντα που εμπλέκεται στην σπερματογένεση» ο οποίος εδράζεται στην περιοχή Yq11, τον οποίο και ονόμασαν Παράγοντα Αζωοσπερμίας (Azoospermia Factor) (Tiepolo & Zuffardi., 1976).

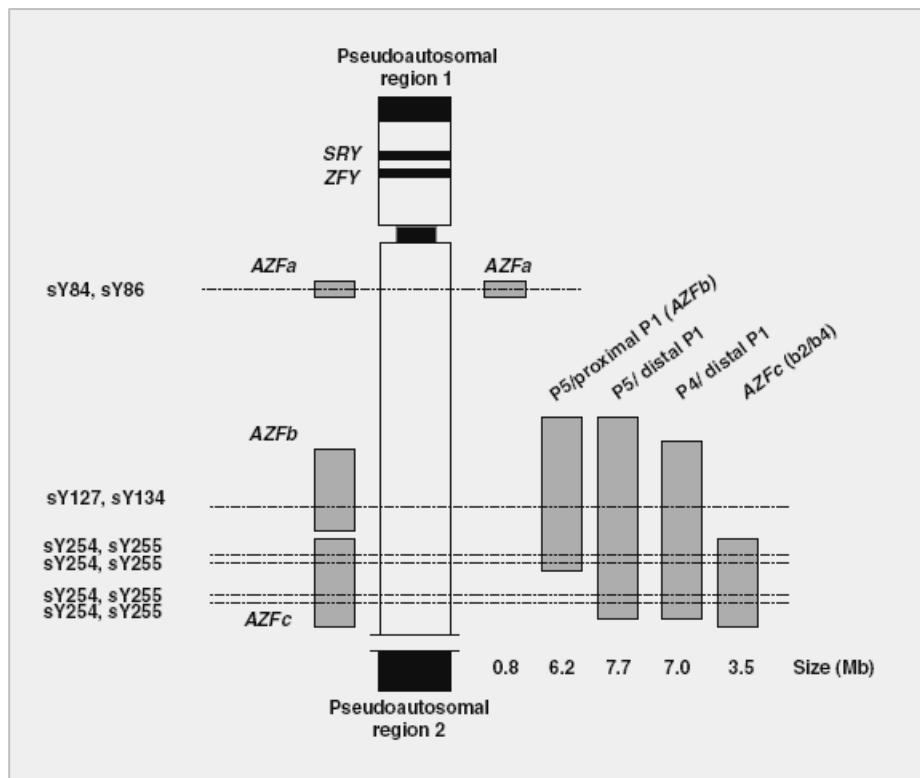
Η χαρτογράφηση του Y χρωμοσώματος ασθενών με ελλείμματα, με την χρήση μοριακών τεχνικών, ανέδειξε την ύπαρξη τριών μη αλληλοεπικαλυπτόμενων περιοχών (Vogt et al., 1996), οι οποίες ονομάστηκαν AZFa, AZFb, AZFc (**Εικόνα 6**). Παράλληλα, προτάθηκε και η ύπαρξη και μιας τέταρτης AZFd περιοχής μεταξύ των AZFb και AZFc, αλλά αυτό το εύρημα χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Στις AZF περιοχές εντοπίζονται αρκετά γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της σπερματογένεσης και εκφράζονται ιστοειδικά στους όρχεις (Vogt et al., 1997; Foresta et al., 2001).



Εικόνα 6. Σχηματική αναπαράσταση του Y χρωμοσώματος. Ο μικρός βραχίονας αναφέρεται ως Yp11 και ο μεγάλος βραχίονας ως Yq11. Παρουσιάζονται οι θέσεις των AZF a,b,c περιοχών και των γονιδίων που απαντώνται σε κάθε μία από αυτές (Krausz et al., 2006).

5.1 Γονίδια που απαντώνται σε κάθε AZF περιοχή

Οι τρεις περιοχές AZFa, AZFb, AZFc αρχικά χαρακτηρίστηκαν μετά από προσεκτική χαρτογράφηση της MSY (Male specific region of Y chromosome) σε ένα μεγάλο αριθμό ανδρών που έφεραν ελλείμματα, όταν ακόμα η πλήρης αλληλουχία του Y χρωμοσώματος δεν ήταν γνωστή (Vogt et al., 1996). Πρόσφατα, προσδιορίστηκε ένα νέο μοντέλο σύμφωνα με το οποίο οι AZFb και AZFc περιοχές είναι αλληλοεπικαλυπτόμενες (Repping et al., 2002). Στην **Εικόνα 7** παρουσιάζονται τα δύο πιθανά μοντέλα που έχουν προταθεί για την διάταξη των AZF περιοχών (Simoni et al., 2004).



Εικόνα 7. Σχηματική αναπαράσταση του Y χρωμοσώματος και των δύο υποθετικών διατάξεων των AZF περιοχών κατά τους Vogt et al., 1996 (αριστερά) και Repping et al., 2002 (δεξιά). Παράλληλα, παρουσιάζονται και τα ζεύγη των ειδικών εκκινητών STS για κάθε AZF περιοχή (Simoni et al., 2004).

1) *AZF_a*

Η *AZF_a* εντοπίζεται στην κεντρική Yq11 περιοχή και το μέγεθός της εκτιμάται μεταξύ 1 – 3 Mb. Σε αυτή έχουν προσδιοριστεί τέσσερα γονίδια που απαντώνται σε ένα μόνο αντίγραφο, το ομόλογο της *Drosophila* DFFRY (*Drosophila* Developmental gene Fats Facets) ή USP9Y (Ubiquitin-specific protease 9, Y chromosome), το DBY (Dead Box Y chromosome), το UTY (Ubiquitous TPR motif Y chromosome) και το TB4Y (Tymosin B4Y isoform). Από τα τέσσερα αυτά γονίδια τα DFFRY ή USP9Y και DBY φαίνεται να διαδραματίζουν σπουδαιότερο ρόλο.

Το γονίδιο DFFRY ή USP9Y ήταν το πρώτο γονίδιο που προσδιορίστηκε στην *AZF_a* περιοχή και δείχθηκε ότι απουσίαζε από υπογόνιμους άνδρες. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη της οποίας το καρβόξυ τελικό άκρο έχει δράση υδρολάσης της ουβικουΐτινης και υπάγεται στην οικογένεια των C19 πεπτιδασών κυστεΐνης (ενδοκυτταρικές πεπτιδάσες), οι οποίες απομακρύνουν μόρια ουβικουΐτινης από πολυουβικουΐτινιωμένα πεπτίδια. Έτσι, η πρωτεΐνη USP9Y φαίνεται να κατέχει σπουδαίο ρόλο στην ρύθμιση του χρόνου ημιζωής πρωτεϊνικών μορίων παρεμποδίζοντας την αποικοδόμησή τους μέσω του πρωτεασώματος. Επίσης,

απαντάται σε ένα μόνο αντίγραφο, διαθέτει ομόλογο στο X χρωμόσωμα το οποίο δεν απενεργοποιείται και εκφράζεται σε ποικιλία ιστών (Foresta et al., 2001; Krausz et al., 2006).

Η πιθανή εμπλοκή του γονιδίου DBY στην διαδικασία της σπερματογένεσης υποστηρίχθηκε εξαιτίας της υψηλής ομολογίας του με το γονίδιο PL10 του ποντικού το οποίο εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις. Στον άνθρωπο, το γονίδιο DBY απαντάται μόνο σε ένα αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα, αποτελείται από 17 εξόνια, κωδικοποιεί μια ATP εξαρτώμενη RNA ελικάση και υπάγεται στην οικογένεια των Dead Box πρωτεϊνών (οι πρωτεΐνες Dead Box δομούνται από 9 συντηρημένα μοτίβα και διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στην ωρίμανση πρόδρομων μορίων RNA καθώς και στην βιογένεση του ριβοσώματος. In vitro έχειδειχθεί ότι πρωτεΐνες που υπάγονται σε αυτή την οικογένεια έχουν δράση ATP εξαρτώμενης RNA ελικάσης (Linder P., 2006)). Παρόλα αυτά η ακριβής λειτουργία της παραγόμενης πρωτεΐνης δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί (Foresta et al., 2001; Simoni et al., 2004).

Το γονίδιο UTY απαντάται μόνο σε ένα αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα και το ομόλογό του στο ποντίκι κωδικοποιεί ένα H-Y αντιγόνο. Τέλος, το γονίδιο TB4Y κωδικοποιεί μια ισομορφή της πρωτεΐνης tyrosin B4 η οποία πιθανώς εμπλέκεται στην αποικοδόμηση της ακτίνης (Krausz et al., 1999; Foresta et al., 2001; Simoni et al., 2004).

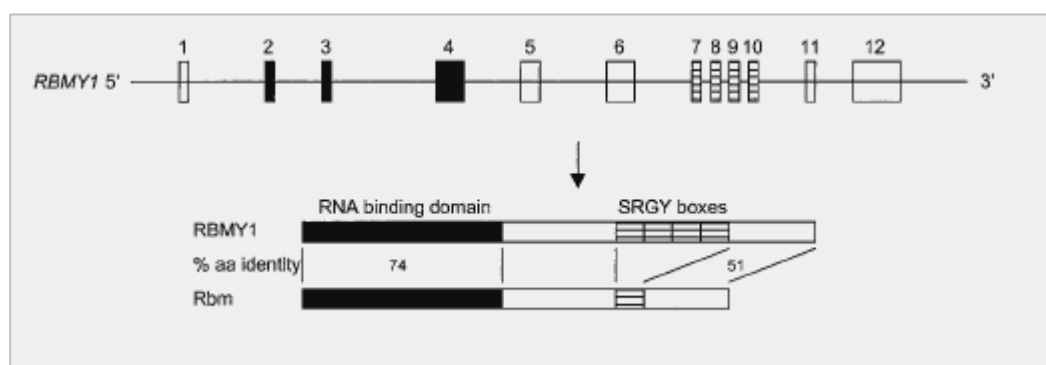
II) AZFb

Η AZFb εντοπίζεται μεταξύ των AZFa και AZFc, στην Yq11 περιοχή και σύμφωνα με πρόσφατα δεδομένα εξαιτίας της παρουσίας δυο πιθανών θέσεων ανασυνδυασμού, η έκτασή της κυμαίνεται από 6,2 Mb έως 7,7 Mb. Σε αυτή έχουν προσδιοριστεί οκτώ γονίδια, το eIF-1A (eukaryotic translation initiation factor 1A), το SMCY (Selected mouse cDNA on the Y chromosome), το HSFY (Heat Shock Factor Y chromosome) που απαντώνται μόνο στην AZFb καθώς και ένα αντίγραφο του BPY2 γονιδίου και του CDY (Chromodomain Y), και δυο αντίγραφα του DAZ γονιδίου που βρίσκονται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη περιοχή με την AZFc. Επίσης, στην AZFb απαντώνται και δυο οικογένειες γονιδίων σε πολλαπλά αντίγραφα, το RBM (RNA binding motif) και το PRY (Krausz et al., 2006).

Το γονίδιο eIF-1A κωδικοποιεί μια ισομορφή του eIF-1A εναρκτήριου παράγοντα της μετάφρασης και διαθέτει ομόλογο στο X χρωμόσωμα (eIF-1AX) το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, με υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους

όρχεις. Ο ρόλος του στην σπερματογένεση δεν έχει διευκρινιστεί ενώ δεν έχει προσδιοριστεί κάποιο έλλειμμα στο οποίο να απομακρύνεται αποκλειστικά το συγκεκριμένο γονίδιο (Foresta et al., 2001; Krausz et al., 2006).

Περισσότερα από 30 γονίδια και ψευδογονίδια RBM είναι διασκορπισμένα και στους δυο βραχίονες του Y χρωμοσώματος. Στην AZFb περιοχή υπάρχει τουλάχιστον ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου RBM. Το γονίδιο RBM είναι το πρώτο που προσδιορίστηκε στην AZFb περιοχή και κλωνοποιήθηκε και υπάγεται στην οικογένεια των RBMY γονιδίων, η οποία υποδιαιρείται σε 6 υποοικογένειες, εκ των οποίων η RBMY-I περιλαμβάνει γονίδια τα οποία μεταγράφονται. Το γονίδιο αυτό απαντάται σε πολλαπλά αντίγραφα σε όλα τα πλακουντοφόρα θηλαστικά και αποτελείται από 12 εξόνια. Οι πρωτεΐνες RBMY δομούνται από μια περιοχή δέσμευσης RNA (RNA binding domain) στο αμινοτελικό άκρο τους και ένα καρβόξυ τελικό άκρο που αποτελείται από 4 επαναλήψεις 37 αμινοξέων (αυτή η περιοχή ονομάζεται SRGY box και περιέχει την αλληλουχία σερίνη-αργινίνη-γλυκίνη-τυροσίνη) (**Εικόνα 8**) (Najmabadi et al., 1996). Το γονίδιο RBMY εκφράζεται αποκλειστικά στα πρόδρομα κύτταρα των σπερματοζωαρίων στους όρχεις (σπερματογόνια, σπερματοκύτταρα και κυλινδρικές σπερματίδες). Ο πραγματικός ρόλος του RBMY στην σπερματογένεση δεν έχει αποσαφηνιστεί, αλλά το γεγονός ότι πρόκειται για πυρηνική πρωτεΐνη που απαντάται σε όλα τα πρόδρομα κύτταρα δείχνει ότι ενδεχομένως να διαθέτει πολλαπλούς ρόλους που σχετίζονται με την εναλλακτική συναρμογή πρόδρομων μορίων RNA (Elliott et al., 1998). Το γονίδιο RBM θεωρείται σημαντικό υποψήφιο γονίδιο για την εμπλοκή του στη σπερματογένεση εξαιτίας τόσο της ιστοειδικότητας της έκφρασής του όσο και του γεγονότος ότι απώλεια του ομολόγου του στο ποντίκι (mouse *Rbm*) οδηγεί σε στειρότητα (Mahadevaiah et al., 1998).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου και της πρωτεΐνης RBMY1. Τα εξόνια 2-4 σημαίνονται με μαύρο και κωδικοποιούν την περιοχή δέσμευσης του RNA, ενώ κάθε ένα από τα εξόνια 7-10 κωδικοποιεί το SRGY box της πρωτεΐνης. Η ομολογία μεταξύ των πρωτεϊνών του ανθρώπου και του ποντικού παρουσιάζεται στο κατώτερο τμήμα της εικόνας (Foresta et al., 2001).

Δύο λειτουργικά αντίγραφα του γονιδίου PRY απαντώνται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη AZFc περιοχή. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια πρωτεϊνική φωσφατάση η οποία πιθανόν εμπλέκεται στην απόπτωση ελλαττωματικών σπερματοζωαρίων και εκφράζεται στις σπερματίδες και στα ώριμα σπερματοζωάρια (Krausz et al., 2006).

Υπάρχουν δύο αντίγραφα του γονιδίου HSFY. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί μια νέα πρωτεΐνη θερμικού σοκ (heat shock protein) η οποία εκφράζεται ιστοειδικά στα κύτταρα Sertoli και στα γεννητικά κύτταρα και εμφανίζει μια στάδιοεξαρτώμενη μεταφορά από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα κατά την σπερματογένεση. Το γονίδιο αυτό διαθέτει ένα ομόλογο, το HSP2 που εντοπίζεται στην θέση 6p22, και κωδικοποιεί ένα μεταγραφικό παράγοντα θερμικού σοκ (Krausz et al., 2006).

Η βιολογική λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου SMCY παραμένει άγνωστη αλλά κωδικοποιεί ένα ειδικό αντιγόνο ιστοσυμβατότητας που απαντάται στα αρσενικά άτομα (Krausz et al., 1999).

III) AZFc

Η AZFc εντοπίζεται κοντά στην ετεροχρωματική περιοχή του Yq και το μέγεθός της εκτιμάται στις 3,5 Mb. Σε αυτή έχουν προσδιοριστεί πέντε γονίδια, το DAZ (Deleted in Azoospermia), το CDY (Chromodomain Y1), το BPY2 (Basic protein Y2), το PRY(PTA-BL related Y) και το TTY2 (testis transcript Y2).

Τα γονίδια CDY, BPY2 και PRY απαντώνται στην αλληλοεπικαλυπτόμενη AZFc περιοχή. Η λειτουργία του προϊόντος του γονιδίου TTY2, το οποίο απαντάται σε τρία αντίγραφα, παραμένει άγνωστη. Τα γονίδια αυτά εκφράζονται ιστοειδικά στους όρχεις και είναι ειδικά του Y χρωμοσώματος (Lahn et al., 1997; Krausz et al., 1999).

Το γονίδιο DAZ απαντάται σε πολλαπλά αντίγραφα εντός της AZFc περιοχής του Y χρωμοσώματος παρά το γεγονός ότι αρχικά θεωρούνταν ότι απαντάται σε ένα μόνο αντίγραφο. Κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη η οποία διαθέτει μια δεσμευτική περιοχή για το RNA (RNA binding domain) στο αμινοτελικό της άκρο και στο καρβόξυ τελικό άκρο μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία 24 αμινοξέων που ονομάζεται DAZ επαναλήψεις. Το γονίδιο δομείται από τουλάχιστον 16 εξόνια και η έκταση που καταλαμβάνει είναι 42kb. Στο εξόνιο 1 απαντάται το κωδικόνιο έναρξης, τα εξόνια 2-5 κωδικοποιούν την δεσμευτική περιοχή για το RNA και τα εξόνια 7a -7g κωδικοποιούν τις DAZ επαναλήψεις (**Εικόνα 9**) (Saxena et al., 1996). Το γονίδιο

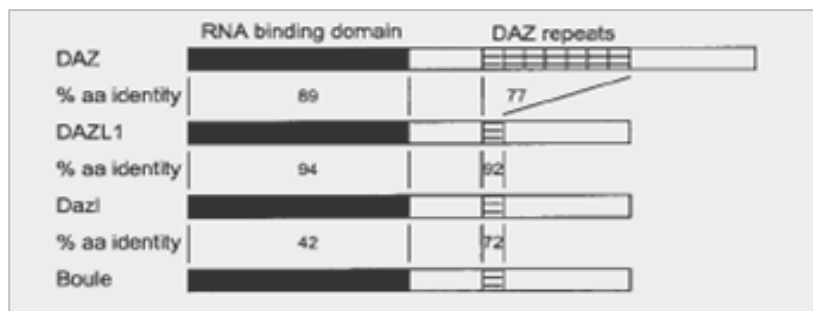
DAZ εκφράζεται αποκλειστικά στα προγονικά κύτταρα των γονάδων των αρσενικών ατόμων.



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου και της πρωτεΐνης DAZ. Τα εξόνια 2-5 σημαίνονται με μαύρο και κωδικοποιούν την περιοχή δέσμευσης για το RNA, ενώ κάθε ένα από τα εξόνια 7a-7g κωδικοποιεί τις DAZ επαναλήψεις της πρωτεΐνης (Foresta et al., 2001).

Το γονίδιο DAZ είναι ομόλογο ενός αυτοσωμικού γονιδίου το οποίο εδράζεται στο χρωμόσωμα 3 (3p24), διαθέτει μόνο μια DAZ επανάληψη και ονομάζεται DAZL1 ή DAZLA (DAZ like autosomal 1). Έχει προταθεί ότι το γονίδιο DAZ έχει προέλθει μετά από μετάθεση ενός αντιγράφου του DAZL1 (Saxena et al., 1996; Foresta et al., 2001). Και το γονίδιο DAZL1 εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις. Στον ποντικό δεν υπάρχει γονίδιο DAZ στο Y χρωμόσωμα παρά μόνο το αυτοσωμικό DAZL1. Στοχευμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο DAZL1 στον ποντικό, οδηγούν σε μη παραγωγή γαμετών τόσο στους όρχεις όσο και στις ωοθήκες, γεγονός που αποδεικνύει τον ουσιώδη ρόλο του γονιδίου αυτού στην ανάπτυξη και επιβίωση των πρόδρομων κυττάρων των γονάδων (Ruggiu et al., 1997). Στον άνθρωπο, σε αυτό το γονίδιο έχει αναφερθεί η αλλαγής μιας βάσης (SNP T54A), η οποία δείχθηκε ότι δεν διαδραματίζει ρόλο στην υπογονιμότητα (Bartoloni et al., 2004).

Τέλος, το γονίδιο DAZ εμφανίζει υψηλή ομολογία με το γονίδιο *boule* της *Drosophila*, του οποίου μεταλλαγές οδηγούν σε διακοπή της σπερματογένεσης (Burgoyne et al., 1996) (**Εικόνα 10**).



Εικόνα 10. Ποσοστό ταυτοσημίας μεταξύ των πρωτεϊνών DAZ (human), DAZL1 (human), Dazl1 (mouse) και boule (Drosophila) (Foresta et al., 2001).

Το γονίδιο CDY κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη η οποία απαντάται στις σπερματίδες και έχει δράση ακετυλοτρανσφεράσης (ειδικά στην H4 ιστόνη) αλληλεπιδρούν με αυτό. Το γονίδιο αυτό διαθέτει ένα ομόλογο στο χρωμόσωμα 6 το οποίο εκφράζεται σε όλους τους ιστούς σε αντίθεση με το CDY που εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις (Krausz et al., 2006).

Το γονίδιο BPY2 εκφράζεται ιστοειδικά στους όρχεις και η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής της πρωτεΐνης έδειξε την πιθανή ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA ή το RNA (Krausz et al., 2006).

5.2 Η προέλευση των ελλειμμάτων στις AZF περιοχές

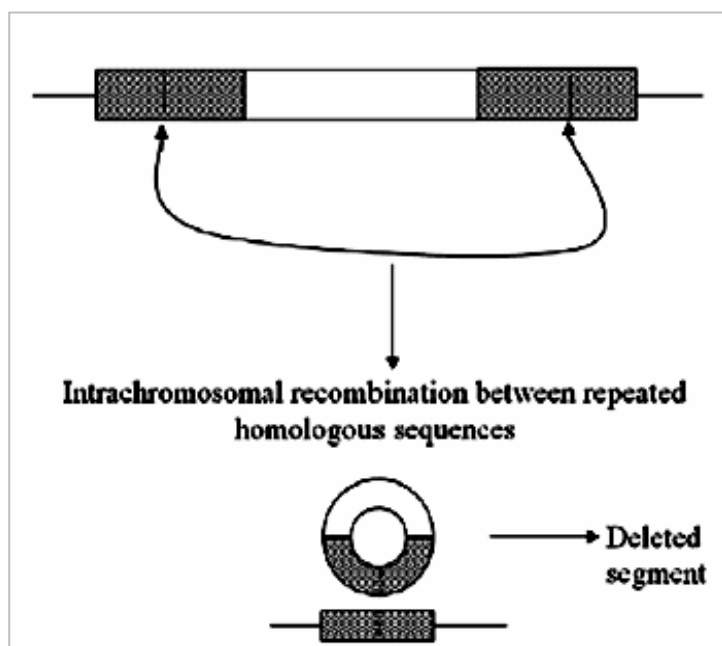
Εκτός των περιπτώσεων όπου παρατηρείται κληρονόμηση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές από τον πατέρα στον γιο, η πλειοψηφία αυτών αποτελούν *de novo* μεταλλάξεις. Είναι πιθανό η έλλειψη να προέκυψε κατά το στάδιο της μείωσης ή στο στάδιο της σπερματίδας. Επίσης είναι δυνατόν να συμβεί και κατά την γονιμοποίηση του ωαρίου ή κατά την ανάπτυξη του εμβρύου με αποτέλεσμα να παρεμποδιστεί η ανάπτυξη των σπερματογονίων και εν συνεχεία να διαταραχθεί η σπερματογένεση στον ενήλικα (Edwards et al., 1997). Τέλος, ο μωσαϊκισμός των γαμετών πιθανώς εξηγεί το γεγονός ότι 2 αγόρια τα οποία ήρθαν στον κόσμο μέσω Ενδοκυτταρικής σπερματέγχυσης (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) έφεραν ελλείμματα στο Y χρωμόσωμα παρά το γεγονός ότι στο DNA του πατέρα τους (που απομονώθηκε από λεμφοκύτταρα) δεν ανιχνεύθηκε έλλειμμα (Kent-First et al., 1996).

5.3 Μηχανισμοί μέσω των οποίων προκύπτουν ελλείμματα στις AZF περιοχές

Η συχνότητα εμφάνισης ελλείψεων στο Y χρωμόσωμα κυμαίνεται από 2%-11% και οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το χρωμόσωμα αυτό είναι επιρρεπές στην αυθόρμητη απώλεια γενετικού υλικού, πιθανώς εξαιτίας της μη ομολογίας με το X

χρωμόσωμα (με αποτέλεσμα τον μη ανασυνδιασμό). Η φύση βέβαια αυτού του μηχανισμού παραμένει σε θεωρητική βάση (Yen et al., 1990).

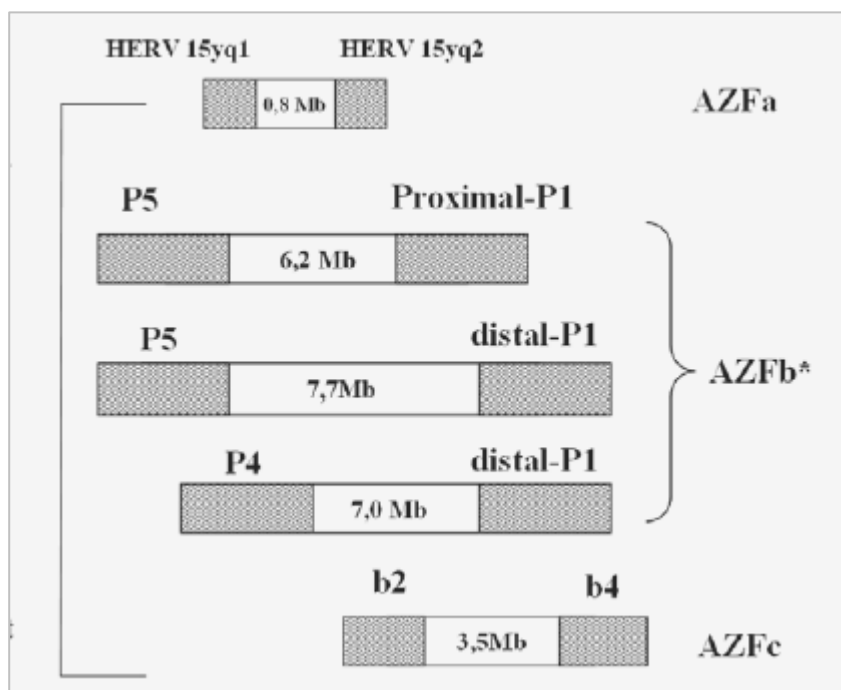
Ο πιο πιθανός μηχανισμός μέσω του οποίου πιστεύεται ότι προκύπτουν τα ελλείμματα στις AZF περιοχές είναι μέσω ενδοχρωμοσωμικού ανασυνδυασμού μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών που απαντώνται καθ'όλο το μήκος του Y χρωμοσώματος (Raicu et al., 2003). Ο μεγάλος βραχίονας διαθέτει ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ειδικών του Y χρωμοσώματος, που ονομάζονται amplicons. Αυτές οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες οργανώνονται σε οκτώ παλινδρομες δομές (P1-P8) που είναι συμμετρικές και μεταξύ αυτών παρατηρούνται υψηλά ποσοστά ομολογίας (Lynch et al., 2005; Krausz et al., 2006). Ομόλογος ανασυνδυασμός μεταξύ αυτών των παλινδρομικών αλληλουχιών έχει σαν αποτέλεσμα την δημιουργία χαρακτηριστικών δευτεροταγών δομών υψηλής αστάθειας που οδηγούν σε διαφόρους τύπους ελλειμμάτων (**Εικόνα 11**) (Vinci et al., 2005).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού μέσω του οποίου προκύπτουν τα ελλείμματα στις AZF περιοχές. Τα σκιασμένα τετράγωνα αντιπροσωπεύουν τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μέσω των οποίων γίνεται ο ανασυνδυασμός με αποτέλεσμα την δημιουργία ασταθών δακτυλιωδών δομών που απομακρύνονται (Krausz et al., 2006).

Ελλείμματα στην AZFc απαντώνται πιο συχνά με συχνότητα 1/4000 αρσενικά άτομα και αυτής της κατηγορίας τα ελλείμματα συνιστούν ~το 80% του συνόλου των ελλειμμάτων που είναι δυνατόν να προκύψουν. Ελλείμματα στην AZFc περιοχή είναι

αποτέλεσμα ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ δυο επαναλαμβανόμενων αλληλουχίων μήκους 229kb. Αντιθέτως, ελλείμματα στην AZFa περιοχή που είναι σπάνια, είναι αποτέλεσμα ομόλογου ανασυνδυασμού μεταξύ δυο επαναλαμβανόμενων αλληλουχίων μήκους 10kb (HERV15q αλληλουχίες -Human Endogenous Retroviral #15) (Vinci et al., 2005) (**Εικόνα 12**).



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση των ελλειμμάτων για κάθε AZF περιοχή ξεχωριστά. Έλλειμμα στην AZFa προκύπτει μετά από ομόλογο ανασυνδιασμό των ρετροϊκών αλληλουχιών HERV15q. Έλλειμματα στην AZFb η οποία αλληλοεπικαλύπτεται μερικώς με την AZFc πραγματοποιούνται μετά από ομόλογο ανασυνδιασμό των παλινδρομικών αλληλουχιών P5,P4,P1. Έλλειμμα στην AZFc πραγματοποιείται μετά από ομόλογο ανασυνδιασμό των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών b2/b4 που απαντώνται εντός της AZFc περιοχής (Krausz et al., 2006).

5.4 Τύποι Ελλειμμάτων και συσχέτισή τους με τον φαινότυπο

Η συχνότητα εμφάνισης ελλείψεων στο Y χρωμόσωμα κυμαίνεται από 15%-20% σε αζωοσπερμικούς άνδρες και 7% - 10% σε άνδρες με σοβαρή олиγοσπερμία (Krausz et al., 2000). Η πλειοψηφία των ελλειμμάτων απαντάται στην AZFc περιοχή με συχνότητα 60%, ακολουθούν ελλείμματα στην AZFb περιοχή και στις AZFbc περιοχές με συχνότητα 35% ενώ η συχνότητα ελλειμμάτων στην AZFa περιοχή είναι μικρότερη με ποσοστό 5% (Krausz et al., 2006).

Η απώλεια ολόκληρης της AZFa περιοχής έχει σαν αποτέλεσμα τα άτομα που φέρουν το έλλειμμα να παρουσιάζουν Sertoli cell only σύνδρομο (παρατηρείται

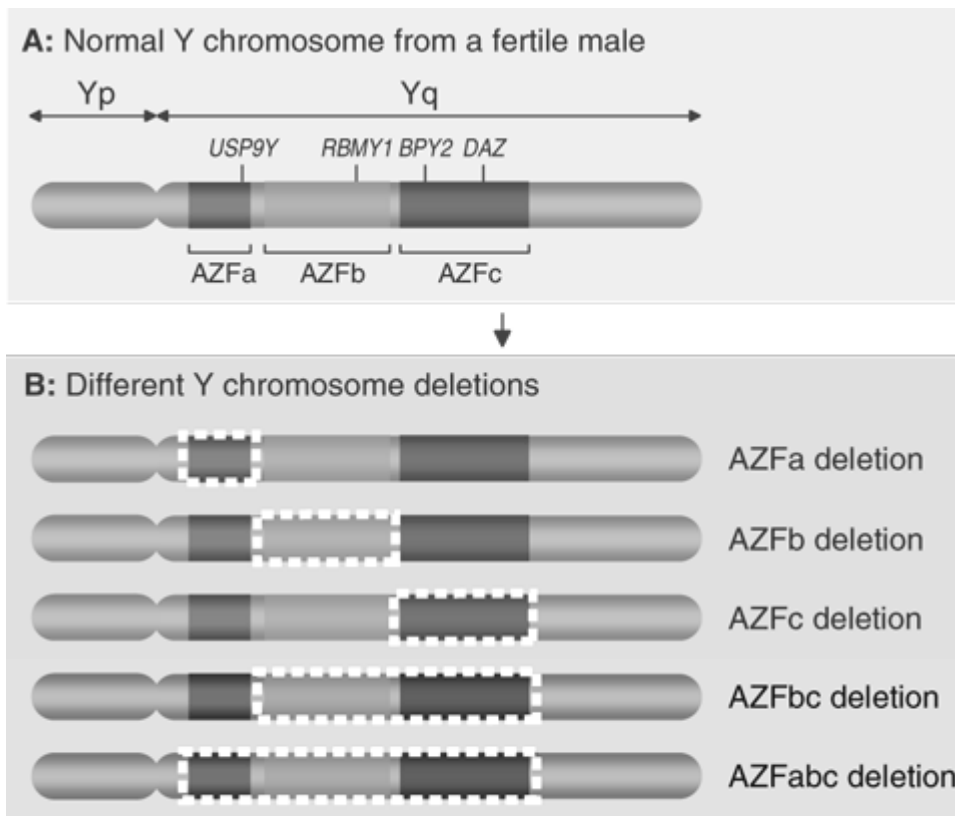
SCOS τύπου I, το οποίο χαρακτηρίζεται από πλήρη απουσία γεννητικών κυττάρων στο σπερματικό επιθήλιο των ορχικών σωληναρίων –παρουσία μόνο κυττάρων Sertoli-, και κλινικά από ασπερμία, (Hinderer et al., 1978)) και αζωοσπερμία. Παράλληλα, άτομα που φέρουν μεμονομένα ελλείμματα των γονιδίων USP9Y και DBY εμφανίζουν ποικίλο ιστολογικό φαινότυπο (Krausz et al., 2000; Simoni et al., 2004; Ferlin et al., 2006).

Η απώλεια της AZFc περιοχής οδηγεί σε ποικίλο κλινικό και ιστολογικό φαινότυπο. Γενικά, ελλείμματα στην AZFc περιοχή σχετίζονται με υπολειπόμενη σπερματογένεση (παρατηρείται το SCOS τύπου II, το οποίο χαρακτηρίζεται από μερική απουσία γεννητικών κυττάρων στο σπερματικό επιθήλιο των ορχικών σωληναρίων δηλαδή υπάρχουν ορισμένες εστίες στον όρχι όπου πραγματοποιείται φυσιολογικά η σπερματογένεση (Hinderer et al., 1978)) και εμφανίζονται σε άνδρες με αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία και σε σπάνιες περιπτώσεις έχει αναφερθεί η φυσιολογική μεταβίβασή σε αρσενικό απόγονο. Άνδρες που φέρουν ελλείμματα στην AZFc περιοχή έχουν αυξημένη πιθανότητα να αποκτήσουν παιδί μετά από βιοψία όρχεων TESE (Testicular Sperm Extraction) και εν συνεχεία ICSI (Simoni et al., 2004).

Η απώλεια ολόκληρης της AZFb περιοχής ή AZFbc οδηγεί σε ιστολογική εικόνα παρόμοια με το Sertoli cell only σύνδρομο ή διακοπή της σπερματογένεσης με αποτέλεσμα αζωοσπερμία ή σοβαρή ολιγοσπερμία. Τα άτομα αυτά έχουν την δυνατότητα τεκνοποίησης μετά από βιοψία όρχεων (TESE) και ενδοκυτταρική σπερματέγχυση (ICSI) (Krausz et al., 2000; Simoni et al., 2004; Ferlin et al., 2006).

Γενικά, η συχνότητα εμφάνισης ελλειμμάτων στο Yq ποικίλει σε κάθε κατηγορία. Πρόσφατα αναφέρθηκαν στην βιβλιογραφία τα εξής ποσοστά: 4% σε ολιγοσπερμικούς άνδρες, 11% σε αζωοσπερμικούς, 14% σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς σοβαρής ολιγοσπερμίας και 18% σε περιπτώσεις ιδιοπαθούς αζωοσπερμίας (Steger et al., 2003; Giannouli et al., 2004). Παράλληλα, η συχνότητα εμφάνισης διαφόρων συνδυασμών ελλειμμάτων στις AZF περιοχές σε αζωοσπερμικούς άνδρες όπως AZFa, AZFb, AZFc, AZFbc και AZFabc είναι 4,9%, 15,8%, 59,6%, 13,6% και <1% , αντίστοιχα (Zheng Li et al., 2008).

Οι διάφοροι τύποι ελλειμμάτων καθώς και συνδυασμός αυτών παρουσιάζονται στην **Εικόνα 13**.



Εικόνα 13. (Α) Σχηματική απεικόνιση του Y χρωμοσώματος και της θέσης των περιοχών AZF σε αυτό. **(Β)** Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων τύπων ελλειμμάτων που μπορούν να προκύψουν (Cram et al., 2006)

5.5 Τεχνικές Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής και Ελλείμματα στις AZF περιοχές

Η μοριακή ανίχνευση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος συνιστάται σε περιπτώσεις ασθενών με αζωοσπερμία, συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $<1 \times 10^6$ /ml ή συγκέντρωση σπερματοζωαρίων 1×10^6 /ml – 5×10^6 /ml και Sertoli Cell Only σύνδρομο (με βάση την ιστολογική εικόνα των όρχεων), αλλά παρόλα αυτά δεν υπάρχουν σαφή κριτήρια επιλογής των υποψηφίων ανδρών για αυτή την ανάλυση. Γενικά, ασθενείς που φέρουν χρωμοσωμικές μεταλλαγές, αζωοσπερμία οφειλόμενη σε κισσοκήλη ή υπογοναδοτρόφο υπογοναδισμό δεν υποβάλλονται στην προαναφερθείσα μοριακή ανάλυση αλλά σε συνήθεις εξετάσεις όπως ο ορμονικός έλεγχος και το σπερμοδιάγραμμα (Krausz et al., 1999; Simoni et al., 2004).

Σε ασθενείς με αζωοσπερμία ή σοβαρή олиγοσπερμία, οι οποίοι είναι υποψήφιοι για να υποβληθούν σε ICSI ή ICSI / TESE, πρέπει να παρέχεται μοριακή ανίχνευση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές. Επίσης, η τεχνική TESE δεν θα πρέπει να

συστήνεται σε περιπτώσεις ασθενών με έλλειψη ολόκληρης της AZFa, ή έλλειψη ολόκληρης της AZFb, ή ακόμα ελλειμμάτων στις AZFbc. Ουσιαστικά μέσω της ICSI ή της Εξωσωματικής γονιμοποίησης (In Vitro Fertilization, IVF) (όταν αυτή είναι δυνατή) σε ασθενείς με ελλείμματα στις AZF περιοχές παρατηρείται κάθετη μεταφορά αυτών των ελλειμμάτων, απευθείας στον απόγονο, μια κατάσταση η οποία περιγράφεται ως Y status επειδή το πρόβλημα υπογονιμότητας μεταβιβάζεται στον απόγονο με αποτέλεσμα να οδηγεί σε οικογενή υπογονιμότητα (Raicu et al., 2003; Simoni et al., 2004).

Ο Siffroi και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι άτομα που έφεραν ελλείμματα στον Yq βραχίονα εμφάνιζαν αυξημένο ποσοστό νουλισωμικών σπερματοζωαρίων (45,XO) (Siffroi et al., 2000). Τα παραπάνω αποτελέσματα αναδεικνύουν την πιθανότητα γέννησης απογόνων με σύνδρομο Turner ή άλλες φαινοτυπικές ανωμαλίες όπως αμφιβόλου φύλου γεννητικά όργανα (ambiguous genitalia). Επίσης, ο Πατσαλής και οι συνεργάτες του σε μία επιλεγμένη ομάδα ανδρών που εμφάνιζαν μωσαϊκισμό 46,XY/45,XO και ασαφή γεννητικά όργανα ή στίγματα Turner προσδιόρισε ότι το 33% των ατόμων αυτών έφεραν ελλείμματα στην AZFc περιοχή (Patsalis et al., 2002). Τέλος, και σε άλλες μελέτες επιβεβαιώνεται η συσχέτιση μεταξύ ελλειμμάτων στον Yq βραχίονα και της παρουσίας 45,XO σπερματοζωαρίων (Le Bourhis et al., 2000; Bellovits et al., 2006).

Με βάση, λοιπόν, τα παραπάνω, κρίνεται υποχρεωτική η παροχή γενετικής συμβουλής σε ζευγάρια που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, προκειμένου να ενημερωθούν για την πιθανότητα να αποκτήσουν ένα γιο με εξασθενημένη σπαρματογένεση, ενώ μπορεί να επηρεαστεί και η ανατομία του γεννητικού συστήματος του απογόνου (πχ. ασάφεια γεννητικών οργάνων). Παρόλα αυτά, ο φαινότυπος δεν μπορεί να προβλεφθεί επακριβώς εξαιτίας του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου και των διαφορετικών περιβαλλοντικών επιδράσεων που θα ασκηθούν στο αναπαραγωγικό σύστημα του πατέρα και του γιού (Simoni et al., 2004; Krausz et al., 2006).

6. Μεταβατικές πρωτεΐνες (Transition proteins - TPs)

Στα θηλαστικά, στο στάδιο που μεσολαβεί μεταξύ της κυλινδρικού σχήματος και της επιμηκυσμένης σπερματίδης, οι ιστόνες απομακρύνονται από το DNA και αντικαθίστανται από τις μεταβατικές πρωτεΐνες [(οι οποίες ονομάζονται και σπερματιδοειδικές (spermatid-specific) ή ενδιάμεσες (intermediate proteins)] (Dadoune J.P., 2003). Αμέσως μετά από την απομάκρυνση των ενδιάμεσων ιστονών και πριν την αντικατάστασή τους από τις μεταβατικές πρωτεΐνες, οι μεταβατικές πρωτεΐνες συνιστούν το 90% των βασικών πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με την χρωματίνη (Kimmins et al., 2005).

6.1 Τα γονίδια των μεταβατικών πρωτεϊνών

Μέχρι σήμερα, έχει προσδιοριστεί η δομή και η νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων των μεταβατικών πρωτεϊνών (TP1 και TP2) στο ποντίκι, στον αρουραίο, στον ταύρο και τον άνθρωπο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις μεταβατικές πρωτεΐνες φέρουν δυο εξόνια και ένα εσόνιο, όπως και τα γονίδια των πρωταμινών. Το γονίδιο της TP1 εδράζεται στο χρωμόσωμα 2, στην χρωμοσωμική θέση 2q35-q36. Το γονίδιο της TP2 εδράζεται στο χρωμόσωμα 16, στην χρωμοσωμική θέση 16p13.3, σε γραμμική ακολουθία με τα γονίδια των πρωταμινών (PRM1, PRM2) (Dadoune J.P., 2003; Carrell et al., 2007).

6.2 Δομικά χαρακτηριστικά των μεταβατικών πρωτεϊνών

Οι μεταβατικές πρωτεΐνες συνιστούν μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών που δεσμεύονται στο DNA που έχουν πιο βασικό χαρακτήρα σε σχέση με τις ιστόνες αλλά λιγότερο βασικό χαρακτήρα σε σχέση με τις πρωταμίνες. Από αυτές οι πιο καλά χαρακτηρισμένες είναι οι TP1 και TP2 πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν περίπου το 55% και 40% των βασικών πρωτεϊνών που απαντώνται στον πυρήνα των σπερματίδων, αντίστοιχα (Kimmins et al., 2005).

Η TP1 πρωτεΐνη έχει 60kDa μοριακό βάρος και δομείται από 54 αμινοξέα. Στην αμινοξική της αλληλουχία συναντώνται τα αμινοξέα αργινίνη, λυσίνη και σερίνη τα οποία ενισχύουν το βασικό της χαρακτήρα. Επίσης, η TP1 έχει αποσταθεροποιητικές ιδιότητες για το DNA οι οποίες οφείλονται στην παρουσία δυο καταλοίπων τυροσίνης μεταξύ των βασικών αμινοξέων αυτής (Carrell et al., 2007).

Η TP2 πρωτεΐνη έχει 13kDa μοριακό βάρος και δομείται από τα αμινοξέα προλίνη, σερίνη, αργινίνη και λυσίνη. Το καρβόξυ τελικό της άκρο είναι πλούσιο σε

βασικά αμινοξέα ενώ συναντώνται και δυο πιθανοί δάκτυλοι Zn^{2+} στο αμινοτελικό της άκρο (Kimmins et al., 2005; Carrell et al., 2007).

Σε knock out ποντίκια για το γονίδιο της TP2 παρατηρήθηκε αδυναμία συμπίκνωσης της χρωματίνης και μάλιστα στα σπερματοζωάρια αυτών το DNA ήταν αποδιατεταγμένο (DNA denaturation) σε σχέση με το DNA των σπερματοζωαρίων του πληθυσμού αναφοράς (Zhao et al., 2001).

6.3 Η λειτουργία των μεταβατικών πρωτεϊνών

Από in vitro πειράματα έχειδειχθεί ότι η TP1 μειώνει την θερμοκρασία τήξης του DNA και προκαλεί τοπική αποσταθεροποίηση του πυρήνα του νουκλεοσώματος, παρατήρηση η οποία μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η TP1 μειώνει την αλληλεπίδραση του DNA με τον πυρήνα του νουκλεοσώματος. Αντιθέτως, η TP2 αυξάνει την θερμοκρασία τήξης του DNA και προάγει την σύμπτυξη του πυρήνα του νουκλεοσώματος, δείχνοντας ότι πρόκειται για μια πρωτεΐνη η οποία προάγει το πακετάρισμα (Dadoune J.P., 2003).

In vivo, η «χαλάρωση» του DNA (DNA relaxation) ως αποτέλεσμα της υπερακετυλίωσης των ιστονών και της δράσης της τοποϊσομεράσης, διευκολύνει την αντικατάσταση των ιστονών από τις μεταβατικές πρωτεΐνες (ενδιάμεσης βασικότητας) (Carrell et al., 2007). Ειδικότερα, οι μεταβατικές πρωτεΐνες φωσφορυλιώνονται αμέσως μετά την σύνθεσή τους και εν συνεχεία αποφωσφορυλιώνονται, γεγονός το οποίο διευκολύνει την δέσμευσή τους στο DNA και προάγει την συμπίκνωση της χρωματίνης (Kimmins et al., 2005).

7. Πρωταμίνες (Protamines - PRMs)

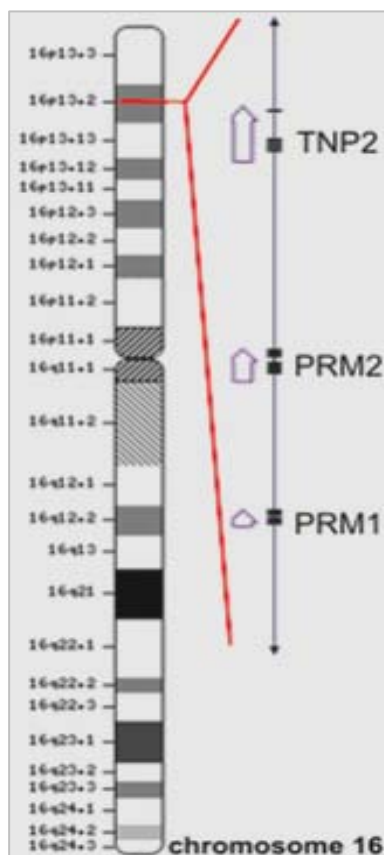
Για πρώτη φορά το σύμπλοκο πρωταμινών και DNA απομονώθηκε από σπέρμα από τον Friedrich Miescher (Miescher F., 1874). Οι πρωταμίνες είναι υψηλής βασικότητας (υψηλή περιεκτικότητα στα βασικά αμινοξέα αργινίνη και κυστεΐνη), μικρού μοριακού βάρους πρωτεΐνες οι οποίες αντικαθιστούν τις μεταβατικές πρωτεΐνες (TP1, TP2) στο στάδιο των επιμηκυσμένων σπερματίδων κατά την σπερμιογένεση με αποτέλεσμα τον υψηλό βαθμό συμπίκνωσης της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου (Dadoune J.P., 2003; Aoki et al., 2003).

Το ποντίκι, ο άνθρωπος και ορισμένα είδη ψαριών διαθέτουν δυο τύπους πρωταμινών σε αντίθεση με τον αρουραίο, τον ταύρο, το ινδικό χοιρίδιο και το

κουνέλι όπου στο σπέρμα τους απαντάται μόνο ένας τύπος πρωταμίνης. Στον άνθρωπο συναντώνται οι πρωταμίνες 1 και 2 (PRM1 & PRM2) (Fuentes-Mascorro G. et al., 2000; Oliva R., 2006).

7.1 Ο γενετικός τύπος των Πρωταμινών

Τα γονίδια των πρωταμινών όπως και οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά έχουν συντηρηθεί εξελικτικά σε όλα τα είδη των θηλαστικών. Στο ανθρώπινο απλοειδές γονιδίωμα (σπέρμα) συναντάται ένα αντίγραφο του γονιδίου της πρωταμίνης 1 και ένα αντίγραφο της πρωταμίνης 2, τα οποία εδράζονται στο χρωμόσωμα 16, στην χρωμοσωμική θέση 16p13.3 (Εικόνα 14).

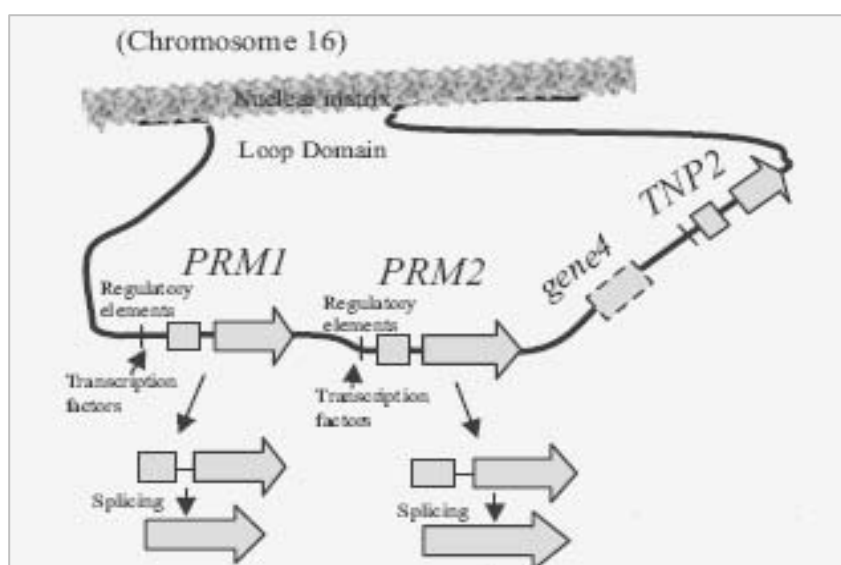


Εικόνα 14. Ο γενετικός τύπος των πρωταμινών εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 (www.wikipedia.com/protamine).

Και τα δυο γονίδια αποτελούνται από δυο εξόνια και ένα εσόνιο (Εικόνα 15) (Oliva R., 2006; Carrell et al., 2007). Στην ίδια χρωμοσωμική θέση εντοπίζεται και το γονίδιο της TP2 καθώς και ένα τέταρτο ψευδογονίδιο, το οποίο ονομάζεται gene4. Το gene4 ονομάστηκε αρχικά και πρωταμίνη-3 (PRM3) εξαιτίας μιας παρατήρησης ότι πιθανώς να προέκυψε από διπλασιασμό του γονιδίου της PRM1. Παρόλα αυτά το όνομα PRM3 είναι παραπλανητικό επειδή η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του gene4 δεν παρουσιάζει ομοιότητα με αυτή των πρωταμινών εφόσον είναι πλούσια

σε γλουταμινικό οξύ και όχι σε αργινίνη, γεγονός που δεν επιτρέπει την αλληλεπίδραση με το DNA, άρα δεν μπορεί να χαρακτηριστεί ως PRM3 (Oliva R., 2006).

Ο γενετικός τόπος PRM1-PRM2-TR2 καταλαμβάνει μια έκταση 28,5kb και τα γονίδια είναι οργανωμένα γραμμικά (**Εικόνα 15**), γεγονός το οποίο πιθανώς διευκολύνει την ταυτόχρονη ή συντονισμένη έκφραση αυτών των γονιδίων (Aoki et al., 2003; Oliva R., 2006; Carrell et al., 2007).



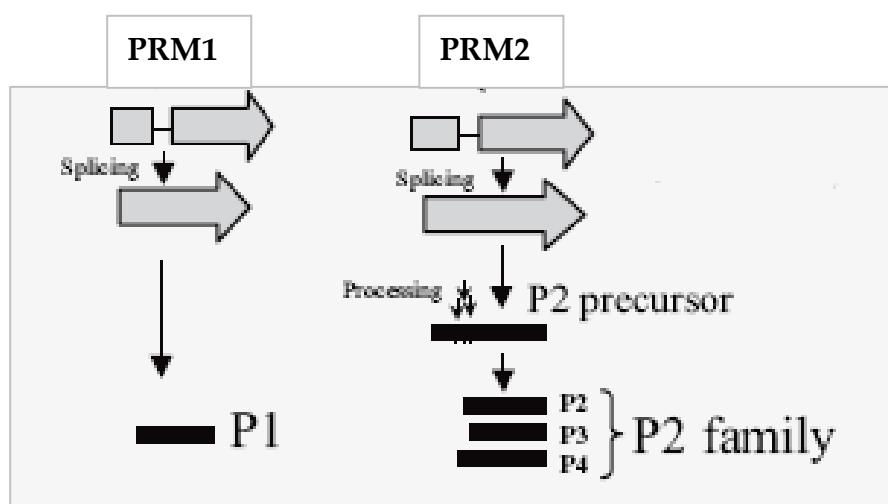
Εικόνα 15. Διαγραμματική απεικόνιση του γενετικού τόπου των πρωταμινών και άλλων γονιδίων που απαντώνται σε αυτόν (Oliva R., 2006)

Η τοπολογία του γενετικού τόπου των πρωταμινών διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών. Αρχικά, ο πολυγονιδιακός τόπος PRM1-PRM2-TR2 εντοπίζεται σε μια μεγάλης έκτασης μεθυλιωμένη περιοχή, η οποία διευκολύνει την δέσμευση στο πυρηνικό πλέγμα (Aoki et al., 2003). Ουσιαστικά, εκατέρωθεν του γενετικού τόπου απαντώνται θέσεις δέσμευσης στο πυρηνικό πλέγμα (Matrix Attachment Regions/MAR ή SAR – Scaffold Attachment Regions, περιοχές δέσμευσης στο ικρίωμα) οι οποίες είναι πλούσιες σε Alu στοιχεία (τα οποία λειτουργούν κατανέμονται σε όλο το γονιδίωμα και λειτουργούν ως πιθανές θέσεις μεθυλίωσης). Γενικά, η μεθυλίωση καταστέλλει την έκφραση γονιδίων ενώ η υπομεθυλίωση ενεργοποιεί την έκφραση γονιδίων. Στην περίπτωση του γενετικού τόπου PRM1-PRM2-TP2, η ενεργοποίηση των γονιδίων πραγματοποιείται μέσω της δέσμευσης των MAR στο πυρηνικό πλέγμα. Βέβαια, ο Schmid και οι συνεργάτες του

(Schmid et al., 2001) ανέφεραν ότι η δέσμευση του γενετικού τόπου στο πυρηνικό πλέγμα είναι ανεξάρτητη της μεθυλίωσης των Alu στοιχείων όπως και ότι η μεθυλίωση των Alu στοιχείων δεν διαδραματίζει ρόλο στην ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων. Επίσης, τα γονίδια της PRM1 και της PRM2 περιέχουν την ρυθμιστική αλληλουχία TATA, που διευκολύνει την δέσμευση μεταγραφικών παραγόντων στον υποκινητή τους, επάγοντας την έναρξη της μεταγραφής. Υπάρχει επίσης ένα στοιχείο CRE, (cAMP Response Element) που εντοπίζεται στην περιοχή -57 έως -48 των γονιδίων PRM1 και PRM2 που ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων αυτών μέσω της δέσμευσης πρωτεϊνών CRE σε αυτό. Τέλος, σε ανοδικά ρυθμιστικά στοιχεία που απαντώνται σε κάθε υποκινητή, δεσμεύονται trans ενεργοποιητικές πρωτεΐνες, που ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την μεταγραφή (Aoki et al., 2003; Schmid et al., 2001; Shaman et al., 2007).

7.2 Τα μέλη της Οικογένειας των πρωταμινών

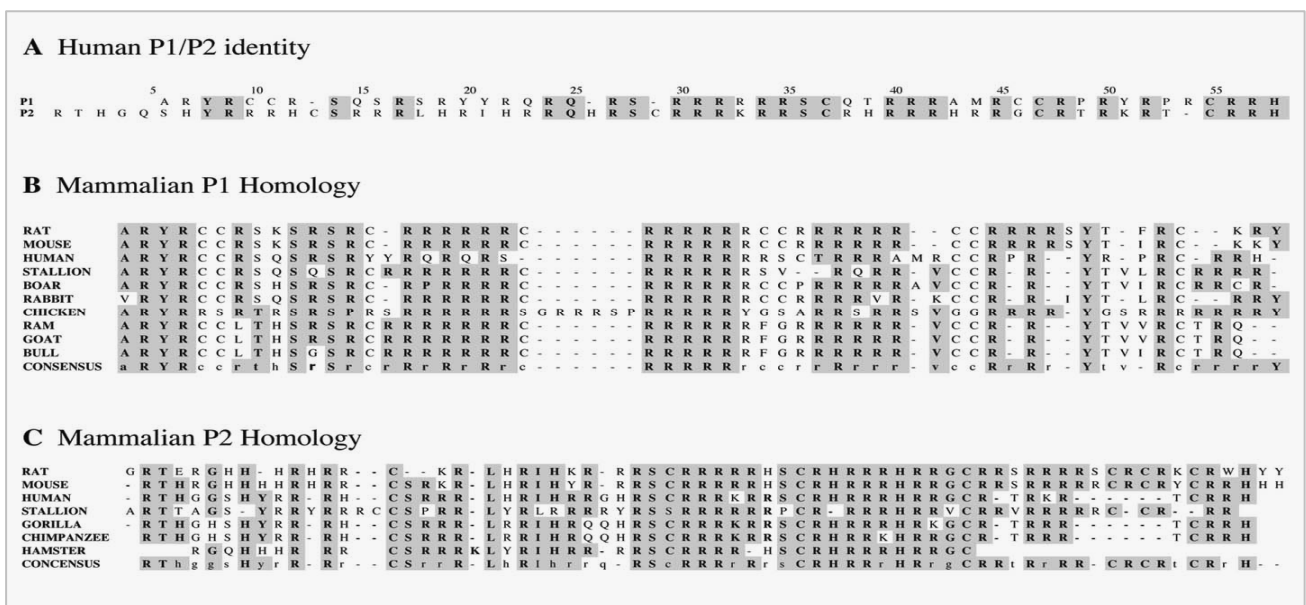
Στον άνθρωπο, από τον πυρήνα ώριμων σπερματοζωαρίων έχουν απομονωθεί τέσσερεις τύποι πρωταμινών, οι PRM1, PRM2, PRM3 και PRM4. Η PRM1 ανήκει στην οικογένεια της P1 (ένας αντιπρόσωπος) ενώ οι PRM2, PRM3 και PRM4 ανήκουν στην οικογένεια της P2 (Dadoune J.P., 2003). Τα μέλη της οικογένειας P2 προκύπτουν μετά από διαφορετική πρωτεόλυση ενός μορίου mRNA το οποίο μεταγράφεται από το γονίδιο της PRM2 (**Εικόνα 16**) (Oliva R., 2006).



Εικόνα 16. Από το γονίδιο της PRM1 παράγεται μόνο η πρωταμίνη 1, ενώ από το γονίδιο της PRM2 προκύπτουν 3 διαφορετικές πρωταμίνες οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια της P2 (Oliva R., 2006).

7.3 Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια των πρωταμινών

Στον άνθρωπο, από τα γονίδια των πρωταμινών, PRM1 και PRM2, κωδικοποιούνται οι αντίστοιχες πρωτεΐνες οι οποίες δομούνται από 51 αμινοξέα και 57-63 αμινοξέα αντίστοιχα. Το ποσοστό ταυτοσημίας των δύο πρωτεϊνών είναι ~50% (**Εικόνα 17[A]**) και η αναλογία αυτών στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου είναι 1:1. Και οι δύο πρωτεΐνες είναι πλούσιες στα βασικά αμινοξέα αργινίνη και κυστεΐνη (50% Arg και 10% Cys). Παρά το γεγονός ότι και οι δυο πρωταμίνες περιέχουν περίπου το ίδιο ποσοστό σε αργινίνη, η πρωταμίνη 2 έχει λίγο πιο βασικό χαρακτήρα, σε σύγκριση με την πρωταμίνη 1, εξαιτίας της παρουσίας καταλοιπών ιστιδίνης και λυσίνης (Aoki et al., 2003).

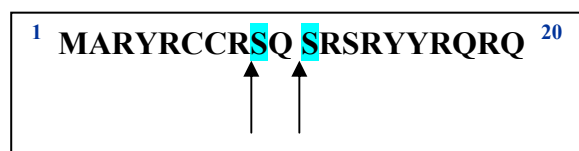


Εικόνα 17. (Α) Σύγκριση των αλληλουχιών των γονιδίων PRM1 και PRM2 του ανθρώπου (50% ταυτοσημία) (McKay et al., 1985), **(Β)** Σύγκριση της αλληλουχίας της PRM1 σε διάφορα είδη θηλαστικών, **(Γ)** Σύγκριση της αλληλουχίας της PRM2 σε διάφορα είδη θηλαστικών (Aoki et al., 2003).

Η πρωτεΐνη PRM1 συντίθενται απευθείας ως ώριμο προϊόν, το οποίο δομείται από τρεις δομικά διαφορετικές περιοχές (Oliva R., 2006; Carrell et al., 2007), οι οποίες είναι:

- το αμινοτελικό άκρο όπου συναντάται το πεπτίδιο ARYRCC
- την κεντρική περιοχή η οποία είναι πλούσια σε αργινίνη και μέσω αυτής επιτυγχάνεται η δέσμευση στο DNA
- το καρβόξυ τελικό άκρο όπου συναντώνται περισσότερα υδρόφοβα αμινοξέα

Η πρωτεΐνη PRM1 φωσφορυλιώνεται απευθείας μετά την σύνθεσή της από την ειδική για σερίνη/αργινίνη πρωτεϊνική κινάση 1 (Serine/Arginine protein specific kinase-1, SRPK1), η οποία εκφράζεται στα πρόδρομα γεννητικά κύτταρα αλλά απουσιάζει από τα ώριμα σπερματοζωάρια και υπάγεται στην οικογένεια των ειδικών για Αργινίνη/Σερίνη κινασών οι οποίες τροποποιούν εκλεκτικά συγκεκριμένα RS διπεπτίδια (απαιτούνται τουλάχιστον τρία RS ή SR διπεπτίδια) (Papoutsopoulou et al., 1999; Dadoune J.P., 2003). Ειδικότερα, η Papoutsopoulou και οι συνεργάτες της προσδιόρισαν *in vitro* ότι οι σερίνες 8 και 10 της πρωταμίνης-1 φωσφορυλιώνονται από την SRPK1 (**Εικόνα 18**). Αυτή η φωσφορυλίωση πραγματοποιείται προκειμένου η πρωταμίνη-1 να δεσμευθεί στο DNA και πιθανώς να είναι απαραίτητη ώστε να μειωθούν οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των γειτονικών μορίων των πρωταμινών (Papoutsopoulou et al., 1999; Oliva R., 2006).



Εικόνα 18. Η SRPK1 φωσφορυλιώνει τις Ser 8 και 10 της πρωτεΐνης PRM1, μεταξύ των οποίων υπάρχει ένα κατάλοιπο γλουταμίνης (Q).

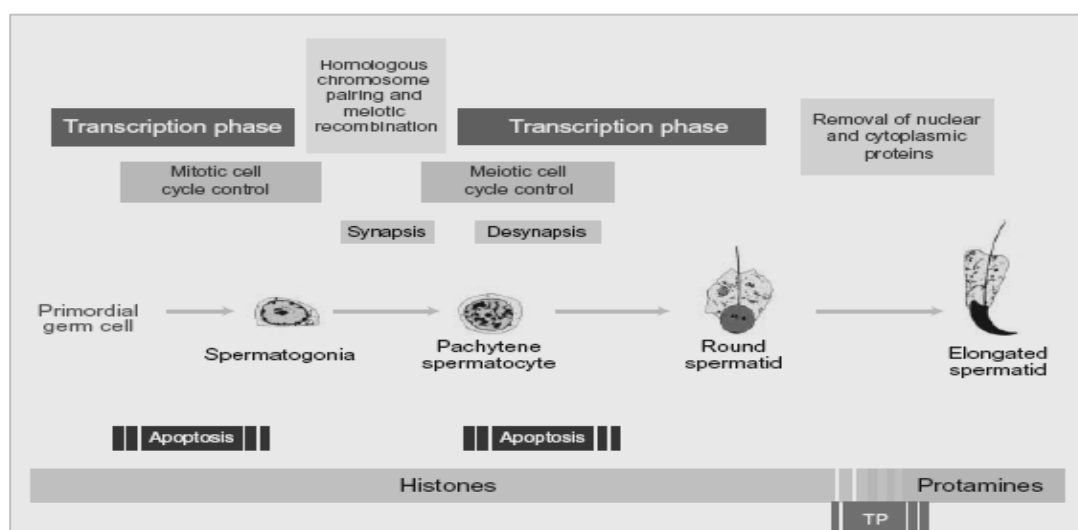
Η πρωτεΐνη PRM2 συντίθενται αρχικά ως μια πρόδρομη πρωτεΐνη 103 αμινοξέων και εν συνεχεία υφίσταται πρωτεόλυση στο αμινοτελικό της άκρο. Ομάδες αργινίνης (3-4) απαντώνται στην κεντρική περιοχή του μορίου της PRM2 ενώ ιστιδίνες και κυστεΐνες κατανέμονται σε τυχαίες θέσεις κατά μήκος του μορίου (Dadoune J.P., 2003). Τα μέλη της οικογένειας της P2 διαφέρουν μεταξύ τους μόνο στην αλληλουχία του αμινοτελικού τους άκρου κατά μια επέκταση ενός έως τεσσάρων αμινοξέων, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι η ισομορφή PRM2 απαντάται σε μεγαλύτερη αφθονία (Εικόνα 16) (Oliva R., 2006). Επίσης, η ισομορφή PRM2 φωσφορυλιώνεται αμέσως μετά την σύνθεσή της από την εξαρτώμενη από Ca^{2+} /καλμοδουλίνη πρωτεϊνική κινάση IV (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV / Camk4) στην σερίνη 14. Η φωσφορυλίωση της PRM2 από την Camk4 είναι απαραίτητη για την δέσμευση της πρώτης στο DNA ενώ η μετέπειτα αποφωσφορυλίωσή της είναι απαραίτητη για την συμπύκνωση της χρωματίνης στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου (Aoki et al., 2003; Kimmins et al., 2005). Στοχευμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο της Camk4 σε αρσενικά ποντίκια οδηγούν σε στειρότητα, απώλεια της PRM2 και διατήρηση της TP2 στην χρωματίνη, παρατηρήσεις, οι οποίες

μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η φωσφορυλίωση της PRM2 είναι απαραίτητη, ώστε να μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη χρωματίνη και εν συνεχεία να απομακρύνει την TP2 (Carrell et al., 2007).

7.4 Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων των πρωταμινών

Οι πρωταμίνες εκφράζονται στο στάδιο των απλοειδών κυλινδρικού σχήματος σπερματίδων (post-meiotic haploid spermatid) (**Εικόνα 3**). Μια ενδιαφέρουσα πτυχή αυτής της διαδικασίας είναι το γεγονός ότι η μεταγραφή και η μετάφραση των πρωτεϊνών είναι δυο ασύζευκτες χρονικά διαδικασίες κατά την πορεία διαφοροποίησης της σπερματίδας (Steger et al., 1998). Ειδικότερα, η μεταγραφή των γονιδίων των πρωταμινών πραγματοποιείται στο στάδιο των κυλινδρικών σπερματίδων (κατά το στάδιο αυτό έχει προσδιοριστεί η παρουσία του mRNA των πρωταμινών ενώ οι πρωτεΐνες είναι απύσες σε αυτή τη φάση) (Steger et al., 2000). Η μετάφραση των mRNAs καθυστερεί μέχρι το στάδιο των επιμηκυσμένων σπερματίδων (Aoki et al. 2003). Ο Lee και οι συνεργάτες του, σε διαγονιδιακά ποντίκια έδειξαν ότι πρόωρη μετάφραση του mRNA των πρωταμινών οδηγεί σε πρόωρη συμπίκνωση του DNA στον πυρήνα με αποτέλεσμα ανωμαλίες στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου (Lee et al., 1995). Βέβαια, ένα μικρό ποσό του mRNA εντοπίζεται στα ώριμα ανθρώπινα σπερματοζωάρια, το οποίο αντιπροσωπεύει πιθανώς μήνυμα που δεν μεταφράστηκε (Wykes et al., 1997).

Το γεγονός λοιπόν ότι η μεταγραφή και η μετάφραση αποτελούν ασύζευκτες χρονικά διαδικασίες οφείλεται σε μεταγραφικούς και μεταφραστικούς ρυθμιστικούς μηχανισμούς (**Εικόνα 19**).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας της σπερματογένεσης και των περιόδων όπου πραγματοποιούνται τα δυο επίπεδα ελέγχου της έκφρασης των γονιδίων των πρωταμινών (Sassone-Corsi P., 2002) .

7.3.1 Η μεταγραφική ρύθμιση

Η ρύθμιση σε επίπεδο μεταγραφής επιτυγχάνεται μέσω δύο μηχανισμών:

1) Η παρουσία των αλληλουχιών MAR

Εκατέρωθεν του γενετικού τόπου PRM1-PRM2-TP2 εντοπίζονται (Εικόνα 15) αλληλουχίες MAR, οι οποίες λειτουργούν ως cis ρυθμιστικές αλληλουχίες (Martins et al., 2004; Carrell et al., 2007).

2) Η δράση trans ρυθμιστικών μεταγραφικών παραγόντων που δεσμεύονται σε ανοδικές ρυθμιστικές αλληλουχίες των γονιδίων των πρωταμινών (πχ. TATA box, CRE-box)

Οι trans ρυθμιστικοί παραγόντες που δεσμεύονται σε ανοδικές αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων των πρωταμινών περιλαμβάνουν την TBP (TATA box protein), cAMP response element modulator (CREM) και τις πρωτεΐνες της οικογένειας Y-box (Carrell et al., 2007).

- Η TBP πρωτεΐνη δεσμεύεται στην αλληλουχία TATA σε συνεργασία με άλλους παράγοντες οι οποίοι διευκολύνουν την πρόσδεση της RNA πολυμεράσης II στην περιοχή με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής (Aoki et al., 2003; Dadoune J.P., 2003; Carrell et al., 2007).

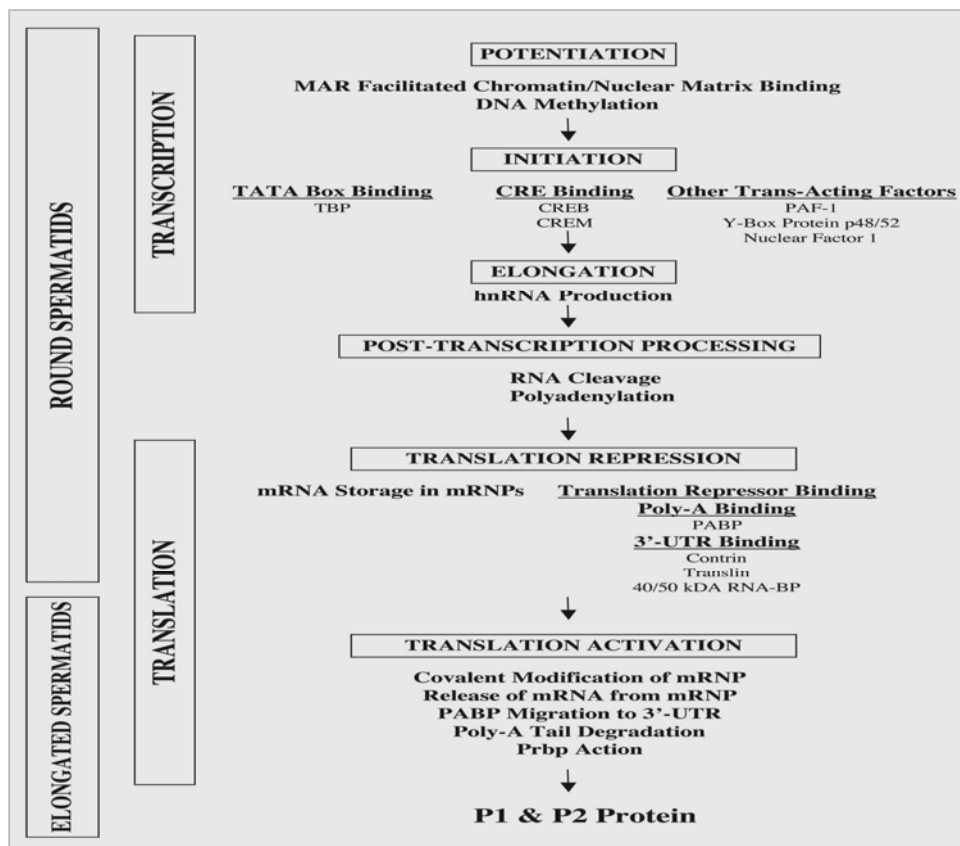
- Οι CRE trans ενεργοποιητικοί παράγοντες εκφράζονται στα γεννητικά κύτταρα και αποτελούν βασικούς ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων όπως των μεταβατικών πρωτεϊνών και των πρωταμινών, μέσω του μονοπατιού της αδενιλικής κυκλάσης. (Krausz and Sassone-Corsi, 2005).

- Οι πρωτεΐνες της οικογένειας Y-box αποτελούν σημαντικούς ρυθμιστές κατά την σπερματογένεση. Αυτές δεσμεύονται τόσο στο DNA όσο και στο RNA είτε επάγοντας είτε καταστέλλοντας την έκφραση. Στον άνθρωπο έχουν προσδιοριστεί οι πρωτεΐνες contrin και translin. Η πρωτεΐνη contrin απαντάται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα γεννητικά κύτταρα και έχει προταθεί ότι έχει δυο βασικές λειτουργίες, (α) λειτουργεί ως συνενεργοποιητής της μεταγραφής των πρωταμινών δεσμευόμενη στο Y-box που βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων και (β) σταθεροποιεί τα πατρικής και μητρικής προέλευσης μετάγραφα στο κυτταρόπλασμα (Carrell et al., 2007). Επίσης, η πρωτεΐνη translin δεσμεύεται σε συγκεκριμένα μόρια mRNA που εκφράζονται στους όρχεις, με αποτέλεσμα την δημιουργία ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (RNPs) τα οποία εξάγονται στο κυτταρόπλασμα (Carrell et al., 2007).

7.3.2 Η ρύθμιση σε επίπεδο μετάφρασης

Στις κυλινδρικές σπερματίδες, το mRNA των πρωταμινών αποθηκεύεται με την μορφή των ανενεργών ριβονουκλεοπρωτεϊνικών σωματιδίων (RNPs/inactive ribonucleic particles), ως αποτέλεσμα της δέσμευσης κατασταλτικών πρωτεϊνών σε ειδικές αλληλουχίες της 3' UTR περιοχής - στην περιοχή πολυαδενυλίωσης της ουράς (poly-A tail). Η μετάφραση των mRNA των πρωταμινών πραγματοποιείται κατά το στάδιο των επιμηκυσμένων σπερματίδων μετά από μερική αποικοδόμηση της πολυαδενυλικής αλληλουχίας της ουράς (Steger et al., 2000). Έχειδειχθεί ότι το 85%-95% των mRNA των πρωταμινών με πολυαδενυλική αλληλουχία στην ουρά μεγέθους 160-180bp δεν μεταφράζονται, ενώ το 80%-95% των mRNA των πρωταμινών με πολυαδενυλική αλληλουχία στην ουρά μεγέθους 30bp καταλοίπων μεταφράζονται.

Ειδικότερα, η Poly-A Binding Protein (PABP) η οποία δεσμεύεται στην πολυαδενυλική αλληλουχία της ουράς των mRNAs έχει διττό ρόλο, αφενός προστατεύει το mRNA από την αποικοδόμηση έως ότου αυτό μεταφραστεί και αφετέρου δρά και ως κατασταλτική πρωτεΐνη διατηρώντας το μέγεθος της πολυαδενυλικής αλληλουχίας της ουράς των mRNAs. Επίσης, η δέσμευση πρωτεϊνών της οικογένειας Y box στην 3' UTR περιοχή των mRNA των πρωταμινών, μέσω της κεντρικής «cold shock» περιοχής τους, δεν επιτρέπει την μετάφραση αυτών (οι πρωτεΐνες της οικογένειας Y box δομούνται από μια cold shock περιοχή, η οποία αποτελείται από 65-70αμινοξέα, και μέσω αυτής δεσμεύονται είτε στο RNA είτε σε μονόκλωνο DNA ρυθμίζοντας με αυτό τον τρόπο είτε την μετάφραση είτε την μεταγραφή (Graumann et al., 1998)). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι contrin και translin (Aoki et al., 2003; Carrell et al., 2007) (**Εικόνα 20**).



Εικόνα 20. Συγκεντρωτική παρουσίαση των γεγονότων που ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων των πρωταμινών και των mRNA αυτών κατά την σπερματογένεση (Aoki et al., 2003).

7.4 Η Προέλευση των πρωταμινών

Είναι πιθανό ότι όλα τα θηλαστικά κληρονόμησαν από ένα κοινό πρόγονο το γονίδιο της PRM1, εφόσον αυτό είναι παρόν σε όλα τα είδη που έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα. Έχουν προταθεί δύο πιθανές εξηγήσεις για την προέλευση του γονιδίου της PRM2. Σύμφωνα με την πρώτη εξήγηση, το γονίδιο της PRM2 έχει προέλθει από το γονίδιο PRM1 με αποκλίνουσα εξέλιξη των δυο γονιδίων. Σύμφωνα με την δεύτερη εξήγηση, τα γονίδια PRM1 και PRM2 έχουν προέλθει από έναν κοινό πρόγονο αλλά ορισμένα είδη έχασαν την ικανότητα να εκφράζουν το γονίδιο της PRM2 (Oliva R., 2006; Carrell et al., 2007).

Από την στιγμή που πραγματοποιήθηκε ο χαρακτηρισμός των πυρηνικών πρωτεϊνών που απαντώνται στο σπέρμα, προτάθηκε ότι οι σωματικές ιστόνες και οι πρωταμίνες των γεννητικών κυττάρων πιθανώς σχετίζονται εξελικτικά. Έτσι, το 1973 (Subirana et al., 1973) με βάση την αμινοξική αλληλουχία, έγινε η υπόθεση ότι οι πρωταμίνες έχουν προέλθει από έναν αρχέγονο τύπο σωματικής – συνδετικής H1 ιστόνης (primitive somatic-like histone precursor) από ένα ανάλογο των πρωταμινών (protamine-like intermediate) μέσω ενός μηχανισμού κάθετης εξέλιξης (Lewis et al., 2004).

Προσεκτική ανάλυση της κωδικοποιούσας ακολουθίας των αναλόγων των πρωταμινών και της σπερμοειδικής ιστόνης τύπου H1 στα γένη *Styela* και *Ciona* έδειξε ότι η μετάβαση από μια αλληλουχία πλούσια σε λυσίνη σε μία πλούσια σε αργινίνη προέκυψε ως αποτέλεσμα μετατόπισης του πλαισίου ανάγνωσης στο καρβόξυ τελικό άκρο της σπερμοειδικής ιστόνης τύπου H1 (πλούσια σε λυσίνη). Ειδικότερα, η έλλειψη του 342nt στο καρβόξυ τελικό άκρο της σπερμοειδικής ιστόνης τύπου H1 του γένους *Ciona* οδηγεί σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης με αποτέλεσμα την μετατροπή 15 αμινοξέων λυσίνης σε αμινοξέα αργινίνης (**Εικόνα 21**) (Lewis et al., 2004).



Εικόνα 21. Έλλειψη του 342nt στο καρβόξυ τελικό άκρο της σπερμοειδικής ιστόνης τύπου H1 του γένους *Ciona* οδηγεί σε μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης με αποτέλεσμα την μετατροπή 15 αμινοξέων λυσίνης σε αμινοξέα αργινίνης (Lewis et al., 2004)

Οι λειτουργίες που έχουν προταθεί για τις πρωταμίνες 1, 2 (PRM1 και PRM2) στον άνθρωπο είναι :

- 42

- ♦ Προστατεύουν το πατρικής προέλευσης γονιδίωμα κατά την είσοδο στο θηλυκό αναπαραγωγικό σύστημα. Παράλληλα, το καθιστούν μη προσβάσιμο σε νουκλεάσες ή γενικότερα σε μεταλλαξιγόνες ουσίες (πχ. σε θρεπτικά υλικά ανάπτυξης που χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις τεχνητής γονιμοποίησης). Η τελευταία διαπίστωση βασίζεται σε παρατηρήσεις, όπου σπερματοζωάρια που παρουσίαζαν ελαττωματικό πακετάρισμα της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου (defective protaminosis), εξαιτίας έλλειψης σε πρωταμίνες, ενώ είχαν την ικανότητα να γονιμοποιήσουν ωάρια, δεν οδηγούσαν σε βιώσιμο ζυγωτό.
- ♦ Ανταγωνίζονται και απομακρύνουν μεταγραφικούς παράγοντες από το DNA στο στάδιο της σπερματίδας, επιτρέποντας τον επαναπρογραμματισμό της έκφρασης από μεταγραφικούς παράγοντες του ωαρίου (blank paternal genetic message).
- ♦ Λειτουργούν και ως επιγενετικοί δείκτες, εφόσον δεσμευόμενες στο DNA καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων (κλειστή κατάσταση της χρωματίνης – μεταγραφικά ανενεργή) (Oliva and Dixon., 1991; Oliva R., 2006).

7.6 Το μοντέλο πακεταρίσματος της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου

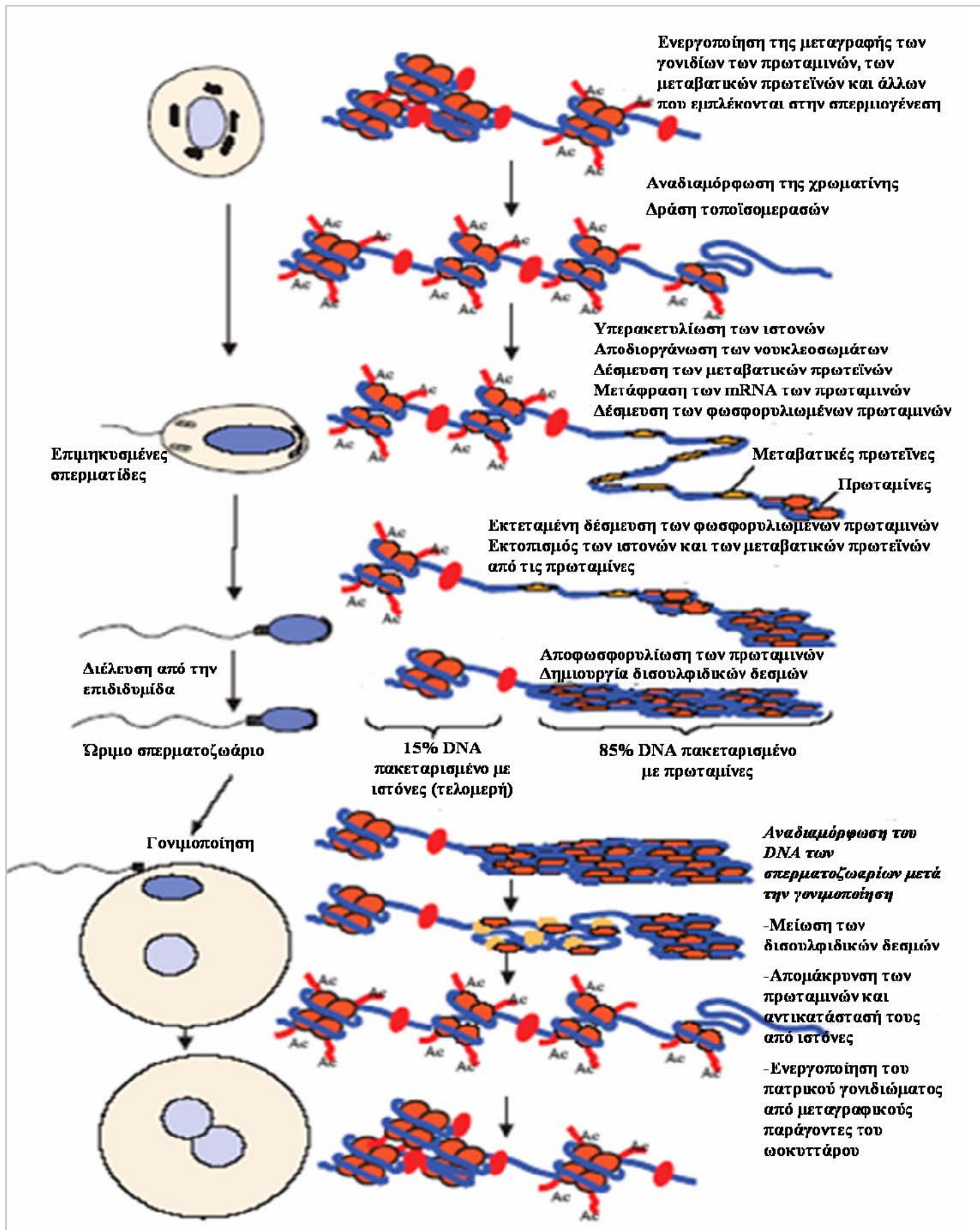
Στο τελικό στάδιο της σπερματογένεσης, την σπερμιόγνεση, κατά την οποία πραγματοποιούνται όλες εκείνες οι διαδικασίες οι οποίες οδηγούν στην διαφοροποίηση και το μορφολογικό μετασχηματισμό των σπερματίδων σε ώριμα, επιμηκυσμένα σπερματοζωάρια, λαμβάνει χώρα η αντικατάσταση των σωματικών ιστονών από τις βασικές πρωτεΐνες πρωταμίνες με αποτέλεσμα τον υψηλό βαθμό πακεταρίσματος της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου.

Ειδικότερα, το μοντέλο το οποίο έχει προταθεί για αυτή την διαδικασία, καθώς και τα επιμέρους στάδια αυτής περιγράφονται παρακάτω (**Εικόνα 22**):

1. Στο στάδιο των κυλινδρικού σχήματος σπερματίδων λαμβάνει χώρα ακετυλίωση των ιστονών (κυρίως της H4 ιστόνης), με αποτέλεσμα την έναρξη της μεταγραφής των γονιδίων των μεταβατικών πρωτεϊνών, των πρωταμινών καθώς και άλλων γονιδίων των οποίων τα προϊόντα εμπλέκονται στην διαδικασία της σπερματογένεσης (πχ. Camk4, Y-box πρωτεΐνες).
2. Στο επόμενο στάδιο, λαμβάνει χώρα υπερακετυλίωση των ιστονών (κυρίως της H4 ιστόνης), με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης γονιδίων και την αποδιοργάνωση των νουκλεοσωμάτων. Παράλληλα, η τοποϊσομεράση II

«εισάγει» αρνητικές υπερέλικες ώστε να «ξεδιπλωθεί» το DNA και να επιτευχθεί η σταδιακή δέσμευση στο DNA των μεταβατικών πρωτεϊνών σε αυτό.

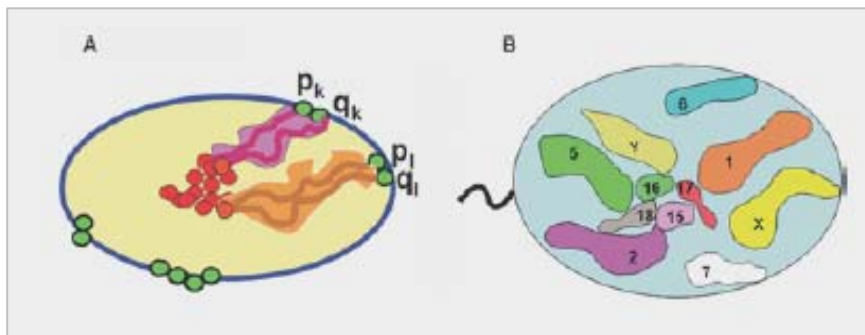
3. Στο στάδιο των επιμηκυσμένων σπερματίδων, όπου πραγματοποιείται η μετάφραση των mRNA των πρωταμινών, οι νεοσυντιθέμενες πρωταμίνες φωσφορυλιώνονται απευθείας μετά την σύνθεσή τους και εν συνεχεία δεσμεύονται στο DNA, εκτοπίζοντας τόσο τις μεταβατικές πρωτεΐνες όσο και τις εναπομείνουσες ιστόνες.
4. Καθώς εξελίσσεται περαιτέρω η δέσμευση των πρωταμινών στο DNA, ακολουθεί η αποφωσφορυλίωσή τους (προκειμένου να συμπτυχθεί η χρωματίνη) και εν συνεχεία η δημιουργία δισουλφιδικών δεσμών, στο ίδιο και σε γειτονικά μόρια πρωταμινών, μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης, κατά την διέλευσή τους από την επιδιδυμίδα.
5. Στα ώριμα, επιμηκυσμένα σπερματοζώαρια το DNA είναι πλέον πακεταρισμένο κατά 85% με πρωταμίνες και κατά 15% με ιστόνες (στην περιοχή των τελομερών).
6. Αμέσως μετά την γονιμοποίηση, μειώνονται οι δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ των μορίων των πρωταμινών και ακολουθεί σταδιακή αντικατάσταση των πρωταμινών από τις σωματικές ιστόνες του ωαρίου, γεγονός τα οποία συντελούν στην ενεργοποίηση του πατρικής προέλευσης γονιδιώματος από μεταγραφικούς παράγοντες του ωαρίου (Brewer et al., 1999; Braun R.E., 2001; Sassoni-Corsi P., 2002; Zini et al., 2006; Oliva R., 2006).



Εικόνα 22. Σχηματική απεικόνιση των βασικών αλλαγών που υφίσταται η χρωματίνη κατά την διαδικασία αντικατάστασης των σωματικών ιστονών από τις πρωταμίνες στο στάδιο της σπερμιόγένεσης (Oliva R., 2006).

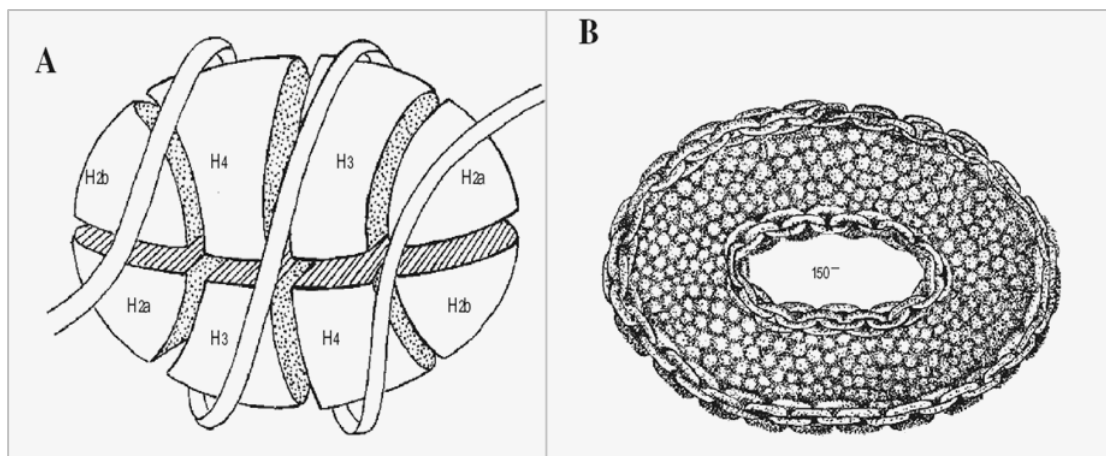
7.7 Το σύμπλοκο DNA – πρωταμινών

Στα ώριμα σπερματοζωάρια, το πακετάρισμα του DNA με πρωταμίνες επάγει την υψηλού βαθμού συμύκνωσή του με αποτέλεσμα την καταστολή της μεταγραφής. Η αρχιτεκτονική, λοιπόν, του πυρήνα του σπερματοζωαρίου μεταβάλλεται εξ'ολοκλήρου. Ειδικότερα, όλα τα χρωμοσώματα συνδέονται μεταξύ τους μέσω των κεντρομερών τους με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός εσωτερικού χρωμόκεντρου, ενώ τα τελομερή αυτών εκτίθενται στην περιφέρεια του πυρήνα, όπου τα δύο τελομερή κάθε χρωμοσώματος αλληλεπιδρούν (**Εικόνα 23[A]**). Επίσης, ένα ακόμα σημαντικό χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη συγκεκριμένων θέσεων όπου τοποθετείται κάθε χρωμόσωμα (**Εικόνα 23[B]**). Μάλιστα, έχει προταθεί ότι αυτή η αρχιτεκτονική του πυρήνα είναι σημαντική τόσο για την γονιμοποίηση όσο και για την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Mudrak et al., 2005; Zalensky and Zalenskaya., 2004; Zalensky and Zalenskaya., 2007).



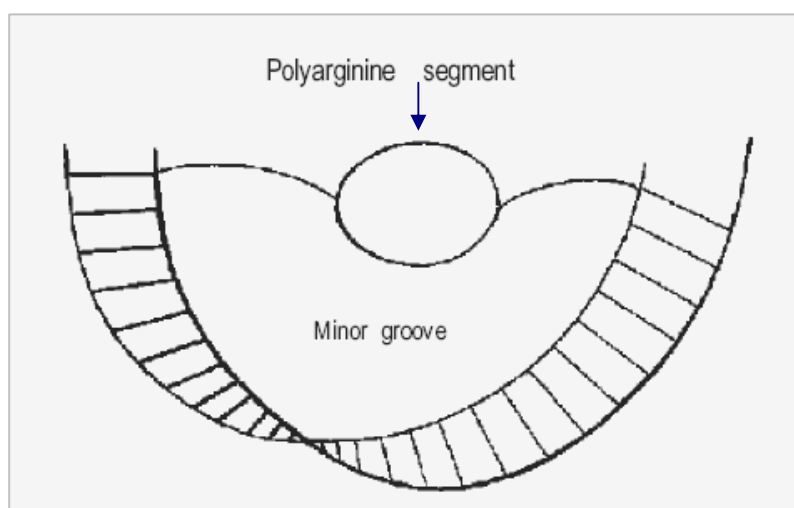
Εικόνα 23. Σχηματική απεικόνιση της αρχιτεκτονικής του πυρήνα ώριμου σπερματοζωαρίου όπου, (**A**) μοντέλο τοποθέτησης των χρωμοσωμάτων στον πυρήνα (οι πράσινες κουκκίδες αναπαριστούν τα τελομερή των χρωμοσωμάτων και οι κόκκινες κουκκίδες αναπαριστούν τα κεντρομερή) και (**B**) ενδοπυρηνικές θέσεις κάθε χρωμοσώματος, όπου αναπαρίστανται η θέση 11 χρωμοσωμάτων (Zalensky and Zalenskaya., 2007).

Το DNA στις περιοχές του κεντομέρους των χρωμοσωμάτων διατηρεί την κεντρομερική πρωτεΐνη A (παράγωγο της H3 ιστόνης) ενώ συναντώνται και πρωταμίνες, ενώ το DNA των τελομερών πακετάρεται με ιστόνες (Zalensky and Zalenskaya., 2007). Το υπόλοιπο τμήμα του DNA πακετάρεται με πρωταμίνες σχηματίζοντας χαρακτηριστικές σπειροειδείς δομές των οποίων η διάμετρος ποικίλει από 50nm -100nm, που εμπεριέχουν 50kb-60kb DNA (**Εικόνα 24**) (Fuentes-Mascorro et al., 2000; Vilfan et al., 2004; Shaman et al., 2007). Ο πυρήνας του σπερματοζωαρίου περιέχει περίπου 50000 σπειροειδείς δομές (Brewer et al., 1999).



Εικόνα 24. (Α) Σχηματική απεικόνιση του πακεταρίσματος του DNA στα σωματικά κύτταρα σε νουκλεοσώματα και (Β) στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου σε σπειροειδείς δομές (Fuentes-Mascorro et al., 2000).

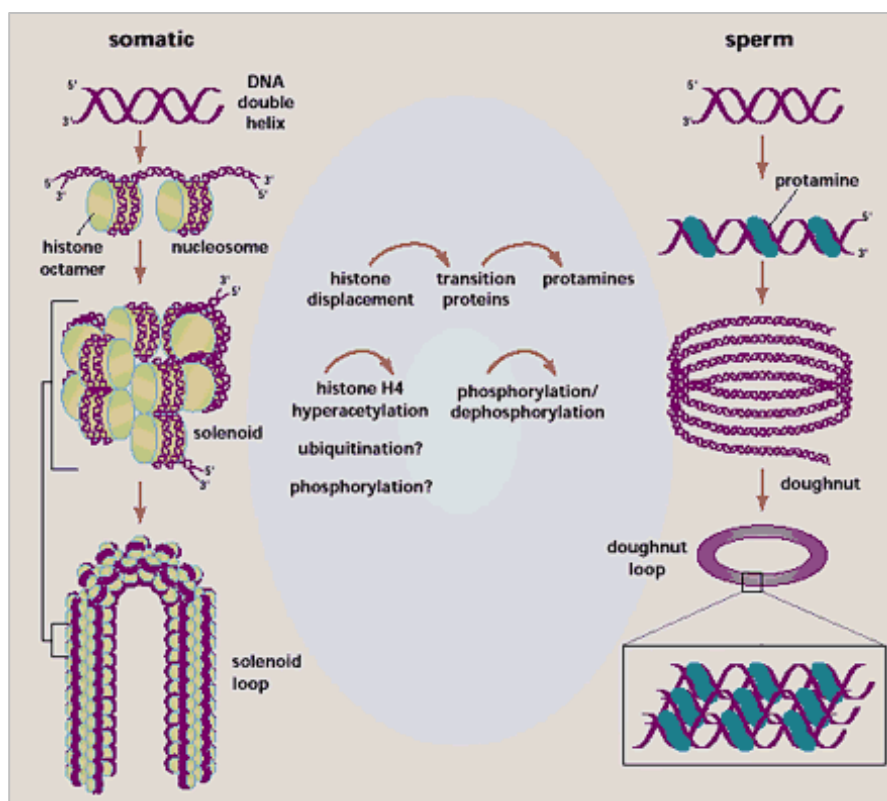
Σε πρόσφατες μελέτες όπου μελετήθηκε η ικανότητα δέσμευσης της πρωταμίνης-1 σε μόρια DNA in vitro δείχθηκε ότι μέσω ομάδων αργινινών (3-7 αργινίνες), που κατανέμονται σε όλο το μήκος της πρωτεΐνης, επιτυγχάνεται η ισχυρή αλληλεπίδραση με το DNA (Balhorn et al., 2000; Brewer et al., 2003; Biegeleisen K., 2006). Ειδικότερα, ένα μόριο πρωταμίνης δεσμεύεται στην μικρή αύλακα του DNA (Εικόνα 25), όπου τα θετικά φορτισμένα μόρια αργινίνης εξουδετερώνουν τον αρνητικά φορτισμένο φωσφοδιεστερικό σκελετό του DNA (Ward and Coffey, 1991; Rousseaux et al., 2005).



Εικόνα 25. Η δέσμευση των πρωταμινών στην μικρή αύλακα του DNA επιτυγχάνεται μέσω της κεντρικής περιοχής η οποία είναι πλούσια σε αργινίνη (Fuentes-Mascorro et al., 2000).

Παράλληλα, το σύμπλοκο DNA-πρωταμινών της μιας αλυσίδας τοποθετείται στην μεγάλη αύλακα της γειτονικής αλυσίδας, με αποτέλεσμα το πακετάρισμα των δύο αλυσίδων του DNA σε γραμμική σειρά (side by side in a linear array), και τελικά

την δημιουργία σπειροειδών δομών που περιέχουν >60kb DNA. Επίσης, η χρωματίνη σταθεροποιείται περαιτέρω μέσω της δημιουργίας ενδο- και δια- μοριακών δισουλφιδικών δεσμών που δημιουργούνται μεταξύ των ιδίων αλλά και μεταξύ των γειτονικών μορίων των πρωταμινών (μέσω των καταλοίπων κυστεΐνης που υπάρχουν σε συγκεκριμένες θέσεις κατά μήκος των πρωτεϊνικών μορίων) (**Εικόνα 26**) (Ward and Coffey, 1991; Rousseaux et al., 2005).



Εικόνα 26. Το πακετάρισμα του DNA μέσω των πρωταμινών οδηγεί την δημιουργία σπειροειδών δομών, με αποτέλεσμα τον υψηλό βαθμό συμπίκνωσης της χρωματίνης στον πυρήνα του σπερματοζωαρίου (Braun R., 2001).

8. Πρωταμίνες και Υπογονιμότητα

8.1 Ο λειτουργικός ρόλος των πρωταμινών (Διαγονιδιακά και knock-out μοντέλα)

Διαγονιδιακά μοντέλα

Πολλές πληροφορίες σχετικές με την λειτουργία και την εμπλοκή των πρωταμινών στην ανδρική στειρότητα έχουν προέλθει από διαγονιδιακά και knock-out μοντέλα σε ποντίκια. Ο Peschon και οι συνεργάτες του, το 1987, δημιούργησαν το πρώτο διαγονιδιακό ποντίκι για την πρωταμίνη-1, όπου και δείχθηκε ότι το διαγονίδιο (φυσιολογικό γονίδιο πρωταμίνης-1) εκφράζονταν κανονικά και τα

ποντίκια ήταν γόνιμα, παρατήρηση η οποία οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μικρές αλλαγές στα επίπεδα έκφρασης της πρωταμίνης-1 είναι συμβατές με κανονική λειτουργία των σπερματοζωαρίων (Peschon et al., 1987).

Επίσης, σε διαγονιδιακά ποντίκια, από τον Lee και τους συνεργάτες του δείχθηκε ότι πρόωρη έκφραση της πρωταμίνης-1 επάγει την πρόωρη συμπύκνωση της χρωματίνης και μορφολογικές ανωμαλίες της κεφαλής του σπερματοζωαρίου, παρατηρήσεις που αποδεικνύουν την σημασία της διαφορικής χρονικά μεταγραφής και μετάφρασης των πρωταμινών (Lee et al., 1995; Steger et al., 2000; Oliva R., 2006).

Knock-out μοντέλα

Στην συνέχεια, knock-out μοντέλα σε ποντίκια τόσο για το γονίδιο της πρωταμίνης-1 όσο και για της πρωταμίνης-2 οδηγούν σε στειρότητα (Oliva and Dixon., 1991; Cho et al., 2001). Από την στιγμή που οι πρωταμίνες εκφράζονται κατά το στάδιο της σπερμιόγνεσης (απλοειδής φάση) υποτέθηκε ότι η «καταστροφή» του ενός αλληλομόρφου (haploinsufficiency) δεν θα επηρέαζε το πακετάρισμα της χρωματίνης. Παρόλα αυτά, ο Cho και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι knock-out ποντίκια για το ένα αλληλόμορφο, παρουσίαζαν αυξημένα ποσοστά θραύσης του DNA (DNA fragmentation) στο σπέρμα εξαιτίας προβλημάτων στο πακετάρισμα της χρωματίνης. Παράλληλα, μετά από ICSI, σπερματοζωάρια από αυτά τα ποντίκια είχαν την δυνατότητα να γονιμοποιήσουν ωάρια αλλά παρατηρήθηκε πρόωρος εμβρυϊκός θάνατος (Cho et al., 2003). Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η ίδια παρατήρηση έγινε και σε υπογόνιμους άνδρες με αυξημένα ποσοστά θραύσης του DNA στο σπέρμα τους μετά από ICSI (Greco et al., 2005).

8.2 Μεταβολές στο περιεχόμενο σε πρωταμίνες σε σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών

Ο Balhorn και οι συνεργάτες του, πραγματοποίησαν την πρώτη μελέτη στην οποία προσδιορίστηκαν τα επίπεδα των πρωταμινών σε γόνιμους και στειρούς άνδρες όπου και παρατηρήθηκε ότι η αναλογία PRM1:PRM2 μεταξύ γόνιμων και στειρών διέφερε μόνο στην περίπτωση των στειρών ατόμων με ανωμαλίες στις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος (Balhorn et al., 1988). Επίσης, ο Blanchard και οι συνεργάτες του σε ένα δείγμα υπογόνιμων ανδρών με μορφολογικές ανωμαλίες στα σπερματοζωάρια τους (κυλινδρική κεφαλή), έδειξαν ότι τα σπερματοζωάρια διέθεταν

μικρότερο ποσοστό πρωταμινών και μεγαλύτερο ποσοστό ιστονών σε σχέση με φυσιολογικά σπερματοζωάρια (Blanchard et al., 1990).

Εξάλλου, μείωση των επιπέδων του mRNA των PRM1 και PRM2 βρέθηκε στις κυλινδρικές σπερματίδες σε υπογόνιμους άνδρες σε βιοψίες όρχεων μέσω υβριδοποίησης *in situ* (Steger et al., 2001). Η ίδια ερευνητική ομάδα επαλήθευσε τα προαναφερθέντα αποτελέσματα και με Real-Time PCR (Steger et al., 2003).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι διαφορές στην έκφραση του γονιδίου της πρωταμίνης-1 ανιχνεύθηκαν και σε σπερματοζωάρια με διαφορετική κινητικότητα και πυκνότητα που λήφθηκαν από φυσιολογικά άτομα (Lambard et al., 2004). Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί και με προηγούμενα στοιχεία που δείχνουν ότι, ακόμη και μέσα σε έναν φυσιολογικό πληθυσμό σπερματοζωαρίων, ανιχνεύονται διαφορές στην έκφραση των γονιδίων των πρωταμινών σε διαφορετικά κύτταρα (Mengual et al., 2003; Zhang et al., 2006).

Πρόσφατα, ο Aoki και οι συνεργάτες του ανέφεραν ένα πιθανό μηχανισμό μέσω του οποίου εξηγείται η ανεπάρκεια σε πρωταμίνες στα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών. Σύμφωνα με αυτόν, ανωμαλίες στην ρύθμιση στο επίπεδο της μετάφρασης των mRNA των πρωταμινών, μπορεί να συμβάλλουν στην ανεπάρκεια πρωταμινών στα σπερματοζωάρια υπογόνιμων ανδρών. Αυτό επαληθεύεται με την ανίχνευση υψηλών επιπέδων mRNA των πρωταμινών και χαμηλών επιπέδων των αντίστοιχων πρωτεϊνών σε αυτούς (Aoki et al., 2005; Aoki et al., 2006).

8.3 Η δομή και η ακεραιότητα της χρωματίνης και ο ρόλος τους στα ποσοστά επιτυχίας της Εξωσωματικής Γονιμοποίησης (IVF)

Μια από τις λειτουργίες που έχει προταθεί για τις πρωταμίνες είναι ότι προστατεύουν το πατρικής προέλευσης γονιδίωμα στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου (Oliva R., 2006). Κατά συνέπεια, ανεπαρκές πακετάρισμα της χρωματίνης εξαιτίας ανεπάρκειας πρωταμινών, καθιστά τη γενετική πληροφορία που μεταφέρεται μέσω των σπερματοζωαρίων πιο ευπαθή σε ενδογενείς ή εξωγενείς παράγοντες, όπως οι νουκλεάσες, οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, μεταλλαξιγόνες ουσίες, και άλλοι μηχανισμοί όπως ο μη φυσιολογικός ανασυνδυασμός, η αποτυχία απόπτωσης, η μη φυσιολογική δράση των τοποϊσομερασών καθώς και η μη φυσιολογική επιδιόρθωση του DNA κατά την σπερματογένεση μπορεί να επηρεάσουν την συνοχή της χρωματίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου

(Agarwal et al., 2003; Laberge et al., 2005; Erenpreiss et al., 2006; Shafic et al., 2006; Angelopoulou et al., 2007).

Κατά συνέπεια, οποιαδήποτε ανωμαλία στο πακετάρισμα της χρωματίνης εξαιτίας ανεπάρκειας πρωταμινών ή η παρουσία διπλών θραύσεων στο DNA ενδέχεται να επηρεάσει αρνητικά τόσο τη γονιμοποίηση όσο και την εξέλιξη της εμβρυϊκής ζωής. Το ποσοστό λοιπόν θραύσης του DNA (DNA fragmentation) αντανakλά την συνοχή του γενετικού υλικού. Η μεταβίβαση κατατμημένου DNA (fragmented DNA) στον απόγονο, ιδιαίτερα σε επίπεδα που υπερβαίνουν την επιδιορθωτική ικανότητα του ωαρίου, ενδέχεται να έχει σοβαρές συνέπειες (Sergeie et al., 2005). Από πολλές ερευνητικές ομάδες έχειδειχθεί ότι η ανίχνευση ελλατωματικού DNA (DNA damage) σε σπερματοζώρια (που μπορεί να είναι αποτέλεσμα της ανεπάρκειας πρωταμινών) αποτελεί ένα κοινό χαρακτηριστικό ζευγαριών που έχουν ιστορικό συνεχών αποβολών (Carrell et al., 2003).

Σε αρκετές μελέτες επίσης έχει εξετασθεί η πιθανή σχέση μεταξύ της θραύσης του DNA και της έκβασης τόσο της IVF ή της ICSI, παρόλα αυτά δεν έχει βρεθεί να υπάρχει σαφής συσχέτιση (Virro et al., 2003; Carrell et al., 2003; Benchai et al., 2003; Zini et al., 2006). Από την στιγμή που το εμβρυϊκό γονιδίωμα δεν εκφράζεται μέχρι τη δεύτερη αυλάκωση είναι λογικό να υποθέσουμε πως η παρουσία κατατμημένου DNA δεν έχει επιπτώσεις στην γονιμοποίηση και στην ανάπτυξη του εμβρύου. Επιπλέον, δεν έχει διαπιστωθεί σχέση μεταξύ θραύσης του DNA και της ποιότητας των εμβρύων μετά από ICSI. Εντούτοις, υψηλά επίπεδα θραύσης του DNA σχετίζονται αρνητικά με την επίτευξη εγκυμοσύνης (Morris et al., 2002; Huang et al., 2005; Zini et al., 2006).

Στον **Πίνακα 1** παρουσιάζονται οι πιο κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του ποσοστού θραύσης του DNA.

ΤΕΧΝΙΚΕΣ	ΒΛΑΒΗ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΕΤΑΙ
Single-cell gel electrophoresis (Comet Assay)	Single and double-strand breaks, evaluates DNA integrity
Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP- nick end labelling – TUNEL	DNA fragmentation, single and double-strand breaks
Acridine Orange Technique (AOT)	Distinguish between single and double stranded DNA
Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)	Acid DNA denaturation
<i>In situ</i> nick translation	Single-strand DNA breaks
Sperm chromatin dispersion test (SCD)	Determines the susceptibility of sperm DNA to acid denaturation
Acidic Aniline Blue	Stains lysine residues of persisting histones
Toluidine blue stain	DNA structure and chromatin packaging, incorporates in the damaged dense chromatin
Chromomycin A ₃ – CMA ₃	Indirect visualization of nicked denatured DNA

8.4 Πολυμορφισμοί στα γονίδια των πρωταμινών

Πρόσφατα, ο Tanaka και οι συνεργάτες του (Tanaka et al., 2003) μελέτησαν τα γονίδια των PRM1 και PRM2 και προσπάθησαν να ανιχνεύσουν μεταλλάξεις, οι οποίες πιθανώς να σχετίζονται με την υπογονιμότητα σε 226 στειρούς και 270 φυσιολογικούς Ιάπωνες άνδρες. Σε αυτή την μελέτη, προσδιόρισαν στους υπογόνιμους άνδρες, την παρουσία πέντε αντικαταστάσεις βάσεων (SNPs) στην κωδικοποιούσα αλληλουχία του γονιδίου της PRM1, κανένας από τους οποίους δεν προκαλεί αμινοξική αντικατάσταση σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Επίσης, προσδιόρισαν και μια αντικατάσταση βάσης στο γονίδιο της PRM2 (C248T) που οδηγεί στην δημιουργία ενός πρόδρομου κωδικονίου λήξης σε ένα άτομο. Οι συγγραφείς πρότειναν ότι η αλλαγή αυτή (SNP C248T) πιθανώς εξηγεί την υπογονιμότητα του ατόμου στο οποίο ανιχνεύθηκε. Παράλληλα, προσδιορίστηκε και ένας SNP στην 3' UTR του γονιδίου της PRM1 και δυο SNPs στο εσόνιο του γονιδίου της PRM2, με ίδια συχνότητα στην ομάδα των υπογόνιμων και των γόνιμων ανδρών, με αποτέλεσμα να μην συνεισφέρουν στην αιτιολογία της υπογονιμότητας (Tanaka et al., 2003).

Επίσης, ο Iguchi και οι συνεργάτες του (Iguchi et al., 2006) ανέφεραν την παρουσία ενός απλού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού στο νουκλεοτίδιο 197 (G197T) (**Κεφ.7, Παρ.1.1**) του γονιδίου της PRM1 σε ποσοστό 10% των υπογόνιμων ανδρών που εξετάστηκαν (3 άτομα στα 30) ενώ ο πολυμορφισμός δεν ανιχνεύθηκε στους φυσιολογικούς άνδρες. Είναι σημαντικό σε αυτό το σημείο να αναφερθεί ότι αυτά τα άτομα επιλέχθηκαν με βάση την μορφολογία των σπερματοζωαρίων τους (η οποία ομοιάζε με αυτή των σπερματοζωαρίων των knock-out ποντικών για τα γονίδια των PRM1 και PRM2). Αυτός ο πολυμορφισμός οδηγεί σε αντικατάσταση της αργινίνης από σερίνη σε μια συντηρημένη ομάδα αργινινών στην κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης PRM1(**Κεφ.7, Παρ.1.2**), η οποία με την σειρά της διαταράσσει την β πτυχωτή δομή της πρωτεΐνης στην περιοχή αυτή (**Κεφ.7, Παρ.1.3**). Παράλληλα, οδηγεί και στην δημιουργία ενός νέου RS μοτίβου το οποίο μπορεί να λειτουργήσει ως πιθανή θέση φωσφορυλίωσης από την SRPS κινάση-1 (Papoutsopoulou et al., 1999). Η εισαγωγή μιας μη απαραίτητης φωσφορυλίωσης μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση μεταξύ DNA-πρωταμίνης στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου (Iguchi et al., 2006). Παράλληλα, ο ίδιος πολυμορφισμός προσδιορίστηκε και από μια πρόσφατη μελέτη (Ravel et al., 2007) σε δύο ασθενείς, εκ των οποίων ο ένας παρουσίαζε σοβαρή олиγοσπερμία ($6,7 \times 10^6$ σπερματοζωάρια/ml) και αυξημένα

ποσοστά θραύσης του DNA (55%) και ο δεύτερος ασθενής παρουσίαζε φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων αλλά παρακολουθούνταν για ανεξήγητη υπογονιμότητα.

Τέλος, σε μια μελέτη η οποία πραγματοποιήθηκε από τον Aoki και τους συνεργάτες του (Aoki et al., 2006) σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων Ιαπωνικής καταγωγής, προσδιορίστηκαν 10 SNPs, εκ των οποίων, οι τρεις στο γονίδιο της PRM1 και επτά στο γονίδιο της PRM2, με όμοιες συχνότητες εμφάνισης στη ομάδα των υπογόνιμων και των φυσιολογικών ανδρών (Aoki et al., 2006). Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι δεν ανιχνεύθηκε ο SNP που αναφέρθηκε από τον Iguchi, γεγονός που ενδεχομένως να οφείλεται σε εθνικές διαφορές μεταξύ των εξετασθέντων πληθυσμών.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας σε άνδρες που κατάγονται από την Δυτική Ελλάδα. Διεθνώς, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα, ένα ποσοστό ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (2%-11%) εμφανίζει ελλείμματα στον μεγάλο βραχίονα του Y χρωμοσώματος (Yq11) στις AZF περιοχές. Επίσης, πρόσφατα περιγράφηκε ένας απλός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) στο γονίδιο της πρωταμίνης-1 (G197T) σε μια ομάδα υπογόνιμων ανδρών, της Καυκασιάς φυλής στις ΗΠΑ. Ο στόχος λοιπόν της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση για την ύπαρξη αφενός ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος και αφετέρου του πολυμορφισμού στο γονίδιο της πρωταμίνης-1 σε ένα δείγμα 100 ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα από την Δυτική Ελλάδα.

Ο διττός αυτός σκοπός της μελέτης, την καθιστά την πρώτη του είδους της στον ελλαδικό χώρο, όπου ο πολυμορφισμός του γονιδίου της πρωταμίνης-1 δεν έχει ουδόλως μελετηθεί, ενώ για τις AZF περιοχές υπάρχουν δυο μελέτες, μια στον ελλαδικό χώρο (Giannouli et al., 2004) και μια στην Κύπρο (Ioulianos et al., 2002), αντίστοιχα.

Κρίνεται σημαντικό επομένως, να προσδιοριστούν οι γενετικές ιδιαιτερότητες των υπογόνιμων ανδρών στον ελληνικό πληθυσμό, η συχνότητά τους καθώς και οι διαφορές που ενδεχομένως παρουσιάζουν σε σχέση με άλλους πληθυσμούς. Τα ευρήματα που θα προκύψουν, πέραν της πληθυσμιακής καταγραφής και πληροφορίας, μπορεί να αποβούν χρήσιμα ως προς τη διαχείριση της υπογονιμότητας και τις δυνατότητες παροχής θεραπευτικής αγωγής καθώς και άλλων παρεμβάσεων.

Για τους σκοπούς της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα και έγινε απομονώθηκε DNA γονιδιώματος. Το DNA αναλύθηκε με την μέθοδο της Multiplex PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών STS για την ανίχνευση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος. Επίσης, προκειμένου να γίνει η γονοτυπική ανάλυση των ατόμων του δείγματός μας, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του προσδιορισμού μεγέθους τμημάτων DNA μετά από κατάτμηση με ένζυμο περιορισμού (PCR-RLFP assay).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Συλλογή δειγμάτων

Στην παρούσα εργασία, θα μελετηθεί το γενετικό υπόβαθρο ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Για το σκοπό αυτό ως βιολογικό υλικό χρησιμοποιήθηκε ολικό περιφερικό αίμα (5ml σε αντιπηκτικό ACD) από αυτούς τους ασθενείς, οι οποίοι ενημερώθηκαν και έδωσαν την συγκατάθεσή τους πριν από τη δειγματοληψία.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε από τον Καθηγητή κ.Π.Περιμένη στην Ουρολογική κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών-Ρίου. Επίσης, μερικά δείγματα παραχωρήθηκαν από την κ.Μ.Κεραμυδά (Κλινικός Εμβρυολόγος) από την Ιδιωτική Μαιευτική-Γυναικολογική Κλινική «Ηώ», στην Πάτρα .

Τα δείγματα των υπογόνιμων ανδρών ομαδοποιήθηκαν σε κατηγορίες με βάση τα στοιχεία του σπερμοδιαγράμματος κάθε ασθενή σύμφωνα με τα κριτήρια του World Health Organization Criteria, 1992 (WHO, 1992).Οι κατηγορίες οι οποίες προέκυψαν καθώς και τα κλινικά γνωρίσματα της κάθε ομάδας εμφανίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2. Κριτήρια Κατηγοριοποίησης των δειγμάτων

<i>Κατηγορίες</i>	Φυσιολογικά δείγματα	Ενδιάμεση Ολιγοσπερμία	Σοβαρή Ολιγοσπερμία	Αζωοσπερμία
Κλινικά Γνωρίσματα				
1. Πυκνότητα (Νσπερματοζωαρίων/ml)	$> 20 \cdot 10^6 / \text{ml}$	$5 - 20 \cdot 10^6 / \text{ml}$	$< 5 \cdot 10^6 / \text{ml}$	$0 - 5 \cdot 10^5 / \text{ml}$
2. Κινητικότητα	$> 50\%$	$20\% - 50\%$	20%	-
3.Τυπικές Μορφές	$> 40\%$	$20\% - 40\%$	20%	-

Στην συνέχεια, ακολουθεί ο Πίνακας 3, όπου και εμφανίζεται ο συνολικός αριθμός των δειγμάτων και πως αυτά κατανέμονται στις προαναφερθείσες κατηγορίες.

Πίνακας 3.

<i>Κατηγορία</i>	<i>Αριθμός Δειγμάτων</i>
Φυσιολογικές Τιμές	16
Ενδιάμεση Ολιγοσπερμία	44
Σοβαρή Ολιγοσπερμία	19
Αζωοσπερμία	21
Σύνολο	100

2. Απομόνωση DNA από ολικό αίμα

Η διαδικασία απομόνωσης DNA από ολικό περιφερικό αίμα περιγράφηκε από τον Flavell R.A. και τους συνεργάτες του, και πραγματοποιήθηκε με μερικές τροποποιήσεις στο αρχικό πρωτόκολλο.

Υλικά – Όργανα

- 10x ACD
- Αποστειρωμένο ddH₂O
- 1% NP40
- 1x RSB
- Πρωτεΐνάση K (20mg/ml)
- 10% SDS
- 3M CH₃COOH , pH= 5.2
- Διάλυμα Φαινόλη:Χλωροφόρμιο:Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1)
- 100% Αιθανόλη
- 70% Αιθανόλη
- Αποστειρωμένα ρύγχι
- Αποστειρωμένα σωληνάρια
- Αποστειρωμένοι φυγοκεντρικοί σωλήνες 15ml
- Αποστειρωμένες γυάλινες πιπέτες των 5ml
- Ρόδα
- Επιτραπέζια φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο (37 °C)

Διαδικασία :

1. Το δείγμα αίματος (5ml) φυλάσσεται στους -80°C
2. Το δείγμα ξεπαγώνει σε υδατόλουτρο στους 37°C και συμπληρώνουμε μέχρι τελικού όγκου 15 ml
3. Ακολουθεί ανάδευση στη ρόδα για 5min
4. Φυγοκέντρωση στις 2500rpm για 20min
5. Αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου
6. Ακολουθεί καλή και ήπια ανάδευση του ιζήματος των κυττάρων σε 5ml διαλύματος 1% NP40 (το 1% NP40 ως ήπιο απορρυπαντικό οδηγεί σε θραύση της κυτταρικής μεμβράνης των λευκών αιμοσφαιρίων)
7. Ακολουθεί ανάδευση στη ρόδα για για 5min
8. Φυγοκέντρωση στις 2500rpm για 20min
9. Αφαίρεση και απόρριψη του υπερκείμενου
10. Προσθήκη στο ίζημα των πυρήνων 2ml διαλύματος 1xRSB και ήπια ανάδευση με τη βοήθεια πιπέτας (το 1xRSB οδηγεί σε θραύση της πυρηνικής μεμβράνης)
11. Προσθήκη 20μl διαλύματος πρωτεΐνάσης K (20mg/ml) και 200μl 10% SDS και προσεκτική ανάδευση στο Vortex. (η πρωτεΐνάση K πρωτεολύει τις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται μετά τη λύση του πυρήνα, και λειτουργεί παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων – SDS-)
12. Ακολουθεί ολονύκτια επώαση σε υδατόλουτρο στους 37°C ή στους 55°C για περίπου 3h
13. Το υγρό που προκύπτει μετά την επώαση πρέπει να είναι διαυγές (εάν δεν είναι επαναλαμβάνουμε τα βήματα 10,11,12)
14. Προσθήκη 1/10, του συνολικού όγκου του δείγματος, διαλύματος 3M CH_3COOH , pH= 5.2 (το CH_3COOH επάγει το συσσωμάτωμα και την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών)
15. Προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος Φαινόλης:Χλωροφόρμιο:Ισοαμυλικής αλκοόλης. Ακολουθεί ήπια ανάδευση ώστε να δημιουργηθεί ομοιογενές γαλάκτωμα (με την προσθήκη του διαλύματος δημιουργούνται 2 φάσεις : η υδατική φάση (DNA) και η οργανική φάση (πρωτεΐνες)
16. Φυγοκέντρωση στις 3000rpm για 10min
17. Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα των 15ml και επανάληψη των βημάτων 15,16

18. Στο νέο φυγοκεντρικό σωλήνα των 15ml προστίθενται δυο όγκοι κρύας απόλυτης αιθανόλης και ακολουθεί ήπια ανάδευση
 19. Με τη βοήθεια πιπέτας Pasteur λαμβάνεται το DNA που αιωρείται
 20. Ακολουθεί ξέπλυμα και μερική ενυδάτωση του DNA σε σωληνάριο που περιέχει 70% αιθανόλη
 21. Το DNA διαλύεται σε 500μl ddH₂O και αποθηκεύεται στους -20 °C
- Όλες οι φυγοκεντρίσεις πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης του DNA γονιδιώματος

Υλικά – Όργανα

- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Αποστειρωμένα σωληνάρια
- Αποστειρωμένα ρύγχι
- Κυβέτα φωτομέτρησης
- Φωτόμετρο

Διαδικασία :

Αρχικά, πραγματοποιείται μηδενισμός του φωτομέτρου με τη χρήση ddH₂O. Τα δείγματα DNA αραιώνονται 1:50 (2μl DNA & 98 μl ddH₂O) και ακολουθεί φωτομέτρησή τους στα 260nm, στην U.V. ακτινοβολία, οπότε και λαμβάνουμε την τιμή της οπτικής απορρόφησης (OD).

Η συγκέντρωση του DNA υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη ότι 1 μονάδα OD στα 260nm αντιστοιχεί σε 50ng\μl DNA.

$$\text{Δηλαδή: } C_{\text{DNA}} (\text{ng}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260\text{nm}} \times 50 \times \text{βαθμός αραιώσης}$$

4. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος

4.1 Πολλαπλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Multiplex PCR) για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος

Για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι εκκινητές STS για κάθε περιοχή. Οι εκκινητές STS υβριδοποιούνται σε μη πολυμορφικές θέσεις της MSY (Male Specific Y) περιοχής του Y χρωμοσώματος (Simoni et al., 2004) και σε κάθε αντίδραση PCR

χρησιμοποιείται κατάλληλος συνδυασμός εκκινητών ώστε να μας παρέχεται μια πλήρης εικόνα και για τις τρεις AZF περιοχές.

Στην αντίδραση της Multiplex PCR χρησιμοποιούνται θετικά και αρνητικά δείγματα ελέγχου-μάτρυρες (controls). Ειδικότερα,

- Παράλληλα με το δείγμα αρσενικού ατόμου, αναλύεται και δείγμα DNA θηλυκού ατόμου ως αρνητικός μάρτυρας, για την ανίχνευση μολύνσεων (αρνητικός μάρτυρας ♀)
- Παράλληλα με το δείγμα αρσενικού ατόμου, αναλύεται και δείγμα DNA από φυσιολογικό-γόνιμο άνδρα (θετικός μάρτυρας ♂)
- Ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας της αντίδρασης PCR χρησιμοποιείται το γονίδιο ZFX/ZFY (ζεύγος εκκινητών ZFYF/ZFYR) τμήμα του οποίου ενισχύεται τόσο στο δείγμα αρσενικού ατόμου όσο και στο δείγμα θηλυκού ατόμου (X και Y specific)
- Ως εσωτερικός θετικός μάρτυρας της αντίδρασης PCR χρησιμοποιούνται οι εκκινητές SRYF/SRYR οι οποίοι ενισχύουν τμήμα του γονιδίου SRY που απαντάται στο Y χρωμόσωμα (Y specific)
- Σε κάθε αντίδραση, ως μάρτυρας για την ανίχνευση μολύνσεων των αντιδραστήριων χρησιμοποιείται ένα δείγμα στο οποίο έχουν προστεθεί όλα τα αντιδραστήρια, αλλά η ποσότητα του υποστρώματος DNA έχει αντικατασταθεί από την αντίστοιχη ποσότητα αποστειρωμένου ddH₂O.

Υλικά – Όργανα

- Υπόστρωμα DNA γονιδιώματος αρσενικού ατόμου
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
- Μίγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs mix)
- Ανοδικός εκκινητής (PrimerF)
- Καθοδικός εκκινητής (PrimerR)
- Διάλυμα MgCl₂
- Αποστειρωμένο ddH₂O
- Συσκευή PCR (Θερμικός κυκλοποιητής MJR PTC 200)

Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρείας Roche, και η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Lab Subblies.

Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και η αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτών εμφανίζεται στον **Πίνακα 4**. Με την χρήση των προτεινόμενων ζευγών εκκινητών (δύο ζεύγη εκκινητών για κάθε AZF περιοχή – στον **Πίνακα 4** σημαίνονται με αστερίσκο) (**Εικόνα 7**) που δημοσιεύθηκαν σύμφωνα με οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ακαδημίας Ανδρολογίας (European Academy of Andrology / EAA) και του Ευρωπαϊκού Δικτύου Ποιότητας Εργαστηρίων Μοριακής Γενετικής (European Molecular Genetics Quality Network / EMQN), μας δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού πάνω από το 95% των ελλειμμάτων (Simoni et al., 2004).

Πίνακας 4.

Περιοχή	Εκκινητές	Αλληλουχία Εκκινητών (5'- 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
Yp	SRY	F: gaa tat tcc cgc tct ccg ga	472 bp
		R: gct ggt gct cca ttc ttg ag	
Yp	ZFY	F: acc tct gta ctg act gtg att aca c	495 bp
		R: gca ctt ctt tgg tat ct gaga aag t	
AZFa	SY84*	F: aga agg gtc tga aag cag gt	326 bp
		R: gcc tact ac ctg gag gct tc	
	SY86*	F: gtg aca cac aga cta tgc ttc	320 bp
		R: aca cac aga ggg aca acc ct	
	SY87	F: tct gtt gct tga aaa gag gg	252 bp
		R: act gca gga aga atc agc tg	
AZFb	SY127*	F: ggc tca caa acg aaa aga aa	274 bp
		R: ctg cag gca gta ata agg ag	
	SY129	F: agc ttc agg agg ttc aaa ac	194 bp
		R: aag tgg gac cta agc tac ga	
	SY134*	F: gtc tgc ctc acc ata aaa cg	301 bp
		R: acc act gcc aaa act ttc aa	
Proximal AZFc (or AZFb)	SY152	F: aag aca gtc tgc cat gtt tca	125 bp
		R: aca gga ggg tac tta gca gt	
AZFc	SY254*	F: ggg tgt tac cag aag gca aa	400 bp
		R: gaa ccg tat cta cca aag cag c	
	SY255*	F: gtt aca gga ttc ggc gtg at	126 bp
		R: ctc gtc atg tgc agc cac	

Στην Πολλαπλή PCR (Multiplex PCR) χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές ομάδες ζευγών εκκινητών, όπου σε κάθε ομάδα περιλαμβάνονταν εκκινητές και για τις τρεις AZF περιοχές καθώς και τα ζεύγη των εκκινητών που λειτουργούν ως εσωτερικοί μάρτυρες της αντίδρασης (**Πίνακας 5**).

Πίνακας 5.

1^η ΟΜΑΔΑ	2^η ΟΜΑΔΑ	3^η ΟΜΑΔΑ
ZFY (X,Y)	ZFY (X,Y)	ZFY (X,Y)
SRY (Y)	SRY (Y)	SRY (Y)
SY84 (AZFa)	SY254 (AZFc)	SY254 (AZFc)
SY134 (AZFb)	SY86 (AZFa)	SY87 (AZFa)
SY255 (AZFc)	SY127 (AZFb)	SY129(AZFb)
		SY152 (AZFc)

Διαδικασία :

Η αντίδραση της Multiplex PCR πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο **50 μ l**.

Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων στην τελική αντίδραση εμφανίζονται στους **Πίνακες 6,7,8** ξεχωριστά για κάθε ομάδα εκκινήτων.

Πίνακας 6.

1^η ΟΜΑΔΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ			
Carx	Αντιδραστήρια	μl / αντίδραση	Cτελ
10 μ M	ZFY F	0,5 μ l	0,1 μ M
10 μ M	ZFY R	0,5 μ l	0,1 μ M
10 μ M	SRY F	0,5 μ l	0,1 μ M
10 μ M	SRY R	0,5 μ l	0,1 μ M
10 μ M	SY84 F (AZFa)	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M	SY84 R	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M	SY134 F (AZFb)	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M	SY134 R	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M	SY255 F (AZFc)	1 μ l	0,2 μ M
10 μ M	SY255 R	1 μ l	0,2 μ M
5mM	dNTPs	2 μ l	0,2mM
10x	Reaction Buffer	5 μ l	1x
50mM	MgCl ₂	2,5 μ l	2,5mM
	Taq polymerase	0,5 μ l	2,5Units/ μ l
	DNA template	10 μ l	500 ng
	ddH ₂ O	22 μ l	

Πίνακας 7.

2^η ΟΜΑΔΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ			
<i>Caρχ</i>	<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>μl / αντίδραση</i>	<i>Cτελ</i>
10μM	ZFY F	0,5 μl	0,1μM
10μM	ZFY R	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SRY F	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SRY R	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SY254 F (AZFc)	0,5μl	0,1μM
10μM	SY254 R	0,5μl	0,1 μM
10μM	SY86 F (AZFa)	1μl	0,2 μM
10μM	SY86 R	1μl	0,2 μM
10μM	SY127 F (AZFb)	2μl	0,4 μM
10μM	SY127 R	2μl	0,4 μM
5mM	dNTPs	2μl	0,2mM
10x	Reaction Buffer	5μl	1x
50mM	MgCl ₂	2,5μl	2,5mM
	Taq polymerase	0,5μl	2,5Units/μl
	DNA template	10μl	500 ng
	ddH ₂ O	21μl	

Πίνακας 8.

3^η ΟΜΑΔΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ			
<i>Caρχ</i>	<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>μl / αντίδραση</i>	<i>Cτελ</i>
10μM	ZFY F	0,5 μl	0,1μM
10μM	ZFY R	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SRY F	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SRY R	0,5 μl	0,1 μM
10μM	SY254 F (AZFc)	0,5μl	0,1μM
10μM	SY254 R	0,5μl	0,1 μM
10μM	SY87F (AZFa)	1μl	0,2 μM
10μM	SY87 F	1μl	0,2 μM
10μM	SY129F (AZFb)	2μl	0,4 μM
10μM	SY129 F	2μl	0,4 μM

10μM	SY152F (AZFc)	1μl	0,2 μM
10μM	SY152 F	1μl	0,2 μM
5mM	dNTPs	2μl	0,2mM
10x	Reaction Buffer	5μl	1x
50mM	MgCl ₂	2,5μl	2,5mM
	Taq polymerase	0,5μl	2,5Units/μl
	DNA template	10μl	500 ng
	ddH ₂ O	19μl	

Οι συνθήκες της αντίδρασης της Multiplex PCR ήταν ίδιες και για τις τρεις ομάδες εκκινητών :

1. 95°C για 5:00 min
 2. 95 °C για 0:30 sec
 3. 60 °C για 0:30 sec
 4. 72 °C για 0:40 sec
- } 1 κύκλος
5. Επανάληψη του κύκλου 1 για 32 φορές
 6. 72 °C για 10:00 min
 7. 4°C για 10:00 min
 8. End

4.2. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Υλικά – Όργανα

- Αγαρόζη
- Διάλυμα 0,5x TBE
- Διάλυμα EtBr (10mg/ml)
- Μάρτυρας μεγεθών DNA
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης
- Μήτρα και κτένι ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό
- Κωνική φιάλη και ογκομετρικός κύλινδρος
- U.V. τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας

Διαδικασία:

Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 2,5%

1. Ζυγίζουμε 2,5g αγαρόζης.
2. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε κωνική φιάλη που περιέχει 100ml διαλύματος TBE 0.5 x (10 ml TBE 5 x και 90 ml mQ H₂O).
3. Το προκύπτον διάλυμα θερμαίνεται υπό ανάδευση μέχρι να γίνει διαυγές
4. Εφ'όσον το διάλυμα κρυώσει προσθέτουμε 5μl Et Br.
5. Αδειάζουμε το διάλυμα στη μήτρα ηλεκτροφόρησης εφόσον προηγουμένως έχουμε τοποθετήσει το κτένι και το αφήνουμε να στερεοποιηθεί .
6. Η μήτρα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία έχουμε προηγουμένως γεμίσει με διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE 0.5x και στην συνέχεια απομακρύνουμε το κτένι.
7. Τέλος , όπως έχουν δημιουργηθεί τα κενά τοποθετούνται τα δείγματα.

Παράλληλα με τα δείγματά μας ηλεκτροφορείται και Μάρτυρας γνωστών μεγεθών DNA –λ φάγου κατατμημένου με το ένζυμο περιορισμού PVUII - (Τα μεγέθη αυτού παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**).

Τα προϊόντα της Multiplex PCR αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% μετά από ολονύκτια ηλεκτροφόρηση στα 35V.

Πίνακας 9.

Μάρτυρας Μεγεθών λ/PVUII
21300
4900-3640
2300
1700
640
580
530
470
340
150

5. Πειραματική διαδικασία για τον προσδιορισμό του SNP G197T

5.1. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) για τον προσδιορισμό του SNP G197T

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε προκειμένου να απομονώσουμε από DNA γονιδιώματος αρσενικού ατόμου, το γονίδιο της Πρωταμίνης 1 (PRM1).

Υλικά – Όργανα

- Υπόστρωμα DNA γονιδιώματος αρσενικού ατόμου
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
- Μίγμα νουκλεοτιδίων (dNTPs mix)
- Ανοδικός εκκινητής (PrimerF)
- Καθοδικός εκκινητής (PrimerR)
- Διάλυμα $MgCl_2$
- Αποστειρωμένο ddH_2O
- Συσκευή PCR (Θερμικός κυκλοποιητής MJR PTC 200)

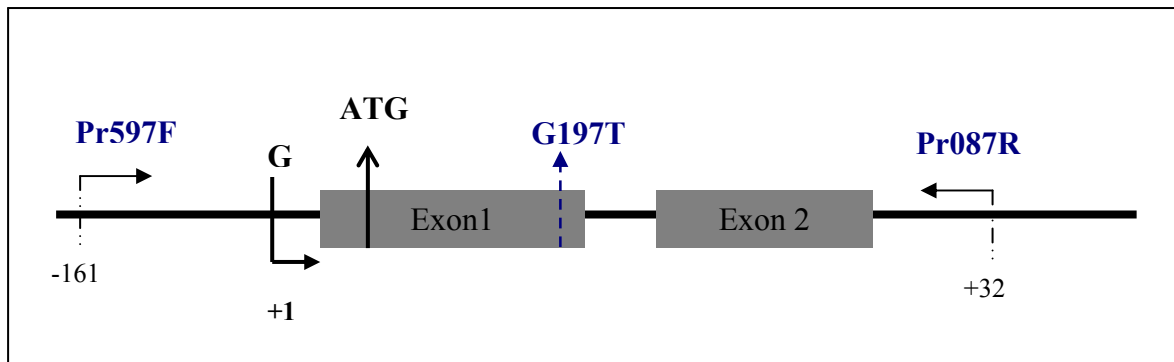
Για την αντίδραση της PCR χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια της εταιρείας Roche, και η σύνθεση των ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Lab Subblies.

Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε καθώς και η αντίστοιχη νουκλεοτιδική αλληλουχία αυτών εμφανίζεται στον παρακάτω **Πίνακα 10**, σύμφωνα με τους Iguchi et al., 2006 .

Πίνακας 10.

<i>Εκκινητής</i>	<i>Νουκλεοτιδική αλληλουχία</i>	<i>Μέγεθος αναμενόμενου προϊόντος PCR</i>
Pr597 Forward	5'-cataggcagcccctacactc- 3'	687 bp
Pr087 Reverse	5'-ccctctcaagaacaaggagagaa-3'	

Ο Ανοδικός εκκινητής δεσμεύεται 161nt ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου της Πρωταμίνης 1 και ο καθοδικός εκκινητής 32nt καθοδικά του γονιδίου της Πρωταμίνης 1 (**Εικόνα 27**).



Εικόνα 27. Σχηματική αναπαράσταση του γονιδίου της Πρωταμίνης 1. Εμφανίζεται το σημείο έναρξης της μεταγραφής (+1), το σημείο έναρξης της μετάφρασης και οι θέσεις υβριδοποίησης των εκκινητών.

Διαδικασία :

Η αντίδραση της PCR για την παραλαβή του επιθυμητού τμήματος, πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο **50 μ l**.

Οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων στην τελική αντίδραση εμφανίζονται στον παρακάτω **Πίνακα 11**.

Πίνακας 11.

<i>Carx</i>	<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>μl / αντίδραση</i>	<i>Cτελ</i>
10 μ M	Pr597F	2,5 μ l	0,5 μ M
10M μ	Pr087R	2,5 μ l	0,5 μ M
5mM	dNTPs	2 μ l	0,2mM
10x	Reaction Buffer	5 μ l	1x
50mM	MgCl ₂	2,5 μ l	2,5mM
	Taq polymerase	0,5 μ l	2,5Units/ μ l
	DNA template	10 μ l	500 ng/ μ l
	ddH ₂ O	25 μ l	

Οι συνθήκες της αντίδρασης της PCR ήταν :

1. 95°C για 5:00 min
 2. 95 °C για 0:30 sec
 3. 60 °C για 0:30 sec
 4. 72 °C για 0:45 sec
- } 1 κύκλος
5. Επανάληψη του κύκλου 1 για 35 φορές

6. 72 °C για 10:00 min
7. 4 °C για 10:00 min
8. End

Η πιστοποίηση της ύπαρξης του προϊόντος της PCR πραγματοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5% (**Κεφ.3, Παρ.4.2**).

5.2. Καθαρισμός των δειγμάτων της PCR – “ PCR Purification Kit ”

Υλικά – Όργανα

- Buffer PBI (Υδροχλωρική γουανιδίνη , ισοπροπανόλη)
- Buffer PE
- Buffer EB (10mM Tris-Cl, pH=8.5)
- 100% Αιθανόλη (EtOH)
- Spin Columns
- Collection Tubes (2ml)
- Αποστειρωμένα σωληνάρια

Ο καθαρισμός των δειγμάτων που προέκυψαν από την PCR με την χρήση Kit της εταιρίας Qiagen (Qiagen – PCR Purification Kit, Cat.No.28104) .

Διαδικασία:

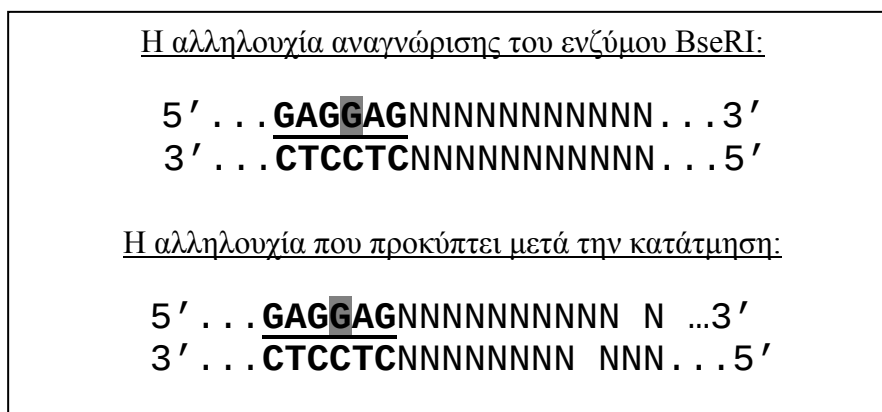
1. Στην αντίδραση της PCR προστίθενται πενταπλάσιος όγκος διαλύματος PB σε σχέση με αυτόν του διαλύματος.
2. Τα δείγματα μεταφέρονται στις κολώνες του Kit και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 min και απόρριψη του εκλούματος.
3. Ακολουθεί ξέπλυμα του DNA με 0,75 ml διαλύματος PE, φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 min και απόρριψη του εκλούματος.
4. Πραγματοποιείται ακόμα μια φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 min και στην συνέχεια , το φίλτρο με το προσδεδεμένο DNA τοποθετείται σε αποστειρωμένο σωληνάριο των 1,5 ml .
5. Τέλος πραγματοποιείται έκλυση του DNA με 50μl διαλύματος EB και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13,000rpm για 1 min .

Τελικά , το DNA έχει συλλεχθεί στο σωληνάριο ($V_{\text{TEL}} = 50 \mu\text{l}$) και έχει απαλλαχθεί από υπολείμματα της αντίδρασης της PCR όπως dNTPs , Taq πολυμεράση και εκκινητές.

5.3. Κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού *BseRI* (RFLP assay)

Προκειμένου να προχωρήσουμε στην ανίχνευση του SNP **G197T** στο προϊόν της αντίδρασης PCR, πραγματοποιείται κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού *BseRI*, το οποίο αναγνωρίζει μια θέση περιορισμού μήκους 17nt στην περιοχή από το 196nt – 212nt της αλληλουχίας του γονιδίου της PRM1 (**Κεφ.7, Παρ.1.1**).

Ειδικότερα, η αλληλουχία η οποία αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού *BseRI* εμφανίζεται στην παρακάτω **Εικόνα 28**.



Εικόνα 28. Εμφανίζεται η αλληλουχία αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *BseRI* καθώς και το αποτέλεσμα μετά την κατάτμηση. Στο σκιασμένο τετράγωνο σημαίνεται η γουανίνη (G) στη θέση 197 η οποία σε υπογόνιμους άνδρες μετατρέπεται σε θυμίνη (T).

Με βάση λοιπόν τα παραπάνω, η μεταστροφή της γουανίνης (G) σε θυμίνη (T) έχει σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου *BseRI*, δηλαδή ο SNP **G197T** οδηγεί και στην δημιουργία Πολυμορφισμού Μήκους Περιοριστικού Θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) το οποίο και θα χρησιμοποιήσουμε ώστε να πραγματοποιηθεί η γονοτυπική ανάλυση των ατόμων του υπό μελέτη δείγματός μας.

Υλικά – Όργανα

- Υπόστρωμα : προϊόν της PCR (clean PCR product)

- Ένζυμο BseRI
- 10x NEBuffer 2 (1x περιέχει : 50mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂ , 1mM dithiothreitol , pH=7.9)
- Αποστειρωμένο ddH₂O

Η κατάτμηση πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο περιορισμού *BseRI* της εταιρείας «New England Biolabs – Bioline», Cat.No. RO581S (200units).

Διαδικασία:

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης κατάτμησης ήταν **40μl** και οι συγκεντρώσεις των επιμέρους αντιδραστηρίων στην τελική αντίδραση εμφανίζονται στον παρακάτω **Πίνακα 12.**

Πίνακας 12.

<i>Αντιδραστήρια</i>	<i>μl / αντίδραση</i>	<i>Γτελ</i>
PCR προϊόν	10–15 μl	1 μg
10x NEBuffer 2	4 μl	1x
BseRI	1 μl	2 units
ddH ₂ O	20 μl	-

Πραγματοποιήθηκε ολονύκτια επώαση των αντιδράσεων σε υδατόλουτρο στους 37°C .

Στην συνέχεια, ακολουθεί ηλεκτροφόρηση 20μl αντίδρασης κατάτμησης σε πήκτωμα αгарόζης 2,5% προκειμένου να ανιχνευθεί η παρουσία ή μη του υπό μελέτη πολυμορφισμού.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Προσδιορισμός ελλειμμάτων στις AZF περιοχές

4.1.1 Εφαρμογή της Πολλαπλής Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Multiplex PCR) για την ανίχνευση ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος

Μετά την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα υπό μελέτη δείγματα ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα και προσδιορισμού της συγκέντρωσης αυτών, εφαρμόστηκε Multiplex PCR με την χρήση κατάλληλων εκκινητών STS για τον προσδιορισμό ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος.

Το ζεύγος των εκκινητών ZFY ενισχύει ένα τμήμα 495bp του ZFY γονιδίου που απαντάται στο X και στο Y χρωμόσωμα. Άρα, η αντίδραση της Multiplex PCR θα δώσει προϊόντα όταν χρησιμοποιηθεί DNA γονιδιώματος τόσο από αρσενικό όσο και από θηλυκό άτομο (εσωτερικό control της αντίδρασης PCR).

Το ζεύγος εκκινητών SRY ενισχύει ένα τμήμα 472bp του γονιδίου SRY το οποίο απαντάται μόνο στο Y χρωμόσωμα (Y specific). Άρα, η αντίδραση της Multiplex PCR θα δώσει προϊόντα, μόνο όταν χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα DNA γονιδιώματος από αρσενικό άτομο (εσωτερικό control της αντίδρασης PCR).

Τα ζεύγη των εκκινητών SY84 και SY86 υβριδοποιούνται ανοδικά των γονιδίων USP9Y και DBY, και ενισχύουν τμήματα μεγέθους 326bp και 320bp, αντιστοίχα (**Εικόνα 7**). Έλλειμμα και των δύο τμημάτων συνεπάγεται απώλεια ολόκληρης της AZFa περιοχής (Simoni et al., 2004). Παράλληλα, το ζεύγος των εκκινητών SY87 ενισχύει ένα τμήμα μεγέθους 252bp στην ακραία περιοχή της AZFa και χρησιμοποιείται προκειμένου να καθοριστεί η έκταση του ελλείμματος (Simoni et al., 1999).

Τα ζεύγη των εκκινητών SY127 και SY134 υβριδοποιούνται στην μεσαία και ακραία περιοχή της AZFb και ενισχύουν τμήματα μεγέθους 274bp και 194bp (**Εικόνα 7**). Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων έλλειμμα και των δύο τμημάτων συνεπάγεται απώλεια ολόκληρης της AZFb περιοχής (Simoni et al., 2004). Παράλληλα, το ζεύγος εκκινητών SY152 ενισχύει ένα τμήμα μεγέθους 125bp στην ακραία περιοχή της AZFb όπου και αλληλοεπικαλύπτεται με την AZFc (proximal AZFc).

Τα ζεύγη των εκκινητών SY254 και SY255 υβριδοποιούνται σε ειδικές θέσεις για το γονίδιο DAZ, το οποίο απαντάται σε τέσσερα αντίγραφα που οργανώνονται σε

δύο συγκροτήματα, δύο γονιδίων με γραμμικό προσανατολισμό. Τα δύο αυτά ζεύγη εκκινητών ενισχύουν τμήματα 400bp και 126bp, αντιστοίχως (**Εικόνα 7**). Απουσία και των δύο τμημάτων συνεπάγεται απώλεια ολόκληρης της AZFc – όλων των αντιγράφων του γονιδίου DAZ. Έλλειμμα μόνο του ενός τμήματος δεν είναι εφικτό και θεωρείται μεθοδολογικό λάθος (Simoni et al., 2004).

Η παρουσία διπλού ελλείμματος στις AZFb και AZFc περιοχές πιστοποιείται με την χρήση των εκκινητών SY127, SY134, SY254 και SY255 (Simoni et al., 2004). Είναι δυνατόν να προσδιοριστούν μερικά ελλείμματα (partial deletions) στις AZFa και AZFb περιοχές αλλά μερικά ελλείμματα της AZFc λαμβάνονται ως μεθοδολογικό λάθος, όπως προαναφέρθηκε.

Πραγματοποιήθηκαν 3 Multiplex PCR για κάθε δείγμα ξεχωριστά, με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς εκκινητών ώστε σε κάθε αντίδραση να έχουμε εικόνα για κάθε AZF περιοχή. Οι τρεις ομάδες εκκινητών εμφανίζονται στον **Πίνακα 6**.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν σε 3 δείγματα ανιχνεύθηκαν ελλείμματα στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος. Ειδικότερα:

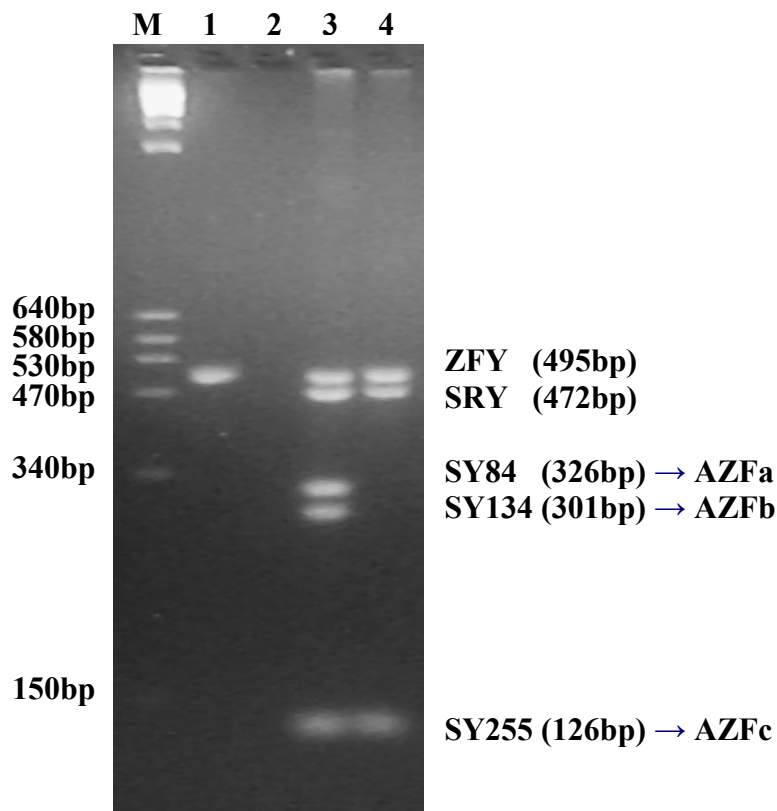
- ♦ Ο 1^{ος} ασθενής, ο οποίος έφερε διπλό έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές, είχε ήδη διαγνωσθεί με ενδιάμεση ολιγοσπερμία, με όγκο σπέρματος 4ml, συγκέντρωση $8,6 \times 10^6$ σπερματοζωάρια/ml και κινητικότητα 17% (**Εικόνες 29,30,31**).
- ♦ Ο 2^{ος} ασθενής, ο οποίος έφερε έλλειμμα στην AZFc περιοχή, είχε ήδη διαγνωσθεί με αζωοσπερμία (**Εικόνες 32,33,34**).
- ♦ Ο 3^{ος} ασθενής, ο οποίος έφερε έλλειμμα στην AZFc περιοχή, είχε ήδη διαγνωσθεί με αζωοσπερμία (**Εικόνες 35,36,37**).

Τα αποτελέσματα της Multiplex PCR για κάθε ομάδα εκκινητών και για τους τρεις ασθενείς παρουσιάζονται στις **Εικόνες 29 – 37**. Παράλληλα, με κάθε δείγμα, αναλύεται και δείγμα που προέρχεται από θηλυκό άτομο (αρνητικός μάρτυρας), από φυσιολογικό – γόνιμο αρσενικό άτομο, καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης που δεν περιέχει DNA γονιδιώματος.

1^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(1^η OMAAA)

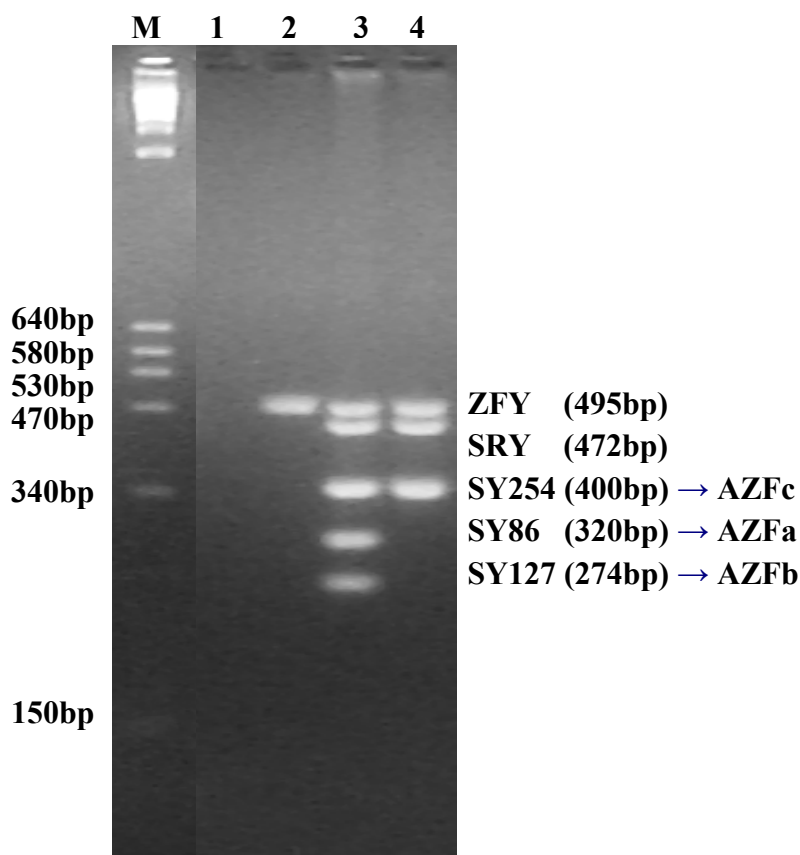


Εικόνα 29. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 1^η Ομάδα εκκινητών για τον 1^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): δείγμα θηλυκού ατόμου, (2): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 1^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές (απουσία των τμημάτων SY84 και SY134 αντίστοιχα).

1^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(2^η OMAAA)

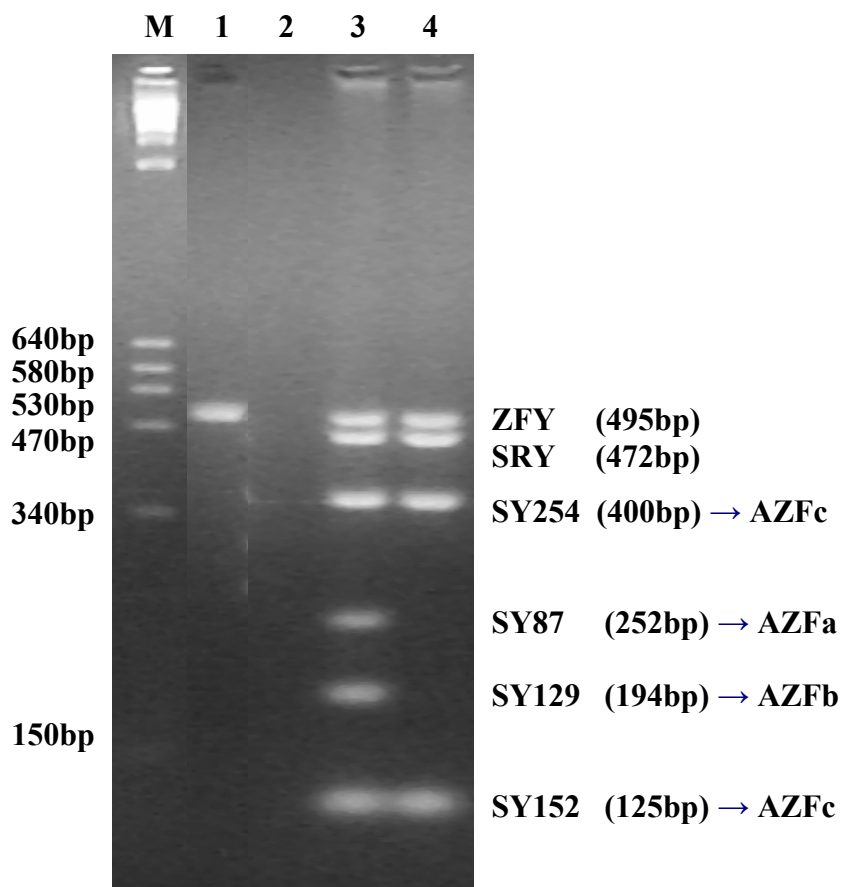


Εικόνα 30. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 2^η Ομάδα εκκινητών για τον 1^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (3): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 1^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές (απουσία των τμημάτων SY86 και SY127 αντίστοιχα).

1^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(3^η ΟΜΑΔΑ)

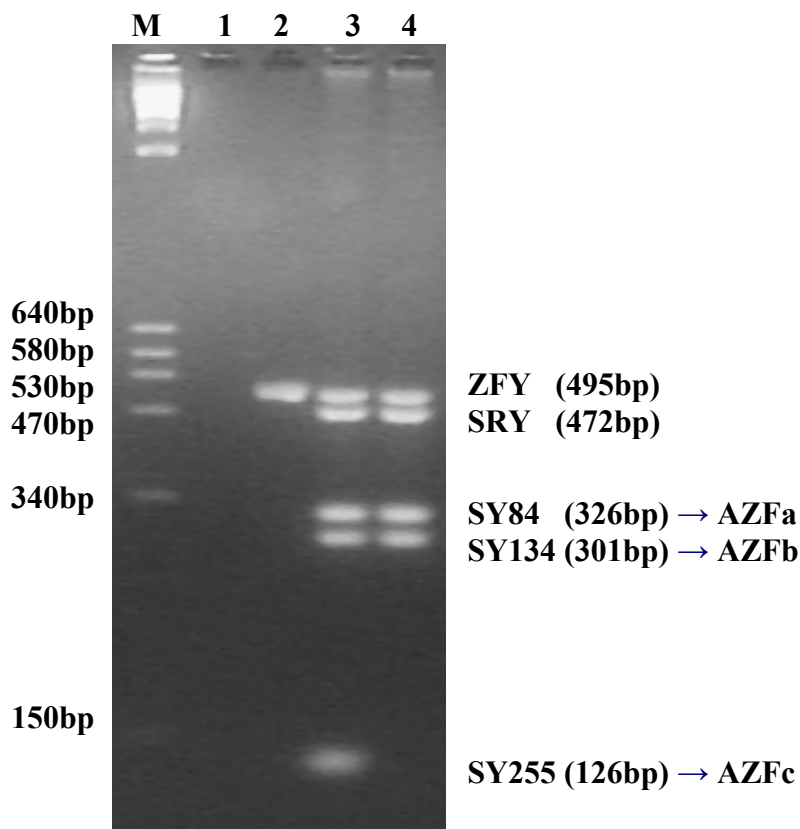


Εικόνα 31. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 3^η Ομάδα εκκινήτων για τον 1^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): δείγμα θηλυκού ατόμου, (2): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 1^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές (απουσία των τμημάτων SY87 και SY129, αντίστοιχα).

2^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(1^η ΟΜΑΔΑ)

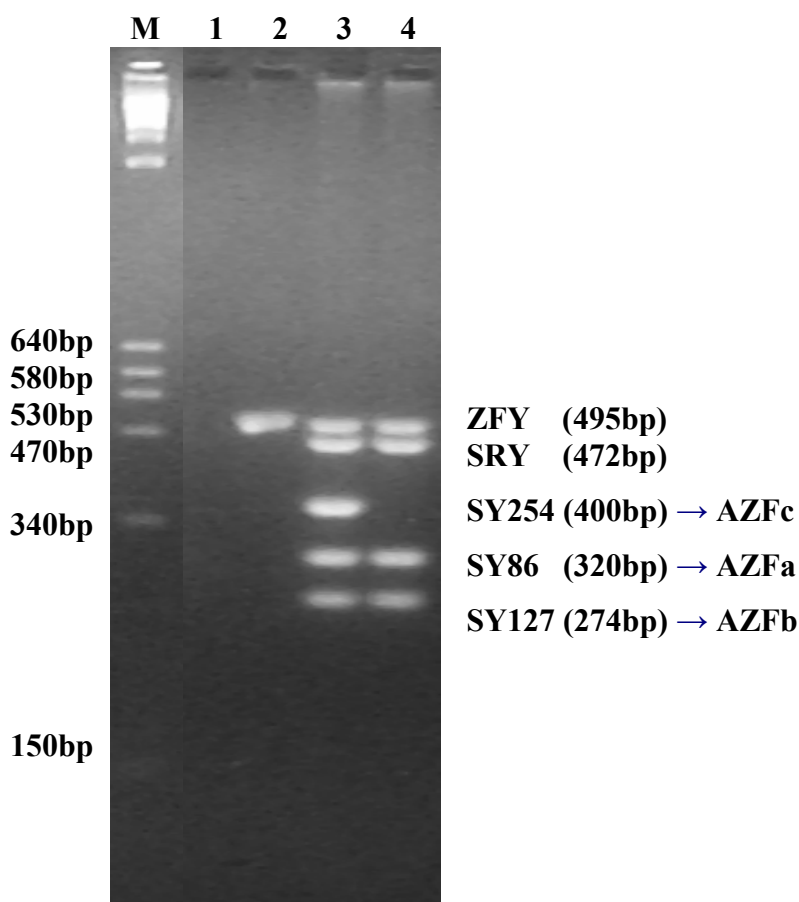


Εικόνα 32. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 1^η Ομάδα εκκινητών για τον 2^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 2^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc περιοχή (απουσία του τμήματος SY255).

2^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(2^η ΟΜΑΔΑ)

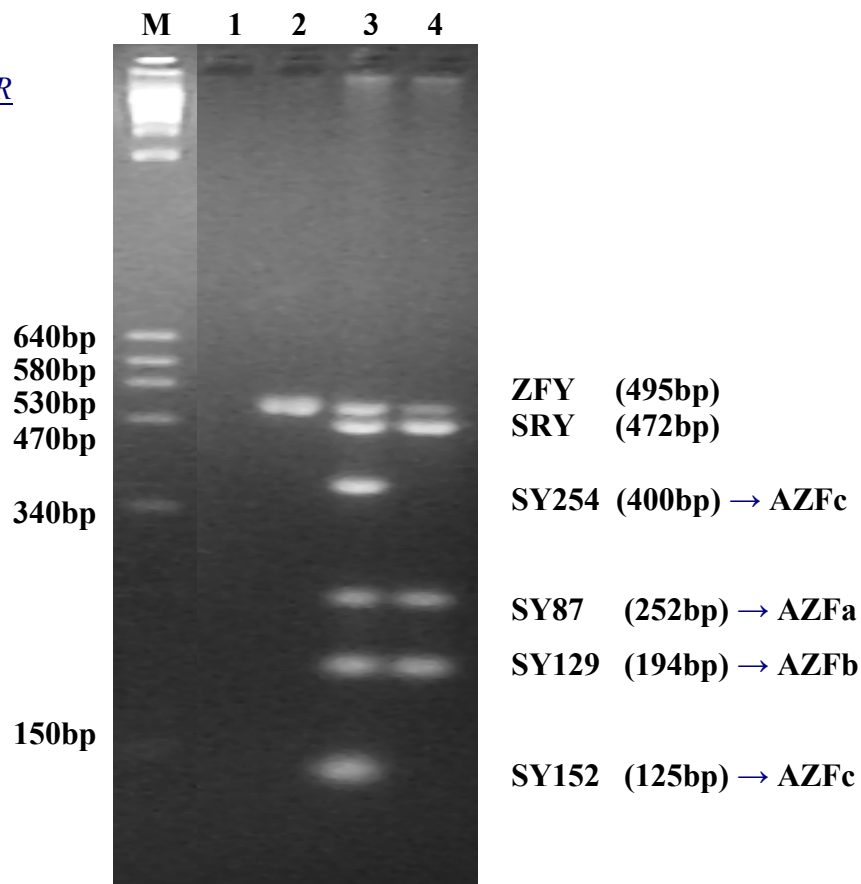


Εικόνα 33. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 2^η Ομάδα εκκινητών για τον 2^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 2^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc περιοχή (απουσία του τμήματος SY254).

2^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(3^η ΟΜΑΔΑ)

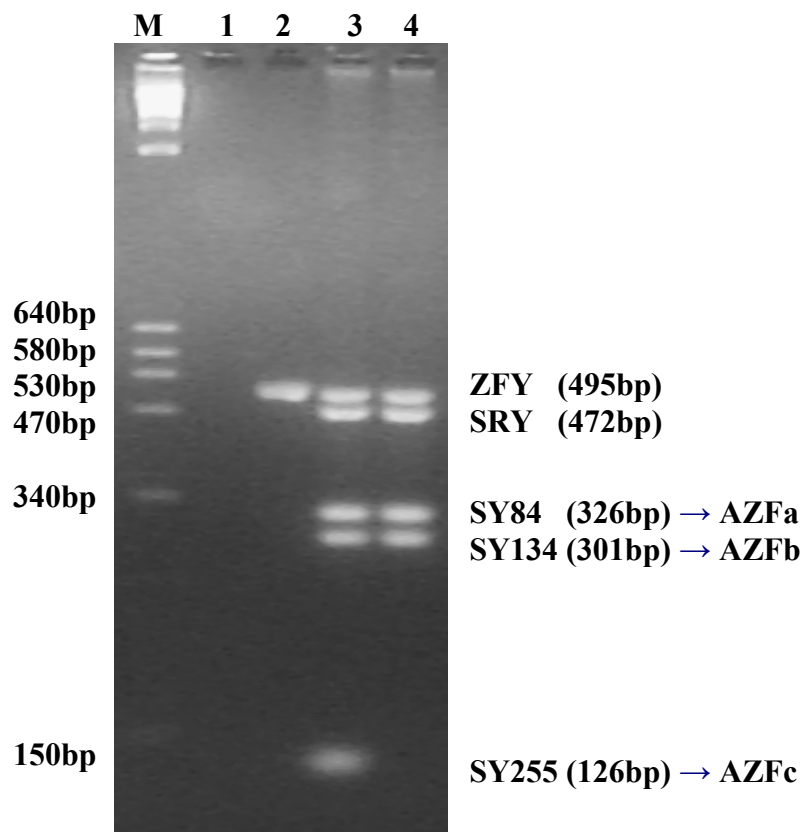


Εικόνα 34. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 3^η Ομάδα εκκινητών για τον 2^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 2^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc περιοχή (απουσία του τμήματος SY254 και SY152).

3^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(1^η ΟΜΑΔΑ)

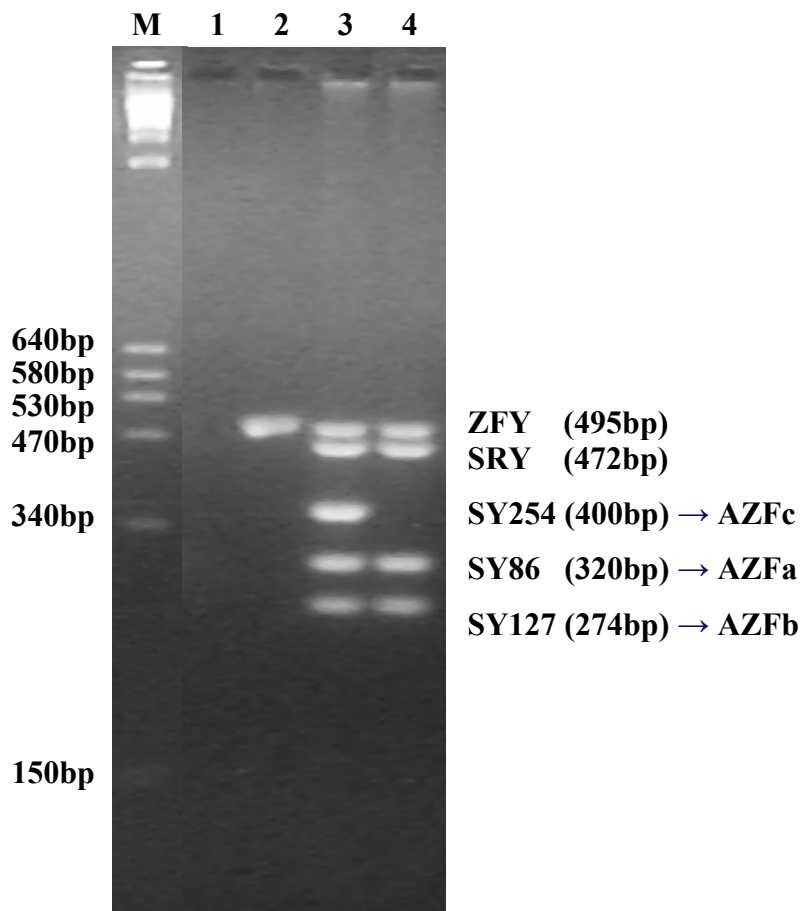


Εικόνα 35. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 1^η Ομάδα εκκινητών για τον 3^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 3^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc περιοχή (απουσία του τμήματος SY255).

3^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(2^η ΟΜΑΔΑ)

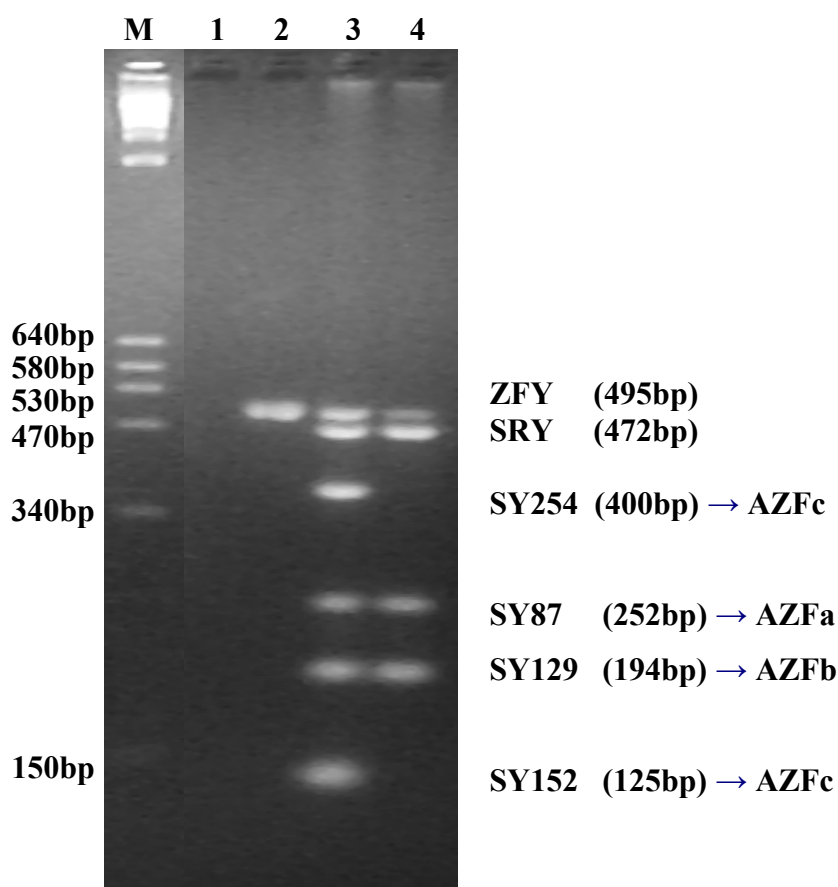


Εικόνα 36. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 2^η Ομάδα εκκινητών για τον 3^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 3^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc (απουσία του τμήματος SY254).

3^{ος} Ασθενής

Multiplex PCR

(3^η ΟΜΑΔΑ)



Εικόνα 37. Αποτελέσματα Multiplex PCR με την 3^η Ομάδα εκκινητών για τον 3^ο ασθενή, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης, (2): δείγμα θηλυκού ατόμου, (3): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου και (4): δείγμα του 3^{ου} ασθενή, που φέρει έλλειμμα στην AZFc περιοχή (απουσία του τμήματος SY254 και SY152).

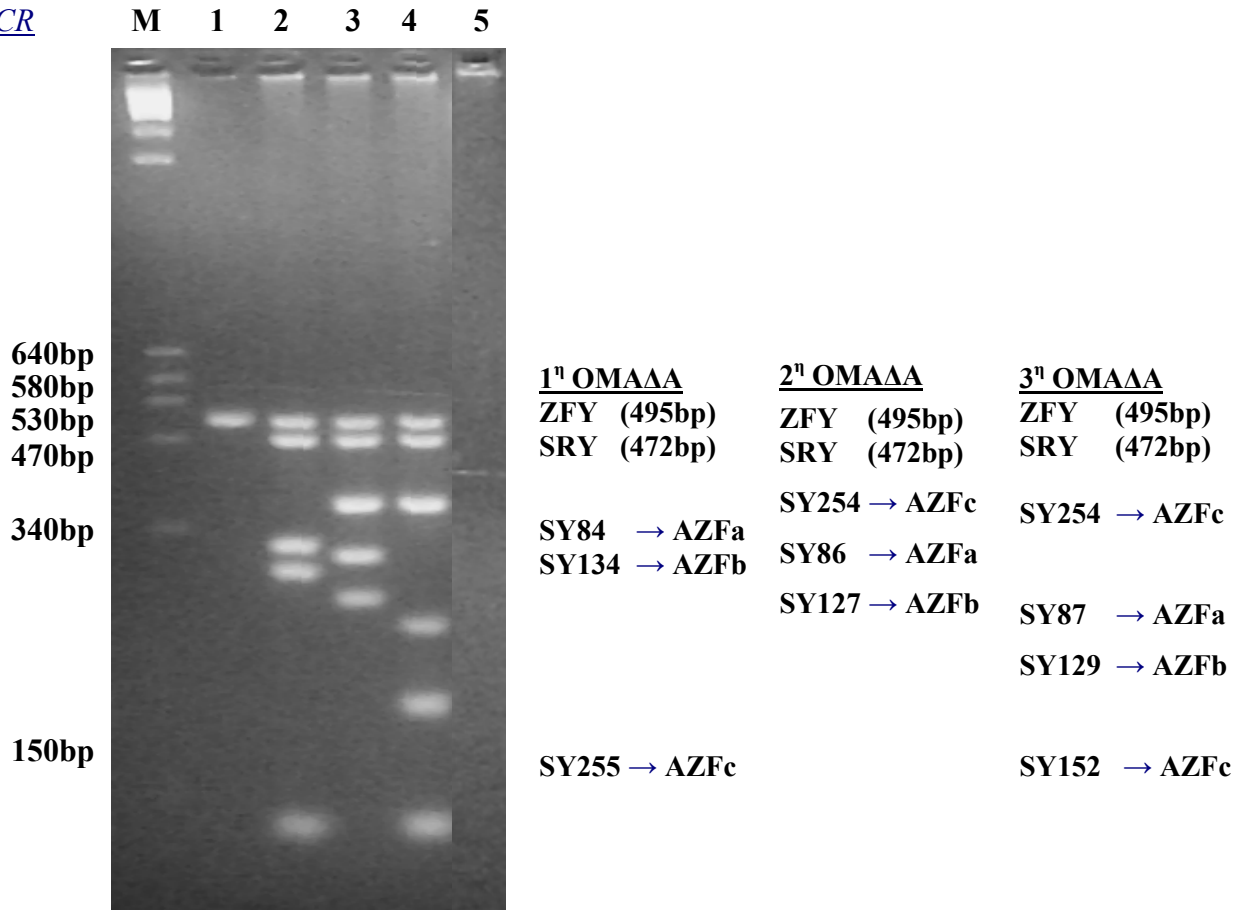
Στους υπόλοιπους υπογόνιμους άνδρες που μελετήθηκαν (n=97) δεν διαπιστώθηκε η παρουσία ελλειμμάτων στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος. Τα αποτελέσματα της Multiplex PCR για κάθε ομάδα εκκινητών, για τους ασθενείς αυτούς παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά στην **Εικόνα 38**.

Multiplex PCR

1^η OMAΔΔ

2^η OMAΔΔ

3^η OMAΔΔ



Εικόνα 38. Αποτελέσματα Multiplex PCR με όλες τις ομάδες των εκκινητών σε δείγμα ενός ασθενούς που μελετήθηκε και δεν προσδιορίστηκε η παρουσία ελλειμμάτων στις AZF περιοχές, το ίδιο πρότυπο παρουσίασαν και οι υπόλοιποι ασθενείς. Μ: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): δείγμα θηλυκού ατόμου, (2): 1^η ομάδα εκκινητών, (3): 2^η ομάδα εκκινητών, (4): 3^η ομάδα εκκινητών, (5): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης .

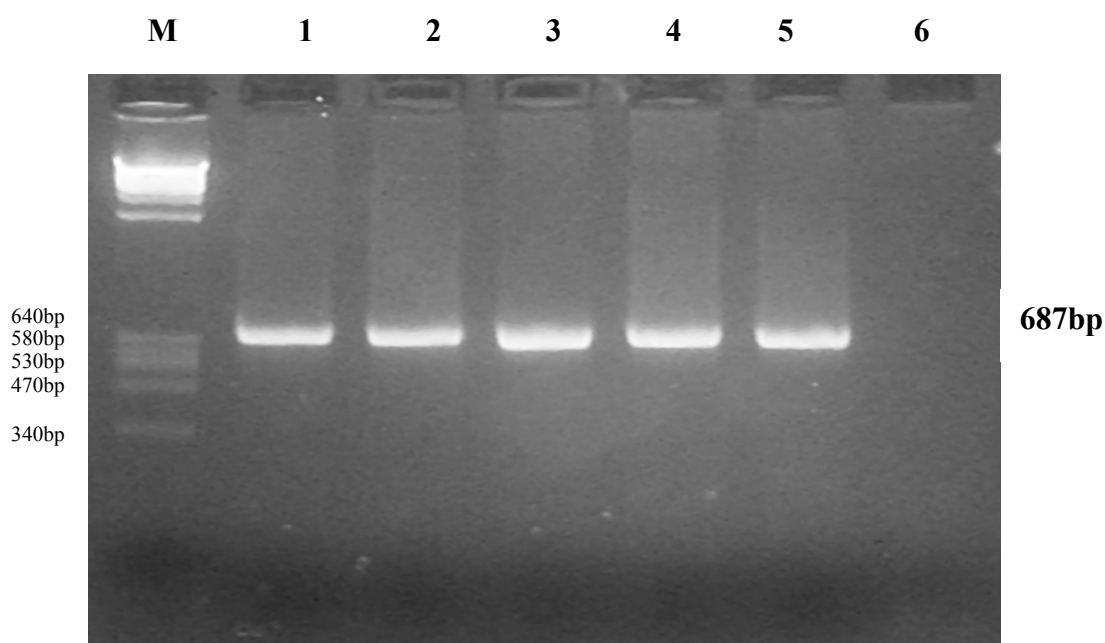
4.2 Προσδιορισμός του νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού SNP G197T

4.2.1 Εφαρμογή της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) για την απομόνωση του γονιδίου της πρωταμίνης-1

Μετά την απομόνωση DNA γονιδιώματος από τα υπό μελέτη δείγματα ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA και εφαρμόστηκε συμβατική PCR, με την χρήση κατάλληλων εκκινητών (Pr597F & Pr087R) (**Εικόνα 27**) όπως περιγράφηκαν από τον Iguchi και τους συνεργάτες του (Iguchi et al., 2006) προκειμένου να απομονωθεί το γονίδιο της πρωταμίνης-1.

Ο ανοδικός εκκινητής υβριδοποιείται 161nt ανοδικά του σημείου έναρξης της μεταγραφής του γονιδίου και ο καθοδικός εκκινητής υβριδοποιείται 32nt καθοδικά του πρώτου εξονίου του γονιδίου (**Εικόνα 27 / Κεφ.7, Παρ.1.1**). Οπότε το τμήμα που περιμένουμε να ενισχυθεί έχει αναμενόμενο μέγεθος 687bp. Παράλληλα, με κάθε δείγμα, αναλύεται και δείγμα που προέρχεται από φυσιολογικό – γόνιμο αρσενικό άτομο καθώς και ο αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης.

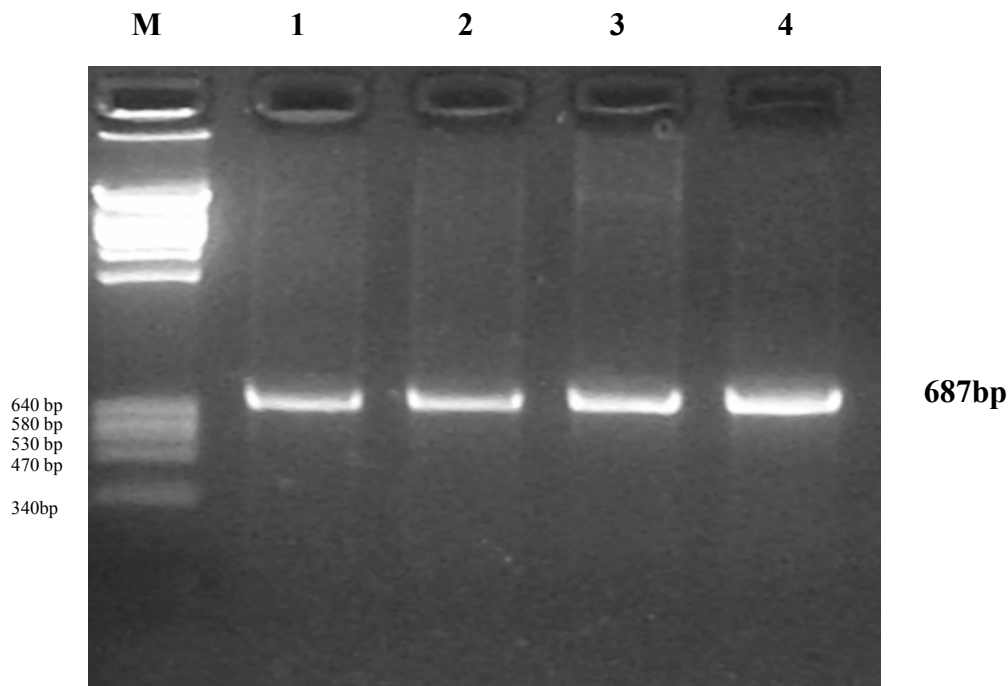
Και από τα 100 δείγματα πραγματοποιήθηκε εκλεκτική ενίσχυση του γονιδίου της πρωταμίνης-1. Η πιστοποίηση της ύπαρξης του επιθυμητού προϊόντος πραγματοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. Τα αποτελέσματα της PCR για τέσσερα από αυτά τα δείγματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 39**, και το ίδιο πρότυπο εμφανίστηκε και στα υπόλοιπα δείγματα.



Εικόνα 39. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR (5μl αντίδρασης PCR) για πέντε ασθενείς, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου, (2-5): δείγματα τεσσάρων ασθενών και (6): αρνητικός μάρτυρας της αντίδρασης.

4.2.2 Καθαρισμός των προϊόντων της PCR

Εφόσον ολοκληρώθηκε η PCR αντίδραση και πιστοποιήθηκε η παρουσία του επιθυμητού προϊόντος μετά από ηλεκτροφόρηση, ακολούθησε καθαρισμός των προϊόντων της PCR (Qiagen– PCR Purification Kit). Ο τελικός όγκος των καθαρισθέντων προϊόντων ήταν τα 50μl. Στην συνέχεια, ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 40**.



Εικόνα 40. Ηλεκτροφόρηση των καθαρισθέντων προϊόντων της PCR (3μl) για τέσσερις ασθενείς, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII- και (1-4): δείγματα τεσσάρων ασθενών.

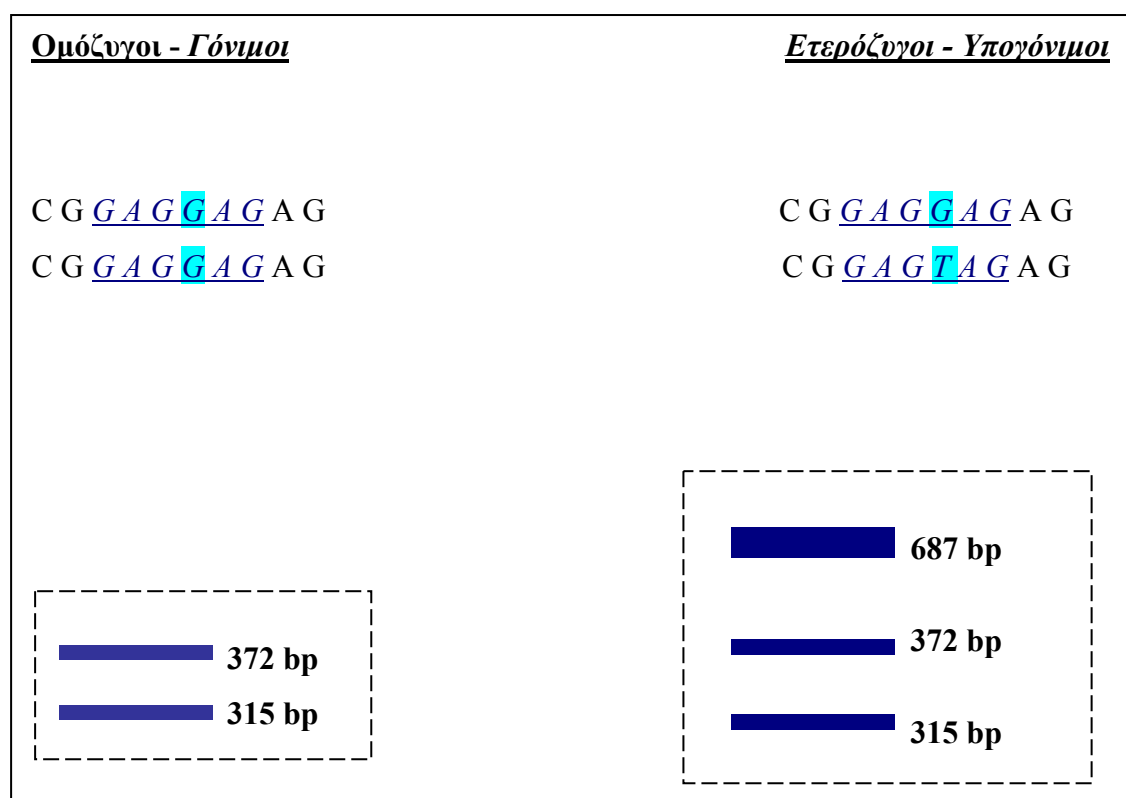
4.2.3 Κατάτμηση των προϊόντων της PCR με το ένζυμο περιορισμού BseRI (RFLP assay)

Προκειμένου να πιστοποιηθεί η παρουσία του SNP **G197T** του γονιδίου της πρωταμίνης-1 στο δείγμα των 100 υπογόνιμων ανδρών, προχωρήσαμε σε κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού BseRI (Iguchi et al., 2006). Το ένζυμο αναγνωρίζει μια θέση περιορισμού μήκους 17nt στην περιοχή από το 196nt – 212nt της αλληλουχίας του γονιδίου της πρωταμίνης-1 (**Κεφ.7, Παρ.1.1**).

Οι φυσιολογικοί – γόνιμοι άνδρες διαθέτουν και στα δύο αλληλόμορφα G στην θέση 197, οπότε μετά από κατάτμηση του προϊόντος της PCR με το ένζυμο

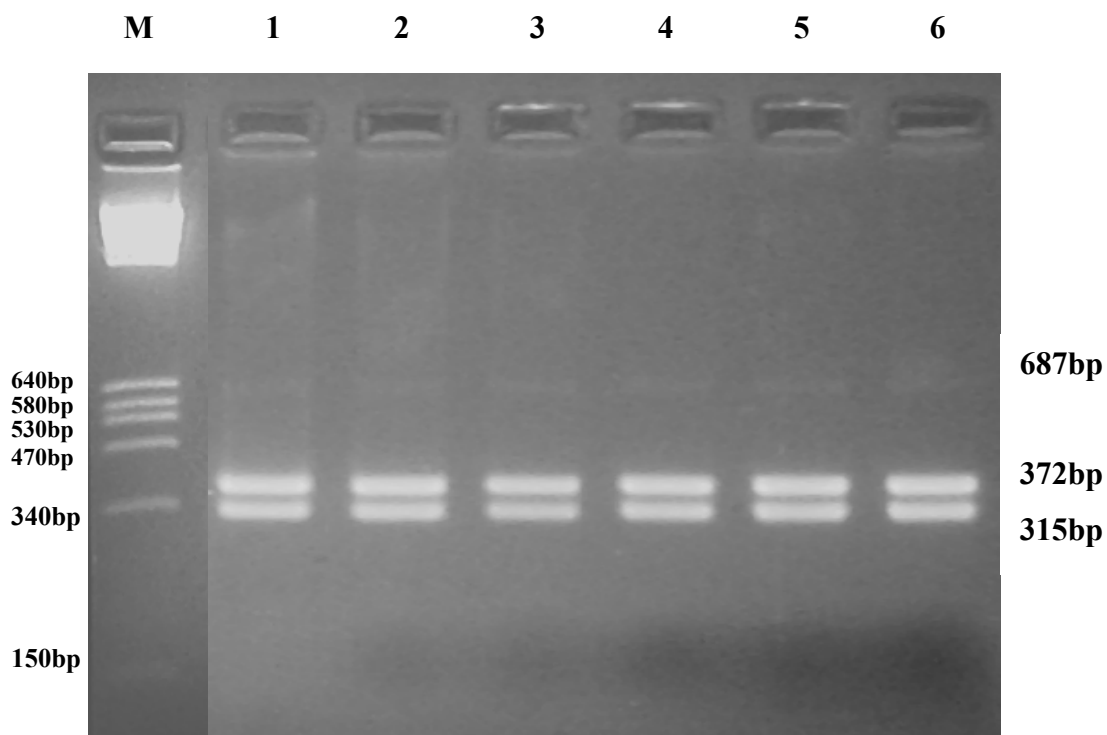
περιορισμού BseRI αναμένουμε δύο ζώνες μεγέθους 315bp και 372 bp, αντίστοιχα. Αντίθετα, σε ορισμένους υπογόνιμους άνδρες, η παρουσία του SNP G197T, θα έχει σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού BseRI (παρουσία T στην θέση 197 και όχι G), με αποτέλεσμα την δημιουργία Πολυμορφισμού Μήκους Περιοριστικού Θραύσματος (RFLP / Restriction Fragment Length Polymorphism). Στην περίπτωση λοιπόν αυτή, μετά από κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού BseRI αναμένουμε τρεις ζώνες μεγέθους 687bp (ακέραιο προϊόν PCR- αλληλόμορφο T197T), 315bp και 372 bp (αλληλόμορφο G197G) (**Εικόνα 41**).

Παράλληλα με τα δείγματα των ασθενών, αναλύεται και δείγμα που προέρχεται από φυσιολογικό – γόνιμο αρσενικό άτομο (G197G).



Εικόνα 41. Σχηματική απεικόνιση των θραυσμάτων περιορισμού που αναμένουμε μετά από κατάτμηση με το ένζυμο περιορισμού BseRI στο προϊόν της PCR τόσο στους γόνιμους όσο και στους υπογόνιμους άνδρες.

Η πιστοποίηση της ύπαρξης των θραυσμάτων περιορισμού πραγματοποιήθηκε μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2,5%. Ειδικότερα, τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης για πέντε από αυτά τα δείγματα παρουσιάζονται στην **Εικόνα 42**.



Εικόνα 42. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της κατάτμησης με το ένζυμο περιορισμού BseRI (20μl αντίδρασης κατάτμησης) για πέντε ασθενείς, όπου M: μάρτυρας μεγεθών DNA-λ/PVUII-, (1-5): δείγματα πέντε ασθενών και (6): δείγμα φυσιολογικού-γόνιμου αρσενικού ατόμου.

Από τα 100 δείγματα που αναλύθηκαν δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα από αυτά ο πολυμορφισμός SNP G197T, όλοι οι ασθενείς όπως παρατηρούμε και στην **Εικόνα 42** ήταν ομόζυγοι G197G (ύπαρξη δύο θραυσμάτων περιορισμού μεγέθους 372bp και 315bp). Το ίδιο πρότυπο περιορισμού παρατηρήθηκε και στα υπόλοιπα άτομα του εξεταζόμενου πληθυσμού.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Προβλήματα υπογονιμότητας αντιμετωπίζει το 15% των ζευγαριών που επιθυμούν να τεκνοποιήσουν, εκ των οποίων το 40%-50% οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα (Foresta et al., 2001; Ferlin et al., 2006). Περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας στις οποίες δεν ανευρίσκεται προφανής αιτιολογικός παράγων (παθολογικά κλινικά ευρήματα, αποφρακτικά αίτια, συγγενείς διαμαρτίες κτλ) αναφέρονται ως περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας (Gianotten et al., 2004). Οι περιπτώσεις αυτές αφορούν ένα σημαντικό ποσοστό υπογόνιμων/στείρων ανδρών και παρουσιάζουν ενδιαφέρον επειδή ακριβώς τα αίτια εξακολουθούν να μην είναι γνωστά γεγονός που εκτός των άλλων καθιστά και την διαχείριση των ασθενών αυτών δύσκολη και αναποτελεσματική.

Παλαιότερες αλλά και πιο πρόσφατες πληθυσμιακές μελέτες ανέδειξαν γενετικούς παράγοντες ως υπεύθυνους για τον φαινότυπο ορισμένων περιστατικών ιδιοπαθούς υπογονιμότητας και επομένως η μελέτη του γενετικού υπόβαθρου των ανδρών αυτών μπορεί να συμβάλλει στην διερεύνηση του παθογενετικού μηχανισμού της υπογονιμότητας/στεριότητας που παρουσιάζουν. Ειδικότερα, έχει διαπιστωθεί ότι ελλείμματα στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος υπάρχουν σε ένα ποσοστό 2% - 11% των υπογόνιμων ανδρών αυτής της κατηγορίας (Ferlin et al., 2006). Επίσης, σε πολύ πρόσφατη μελέτη (Iguchi et al., 2006) προσδιορίστηκε η παρουσία ενός απλού νουκλεοτιδικού πολυμορφισμού SNP G197T που εντοπίζεται στο τέλος του πρώτου εξονίου του γονιδίου της πρωταμίνης-1. Ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί σε αντικατάσταση μιας συντηρημένης αργινίνης από σερίνη στην αμινοξική αλληλουχία της πρωταμίνης-1 (R34S), με ενδεχόμενες συνέπειες στο πακετάρισμα και την ακεραιότητα του DNA στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου, γεγονός, που μπορεί να οδηγήσουν σε ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Στην εν λόγω μελέτη, που αφορούσε μικρό αριθμό δειγμάτων, ο πολυμορφισμός αυτός συσχετίζεται θετικά με την υπογονιμότητα στο 10% των περιπτώσεων.

Παράλληλα, η ραγδαία ανάπτυξη των μεθόδων τεχνητής γονιμοποίησης και ειδικότερα της ενδοκυτταρικής σπερματέγχυσης (ICSI) σε συνδυασμό με την βιοψία όρχεων (TESE) άνοιξαν νέους ορίζοντες στην αντιμετώπιση της ανδρικής υπογονιμότητας, τα ποσοστά επιτυχών γονιμοποιήσεων αυξήθηκαν σε σχέση με την συμβατική εξωσωματική γονιμοποίηση (IVF). Έτσι, το ποσοστό επιτυχών γονιμοποιήσεων από το συνδυασμό των μεθόδων ICSI / TESE είναι περί το ~64,3% ,

έναντι ποσοστού ~37,4% επιτυχών γονιμοποιήσεων με την συμβατική IVF (Steger K., 2003).

Είναι επομένως προφανές ότι η γνώση του γενετικού υπόβαθρου της υπογονιμότητας των ατόμων αυτών είναι σημαντική, προκειμένου αφενός να προσδιοριστούν τα γονίδια που έχουν σχέση με την ομαλή πορεία της σπερματογένεσης και στο βαθμό που είναι δυνατόν να γίνει συσχέτιση γονοτύπου/φαινοτύπου και αφετέρου να προταθεί η κατάλληλη θεραπευτική αγωγή, και να εκτιμηθεί η δυνατότητα τεκνοποίησης, ώστε να αποφεύγεται η συναισθηματική φόρτιση του ζεύγους και η ιατρική επιβάρυνση της υποψήφιας μητέρας μετά από άκαρπες προσπάθειες εξωσωματικών γονιμοποιήσεων.

Για τους παραπάνω λόγους κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα στην Δυτική Ελλάδα, λαμβάνοντας υπόψη και τα περιορισμένα βιβλιογραφικά δεδομένα από μελέτες στον ελληνικό χώρο, όπου αναφέρονται δύο μελέτες. Η μια πραγματοποιήθηκε στον Ελλαδικό χώρο (Giannouli et al., 2004) και η άλλη στην Κύπρο (Ioulianos et al., 2002) και αφορούσαν τον προσδιορισμό της συχνότητας εμφάνισης ελλειμμάτων στην Υq περιοχή. Στην πρώτη μελέτη (Giannouli et al., 2004), σε δείγμα 68 υπογόνιμων ανδρών (με ιδιοπαθή μη αποφρακτική αζωοσπερμία και ολιγοασθενοσπερμία) αναφέρθηκαν 2 ασθενείς με ιδιοπαθή αζωοσπερμία (3%) και φυσιολογικό καρυότυπο που έφεραν ελλείμματα, ο ένας στην AZFc και ο άλλος διπλό έλλειμμα στις AZFb και AZFc περιοχές. Δεν ανιχνεύθηκαν ελλείμματα στους υπόλοιπους 66 ασθενείς, ούτε στην ομάδα των φυσιολογικών/γόνιμων ανδρών. Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Κύπρο, περιελάμβανε 80 Ελληνοκύπριους με αζωοσπερμία (n=32) και σοβαρή ολιγοσπερμία (n=48), ελλείμματα στις AZF περιοχές προσδιορίστηκαν στο 5% (4/80) του συνολικού δείγματος. Συγκεκριμένα, στην AZFb (ένας ασθενής), στην AZFc (ένας ασθενής), και στην AZFbc (δύο ασθενείς), ενώ και οι τέσσερις ασθενείς είχαν διαγνωσθεί με αζωοσπερμία (Ioulianos et al., 2002).

Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του γενετικού υπόβαθρου της υπογονιμότητας 100 ανδρών που κατάγονται από την Δυτική Ελλάδα, σε συνεργασία με την Ουρολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών, όπου τα άτομα αυτά παρακολουθούνται για προβλήματα υπογονιμότητας αγνώστου αιτιολογίας. Ειδικότερα, το πρώτο μέρος της μελέτης αφορούσε την διερεύνηση των περιοχών AZF του Υ χρωμοσώματος και το δεύτερο μέρος της μελέτης αφορούσε την ανίχνευση του πολυμορφισμού SNP G197T.

Σημειωτέον ότι, όσον αφορά τον πολυμορφισμό αυτό, η παρούσα εργασία είναι η πρώτη του είδους της στον ελληνικό χώρο.

Όσον αφορά το πρώτο μέρος της μελέτης, από τους 100 ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα που μελετήθηκαν, μόνο τρεις βρέθηκε να φέρουν ελλείμματα στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος (3%). Ειδικότερα, ένα άτομο με ενδιάμεση ολιγοσπερμία, έφερε διπλό έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές και δύο άτομα με αζωοσπερμία έφεραν έλλειμμα στην AZFc περιοχή.

Το ποσοστό 3% του εξεταζόμενου πληθυσμού που διαπιστώθηκε ότι έφεραν έλλειμμα στις AZF περιοχές, εμπίπτει εντός των ορίων που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Παράλληλα, το γεγονός ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ασθενών με αζωοσπερμία φέρουν έλλειμμα στην AZFc περιοχή (Zheng Li et al., 2008), επίσης επαληθεύθηκε στον εξετασθέντα πληθυσμό όπου το 2% των ασθενών προσδιορίστηκε ότι είχαν έλλειμμα σε αυτή.

Στην παρούσα λοιπόν μελέτη προσδιορίσαμε ελλείψεις ανάλογες ή ίδιες με αυτές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι ελλείψεις αυτές αφορούν τα γονίδια USP9Y και DBY από την AZFa περιοχή, τα γονίδια HSFY, eIF-1AY και RBMY από την AZFb περιοχή και τα τέσσερα αντίγραφα του γονιδίου DAZ, το BPY2 και το CDY από την AZFc περιοχή. Πρόκειται για ολικές ελλείψεις των αντίστοιχων AZF περιοχών εφόσον οι εκκινητές STS που χρησιμοποιήθηκαν κάθε φορά μας παρέχουν εικόνα για όλη την έκταση των AZF περιοχών (**Κεφ. 4, Παρ4.1.1**) (Simoni et al., 2004). Επειδή ακριβώς οι ανευρισκόμενες ελλείψεις καλύπτουν περισσότερα του ενός γονίδια δεν είναι δυνατή η ακριβής συσχέτιση μεταξύ συγκεκριμένου φαινοτύπου με αντίστοιχο γονιδιακό έλλειμμα σε κάποια από τις AZF περιοχές.

Επίσης, ο ασθενής, στον οποίο προσδιορίστηκε διπλό έλλειμμα στις AZFa και AZFb περιοχές, είχε διαγνωσθεί με ενδιάμεση ολιγοσπερμία ($8,6 \times 10^6$ σπερματοζωάρια/ml). Στην περίπτωση αυτή, εξαιτίας του διπλού ελλείμματος θα αναμέναμε το άτομο αυτό να έχει αζωοσπερμία και να παρουσιάζει SCO σύνδρομο, σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας. Η παρουσία όμως ικανού αριθμού σπερματοζωαρίων ώστε να καταταχθεί στην κατηγορία της ενδιάμεσης ολιγοσπερμίας ενδεχομένως αποδεικνύει την ύπαρξη περιοχών στους όρχεις όπου εξελίσσεται φυσιολογικά η διαδικασία της σπερματογένεσης (ιστολογική εικόνα όμοια με το SCO σύνδρομο τύπου II).

Όσον αφορά το δεύτερο μέρος της μελέτης, από τους 100 ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα που μελετήθηκαν, όλοι βρέθηκαν ομόζυγοι (G197G) (**Κεφ. 4, Παρ4.2.3, Εικόνα 42**) και επομένως η συμβολή του πολυμορφισμού SNP G197T του γονιδίου της πρωταμίνης-1 είναι μηδενική όσον αφορά την ιδιοπαθή υπογονιμότητα των ατόμων της παρούσας εργασίας. Αυτό βέβαια μπορεί να οφείλεται είτε στον μικρό αριθμό δειγμάτων του υπό μελέτη πληθυσμού είτε στο γεγονός ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός δεν έχει σημαντική συνεισφορά στην αιτιολογία της ιδιοπαθούς υπογονιμότητας, όπως προτείνεται και από άλλες μελέτες στις οποίες αυτός ο πολυμορφισμός είτε δεν ανευρέθη σε ασθενείς με ιδιοπαθή υπογονιμότητα (n=300) (Kichine et al., 2007), είτε προσδιορίστηκε σε μικρό αριθμό δειγμάτων (2 ασθενείς στους 281, όπου ο ένας εμφάνιζε σοβαρή ολιγοσπερμία με υψηλά ποσοστά θραύσης του DNA και ο άλλος είχε κανονικό αριθμό σπερματοζωαρίων αλλά παρακολουθούνταν για ανεξήγητη υπογονιμότητα) (Ravel et al., 2007). Σημειώνεται ότι, ο πολυμορφισμός SNP G197T διαπιστώθηκε σε δύο γόνιμους άνδρες (2 άτομα στους 672 γόνιμους άνδρες) στην μελέτη του Kichine και των συνεργατών του. Αυτή η παρατήρηση μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού μπορεί να επηρεάζει την αποδοτικότητα αναδιαμόρφωσης χρωματίνης κατά την σπερματογένεση, χωρίς όμως να μειώνει σημαντικά την γονιμότητα (Kichine et al., 2007).

Το σχετικά υψηλό ποσοστό της ετερόζυγης κατάστασης του πολυμορφισμού G197T που προσδιορίστηκε από την πρώτη μελέτη (Iguchi et al., 2006) (3 ασθενείς στους 30, 10%) ενδεχομένως να σχετίζεται με τα διαφορετικά κριτήρια επιλογής του υπό μελέτη πληθυσμού, ο οποίος περιελάμβανε ασθενείς με φυσιολογικές τιμές σπερματοζωαρίων αλλά με μορφολογικές ανωμαλίες (<4,4% τυπικές μορφές) ή/και αυξημένα ποσοστά θραύσης του DNA (> 27% κατετμημένο DNA). Στο εξεταζόμενο δείγμα του Ελληνικού πληθυσμού μόνο 16 άτομα είχαν φυσιολογικό αριθμό σπερματοζωαρίων, σύμφωνα με τις παραμέτρους του σπερμοδιαγράμματος, ενώ δεν διαθέταμε στοιχεία για τον παράγοντα θραύσης του DNA (DNA fragmentation).

Συνοψίζοντας λοιπόν, τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμπεραίνουμε ότι μόνο 3 από τα 100 άτομα (3%) έφεραν ελλείμματα στο Y χρωμόσωμα, ειδικότερα ένα άτομο με ενδιάμεση ολιγοσπερμία έφερε ελλείμματα στις AZFa και AZFb περιοχές και δυο άτομα με αζωοσπερμία έφεραν ελλείμματα στην AZFc περιοχή. Παράλληλα, ο πολυμορφισμός SNP G197T δεν ανευρέθη σε κανένα δείγμα του εξεταζόμενου πληθυσμού.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής είναι ενδεικτικά της γονοτυπικής σύστασης του εγχώριου Ελληνικού πληθυσμού και χρήζουν περαιτέρω αξιολόγησης με διεύρυνση των μελετούμενων δειγμάτων ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο όρος υπογονιμότητα περιγράφει την αδυναμία ενός ζεύγους να τεκνοποιήσει μετά από τουλάχιστον ενός έτους σεξουαλικών επαφών χωρίς προφυλάξεις. Προβλήματα υπογονιμότητας αντιμετωπίζει το 15% των ζευγαριών, εκ των οποίων το 40%-50% οφείλεται στον ανδρικό παράγοντα. Περιπτώσεις ανδρικής υπογονιμότητας στις οποίες δεν ανευρίσκεται προφανής αιτιολογικός παράγων αναφέρονται ως περιπτώσεις ιδιοπαθούς υπογονιμότητας.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, ένα ποσοστό, το οποίο κυμαίνεται από 2%-11% των περιπτώσεων ιδιοπαθούς υπογονιμότητας οφείλεται σε ελλείμματα στις AZF περιοχές του Y χρωμοσώματος. Ειδικότερα, έχουν προσδιοριστεί 3 περιοχές (AZFa, AZFb, AZFc) στο μεγάλο βραχίονα του Y (Yq) χρωμοσώματος οι οποίες εμπεριέχουν γονίδια τα οποία εμπλέκονται στην διαδικασία της σπερματογένεσης. Επίσης, πρόσφατες μελέτες (Iguchi et al., 2006; Ravel et al., 2007) ανέδειξαν την παρουσία μιας πολυμορφικής θέσης (SNP G197T) στο τέλος του πρώτου εξονίου του γονιδίου της πρωταμίνης-1, σε ένα ποσοστό ανδρών με ιδιοπαθή υπογονιμότητα. Ο πολυμορφισμός αυτός οδηγεί σε αντικατάσταση μιας συντηρημένης αργινίνης από σερίνη στην αμινοξική αλληλουχία της πρωταμίνης-1 (R34S), με ενδεχόμενες συνέπειες στο πακετάρισμα και την ακεραιότητα του DNA στην κεφαλή του σπερματοζωαρίου, γεγονός, που μπορεί να οδηγήσουν σε ιδιοπαθή υπογονιμότητα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός ελλειμμάτων στις περιοχές AZF του Y χρωμοσώματος καθώς και η ανίχνευση του πολυμορφισμού SNP G197T σε 100 άνδρες εντοπίας προέλευσης που παρακολουθούνται από την Ουρολογική Κλινική του Περιφερειακού Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Πατρών για προβλήματα υπογονιμότητας αγνώστου αιτιολογίας. Η προτεινόμενη μελέτη είναι η πρώτη του είδους της στον ελληνικό πληθυσμό και επομένως παρουσιάζει ενδιαφέρον όσον αφορά την ανάδειξη του γενετικού υπόβαθρου της ανδρικής υπογονιμότητας στον ελληνικό χώρο.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από ολικό περιφερικό αίμα των ατόμων και εν συνεχεία ακολούθησε ανίχνευση των ελλειμμάτων μέσω Multiplex PCR με τη χρήση εκκινητών STS ειδικών για κάθε περιοχή AZF. Επίσης, όσον αφορά τον πολυμορφισμό SNP G197T πραγματοποιήθηκε PCR ώστε να απομονωθεί το γονίδιο της πρωταμίνης-1 και εν συνεχεία κατάτμηση του προϊόντος με το ένζυμο περιορισμού BseRI (δημιουργία RFLP) προκειμένου να προσδιοριστούν ομόζυγα

(G/G) και ετερόζυγα άτομα (G/T) (η παρουσία του αλληλομόρφου T έχει σαν αποτέλεσμα την κατάργηση της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου BseRI).

Τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι μόνο 3 από τα 100 άτομα (3%) έφεραν ελλείμματα στο Υ χρωμόσωμα, ειδικότερα ένα άτομο με ενδιάμεση олиγοσπερμία έφερε ελλείμματα στις AZFa και AZFb περιοχές και δυο άτομα με αζωοσπερμία έφεραν ελλείμματα στην AZFc περιοχή. Παράλληλα, ο πολυμορφισμός SNP G197T δεν ανευρεθεί σε κανένα δείγμα του εξεταζόμενου πληθυσμού.

1.2 Η αλληλουχία της πρωτεΐνης πρωταμίνης-1

Protein ID: [NP_002752.1](#)

Size: 51 aa

1 MARYRCCRSQ SRSRYRQRQ RSRRRRRRSC QTRRRAMRCC RPRYRPRCRR

51 H

Η παρουσία του SNP G197T οδηγεί στην αντικατάσταση της αργινίνης (R) στο αμινοξύ 34 σε σερίνη (S), με αποτέλεσμα να προκύπτει η παρακάτω αλληλουχία

1 MARYRCCRSQ SRSRYRQRQ RSRRRRRRSC QTRSRAMRCC RPRYRPRCRR

51 H

1.3 Πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης πρωταμίνης-1

Με την χρήση του προγράμματος Robson's secondary structure prediction program πραγματοποιήθηκε η πρόβλεψη της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης της πρωταμίνης-1, σύμφωνα με την οποία στις θέσεις 15, 16, 32, 33, 35 και 36 δημιουργούνται β πτυχωτές δομές (β έλικες).

Secondary structure prediction (*H = helix, E = strand, - = no prediction*)

-----HH-----HH-HH-----

Η παρουσία του SNP G197T έχει σαν αποτέλεσμα να διαταράσσεται η β πτυχωτή δομή της πρωτεΐνης πρωταμίνης-1, ειδικότερα καταργούνται οι β έλικες στις θέσεις 32, 33 και 35.

Secondary structure prediction (*H = helix, E = strand, - = no prediction*):

-----HH-----H-----

8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ♦ Μπαρμπαλιάς Γ.Α., (2004), Ουρολογία, 2^η Έκδοση, Εκδόσεις Tyrorama
- ♦ Τριανταφυλίδης Κ. και Κουβάτση Α., (2003), Γενετική Ανθρώπου, 3^η Έκδοση, Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη
- ♦ Affara N.A., (2003), The role of the Y chromosome in male infertility, *Reproductive Medicine Review*, **11**(2):67–85
- ♦ Agarwal et al.,(2003), Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility, *Human Reproduction Update*, **9**(4):331-345
- ♦ Aoki et al.,(2003), Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility, *Asian J Androl*, **5**: 315-324
- ♦ Aoki et al.,(2005), DNA integrity is compromised in protamine-deficient sperm. *J Androl* **26**,741–748.
- ♦ Aoki et al.,(2006), A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency, *Molecular Human Reproduction*, **12**(1):41-50
- ♦ Aoki et al.,(2006), Identification of novel polymorphisms in the nuclear proteins genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility, *Fertil.Steril.*,**86**:1416-1422
- ♦ Angelopoulou et al.,(2007), Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA, *Reproductive Biology and Endocrinology*, **5**(36):
- ♦ Baker et al., (1996), Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genet.* **13**, 336-342
- ♦ Balhorn et al.,(1988), Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* **44**,52–55.
- ♦ Balhorn et al.,(2000), DNA Condensation by Protamine and Arginine-Rich Peptides: Analysis of Toroid Stability Using Single DNAMolecules, *Molecular Reproduction And Development* , **56**:230–234
- ♦ Bartoloni et al., (2004), Lack of the T54A polymorphism of the DAZL gene in infertile Italian patients, *Molecular Human Reproduction*, **10**(8):613-615

- ♦ Bellovits O. et al., (2006), Chromosomal aneuploidy in Azoospermic men, *Int.J.Hum.Genet.*,**6**(2):171-176
- ♦ Benchaib et al., (2003), Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum Reprod.* **18**:1023-1028.
- ♦ Biegeleisen K.,(2006), The probable structure of the protamine–DNA complex, *Journal of Theoretical Biology*, **241**:533–540
- ♦ Blanchard et al.,(1990), Anomalous distribution of nuclear basic proteins in round-headed human spermatozoa. *Andrologia*, **22**,549–555.
- ♦ Bramlage et al., (1997),Differential expression of the murine histone genes H3.3A and H3.3B. *Differentiation* **62**, 13–20
- ♦ Braun R.E., 2001, Packaging paternal chromosomes with protamine, *NATURE GENETICS*, **28**:10-12
- ♦ Brewer et al.,(1999), Protamine-induced condensation and decondensation of the same DNA molecule,*Science*,**286**:120-123
- ♦ Brewer et al.,(2003), Dynamics of Protamine 1 Binding to Single DNA Molecules, *The Journal Of Biological Chemistry*,**278**(43): 42403–42408
- ♦ Burgoyne PS ., 1996, Fruit(less) flies provide a clue. *Nature* , **381**: 740–741
- ♦ Cadman S.M. et al.,(2007), Molecular Pathogenesis of Kallmann’s Syndrome, *Horm Res* ,**67**:231–242
- ♦ Carrell et al., (2003), Sperm DNA fragmentation is increased in couples with unexplained recurrent pregnancy loss. *Arch Androl* , **49**:49-55.
- ♦ Carrell et al., (2007), Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link?, *Human Reproduction Update*, **13**(3):313–327.
- ♦ Chillon M., et al., (1995), Mutations In The Cystic Fibrosis Gene And Absence Of The Vas Deferens, *The New England Journal Of Medicine*, **332**(22):1475-1480
- ♦ Chaganti et al.,(1980), Genetically determined asynapsis, spermatogenic degeneration and infertility in men. *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 833-848.
- ♦ Cho et al., (2001), Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* **28**,82–86.
- ♦ Cho et al., (2003), Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice. *Biol Reprod* , **69**,211–217.
- ♦ Cram D. et al., (2006),Y chromosome microdeletions: implications for assisted conception, *The Medical Journal of Australia*, **185**(5):433-434

- ♦ Dadoune J.P.,(2003), Expression of Mammalian Spermatozoal Nucleoproteins, *Microscopy Research And Technique*, **61**:56–75
- ♦ de Kretser et al., (1999),Infertility in men:recent advances and continuing controversies, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **84**:3443-3449
- ♦ Edwards et al., (1997), On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 549-54.
- ♦ Elliott et al., (1998), Dynamic changes in the subnuclear organisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *J Cell Sci* , **111**:1255–1265
- ♦ Erenpreiss et al., (2006), Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects, *Asian J Androl.* **8** (1): 11–29
- ♦ Feinberg A.P., (2007),Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease, *NATURE*, **447**:433-440
- ♦ Ferlin et al., (2006), Genetic causes of male infertility, *Reproductive Toxicology*, **22**:133-141
- ♦ Foresta et al., (2001), Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, **22**(2):226-239
- ♦ Fuentes-Mascorro G. et al., (2000), Sperm Chromatin, *Archives Of Andrology*, **45**:215–225
- ♦ Giannouli G. et al., (2004), Idiopathic non-obstructive azoospermia or severe oligozoospermia: a cross-sectional study in 61 Greek men, *International Journal of Andrology*, **27**: 101-107
- ♦ Gianotten et al.,(2004), Idiopathic impaired spermatogenesis: genetic epidemiology is likely to provide a short-cut to better understanding, *Human Reproduction Update*, **10**(6):533-539
- ♦ Graumann et al., (1998), A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain, *TIBS*, **23**:286-290.
- ♦ Greco et al., (2005), Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod* **20**,226–230.
- ♦ Hendzel et al., (2004),The C-terminal domain is the primary determinant of histone H1 binding to chromatin in vivo. *J. Biol. Chem.* **279**, 20028–20034
- ♦ Hinderer et al., (1978), Sertoli-cell-only-syndrome. Histology and pathogenesis, *Schweiz Med Wochenschr.*,**108**(23):858-66.

- ♦ Huang et al., (2005),Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. *Fertil Steril*, **84**:130-140.
- ♦ Iguchi et al., (2006), An SNP in protamine-1:a possible genetic cause of male infertility?. *J. Med. Genet.*,**43**:382-384
- ♦ Ioulianos et al., (2004), A nation-based population screening for azoospermia factor deletions in Greek-Cypriot patients with severe spermatogenic failure and normal fertile controls, using a specific study and experimental design *International Journal of Andrology*, **25**:153-158
- ♦ Iwasaki A, Gagnon C., (1992), Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril.*, **57**:409–416
- ♦ Jarro J.P., (2001), Effects of varicocele on male infertility, *Human Reproduction Update*, **7**(1):59-64
- ♦ Jeske et al., (1995), Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge. *Nat Genet* , **10**:480–482
- ♦ Junqueira J.Carlos, Carneiro Jose, O.Kelley Robert, Βασική Ιστολογία, 6^η Έκδοση, Εκδόσεις Πασχαλίδης,1991
- ♦ Kastner et al., (1996), Abnormal spermatogenesis in RXR beta mutant mice. *Genes & Dev.* **10**, 80-92
- ♦ Kent-First et al.,(1996), The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol. Hum. Rep.* **2**, 943-950.
- ♦ Kimmins et al.,(2005), Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells, *NATURE*, **434**:583-289
- ♦ Koopman P., (1999), Sry and Sox9: mammalian testis-determining genes. *Cell Mol Life Sci* , **55**:839–856
- ♦ Krausz et al., (1999), Y chromosome and male infertility, *Frontiers in Bioscience*, **4**:1-8
- ♦ Krausz et al., (2000), Prognostic value of Y deletion analysis, *Human Reproduction*, **15**:1431-1434
- ♦ Krausz et al., (2005), Genetic control of spermiogenesis: insights from the CREM gene and implications for human infertility. *Reprod Biomed Online.* **10**,64–71.
- ♦ Krausz et al., (2006), Y chromosome and male infertility: Update 2006, *Frontiers in Bioscience*, **11**: 3049-3061

- ♦ Laberge et al., (2005), Chromatin Remodeling In Spermatids: A Sensitive Step For The Genetic Integrity Of The Male Gamete, *Archives of Andrology*, **51**:125–133
- ♦ Lahn et al., (1997), Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*, **278**:675–680
- ♦ Lambard et al., (2004), Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod.* **10**,535–541
- ♦ Lee et al., (1995), Premature translation of protamine-1 mRNA causes precocious nuclear condensation and arrests spermatid differentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**,12451–12455.
- ♦ Le Bourhis C. et al., (2000), Y chromosome microdeletions and germinal mosaicism in infertile males. *Mol Hum Reprod*,**6**:688-693
- ♦ Lewis et al., (2004), Histone H1 and the origin of protamines, *PNAS*,**101**(12): 4148–4152
- ♦ Lilford et al., (1994), Case-control study of wheter subfertility in men is familial. *B.M.J.* **309**, 570-573.
- ♦ Linder P., (2006), Dead-box proteins: a family affair-active and passive players in RNP-remodelling, *Nucleic Acid Research*, **34**(15):4168-4180
- ♦ Lynch M. et al., (2005), The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility, *Molecular Human Reproduction*, **11**(7):507-512
- ♦ Mahadevaiah et al., (1998), Mouse homologues of the human AZF candidate gene RBM are expressed in spermatogonia and spermatids, and map to a Y chromosome deletion interval associated with a high incidence of sperm abnormalities. *Hum Mol Genet*, **7**:715–727
- ♦ Mangs H. et al., (2007), The human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin,Function and Future, *Current Genomics*, **8**(2):129-136
- ♦ Martins et al., (2004), Nuclear matrix interactions at the human protamine domain: a working model of potentiation. *J Biol Chem* , **279**,51862–51868.
- ♦ McKay et al., (1985), The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci Rep*, **5**: 383-91
- ♦ Mengual et al., (2003), Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl* **24**,438–447.

- ♦ Miescher F., (1874), Das Protamin – Eine neue organische Basis aus den Samenfaden des Rheinlachs. *Ber Dtsch Chem Ges* **7**,376.
- ♦ Morris et al., (2002), The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, **17**:990-998.
- ♦ Mudrak et al., (2005), Chromosome architecture in the decondensing human sperm nucleus, *Journal of Cell Science* **118**, 4541-4550
- ♦ Najmabadi et al., (1996), Genomic structure of a Y-specific ribonucleic acid binding motif-containing gene: a putative candidate for a subset of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab*, **81**:2159–2164
- ♦ Nayernia. et al., (2003), Male mice lacking three germ cell expressed genes are fertile. *Biol. Reprod.* **69**, 1973–1978
- ♦ Okabe et al., (1998), Male infertility and the genetics of spermatogenesis, *Am.J.Hum.Genet.*, **62**:1274-1281
- ♦ Oliva R., (2006), Protamines and male infertility, *Human Reproduction Update*,**12**(4): 417–435.
- ♦ Oliva R and Dixon GH, (1991), Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **40**,25–94.
- ♦ Paduch Darius A., (2006), Testicular cancer and male infertility, *Current Opinion in Urology*, **16**(6):419-427
- ♦ Papoutsopoulou S. et al., (1999), SR –protein specific kinase 1 is highly expressed in testis and phosphorylates protamine 1, *Nucleic Acid Research*, **27**(14):2972-2980
- ♦ Patsalis P.C. et al., (2002), Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet*, **360**:1222-1224
- ♦ Peschon et al., (1987), Spermatid specific expression of protamine 1 in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**,5316–5319.
- ♦ Raicu et al., (2003), Screening for microdeletions in human Y chromosome – AZF candidate genes and male infertility, *J.Cell.Mol.Med.*,**7**:43-48
- ♦ Repping et al., (2002), Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *American Journal of Human Genetics*, **71**, 906–922.
- ♦ Rosa Maduro et al., (2003), Genes and male infertility: What can go wrong?, *Journal of Andrology*,**24**:485-493

- ♦ Rousseaux et al., (2005), Establishment of male-specific epigenetic information, *Gene*, **345**:139–153
- ♦ Ruggiu et al., (1997), The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature*. **389**, 73-77.
- ♦ Sadler T.W., Ιατρική Εμβρυολογία, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, 1999.
- ♦ Salas-Cortes et al., (1999), The human SRY protein is present in fetal and adult Sertoli cells and germ cells. *Int J Dev Biol* , **43**:135–140
- ♦ Sassoni-Corsi P., (2002), Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis, *Science*, **296**:2176-2178
- ♦ Saxena et al., (1996), The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet* , **14**:292–299
- ♦ Schmid et al., (2001), Sperm nuclear matrix association of the PRM1-PRM2-TP2 domain is independent of Alu methylation, *Molecular Human Reproduction*, **7**:903-911
- ♦ Seshagiri P.B., (2001), Molecular insight into the causes of male infertility, *J.Biosci.*, **26**:429-435.
- ♦ Sergerie et al., (2005), Sperm DNA fragmentation: threshold value for male infertility, *Human Reproduction*, **20**(12):3446-3451
- ♦ Shafic et al., (2006), Sperm DNA Fragmentation, *Archives of Andrology*, **52**:197–208
- ♦ Shaman et al., (2007), Function of the Sperm Nuclear Matrix, *Archives of Andrology: Journal of Reproductive Systems*, **53**:135–140
- ♦ Siffroi J.P. et al., (2000), Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions, *Hum Reprod*, **15**:2559-2562
- ♦ Simoni, M. et al., (1999), Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. *International Journal of Andrology*, **22**:292–299.
- ♦ Simoni et al., (2004), EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y chromosomal microdeletions. State of the art 2004, *International Journal of Andrology*, **27**:240-249
- ♦ Sismani C. et al., (2002), A nation-based population screening for azoospermia factor deletions in Greek-Cypriot patients with severe spermatogenic failure and normal fertile controls, using a specific study and experimental design *International Journal of Andrology*, **25**:153-158

- ♦ Stach et al., (2002), Phylogeny of tunicata inferred from molecular and morphological characters, *Mol. Phylogenet. Evol.* **25**, 408–428.
- ♦ Steger et al., (1998), Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* , **4**: 939-45.
- ♦ Steger et al., (2000), Expression of protamine-1 and -2 mRNA during human spermiogenesis. *Mol Biol Evol.* **17**: 278-83
- ♦ Steger et al., (2001), Round spermatids from infertile men exhibit decreased protamine-1 and -2 mRNA, *Human Reproduction*, **16**(4):709-716
- ♦ Steger et al., (2003), Decreased protamine-1 transcript levels in testes from infertile men, *Molecular Human Reproduction*, **9**(6):331-336
- ♦ Steger K., (2003), Possible predictive factors of ICSI? Molecular biology techniques in combination with therapeutic testicular biopsies, *Andrologia*, **35**:200-208
- ♦ Subirana et al., (1973), Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 364–379.
- ♦ Tanaka et al., (2003), Single nucleotide polymorphisms in the protamine-1 and -2 genes of fertile and infertile human male populations, *Molecular Human Reproduction*, **19**(2):69-73
- ♦ Tanaka et al., (2005), Gene expression in spermatogenesis, *Cell Mol. Life Sci.*, **62**:344-354
- ♦ Tiepolo and Zuffardi, (1976), Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* , **34**:119–124
- ♦ Vilfan et al., (2004), Formation of Native-like Mammalian Sperm Cell Chromatin with Folded Bull Protamine, *The Journal Of Biological Chemistry*, **279**(19): 20088–20095
- ♦ Vinci G. et al., (2005), A deletion of a novel heat shock gene on the Y chromosome associated with azoospermia, *Molecular Human Reproduction*, **11**(4):295-298
- ♦ Virro et al., (2004), Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil.Steril.* **81**:1289-1295.

- ♦ Vogt et al., (1995), The azoospermia factor [AZF] of the human Y chromosome in Yq11: function and analysis in spermatogenesis, *Reprod.Fertil.Dev.*, **7**:685-693
- ♦ Vogt et al., (1996), Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, **5**, 933–943.
- ♦ Vogt et al., (1997), Report of the Third International Workshop on Y Chromosome Mapping 1997. *Cytogenet Cell Genet*, **79**:1–20
- ♦ Ward and Coffey, (1991), DNA Packaging and Organization in Mammalian Spermatozoa: Comparison with Somatic Cells, *Biology Of Reproduction* **44**, 569-574
- ♦ WHO, (1992), Laboratory manual for the examination of the human semen and semen-cervical mucus interaction, 3rd edn, Cambridge University Press, Cambridge
- ♦ Wykes et al., (1997), Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. **3**: 15-9.
- ♦ Yen et al., (1990), Frequent deletions of the human X chromosome distal short arm result from recombination between low copy repetitive elements. *Cell*. **61**, 603-610. Yen PH., (1999), Advances in Y chromosome mapping, *Curr Opin Obstet Gynecol*, **11**:275–281
- ♦ Zalensky et al., (2002), Human testis/sperm-specific histone H2B (hTSH2B). Molecular cloning and characterization. *J. Biol. Chem*. **277**, 43474–43480
- ♦ Zalenskaya and Zalensky (2004), Non-random positioning of chromosomes in human sperm nuclei, *Chromosome Res*. **12**:163–173
- ♦ Zalensky and Zalenskaya., (2007), Organization of chromosomes in spermatozoa: an additional layer of epigenetic information?, *Biochemical Society Transactions*, **35**(3):609-611
- ♦ Zhang et al., (2006), Sperm Nuclear Histone to Protamine Ratio in Fertile and Infertile Men: Evidence of Heterogeneous Subpopulations of Spermatozoa in the Ejaculate, *Journal of Andrology*, **27**(3): 414-420
- ♦ Zhao et al., (2001), Targeted disruption of the transition protein 2 gene affects sperm chromatin structure and reduces fertility in mice. *Mol Cell Biol* , **21**, 7243–7255.
- ♦ Zheng Li et al., (2008), "Micro-deletions" of the human Y chromosome and their relationship with male infertility, *J.Genet.Genomics*, **35**:193-199
- ♦ Zini A. and Libman J., (2006), Sperm DNA damage: clinical significance in era of assisted reproduction, *CMAJ*, **175**(5):495-500

Ηλεκτρονικές Διευθύνσεις

<http://www.gdb.org/hugo/chrY/geneMaps.html>, Απρίλιος 2007

<http://male-subfertility.tripod.com>

www.wikipedia.com/spermatogenesis