



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα

Χριστίνα Μ. Σαλίγινα

ΑΘΗΝΑ

Οκτώβριος 2018

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Χριστίνα Μ. Σαλίγινα

A.M.: 20161032

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μαιευτικής-γυναικολογίας της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, διευθυντή της Α΄ Μαιευτικής και Γυναικολογικής κλινικής του Νοσοκομείου “Αλεξάνδρα” κύριο Λουτράδη Δημήτριο, καθώς και τον υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» κύριο Δρακάκη Πέτρο για την ευκαιρία που μου προσέφεραν να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα μελέτης.

Επιπλέον οφείλω να ευχαριστήσω την κυρία Μαυρογιάννη Δέσποινα, καθηγήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Αναπαραγωγική – Αναγεννητική Ιατρική» μέλος Ε.Δ.Ι.Π. και υπεύθυνη επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσας διπλωματικής εργασίας για την αμέριστη συμπαράσταση και επιστημονική υποστήριξη καθ’όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κωνσταντόπουλο Φειδία, αγαπημένο φίλο μου δημοσιογράφο του Αθηναϊκού Πρακτορείου Ειδήσεων, για το έλεγχο της γραμματικής - συντακτικής ορθότητας και της ορθογραφίας, του κειμένου της μελέτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα την διακεκριμένη στοματολόγο απόφοιτη του Πανεπιστημίου Harvard Δρ. Στουφή Ελεάνα, για την καθοδήγηση και συμβολή της στην ενασχόληση μου με το αντικείμενο της υπογονιμότητας. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για την αμέριστη υποστήριξη και την αγάπη που μου προσφέρει. Χάρη σε αυτήν απέκτησα όνειρα και έβαλα στόχους, θέλω να την ευχαριστήσω για το δρόμο της γνώσης που μου επέδειξε. Είναι πολύ σημαντικό να βρεθεί το ιδανικό πρότυπο σε κάθε άνθρωπο, για μένα προσωπικά αυτό το πρότυπο βρίσκεται στο πρόσωπο της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την λατρεμένη οικογένεια μου, την Σαλίγινα Ελένη, τον Μίχο Ευάγγελο και την Μίχου Ναυσικά για την ψυχολογική και πνευματική υποστήριξη στην σταδιοδρομία μου και την αγάπη που μου χαρίζουν.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	5
ABSTRACT	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	10
Κεφάλαιο 1	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
Ανατομία και Φυσιολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος	12
Ανατομία αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών	12
Εισαγωγή	12
Όρχεις	13
Επιδιδυμίδα	14
Σπερματικός Πόρος	15
Σπερματοδόχος κύστη	15
Προστάτης	16
Βολβουρηθραίοι Αδένες	17
Χαρακτηριστικά των έξω γεννητικών οργάνων	17
Φυσιολογία αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών	18
Σπερματογένεση	18
Φάσεις της σπερματογένεσης	19
1. Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων	21
2. Μείωση	24
3. Σπερμιογένεση	28
4. Σπερμίαση	29
Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάκια	30
Τα κύτταρα Sertoli	30

Τα ενδιάμεσα κύτταρα Leydig	35
Η χρωματίνη του σπέρματος, το DNA, οι πρωταμίνες και ο ψευδάργυρος	35
Σπέρμα	37
Χαρακτηριστικά του Σπερματοζωαρίου	37
Ανδρική υπογονιμότητα	38
Ορισμός της ανδρικής υπογονιμότητας	38
Αιτιολογία της ανδρικής υπογονιμότητας	42
Διάγνωση	42
Ανάλυση σπέρματος	42
Ορμονικός έλεγχος	44
Γενετική εκτίμηση	44
Τύποι μεταλλάξεων	46
Κεφάλαιο 2	48
ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ	48
Μεταλλάξεις που σχετίζονται με αζωσπερμία	49
Αζωσπερμία	49
Μεταλλάξεις <i>SYCP3</i> και <i>SYCE1</i> με φαινότυπο αζωσπερμίας	51
Λειτουργίες <i>SYCP3</i> και <i>SYCE1</i> πρωτεϊνών του συναπτομερούς	51
Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>SYCP3</i>	54
Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>SYCE1</i>	57
Μετάλλαξη <i>HSF2</i> με φαινότυπο αζωσπερμίας	59
Λειτουργία του παραγόντου θερμικού σοκ <i>HSF2</i>	59
Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>HSF2</i>	63
Μεταλλάξεις <i>TAF4B</i> και <i>ZMYND15</i> που σχετίζονται με αζωσπερμία	65
Λειτουργία της πρωτεΐνης <i>TAF4B</i>	65
Μετάλλαξη του γονιδίου <i>TAF4B</i>	71

Λειτουργίες της πρωτεΐνης ZMYND15	72
Μετάλλαξη του γονιδίου ZMYND15	74
Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις αζωσπερμίας	75
Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την олиγοσπερμία	77
Ολιγοσπερμία	77
Μετάλλαξη KLHL10 με φαινότυπο олиγοσπερμίας	77
Λειτουργία της πρωτεΐνης KLHL10	77
Μεταλλάξεις του γονιδίου KLHL10	79
Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις олиγοσπερμίας	82
Μεταλλάξεις που σχετίζονται με τερατοσπερμία	83
Τερατοσπερμία	83
Μακροζωοσπερμία (Macrozoospermia)	83
Μεταλλάξεις AURKC με φαινότυπο μακροζωοσπερμίας	84
Λειτουργία πρωτεϊνικής κινάσης Aurora- AURKC	84
Μεταλλάξεις του γονιδίου AURKC	89
Σφαιροζωοσπερμία (Globozoospermia)	93
Μεταλλάξεις DPY19L2 με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας	96
Λειτουργία της πρωτεΐνης DPY19L2	96
Μεταλλάξεις του γονιδίου DPY19L2	98
Μετάλλαξη SPATA16 με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας	101
Λειτουργία της πρωτεΐνης SPATA16	101
Μεταλλάξεις του γονιδίου SPATA16	103
Μετάλλαξη PICK1 με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας	104
Λειτουργία της πρωτεΐνης PICK1	104
Μεταλλάξεις του γονιδίου PICK1	106
Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις τερατοσπερμίας	107
Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ασθενοζωοσπερμία	110

Ασθενοζωοσπερμία	110
Μεταλλάξεις <i>SEPT12</i> με φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας	111
Λειτουργία της πρωτεΐνης <i>SEPT12</i>	111
Μεταλλάξεις του γονιδίου <i>SEPT12</i>	113
Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις ασθενοζωοσπερμίας	116
Κεφάλαιο 3	118
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	118
Περίληπτικά τα συμπεράσματα	129
Κεφάλαιο 4	131
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΩΝ	131
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	134

ABSTRACT

Infertility is defined by the inability of child conception over a year. Infertility is estimated to affect about 50 million couples worldwide. Infertility affects about 15% of couples who want to conceive, while 50% of these cases are related to the male factor. In 30-40% of infertility cases the etiology of male infertility still remains unknown and is therefore defined as idiopathic male infertility. When assisted reproductive technologies are used to achieve pregnancy, an adequate genetic diagnosis of male infertility is of great importance in assessing whether a genetic abnormality will be transmitted to the offspring. In addition, there is a need for improved diagnostic biomarkers to assess the success rates of these assisted reproduction technologies. This study refers to the bibliography investigation on the mutations associated with various pathological phenotypes that regulate male infertility such as azoospermia, oligozoospermia, macrozoospermia, globozoospermia, asthenozoospermia. In conclusion, male infertility is a complex, multifactorial disorder whose underlying causes often remain unknown. Further investigation of the genetic and molecular lesions of spermatogenesis is necessary to improve diagnosis and develop more personalized therapies for men with idiopathic infertility.

Key words: Male infertility, male infertility mutations, spermatogenesis, gene function, gene damage, azoospermia, oligozoospermia, macrozoospermia, globozoospermia, asthenozoospermia, SYCP3, SYCE1, HSF2, TAF4B, ZMYND15, KLHL10, AURKC, DPY19L2, SPATA16, PICK1, SEPT12

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η υπογονιμότητα, που ορίζεται από την αδυναμία σύλληψης μετά από ένα έτος, εκτιμάται ότι αφορά περίπου 50 εκατομμύρια ζευγάρια παγκοσμίως. Η υπογονιμότητα επηρεάζει περίπου το 15% των ζευγαριών που θέλουν να συλλάβουν και 50% των περιπτώσεων αυτών σχετίζονται με το ανδρικό παράγοντα. Σε 30 - 40% των περιπτώσεων η αιτιολογία της ανδρικής υπογονιμότητας παραμένει άγνωστη και ονομάζεται ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα. Όταν χρησιμοποιούνται τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής για την επίτευξη εγκυμοσύνης, μια επαρκής γενετική διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας έχει μεγάλη σημασία για να εκτιμηθεί εάν μια γενετική ανωμαλία θα μεταδοθεί στους απογόνους. Επιπλέον, υπάρχει ανάγκη για καλύτερους διαγνωστικούς βιοδείκτες για να εκτιμηθούν τα ποσοστά επιτυχίας αυτών των τεχνολογιών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Αυτή η μελέτη αφορά την βιβλιογραφική διερεύνηση των μεταλλάξεων που σχετίζονται με διάφορους παθολογικούς φαινοτύπους που διέπουν την ανδρική υπογονιμότητα όπως αζωοσπερμία, ολιγοσπερμία, μακροζωοσπερμία, σφαιροζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία. Συμπερασματικά, η ανδρική υπογονιμότητα είναι μια σύνθετη, πολυπαραγοντική διαταραχή και οι υποκείμενες αιτίες συχνά παραμένουν άγνωστες. Περαιτέρω έρευνα των γενετικών και μοριακών βλαβών της σπερματογένεσης είναι απαραίτητη για τη βελτίωση της διάγνωσης και την ανάπτυξη πιο εξατομικευμένων θεραπειών για τους άνδρες με ιδιοπαθή υπογονιμότητα.

Λέξεις κλειδιά : Ανδρική υπογονιμότητα, μεταλλάξεις ανδρικής υπογονιμότητας, σπερματογένεση, λειτουργία γονιδίων, βλάβες γονιδίων, σφαιροζωοσπερμία, ασθενοζωοσπερμία, ολιγοσπερμία, αζωοσπερμία, μακροζωοσπερμία, SYCP3, SYCE1, HSF2, TAF4B, ZMYND15, KLHL10, AURKC, DPY19L2, SPATA16, PICK1, SEPT12

Κεφάλαιο 1

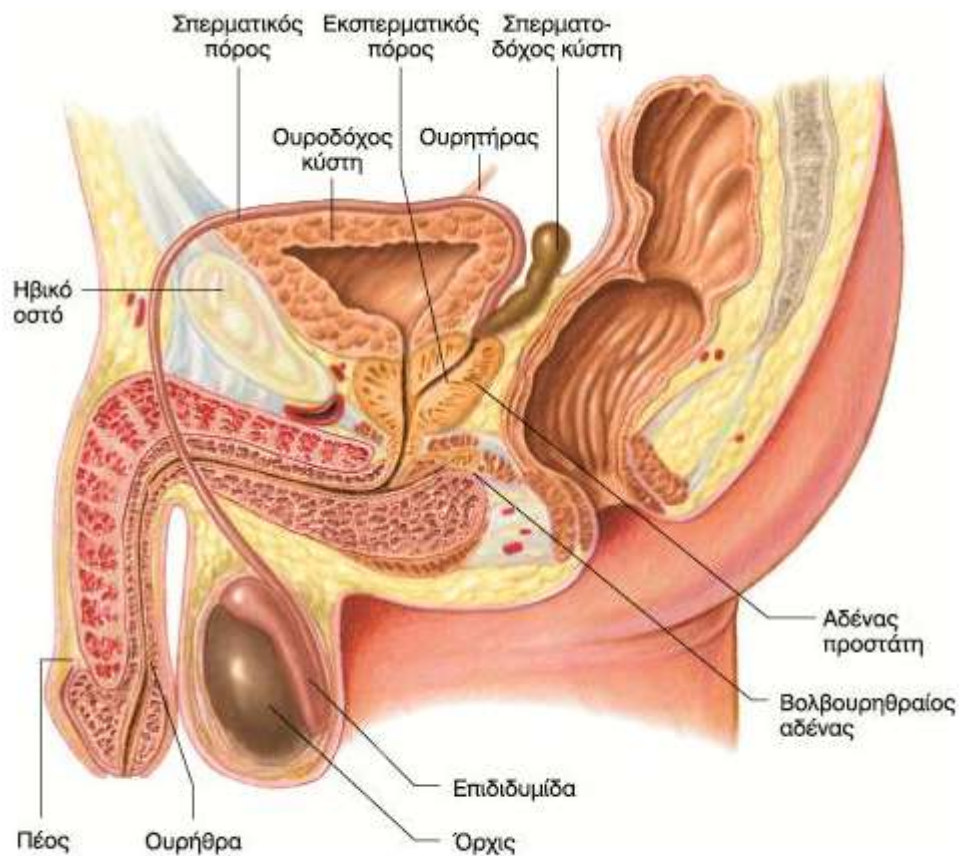
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ανατομία και Φυσιολογία του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος

Ανατομία αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών

Εισαγωγή

Το αναπαραγωγικό σύστημα των ανδρών έχει τα στοιχεία του στην κοιλιά, την πύελο και το περίνεο. Τα κύρια στοιχεία του είναι ο όρχις, η επιδιδυμίδα, ο σπερματικός πόρος και ο εκσπερματιστικός πόρος σε κάθε πλευρά, και η ουρήθρα και το πέος στην μέση γραμμή. Επιπρόσθετα, με το σύστημα αυτό σχετίζονται τρεις τύποι επικουρικών αδένων: ο προστάτης, ένα ζεύγος σπερματοδόχων κύστεων και ένα ζεύγος βολβουρηθραίων αδένων (Εικ. 1).



[Εικόνα 1] Ανατομικό διάγραμμα αναπαραγωγικού συστήματος άρρενος (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011)

Το αναπαραγωγικό σύστημα του άνδρα αποτελείται σε γενικές γραμμές από μια σειρά πόρων και σωληναρίων. Η τοπογραφική κατανομή των διαφόρων τμημάτων και η σύνδεσή τους με την ουροφόρα οδό αντανακλά την εμβρυϊκή τους ανάπτυξη. (Kahle W., Leonhardt H., Platzer W., 1985) (Παρασκευάς Γ., 2008)

Όρχεις

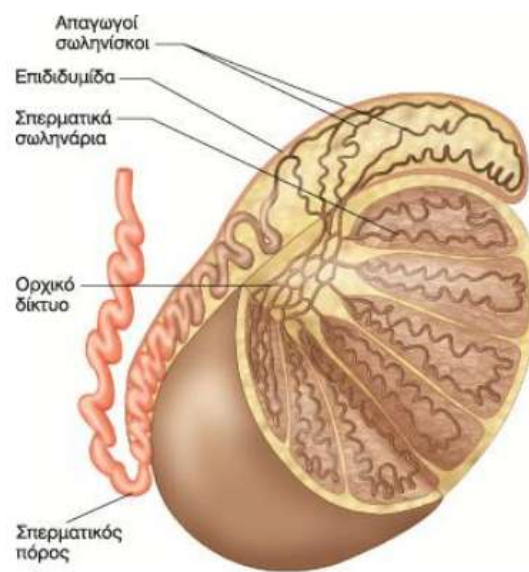
Οι όρχεις αναπτύσσονται αρχικά ψηλά στο οπίσθιο κοιλιακό τοίχωμα και μετά κατέρχονται, φυσιολογικά πριν από την γέννηση, διαμέσου του βουβωνικού πόρου στο όσχεο του περινέου. Κατά την κάθοδό τους οι όρχεις συμπαρασύρουν τα αιμοφόρα αγγεία, τα λεμφαγγεία και τα νεύρα τους, καθώς και τους κύριους αποχετευτικούς αγωγούς τους, τους σπερματικούς πόρους. Η λεμφική αποχέτευση των όρχεων κατευθύνεται, επομένως, προς τους παρααορτικούς λεμφαδένες στην κοιλιά και όχι στους βουβωνικούς ή τους πυελικούς λεμφαδένες. Αυτή η κάθοδος είναι σημαντική προϋπόθεση για τη φυσιολογική παραγωγή σπέρματος κατά την ενηλικίωση, αφού ο σχηματισμός του σπέρματος απαιτεί θερμοκρασία αρκετών βαθμών μικρότερη από την εσωτερική θερμοκρασία του σώματος. Ο κλιματισμός των όρχεων επιτυγχάνεται με τον κυκλοφορούντα αέρα γύρω από το όσχεο και με ένα μηχανισμό ανταλλαγής θερμότητας ο οποίος ανατομικά υποστηρίζεται από τα αιμοφόρα αγγεία που τροφοδοτούν τους όρχεις. Σε αντίθεση με τη σπερματογένεση, η έκκριση της τεστοστερόνης επιτελείται συνήθως σε φυσιολογική εσωτερική θερμοκρασία σώματος και συνεπώς εάν οι όρχεις δεν κατέλθουν εντός του όσχεου δεν ελαττώνεται η έκκριση της τεστοστερόνης. (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011)

Κάθε ένας από τους ελλειψοειδούς σχήματος όρχεις βρίσκεται κλεισμένος μέσα στο τελικό τμήμα ενός επιμήκους μυοπεριτονιακού θυλακίου, που αποτελεί συνέχεια του πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος και προβάλλει στο όσχεο. Ο σπερματικός τόνος είναι η σωληνοειδής σύνδεση μεταξύ του θυλάκου του όσχεου και του κοιλιακού τοιχώματος.

Οι πλάγιες και η πρόσθια επιφάνεια του όρχεος περιβάλλονται από ένα κλειστό περιτοναϊκό σάκο (τον ιδίως ελυτροειδή χιτώνα), ο οποίος αρχικά επικοινωνούσε με την κοιλιακή κοιλότητα. Φυσιολογικά, μετά την κάθοδο των όρχεων, η επικοινωνία αυτή καταργείται και παραμένει μόνο ένα ινώδες κατάλοιπο.

Κάθε όρχις αποτελείται από τα σπερματικά σωληνάκια, τον διάμεσο ιστό, και περιβάλλεται από μια παχιά θήκη ή κάψα από συνδετικό ιστό (ινώδης χιτώνας). Στα σπερματικά σωληνάκια παράγονται τα σπερματοζωάρια. Καθένα σπερματικό σωληνάριο οριοθετείται από μια βασική μεμβράνη και ένα στρώμα κυττάρων λείου μυός, τα οποία είναι υπεύθυνα για τις περισταλτικές κινήσεις των σωληναρίων. Στο κέντρο του κάθε σωληναρίου βρίσκεται ένας υγροφόρος αυλός που περιέχει τα σπερματοζωάρια. Το σωληναριακό τοίχωμα αποτελείται από τα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα και τα

κύτταρα Sertoli (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011). Τα 400-600 έντονα σπειροειδή σπερματικά σωληνάρια μετατρέπονται στο περιφερικό άκρο τους σε ευθεία σωληνάρια, που καταλήγουν σε ένα συλλεκτικό διαμέρισμα που ονομάζεται ορχικό δίκτυο ή δίκτυο του Haller και σχηματίζουν μια παχιά, κατακόρυφα προσανατολισμένη, γραμμοειδή σφήνα συνδετικού ιστού, το μεσαύλιο του όρχεος, που προέχει από την θήκη στην οπίσθια επιφάνεια του γεννητικού αδένα. Από το ανώτερο άκρο του ορχικού δικτύου αναδύονται 12 έως 20 περίπου απαγωγά εκφορητικά σωληνάρια, που διαπερνούν τον ινώδη χιτώνα και συνδέονται με την επιδιδυμίδα (Εικ. 2).



[Εικόνα 2] Τμήμα όρχεος (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011)

Επιδιδυμίδα

Η επιδιδυμίδα είναι ένας μακρύς ελικοειδής πόρος, που πορεύεται κατά μήκος της οπισθοπλάγιας επιφάνειας του όρχεος και αποτελείται από δυο ξεχωριστά τμήματα: τους εκφορητικούς πόρους (απαγωγά σωληνάρια), οι οποίοι σχηματίζουν μια διευρυμένη σπειροειδή μάζα που εντοπίζεται στον οπίσθιο άνω πόλο του όρχεος και σχηματίζει την κεφαλή της επιδιδυμίδας, και την ιδίως επιδιδυμίδα, η οποία είναι ένας μακρύς σπειροειδής πόρος, στον οποίο εκβάλλουν όλα τα απαγωγά σωληνάρια και που συνεχίζεται προς τα κάτω κατά μήκος του οπισθοπλάγιου χείλους του όρχεος, αποτελώντας το σώμα της επιδιδυμίδας. Στην συνέχεια διευρύνεται, σχηματίζοντας στον κάτω πόλο του όρχεος την ουρά της επιδιδυμίδας (Εικ. 2).

Στη διαδρομή τους μέσα από την επιδιδυμίδα, τα σπερματοζωάρια αποκτούν την ικανότητα να κινούνται και να γονιμοποιούν ένα ωάριο. Η επιδιδυμίδα αποτελεί, επίσης,

το χώρο αποθήκευσης σπερματοζωαρίων μέχρι την εκσπερμάτιση. Το τελικό άκρο της επιδιδυμίδας ενώνεται με τον σπερματικό πόρο (Εικ. 2).

Σπερματικός Πόρος

Ο σπερματικός πόρος είναι ένας μακρύς μυώδης αγωγός ο οποίος μεταφέρει τα σπερματοζωάρια από την ουρά της επιδιδυμίδας, που βρίσκεται στο όσχεο, στον εκσπερματιστικό πόρο, που βρίσκεται στην πυελική κοιλότητα. Πορεύεται προς τα πάνω στο όσχεο, αποτελώντας στοιχείο του σπερματικού τόνου, και διασχίζει το πρόσθιο κοιλιακό τοίχωμα, περνώντας από τον βουβωνικό πόρο.

Αφού περάσει από το βουβωνικό δακτύλιο, ο σπερματικός πόρος κάμπτεται προς τα έσω, γύρω από το αριστερό πλάγιο της κάτω επιγάστριας αρτηρίας, διασταυρώνεται με την έξω λαγόνια αρτηρία και την ομώνυμη φλέβα στην είσοδο της πυέλου και εισέρχεται στην πυελική κοιλότητα.

Στη συνέχεια πορεύεται προς τα κάτω και έσω, πάνω στο πυελικό τοίχωμα, κάτω από το περιτόναιο, και έρχεται πίσω από την ουροδόχο κύστη, όπου διασταυρώνεται με τον ουρητήρα. Από εκεί συνεχίζει την προς τα κάτω και έσω πορεία του κατά μήκος της βάσης της ουροδόχου κύστης, μπροστά από το ορθό και σχεδόν στην μέση γραμμή, όπου δέχεται την εκβολή της σπερματοδόχου κύστης. Με τη συμβολή του σπερματικού πόρου και της σπερματοδόχου κύστης σχηματίζεται ο εκσπερματικός πόρος (Εικ. 1).

Μεταξύ της θέσης όπου διασταυρώνεται με τον ουρητήρα και του εκσπερματικού πόρου, ο σπερματικός πόρος διατείνεται και σχηματίζει τη σπερματική λήκυθο. Ο εκσπερματικός πόρος περνά μέσα από τον προστάτη και εκβάλλει στην προστατική μοίρα της ουρήθρας. (Παρασκευάς Γ., 2008) (Albertine K.H., Morton D.A., Peterson K.D., 2008)

Σπερματοδόχος κύστη

Οι σπερματοδόχες κύστεις αποτελούν συμπληρωματικούς αδένες του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, οι οποίοι έχουν την μορφή μιας τυφλής σωληνοειδούς προσεκβολής του σπερματικού πόρου. Ο σωλήνας αυτός έχει σπειροειδή μορφή με πολλαπλές θυλακιοειδείς εκβλαστήσεις και περιβάλλεται από μια θήκη συνδετικού ιστού, αποτελώντας ένα επιμήκες μόρφωμα που εντοπίζεται μεταξύ της ουροδόχου κύστης και

του ορθού. Ο αδένας βρίσκεται αμέσως πλάγια-έξω από τον σπερματικό πόρο και ακολουθεί τη διαδρομή του στη βάση της ουροδόχου κύστης (Εικ. 1).

Ο πόρος της σπερματοδόχου κύστης ενώνεται με τον σπερματοδόχο πόρο και σχηματίζει τον εκσπερματικό πόρο. Οι εκκρίσεις από την σπερματοδόχο κύστη συμβάλλουν σημαντικά στον όγκο της εκσπερμάτισης (σπέρμα).

Η σπερματοδόχος κύστη συμβάλλει στο 85% του συνολικού σπερματικού υγρού. Η συγκεκριμένη κύστη εκκρίνει ένα κίτρινο, αλκαλικό και κολλώδες υγρό που περιέχει φρουκτόζη, ινωδογόνο, προσταγλανδίνες, βιταμίνη C, καθώς και άλλες πρωτεΐνες.

Προστάτης

Ο προστάτης είναι ένα επικουρικό μόρφωμα του ανδρικού αναπαραγωγικού συστήματος, το οποίο περιβάλλει την ουρήθρα στην πυελική κοιλότητα. Εντοπίζεται αμέσως κάτω από την ουροδόχο κύστη, πίσω από την ηβική σύμφυση και μπροστά από το ορθό (Εικ. 1).

Ο προστάτης έχει το σχήμα ενός αναποδογυρισμένου υποστρόγγυλου κώνου και εμφανίζει μια πλατύτερη βάση, που συνεχεται προς τα πάνω με τον αυχένα της ουροδόχου κύστης, και μια στενότερη κορυφή, που στηρίζεται στο πυελικό έδαφος. Οι κάτω πλάγιες επιφάνειες του προστάτη έρχονται σε επαφή με τους ανελκκτήρες μυς του πρωκτού, που τον υποβαστάζουν.

Ο προστάτης αποτελείται από 30-40 ανεξάρτητους σύνθετους αδένες, οι οποίοι αναπτύσσονται από το επιθήλιο της ουρήθρας. Το σύνολο των αδένων αυτών διευρύνει το τοίχωμα της ουρήθρας και σχηματίζει αυτό που είναι γνωστό ως προστάτης. Όλοι οι αδένες διατηρούν τους εκφορητικούς πόρους τους, που εκβάλλουν ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο στους ουρηθραίους κόλπους, που εντοπίζονται στην οπίσθια επιφάνεια του αυλού της ουρήθρας.

Οι προστατικές εκκρίσεις, από κοινού με τις εκκρίσεις των σπερματοδόχων κύστεων, συμβάλλουν στο σχηματισμό του σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση. Το υγρό που εκκρίνεται από τον προστάτη αποτελεί περίπου το ένα τρίτο του συνολικού όγκου του σπέρματος και περιέχει διάφορα ένζυμα, ψευδάργυρο και κιτρικό οξύ. Αν και το προστατικό υγρό είναι ελαφρώς όξινο, ένα άλλο υγρό στο σπέρμα που παράγεται από την σπερματοδόχο κύστη αφήνει το σπέρμα ελαφρώς αλκαλικό ή βασικό. Αυτή η

αλκαλικότητα βοηθάει στην προστασία του σπέρματος και παρατείνει τη ζωή του μετά την εναπόθεσή του στο όξινο περιβάλλον του κόλπου. Ένα από τα συστατικά του υγρού του προστάτη είναι ένα ένζυμο που ονομάζεται ειδικό προστατικό αντιγόνο (Prostate Specific Antigen - PSA) που βοηθά στη ρευστοποίηση του σπέρματος το οποίο πίζει μετά την εκσπερμάτιση. Η συγκεκριμένη δράση αραίωσης επιτρέπει στο σπέρμα να κολυμπά πιο ελεύθερα.

Οι εκσπερματιστικοί πόροι πορεύονται σχεδόν κατακόρυφα σε μια πρόσθια-κάτω κατεύθυνση μέσα στο οπίσθιο τμήμα του προστάτη και εκβάλουν στην προστατική μοίρα της ουρήθρας.

Βολβουρηθραίοι Αδένες

Οι βολβουρηθραίοι αδένες, ένας σε κάθε πλευρά, είναι μικροί βλεννογόνοι αδένες με σχήμα μπιζελιού, οι οποίοι συναντώνται μέσα στο εν τω βάθει κόλπωμα του περινέου. Βρίσκονται στα πλάγια της υμενώδους μοίρας της ουρήθρας και εντοπίζονται μεταξύ των ινών του έξω σφιγκτήρα της ουρήθρας. Ο πόρος κάθε αδένος πορεύεται προς τα κάτω και έσω δια μέσου του υμένα του περινέου και εκβάλλει στο βολβό της σηραγγώδους μοίρας της ουρήθρας, στη ρίζα του πέους.

Μαζί με μικρούς αδένες που εντοπίζονται κατά μήκος της σηραγγώδους μοίρας της ουρήθρας, οι βολβουρηθραίοι αδένες συμβάλλουν στη λίπανση της ουρήθρας και στην πριν από την εκσπερμάτιση έκκριση του πέους. (Albertine K.H., Morton D.A., Peterson K.D., 2008) (Drake R.L., Vogl W., Mitchell A.W., 2007)

Χαρακτηριστικά των έξω γεννητικών οργάνων

Τα επιφανειακά ανατομικά μέρη των ανδρικών γεννητικών οργάνων είναι το όσχεο και το πέος. Τα οσχεοχειλικά ογκώματα του εμβρύου συγχωνεύονται στη μέση γραμμή, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός και μόνο όσχεου, στο οποίο κατέρχονται από την κοιλιά οι όρχεις και τα σχετικά με αυτούς μυοαπονευρωτικά πέταλα, αιμοφόρα αγγεία, νεύρα και λεμφαγγεία μαζί με τους αντίστοιχους εκφορητικούς πόρους. Το πέος αποτελείται κυρίως από τα δυο σηραγγώδη σώματα του πέους και από το μοναδικό σηραγγώδες σώμα της ουρήθρας, το οποίο περιβάλλει την ουρήθρα.

Φυσιολογία αναπαραγωγικού συστήματος των ανδρών

Σπερματογένεση

Ήδη κατά διάρκεια της εμβρυϊκής ζωής του εμβρύου γίνεται η προετοιμασία των σπερματογονίων. Τα ανώριμα βλαστικά κύτταρα από την επιβλάστη μεταναστεύουν στον λεκθικό ασκό και εισβάλλουν στις σπερματικές χορδές (τα οποία θα γίνουν σπερματικά σωληνάκια στην εφηβεία) και στους δύο όρχεις και θα αρχίσουν να πολλαπλασιάζονται μέχρι την 18 εβδομάδα της εμβρυϊκής ζωής. Τα άλλα κύτταρα μέσα στις σπερματικές χορδές είναι τα κύτταρα Sertoli που επίσης πολλαπλασιάζονται σε αυτήν τη φάση. Τα σωματικά κύτταρα Sertoli και τα σπερματογόνια θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως μονάδα μελλοντικής παραγωγής σπέρματος. Εάν διαταραχθεί η μετανάστευση των γαμετικών κυττάρων (germ cells) τότε αυτά εκφυλίζονται, επομένως λίγα ή καθόλου σπερματογόνια θα παραμείνουν για παραγωγή σπέρματος, και τα μόνα κύτταρα που θα παραμείνουν θα είναι τα κύτταρα Sertoli. (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010)

Για την ανάπτυξη και διαφοροποίηση ενός Αρ σπερματογονίου σε ένα ώριμο σπέρμα τουλάχιστον τέσσερις κύκλοι σπερματογένεσης είναι απαραίτητοι. Υπολογίζεται ότι η συνολική διάρκεια της σπερματογένεσης είναι τουλάχιστον 64 ημέρες στον άνθρωπο. Πρέπει να επισημανθεί, ωστόσο, ότι μια πρόσφατη επανεξέταση συνιστά 74 ημέρες, καθώς συμπεριλαμβάνει το χρόνο για την ανανέωση σπερματογονίων (Amann 2008). (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010)

Η σπερματογένεση αποτελείται από τέσσερις διαφορετικές διαδικασίες. Πρώτη είναι η ανανέωση των βλαστικών κυττάρων.

Η σπερματογένεση, δηλαδή η διαδικασία της παραγωγής των σπερματοζωαρίων, αποτελεί μια συνεχή και περιοδική διαδικασία, που ξεκινά από την εφηβεία, με την έναρξη της κατά ώσεις έκκρισης των γοναδοτροπινών, και συνεχίζεται κατά τη μεγαλύτερη διάρκεια της ζωής του άνδρα (Μηντζιώρη Γ., Γουλής Δ.Γ.).

Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στο σπερματικό επιθήλιο των σπερματικών σωληναρίων. Κατά την εμβρυογένεση, αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (stem cells) μεταναστεύουν στους όρχεις και μετατρέπονται σε ανώριμα βλαστικά κύτταρα, που ονομάζονται σπερματογόνια. Τα σπερματογόνια διατάσσονται σε δύο ή τρεις στοιβάδες, στην εσωτερική επιφάνεια των σπερματικών σωληναρίων. Τα μόνα άλλα κύτταρα των σωληναρίων κατά αυτήν την χρονική περίοδο είναι τα κύτταρα Sertoli, που είναι

σωματικά (διπλοειδικά) κύτταρα, τα οποία δεν στηρίζουν απλώς τα βλαστικά κύτταρα, αλλά διαδραματίζουν έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην αλληλουχία των γεγονότων της σπερματογένεσης.

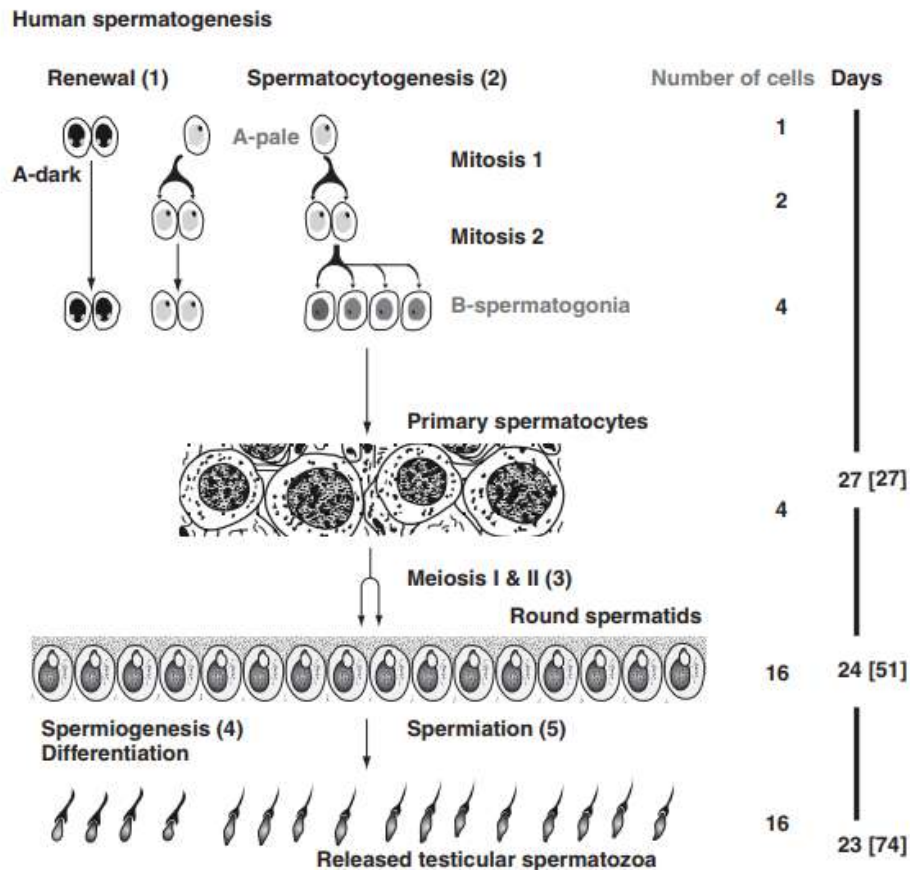
Κατά την εφηβεία, τα σπερματογόνια εισέρχονται στον κύκλο της σπερματογένεσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα και κατά ομάδες, που ονομάζονται «γενεές». Η ωρίμανση των κυττάρων που ανήκουν στην ίδια γενεά διακρίνεται σε διαδοχικές μιτωτικές, μειωτικές και μεταμειωτικές φάσεις. Τα σπερματογόνια πολλαπλασιάζονται με συνεχείς μιτωτικές διαιρέσεις. Στη συνέχεια, ορισμένα από αυτά, υφίστανται μείωση για να δώσουν, τελικά, γένεση στις απλοειδικές σπερματίδες, που με τη σειρά τους θα μετατραπούν σε σπερματοζώαρια.

Τα σπερματογόνια βρίσκονται στη βάση της πυραμίδας της σπερματογένεσης. Μπορούν να ανανεώνονται και να παράγουν ένα μεγάλο αριθμό διαφοροποιημένων βλαστικών κυττάρων. Η διατήρηση της φυσιολογικής σπερματογένεσης και επακόλουθα της γονιμότητας προϋποθέτει την ύπαρξη ισορροπίας μεταξύ της ανανέωσης των σπερματογόνιων και της διαφοροποίησής τους προς σπερματοζώαρια. Αυτές οι δύο διαδικασίες ρυθμίζονται τόσο από τη γονιδιακή έκφραση στα σπερματογόνια όσο και από εξωγενή σήματα, όπως τους διαλυτούς παράγοντες και τα μόρια προσκόλλησης από το ορχικό μικροπεριβάλλον.

Φάσεις της σπερματογένεσης

Τα στάδια σπερματογένεσης εμφανίζονται καλά ενορχηστρωμένα, όχι μόνο στο χρόνο αλλά και στο χώρο, η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως κύμα σπερματογένεσης (Εικ. 3,4).

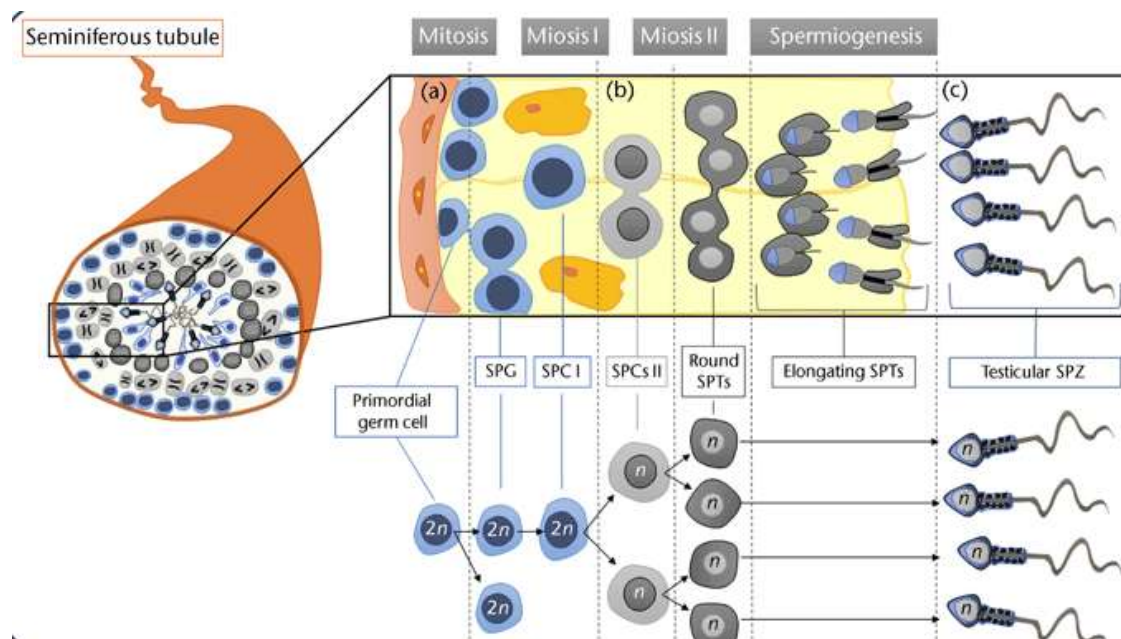
Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.



[Εικόνα 3] Σχηματική αναπαράσταση σπερματογένεσης (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010)

Ολόκληρη η διαδικασία της σπερματογένεσης μπορεί να χωριστεί σε τέσσερις φάσεις:

1. Μιτωτικός πολλαπλασιασμός και διαφοροποίηση διπλοειδών σπερματογονίων (germ cells) (σπερματογονιογένεση)
2. Μειωτική διαίρεση των τετραπλοειδών σπερματοκυττάρων που οδηγεί σε παράγωγή απλοειδών σπερματίδιων
3. Μετασχηματισμός σπερματίδιων σε σπέρμα όρχεων (σπερμιογένεση)
4. Απελευθέρωση σπερματοζωαρίων από το βλαστικό επιθήλιο στο σωληνοειδές αυλό (σπερμίαση).



[Εικόνα 4] Σχηματική αναπαράσταση σπερματογένεσης (El Inati E., Muller J., Viville S., 2012).

1. Πολλαπλασιασμός των σπερματογονίων

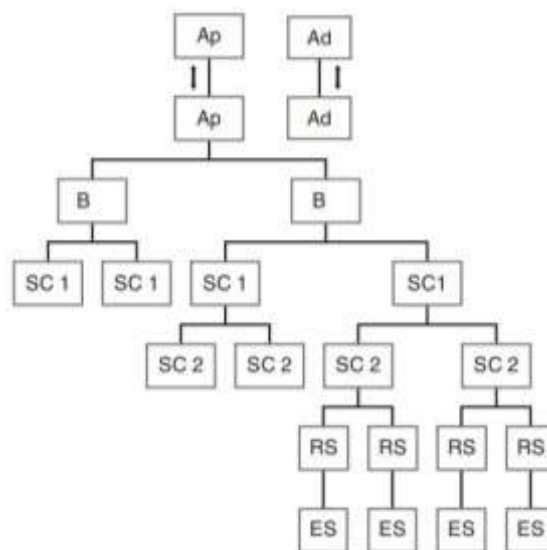
Η πρώτη φάση, αυτή του πολλαπλασιασμού των σπερματογονίων (spermatogonial replication), περιλαμβάνει τη διαίρεση τους, τόσο για να αντικαταστήσουν τον εαυτό τους όσο και για να παράγουν έναν αριθμό κυττάρων που θα μετατραπούν σε ώριμα σπερματοζώαρια.

Εκτιμάται ότι τα σπερματογόνια υποβάλλονται σε περίπου 20 μιτωτικές κυτταρικές διαιρέσεις ετησίως, οπότε στα 35 έτη της ηλικίας τα σπερματογόνια έχουν υποβληθεί σε περίπου 400 μιτωτικές κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ το θηλυκό ωοκύτταρο αναπαύεται από την 10η εμβρυϊκή εβδομάδα έως την ωορρηξία. Έτσι, οι κίνδυνοι που συνδέονται με γεγονότα διαίρεσης κυττάρων (μεταλλάξεις στο DNA, ανευπλοειδία, μεταλλάξεις και διαγραφές στο μιτοχονδριακό DNA) συχνότερα επηρεάζουν τη σπερματογένεση από την ωογένεση (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010).

Με βάση την εμφάνιση του πυρήνα τους, διακρίνονται τρεις λειτουργικά διαφορετικοί τύποι σπερματογονίων: τα τύπου A βαθυχρωματικά (dark - Ad), τα τύπου A ωχρά (pale - Ap) και τα τύπου B σπερματογόνια (B). Τα σπερματογόνια τύπου A παραμένουν εκτός του αιματοορχικού φραγμού και συνεχίζουν να διαιρούνται από την εφηβεία έως το θάνατο. Με τον τρόπο αυτό, διατηρείται μια δεξαμενή γαμετών που, θεωρητικά τουλάχιστον, διατηρεί τη γονιμοποιητική ικανότητα του άνδρα έως μια προχωρημένη

ηλικία. Τα σπερματογόνια Ad δεν οδηγούν άμεσα στην παραγωγή σπερματοζωαρίων. Κύριος ρόλος τους είναι να διατηρούν έναν ικανό αριθμό βλαστικών κυττάρων. Η διαίρεσή τους μπορεί να ακολουθήσει δύο δρόμους: είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ad, όμοιων προς το αρχικό, είτε προς την παραγωγή δύο σπερματογονίων Ap. Αυτό είναι αρχικό μοντέλου σπερματογένεσης του Clermont το οποίο αρχίζει να αναθεωρείται και καθιερώνεται ότι τα Ad σπερματογόνια δεν είναι η πηγή των Ap σπερματογονίων.

Το νεώτερο μοντέλο σπερματογένεσης που περιγράφηκε από Ehmkcke καθιερώνει ότι τα Ad σπερματογόνια δεν δείχνουν πολλαπλασιαστική δραστηριότητα υπό κανονικές συνθήκες και πιστεύεται ότι διαιρούνται σπάνια (Εικ 5). Αυτά τα σπερματογόνια πιστεύεται ότι αντιπροσωπεύουν τα ορχικά αρχέγονα γαμετικά κύτταρα (germ cells) (Ehmcke J., Schlatt S., 2006). Αυτά τα γαμετικά κύτταρα ωστόσο, υφίστανται μιτωτικές διαιρέσεις όταν ο συνολικός πληθυσμός των σπερματογονίων μειώνεται δραστικά, για παράδειγμα κατά την έκθεση σε ακτινοβολία (de Rooij 1998). (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010)



[Εικόνα 5] Σχηματική αναπαράσταση της πολλαπλασιαστικής κινητικής της ανθρώπινης σπερματογένεσης. Για λόγους σαφήνειας, εμφανίζεται πλήρης ανάπτυξη μόνο ενός σπερματογονίου. Ο ανθρώπινος όρχις περιέχει περίπου 1 δισεκατομμύριο σπέρμα και απελευθερώνει περίπου 25.000 σπερματοζωάρια κάθε λεπτό. Ένα σπερματοζωάριο Ap μπορεί να είναι ο πρόγονος για 16 επίμηκες σπερματίδες. Ad = α-σκούρο σπερματογόνιο (βλαστικό κύτταρο των όρχεων που διαιρείται σπάνια), Ap = A-ανοιχτό σπερματογόνιο (αυτοανανεώσιμο και προγονικό κύτταρο για σπερματογένεση), B = B σπερματογόνο, SC1 = πρωτογενές σπερματοκύτταρο, SC2 = δευτερογενές σπερματοκύτταρο, RS = στρογγυλή σπερματίδα, ES = επίμηκες σπερματίδα (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010).

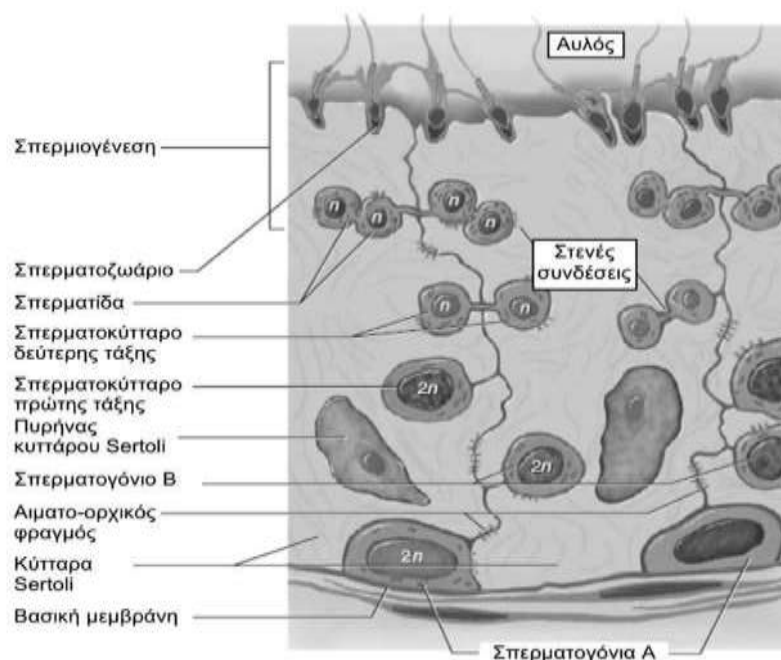
Αντίθετα, τα σπερματογόνια Ap διαιρούνται μιτωτικά για να παράξουν όμοια κύτταρα - κλώνους, που ενώνονται μεταξύ τους με κυτταροπλασματικές γέφυρες, που επιτρέπουν

το συντονισμό των περαιτέρω διαιρέσεων. Τελικά, τα σπερματογόνια Αρ διαφοροποιούνται σε δύο σπερματογόνια τύπου Β.

Στη συνέχεια, τα σπερματογόνια τύπου Β θα διαιρεθούν μιτωτικά προς σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης, που αποτελούν ενδιάμεσα διπλοειδικά κύτταρα (Εικ. 5). Στην πρώτη αυτή φάση της σπερματογένεσης, τα σπερματογόνια μεταναστεύουν προς τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων, κινούμενα μεταξύ των κυττάρων Sertoli. Καθώς τα τελευταία είναι μεγάλα κύτταρα, με πλούσιο κυτταρόπλασμα, περιβάλλουν τα σπερματογόνια σε όλη τους την πορεία. Τα σπερματογόνια που περνούν τις συνδέσεις των κυττάρων Sertoli υφίστανται δομικές αλλαγές και μετατρέπονται στα μεγάλα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης (Εικ. 6).

Τα κύτταρα Sertoli διαχωρίζουν το τοίχωμα του σπερματικού σωληναρίου στο βασικό διαμέρισμα (basal compartment), όπου ανευρίσκονται κυρίως τα σπερματογόνια και το παρααυλικό διαμέρισμα (adluminal compartment), όπου ανευρίσκονται πιο προηγμένα κύτταρα της σπερματογένεσης. Έτσι, το βασικό διαμέρισμα βρίσκεται πριν και το παρααυλικό μετά τον αιματοορχικό φραγμό.

Ασφαλώς, η θέση την οποία έχουν τα κύτταρα στο σπερματικό επιθήλιο δεν είναι τυχαία, καθώς υπάρχει υψηλού βαθμού αρχιτεκτονική οργάνωση: ομάδες παρόμοιων λειτουργικά κυττάρων τοποθετούνται κοντά μέσα στο σπερματικό επιθήλιο, με τα πλέον άωρα κύτταρα προς στη βασική μεμβράνη και τα πλέον ώριμα προς τον αυλό (Εικ. 6).



[Εικόνα 6] Σπερματικό επιθήλιο (Μηντζιώρη Γ., Γουλής Δ.Γ.).

Καθώς τα σπερματοκύτταρα πρώτης τάξης ετοιμάζονται για να εισέλθουν στη μακράς διάρκειας πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (μείωση Ι), μετακινούνται από τη βασική μεμβράνη του σπερματικού σωληναρίου προς τον αυλό. Σε αυτό το σημείο, τα σπερματοκύτταρα δεσμεύονται από τα κύτταρα Sertoli μέσω ειδικών κυτταρικών συνδέσεων (tight junctions). Μπροστά από το σπερματοκύτταρο, η σύνδεση μεταξύ δύο γειτονικών κυττάρων Sertoli λύεται, ενώ μια νέα σύνδεση σχηματίζεται από την άλλη πλευρά, κλείνοντας έτσι μια ανατομική και λειτουργική «πόρτα», πίσω από το σπερματοκύτταρο (Εικ. 6).

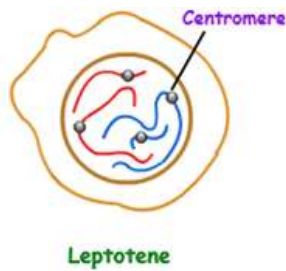
2. Μείωση

Η δεύτερη αυτή φάση αποτελείται από δύο κυτταρικές διαιρέσεις του σπερματοκυττάρου πρώτης τάξης, που συνοδεύεται από ένα μόνο διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων.

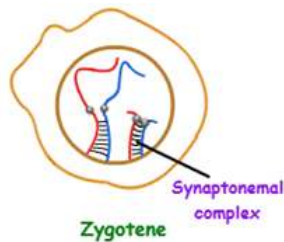
Ο σκοπός της μείωσης είναι να εξασφαλίσει ότι κάθε σπερματοζωάριο αποκτάει (α) ένα μοναδικό συνδυασμό DNA και (β) ένα απλοειδές γονιδίωμα στο οποίο τα αρχικά 23 ζεύγη χρωμοσωμάτων μειώνονται σε 23 μονόκλωνα DNA. Κάθε ένα από τα τέσσερα πρωτογενή σπερματοκύτταρα υφίσταται τις δύο μειωτικές διαιρέσεις και σχηματίζονται οκτώ δευτερογενή σπερματοκύτταρα, τα οποία τελικά οδηγούν στο σχηματισμό 16 στρογγυλών σπερματίδων (Εικ. 3 και 4). (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010)

Η πρόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης (πρόφαση Ι) καταλαμβάνει περισσότερο από το 90% της συνολικής διάρκειας της μείωσης και διαρκεί 1-3 εβδομάδες, ενώ οι υπόλοιπες φάσεις της πρώτης μειωτικής διαίρεσης και ολόκληρη η δεύτερη μειωτική διαίρεση ολοκληρώνεται σε 1-2 μέρες (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010). Η πρόφαση Ι διαιρείται σε πέντε επιμέρους στάδια: το στάδιο της λεπτотαινίας, της ζυγοταινίας, της παχυταινίας, της διπλοταινίας και της διακίνησης (Πίνακας 1).

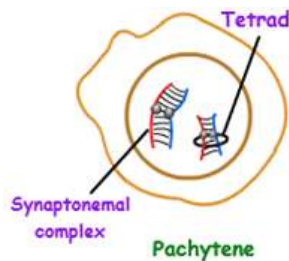
[Πίνακας 1] Φάσεις της πρόφασης (SOCRATIC, 2018)



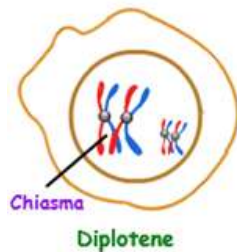
Λεπτοταινία: Τα χρωμοσώματα (αποτελούνται από δύο αδελφές χρωματίδες το καθένα) αρχίζουν να συμπυκνώνονται ενώ σχηματίζονται θραύσεις και στις δύο αλυσίδες του DNA (double-strand breaks - DSBs). Οι DSBs θα χρησιμεύσουν, αργότερα, στον ανασυνδυασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων.



Ζυγοταινία: Τα ομόλογα χρωμοσώματα αρχίζουν να ζευγαρώνουν και να σχηματίζουν συνάψεις (synaptonemal complexes - SCs). Πρόκειται για πρωτεϊνικές δομές, που συνθέτονται από δύο πλάγια στοιχεία κατά μήκος των νηματίων χρωματίνης, και που συνδέονται με ένα κεντρικό στοιχείο, το οποίο ενώνει ως «φερμουάρ» τα δύο πλάγια στοιχεία.



Παχυταινία: Ολοκλήρωση της συναρμολόγησης του συναπτομερούς, με αποτέλεσμα τα ζεύγη των ομόλογων χρωμοσωμάτων να βρίσκονται σε πλήρη σύναψη - τετράδες (που αποτελούνται από τέσσερις χρωματίδες). Επιτελείται ο ομόλογος ανασυνδυασμός.



Διπλοταινία: Αρχίζει αποσυναρμολόγηση του συναπτομερούς SCs. Τα ομόλογα χρωμοσώματα διαχωρίζονται μέχρι μια ορισμένη απόσταση, ενώ παραμένουν συνδεδεμένα μέσω σημείων επιχiasμού. Οι αδελφές χρωματίδες κάθε χρωμοσώματος παραμένουν ενωμένες στα κεντρομερίδια. Τα χρωμοσώματα αποσυμπυκνώνονται και γίνεται έντονη σύνθεση mRNAs και rRNA.



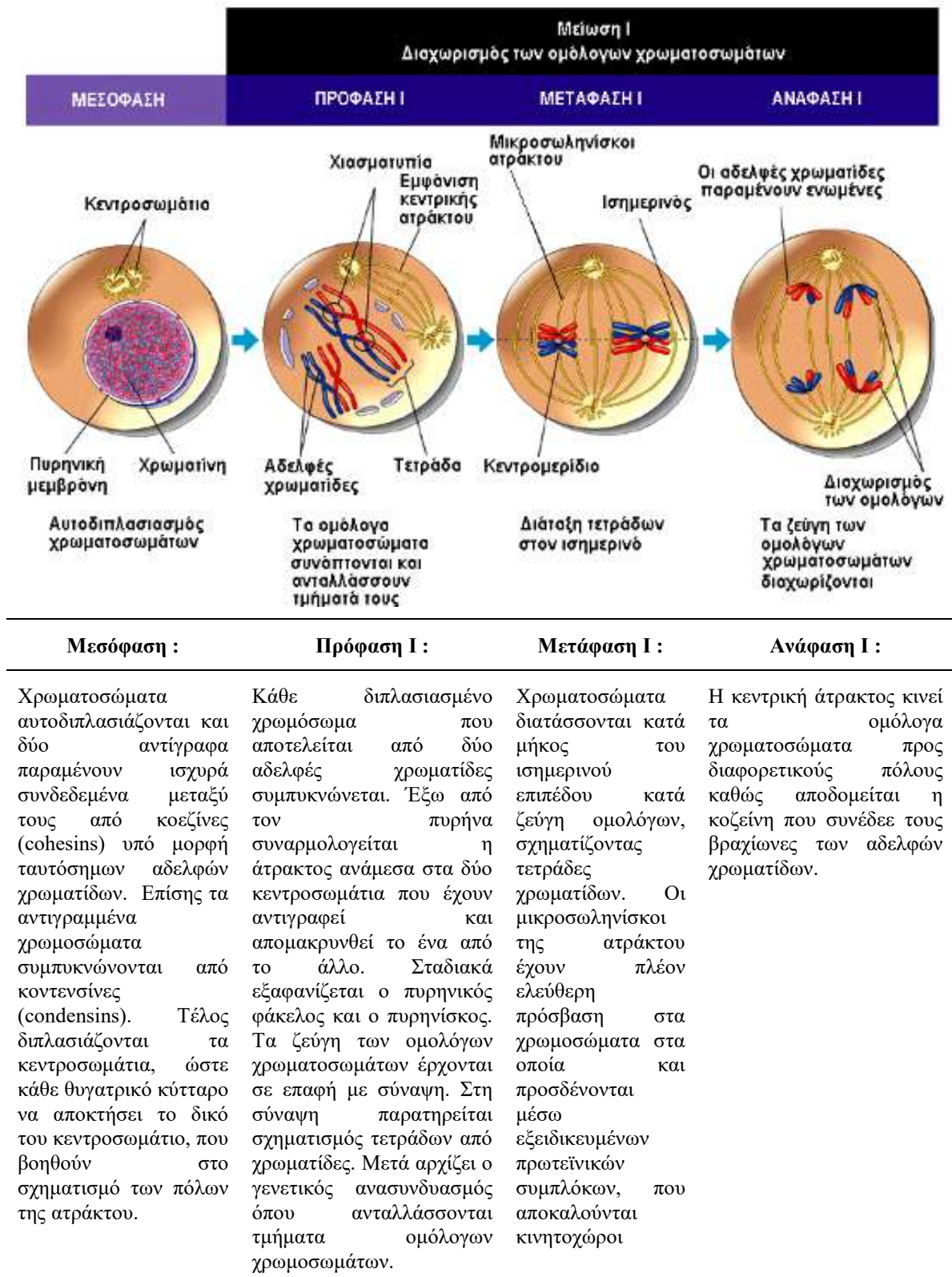
Διακίνηση: Μεταβατικό στάδιο από τη διπλοταινία στη μετάφαση I. Τα χρωμοσώματα συμπυκνώνονται και η συνθετική δραστηριότητα διακόπτεται.

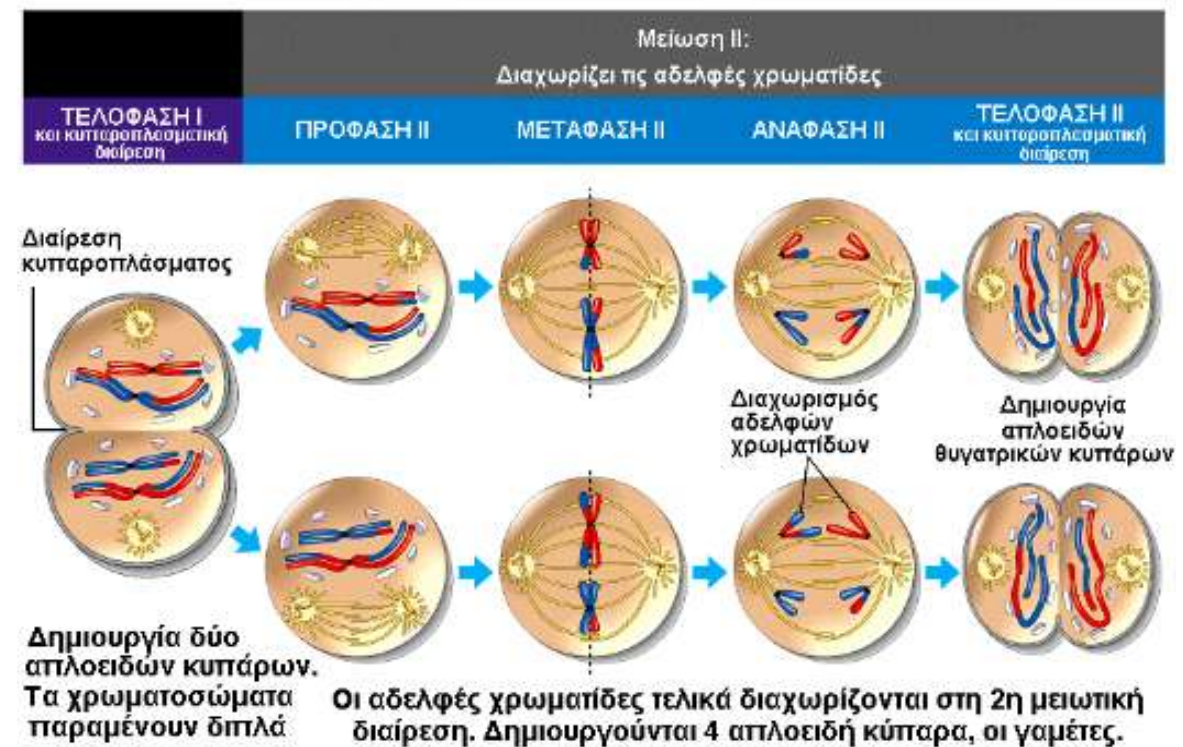
Μετά την πρόφαση I ακολουθεί η μετάφαση, η ανάφαση και η τελόφαση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης, με τελικά προϊόντα δύο σπερματοκύτταρα δεύτερης τάξης για κάθε σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης, οι αδελφές χρωματίδες διαχωρίζονται και διαιρούνται για να παραχθούν οι κυκλικές σπερματίδες (Πίνακας 2). Στο τέλος αυτής της φάσης, από ένα σπερματοκύτταρο πρώτης τάξης θα έχουν σχηματιστεί τέσσερις σπερματίδες, η καθεμιά από τις οποίες περιέχει μια

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

απλοειδική ομάδα χρωμοσωμάτων. Πολλά σημεία της διαδικασίας της μείωσης ρυθμίζονται από επιγενετικές τροποποιήσεις.

[Πίνακας 2] Κύρια στάδια της πρώτης και της δεύτερης μειωτικής διαίρεσης (DOCPLAYER, 2018), (Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2006)





Τελοφαση I:	Πρόφαση II:	Μεταφαση II:	Ανάφαση II:	Τελοφαση II:
Χρωματοσώματα φτάνουν στους πόλους όπου παράγονται δύο θυγατρικά κύτταρα το καθένα με το μισό αριθμό των χρωματοσωμάτων. Κάθε χρωματόσωμα αποτελείται από δύο χρωματίδες. Γύρω από κάθε ομάδα συναρμολογείται ένα νέο πυρηνικό περίβλημα και έτσι ολοκληρώνεται ο σχηματισμός των δύο πυρήνων και σηματοδοτείται το τέλος της μείωσης I. Η διαίρεση του κυτταροπλάσματος αρχίζει με τη συναρμολόγηση του συστατικού δακτυλίου	Κεντροσωμάτιο διπλασιάζεται και σχηματίζεται η άτρακτος.	Χρωματοσώματα διατάσσονται στο ισημερινό και η άτρακτος είναι πλήρως σχηματισμένη. Κατά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση οι κινητοχώροι πάνω σε κάθε αδελφή χρωματίδη φέρουν μικροσωληνίσκους που στρέφονται προς αντίθετες κατευθύνσεις.	Οι κοοεζίνες που συγκρατούν τις αδελφές χρωματίδες στο κεντρομερίδιο αποδομούνται, αφήνοντας τις αδελφές χρωματίδες να κινηθούν προς αντίθετους πόλους, οπότε παράγονται θυγατρικά κύτταρα με απλοειδή ποσότητα DNA.	Δημιουργείται η πυρηνική μεμβράνη και οι πυρηνίσκοι και ακολουθεί η κυτταροπλασματική διαίρεση. Τελικά προκύπτουν τέσσερα απλοειδή θυγατρικά κύτταρα, το καθένα με το μισό αριθμό χρωματοσωμάτων από εκείνο του μητρικού κυττάρου.

3. Σπερμιογένεση

Η σπερμιογένεση (spermiogenesis) είναι η μακρά φάση της σπερματογένεσης κατά την οποία οι απλοειδικές σπερματίδες μετατρέπονται σε σπερματοζωάρια. Οι βασικές μεταβολές που λαμβάνουν χώρα είναι ο σχηματισμός της κεφαλής και της ουράς του σπερματοζωαρίου, και η απώλεια του κυτταροπλάσματός του (Εικ. 7).

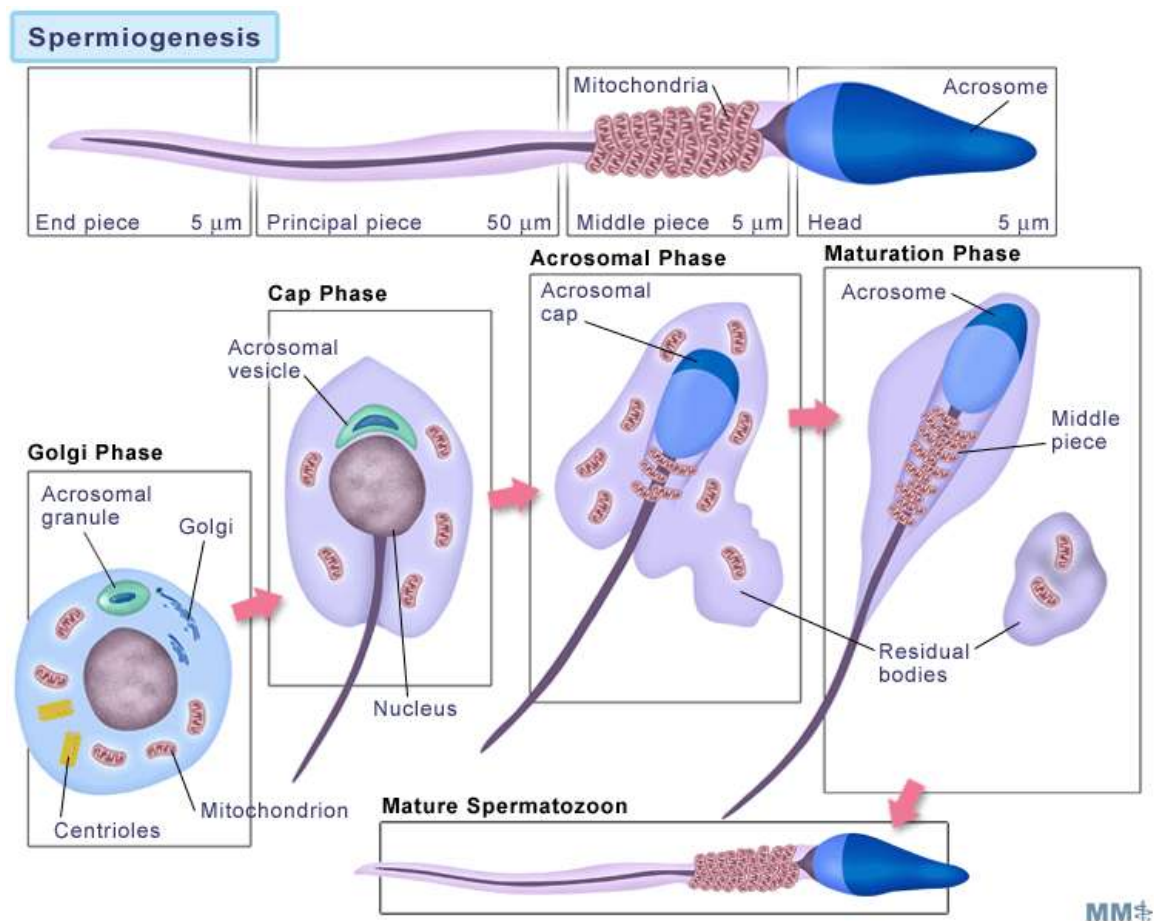
Οι στρογγυλές σπερματίδες που παράγονται από την δεύτερη μειωτική διαίρεση είναι μιτωτικά ανενεργά κύτταρα που υφίστανται ολοκληρωτική διαφοροποίηση οδηγούμενη σε τελική παραγωγή των επιμήκους σπερματίδων και σπέρματος (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010).

Η φάση της σπερμιογένεσης χωρίζεται σε τέσσερις επιμέρους φάσεις: τη φάση Golgi, τη φάση Cap, την ακροσωμική φάση και τη φάση ωρίμανσης. Κατά την πρώτη φάση (φάση Golgi) σχηματίζεται το ακροσωμικό κυστίδιο (acrosomic vesicle), η χρωματίνη της κάθε σπερματίδας συμπυκνώνεται δημιουργώντας μια συμπαγή μάζα και ο πυρήνας περιβάλλεται από ένα μεμβρανικό παράγωγο του συστήματος Golgi. Κατά τη δεύτερη φάση (φάση Cap), το ακροσωμικό κυστίδιο μετακινείται προς τον πυρήνα της στρογγυλής σπερματίδας και αρχίζει να σχηματίζεται ο πρόδρομος της ουράς (μαστίγιο) από το κεντριόλιο. Στο σημείο αυτό η σπερματίδα επιμηκύνεται και το ακροσώμα που αναπτύσσεται καλύπτει τα 2/3 της σπερματίδας. Το ακρόσωμα περιέχει ένζυμα απαραίτητα για τη διείσδυση του σπερματοζωαρίου στο ωάριο.

Κατά την τρίτη φάση (ακροσωμιακή φάση), ο πυρήνας συμπυκνώνεται περαιτέρω και η επιμήκυνση του κυττάρου ολοκληρώνεται. Κατά την συμύκνωση η πλειοψηφία των ιστονών χάνεται και γενετική μεταγραφή διακόπτεται. Η πυρηνική χρωματίνη είναι τώρα τελείως συμπυκνωμένη, συνεπώς οποιαδήποτε πρωτεΐνη που είναι απαραίτητη για την σπερμιογένεση θα πρέπει να έχει ήδη συντεθεί πριν από αυτό το σημείο και δικαιώνοντας την παρουσία RNA με πολύ μακρύ χρόνο ημιζωής και RNA προσδεώμενες πρωτεΐνες (RNA-binding). Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες μεταφοράς και προταμίνες (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010). Τέλος, κατά την τέταρτη φάση (φάση της ωρίμανσης), τα μιτοχόνδρια συγκεντρώνονται γύρω από το μαστίγιο, το οποίο διαμορφώνεται πλήρως. Καθώς ο σχηματισμός του σπερματοζωαρίου προχωρά, το μεγαλύτερο μέρος του κυτταροπλάσματος αποβάλλεται. Το αποβαλλόμενο κυτταρόπλασμα φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα Sertoli και έχει ρυθμιστικό ρόλο. Οι επιμήκεις σπερματίδες και τα αποβαλλόμενο κυτταρόπλασμα επηρεάζουν την εκκριτική

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

λειτουργία των κυττάρων Sertoli (παραγωγή υγρού σπερματικών σωληναρίων, αναστολέα-inhibin, πρωτεΐνες σύνδεσης σε ανδρογόνα-androgen-binding protein και ιντερλευκίνη-1 και 6) (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010). Το τελικό στάδιο της μεταμόρφωσης της σπερματίδας σε σπερματοζώαριο αποτελεί ο σχηματισμός της πολύπλοκης ουράς από το άξονημάτιο (axonemal complex), που αποτελείται από δύο εσωτερικά μονά και εννέα εξωτερικά διπλά μικροσωληνάρια (Εικ. 7). Στη συνέχεια, το σπερματοζώαριο οδηγείται στην επιδιδυμίδα, όπου ωριμάζει, παραμένοντας εκεί για άλλες 21 ημέρες, και καθίσταται ικανό για γονιμοποίηση.



[Εικόνα 7] Φάσεις της σπερμιογένεσης (WriteOpinions.com, 2018).

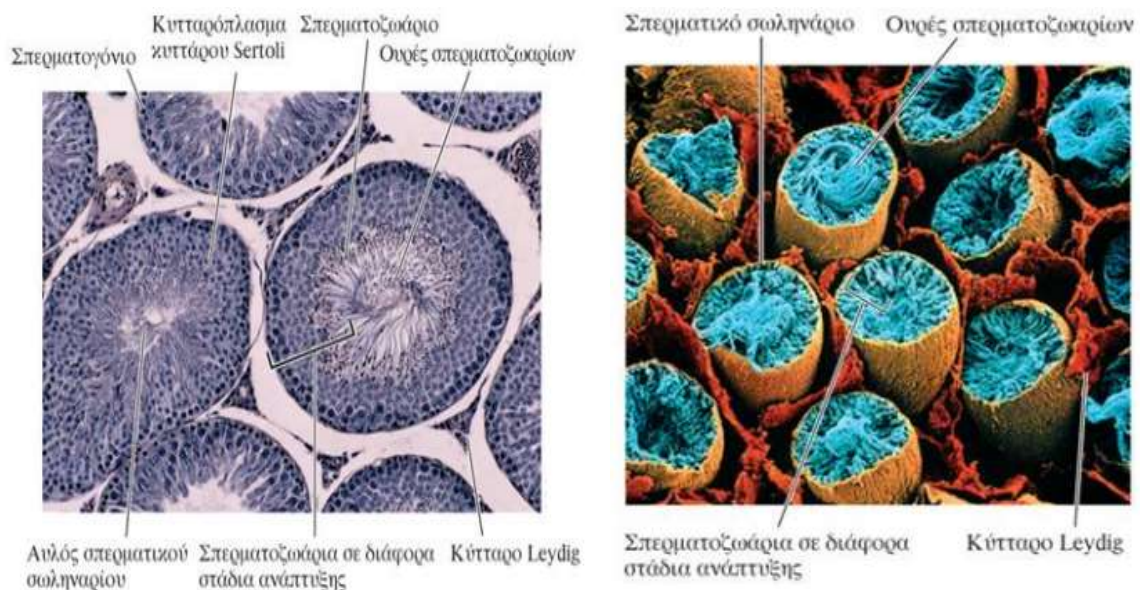
4. Σπερμίαση

Τέλος παραγοντοποιείται η απελευθέρωση του σπέρματος στο σωληνοειδές αυλό που καλείται σπερμίαση (speriation). Αυτή η διαδικασία επηρεάζεται από τους ενεργοποιητές πλασμιτογόνου. Η συγκεκριμένη διαδικασία μπορεί να επηρεαστεί ιδιαίτερα από ορμονικές τροποποιήσεις, θερμοκρασία και τοξίνες. Η αιτία αυτής της ευαισθησίας είναι άγνωστη. Σπέρμα που δεν απελευθερώνεται φαγοκυτταρώνεται από τα κύτταρα Sertoli.

Οι στρογγυλές και επίμηκες σπερματίδες εμπεριέχουν όλες τις απαραίτητες πληροφορίες για την γονιμοποίηση, καθώς με την τεχνική ICSI είναι δυνατή η επιτυχής εγκυμοσύνη με τη χρήση ορχικού σπέρματος, ακόμη και με τη χρήση των στρογγυλών σπερματίδων (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010).

Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα στα σπερματικά σωληνάρια

Ένα φυσιολογικό σπερματικό σωληνάριο έχει διάμετρο περίπου 180 μm και η διάμετρος του μειώνεται όταν η σπερματογένεση είναι μειωμένη (Εικ. 8). Τα τοιχώματα των σωληναρίων αποτελούνται από πέντε στρώματα μυοϊνοβλαστών στον συνδετικό ιστό, που προκαλούν περισταλτικά κύματα συστολής για την μεταφορά των ακίνητων ορχικών σπερματοζωαρίων προς το ορχικό δίκτυο και για την περαιτέρω μεταφορά, μέσω των απαγωγών σωληνίσκων, μέχρι την επιδιδυμίδα. Το πάχος του περιτονικού ιστού είναι 8 μm , το οποίο αντιστοιχεί στο μέγεθος των γειτονικών σπερματογονίων. Ένα παχύτερο τοίχωμα συνδέεται με εξασθενημένη σπερματογένεση.



[Εικόνα 8] Εγκάρσια τομή σπερματικών σωληναρίων (φωτογραφία από φωτονικό μικροσκόπιο – αριστερά και φωτογραφία από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης – δεξιά) (Sherwood L., 2016)

Τα κύτταρα Sertoli

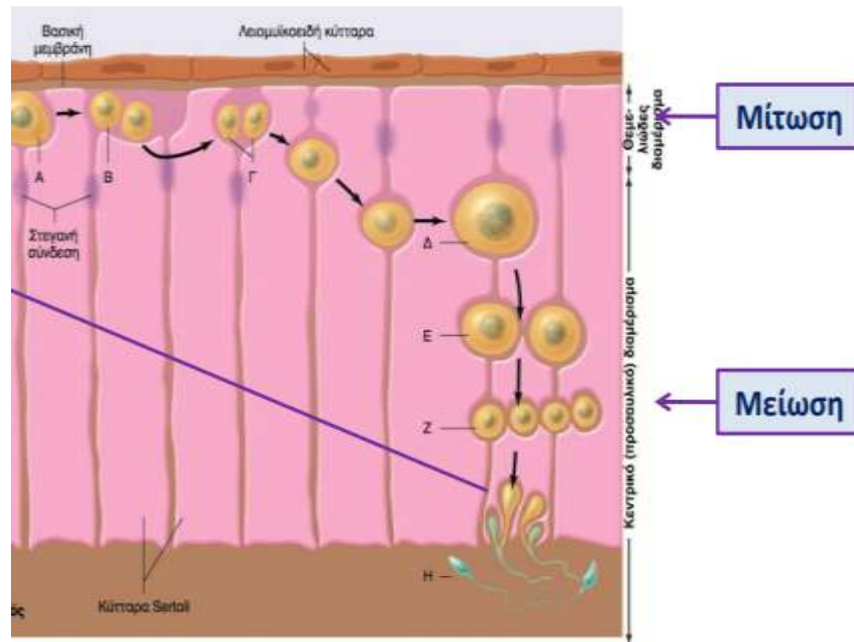
Τα κύτταρα Sertoli είναι σωματικά κύτταρα και βρίσκονται στα σπερματικά σωληνάρια. Στην ενήλικη ζωή τα κύτταρα αυτά είναι μιτωτικά ανενεργά. Εκτείνονται από την βασική μεμβράνη έως τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων. Είναι κύτταρα υποστήριξης που παρέχουν θρεπτικά συστατικά και μεσολαβούν σε παρακρινικά σήματα για σπερματογένεση, καθώς και στην προστασία των αναπτυσσόμενων γαμετικών

κυττάρων από το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα κύτταρα Sertoli επικοινωνούν, μέσω παραγόντων και τεστοστερόνης, με τα ενδιάμεσα κύτταρα των σπερματικών σωληναρίων Leydig. Παράγουν ανασταλτίνη-B (inhibin-B) που ασκεί αρνητική επίδραση στην ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) η οποία εκκρίνεται από την υπόφυση. Περίπου στους μισούς αζωσπερμικούς άντρες, τα κύτταρα Sertoli παράγουν χαμηλά επίπεδα inhibin-B, με αποτέλεσμα τα αυξημένα επίπεδα FSH στο αίμα. Ωστόσο, τα χαμηλά επίπεδα inhibin-B και τα υψηλά επίπεδα FSH δεν αποκλείουν ότι εστιακή σπερματογένεση μπορεί να βρεθεί σε βιοψία όρχεων, καθιστώντας δυνατή την ανάκτηση σπέρματος και την διενέργεια της ICSI θεραπείας. Η προστασία από το ανοσοποιητικό σύστημα διαμεσολαβείται από τα γειτονικά κύτταρα Sertoli τα οποία σχηματίζουν σφιχτούς δεσμούς μεταξύ τους, διαιρώντας έτσι τα σπερματικά σωληνάρια σε δύο διαμερίσματα (Εικ. 9):

α) Το θεμελιώδες διαμέρισμα που εκτείνεται από την βασική μεμβράνη που περιβάλλει τα σπερματικά σωληνάρια έως τις στεγανές συνδέσεις των κυττάρων Sertoli, όπου το ανοσοποιητικό σύστημα μπορεί να δράσει εναντίον του ξένου και

(β) το κεντρικό διαμέρισμα από τις στεγανές συνδέσεις έως τον αυλό των σπερματικών σωληναρίων από όπου απελευθερώνονται τα σπερματοζώαρια.

Στη μείωση τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα, τα οποία σύντομα πρόκειται να μετατραπούν σε σπερματίδες με μοναδικό DNA (και ως εκ τούτου θα παρουσιάζονται ως ξένοι στο ανοσοποιητικό σύστημα), μεταφέρονται από το βασικό στο κεντρικό διαμέρισμα, διαφεύγοντας έτσι τον κίνδυνο προσβολής από το ανοσοποιητικό σύστημα. (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010)



[Εικόνα 9] Λειτουργική σχέση μεταξύ των κυττάρων Sertoli και των γαμετικών κυττάρων. Τα κύτταρα Sertoli σχηματίζουν έναν φραγμό γύρω από όλο το σπερματικό σωληνάριο. Σπερματογόνια (Α και Β) βρίσκονται μόνο στο θεμελιώδες διαμέρισμα που ορίζεται από τις στεγανές συνδέσεις και τη βασική μεμβράνη του σωληναρίου. Ύστερα από αρκετούς μειωτικούς κύκλους τα σπερματογόνια παράγουν πρωτογενή σπερματοκύτταρα (Γ). Καθένα από αυτά διασχίζει τη στεγανή σύνδεση και διαιρείται σε δύο δευτερογενή σπερματοκύτταρα (Ε), τα οποία διαιρούνται σε σπερματίδες (Ζ), οι οποίες με την σειρά τους διαφοροποιούνται σε σπερματοζώαρια (Η) (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011).

Η διάταξη αυτή εξυπηρετεί αρκετούς σημαντικούς σκοπούς: (1) Ο δακτύλιος των στενά αλληλοσυνδεδεμένων κυττάρων Sertoli σχηματίζει έναν φραγμό, ο οποίος εμποδίζει τη μεταφορά αρκετών χημικών ουσιών από το αίμα στον αυλό των σπερματικών σωληναρίων και έτσι διασφαλίζονται οι κατάλληλες συνθήκες ανάπτυξης και διαφοροποίησης για τα γαμετικά κύτταρα εντός των σωληναρίων και (2) τα διαφορετικά στάδια σπερματογένεσης λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά διαμερίσματα δηλαδή σε διαφορετικό περιβάλλον.

Η μίτωση και η διαφοροποίηση των σπερματογόνιων, όπου παρέχει πρωτογενή σπερματοκύτταρα λαμβάνει χώρα στο θεμελιώδες διαμέρισμα. Ακολούθως, τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα κινούνται διαμέσου των στεγανών συνδέσεων των κυττάρων Sertoli, οι οποίες ανοίγουν με την εμφάνιση τους ενώ ταυτόχρονα κάποιες νέες στεγανές συνδέσεις κλείνουν μετέχοντας στην διέλευση τους και έτσι τα σπερματοκύτταρα βρίσκονται εντός του κεντρικού διαμερίσματος. Μέσα σε αυτό το κεντρικό διαμέρισμα, συμβαίνουν οι μειωτικές διαιρέσεις της σπερματογένεσης και αναδομούνται οι σπερματίδες σε σπέρμα καθώς εγκλωβίζονται σε κοιλώματα που σχηματίζονται από τα εγκολπώματα της μεμβράνης των κυττάρων Sertoli. Όταν ο

σχηματισμός σπέρματος έχει ολοκληρωθεί, ο εναγκαλισμός του σπέρματος από το κυτταρόπλασμα των κυττάρων Sertoli υποχωρεί και έτσι το σπέρμα απελευθερώνεται εντός του αυλού και εμποτίζεται εντός του αντίστοιχου υγρού. Τα κύτταρα Sertoli αποτελούν τη διαδρομή μέσα από την οποία διαφορετικές ουσίες φθάνουν στα αναπτυσσόμενα γαμετικά κύτταρα όπως επίσης τούτα εκκρίνουν το περισσότερο από το υγρό το οποίο βρίσκεται στο σωληναριακό αυλό. Το υγρό αυτό φέρει ειδικά χαρακτηριστικά όσον αφορά στην ιονική του σύσταση. Περιέχει επίσης άφθονη ανδρογονοδεσμεύουσα πρωτεΐνη με την οποία ενώνεται η τεστοστερόνη η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα Leydig και βρίσκεται εντός των σωληναρίων αφού πρώτα διασχίσει το φράγμα των κυττάρων Sertoli. Έτσι, διατηρείται μια υψηλή συγκέντρωση άθικτης τεστοστερόνης στον αυλό των σωληναρίων και ολόκληρου του συστήματος αγωγών (Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M., 2011).

[Πίνακας 3] Λειτουργίες των κυττάρων Sertoli:

- Δημιουργούν τον αιματορχικό φραγμό
 - Διατρέφουν το αναπτυσσόμενο σπέρμα
 - Εκκρίνουν το υγρό των σπερματικών σωληναρίων
 - Εκκρίνουν την πρωτεΐνη δέσμευσης ανδρογόνων
 - Λαμβάνουν ερεθίσματα από την τεστοστερόνη και την FSH για να εκκρίνουν παρακρινείς παράγοντες που προκαλούν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση του σπέρματος
 - Εκκρίνουν την ορμόνη ανασταλτίνη η οποία αναστέλλει την έκκριση της FSH
 - Εκκρίνουν παρακρινείς παράγοντες που επηρεάζουν τη λειτουργία των κυττάρων Leydig
 - Φαγοκυτταρώνουν τα ελαττωματικά γεννητικά κύτταρα και το κυτταρόπλασμα που αποβάλουν οι σπερματίδες
 - Κατά τη εμβρυϊκή περίοδο εκκρίνουν την αντιμυλλέρια ορμόνη
-

Περίπου το 35-40% του όγκου του βλαστικού επιθηλίου αντιπροσωπεύεται από τα κύτταρα Sertoli. Ο άθικτος όρχις με πλήρη σπερματογένεση περιέχει $800-1200 \times 10^6$ κύτταρα Sertoli ή περίπου 25×10^6 κύτταρα Sertoli ανά γραμμάριο όρχεων (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010).

Τα κύτταρα Sertoli συνθέτουν και εκκρίνουν μεγάλη ποικιλία παραγόντων όπως πρωτεΐνες, κυτταροκίνες, αναπτυξιακούς παράγοντες (growth factors), οπιοειδή, στεροειδή, προσταγλαντίνες και ρυθμιστές της κυτταρικής διαίρεσης. Τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα ρυθμίζουν την λειτουργία των κυττάρων Sertoli .

Μια άλλη σημαντική λειτουργία των κυττάρων Sertoli είναι ότι αυτά είναι υπεύθυνα για τον τελικό όγκο των όρχεων και την παραγωγή σπέρματος στον ενήλικα. Κάθε

ανεξάρτητο κύτταρο Sertoli βρίσκεται σε μορφολογική και λειτουργική επαφή με ορισμένο αριθμό σπερματοζωαρίων. Ο αριθμός των σπερματοζωαρίων ανά κύτταρο Sertoli εξαρτάται από το είδος. Στους άνδρες παρατηρούμε περίπου 10 γεννητικά κύτταρα ή 1,5 σπερματοζωάρια ανά Sertoli.

Ο αριθμός των κυττάρων Sertoli στους άνδρες αυξάνεται μέχρι το 15ο έτος της ζωής τους. Ο πολλαπλασιασμός των Sertoli ενεργοποιείται σημαντικά όταν αυτά εκτίθενται σε γοναδοτροπίνες. Και ο αριθμός των κυττάρων Sertoli και η έκφραση των δεικτών κυτταρικής διαίρεσης διεγείρονται από αυτές τις ορμόνες. Η διαίρεση των κυττάρων Sertoli τελειώνει όταν το πρώτο βλαστικό κύτταρο υποβάλλεται σε μειωτική διαίρεση και τα Sertoli έχουν δημιουργήσει σφιχτούς συνδέσμους μεταξύ τους. Έλλειψη της συνδεξίνης-43, μιας κυρίαρχης πρωτεΐνης που δημιουργεί συνδέσμους, αποτρέπει την ωρίμανση των κυττάρων Sertoli που σχετίζεται με τη συνέχιση της διαίρεσης τους, την καθήλωση της σπερματογένεσης και την παρεμπόδιση της σπερματογενούς ανάπτυξης. Η έκφραση των κυτταρικών δεικτών των Sertoli όπως transferrin, androgen-binding protein και συνδετικών πρωτεϊνών όπως N-cadherin, connexin-43, gelsolin, laminin-γ3, occludin, testin, nectin, zyxin και vinculin εξαρτάται από τα ανδρογόνα. Φαίνεται ότι πολλά από αυτά τα συστατικά εμπλέκονται στην δημιουργία του αιματικού φραγμού αλλά και στην απελευθέρωση του σπέρματος και στη συνεχή αναδιαμόρφωση των στενών συνδέσμων. Στον αρουραίο, η πειραματική επέκταση της φάσης διαίρεσης των κυττάρων Sertoli, που δημιουργείται με στέρηση θυρεοειδικών ορμονών, οδηγεί σε αύξηση του βάρους των όρχεων και της παραγωγή σπέρματος κατά περίπου 80%. Αντίθετα η μείωση του αριθμού των κυττάρων Sertoli από μια αντιμιτωτική ουσία οδηγεί σε μείωση του όγκου των όρχεων και της παραγωγής σπέρματος. Ασθενείς με το Laron dwarfism πάσχουν από μια διαταραχή της λειτουργίας του θυρεοειδούς και έλλειψης αυξητικής ορμόνης / IGF-I και συχνά έχουν όρχεις με μεγαλύτερο από το κανονικό μέγεθος.

Περισσότερο από το 90% του κυτταρικού υγρού των Sertoli εκκρίνεται στο σπερματικό αυλό. Ειδικά τα δομικά στοιχεία του αιματικού φραγμού εμποδίζουν την επαναπορρόφηση του εκκριθέντος ρευστού, με αποτέλεσμα την πίεση που διατηρεί τη βατότητα του αυλού. Σε αντίθεση με το αίμα, το σωληνοειδές υγρό περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση ιόντων καλίου και χαμηλότερη συγκέντρωση ιόντων νατρίου. Άλλα συστατικά είναι το διττανθρακικό μαγνήσιο και τα χλωριούχα ιόντα, η ινοσιτόλη, η γλυκόζη, η καρνιτίνη, η γλυκεροφωφορυλοχολίνη, αμινοξέα και αρκετές πρωτεΐνες.

Επομένως, τα γαμετικά κύτταρα εμβλαπίζονται σε ένα υγρό μοναδικής σύνθεσης (Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S., 2010).

Τα ενδιάμεσα κύτταρα Leydig

Εκτός από τη σπερματογένεση ο όρχις έχει και έναν άλλο ζωτικό ρόλο: την παραγωγή τεστοστερόνης από τα κύτταρα Leydig που περιβάλλουν τα τριχοειδή αγγεία στο ενδιάμεσο.

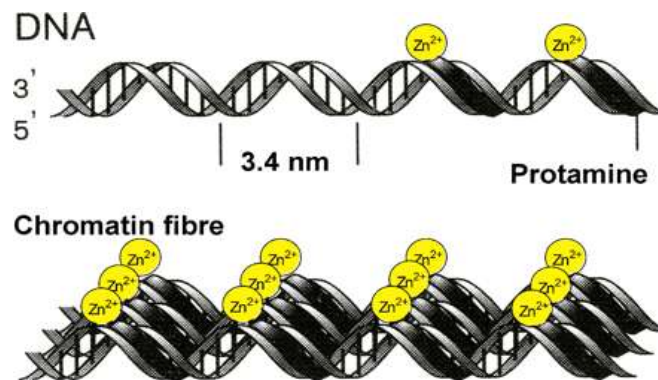
Σε απάντηση στην ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (hCG) που παράγεται από τον πλακούντα κατά την εμβρυική ανάπτυξη τα κύτταρα Leydig παράγουν τεστοστερόνη απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και ανάπτυξη ενός γόνιμου άνδρα. Η διαταραγμένη λειτουργία του πλακούντα κατά τη διάρκεια κρίσιμων περιόδων για την εμβρυϊκή ανάπτυξη μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ανδρική ανάπτυξη και συνεπώς τη μελλοντική ανδρική γονιμότητα.

Στην εφηβεία, η γοναδοτροπίνη (GnRH) εκκρίνεται από τον υποθάλαμο σε διαστήματα ανά 90 λεπτά, η ορμόνη αυτή διεγείρει την υπόφυση με αποτέλεσμα να εκκρίνεται η FSH και η LH. Η LH διεγείρει τα κύτταρα Leydig ώστε αυτά να παράγουν τεστοστερόνη. Το 90% της τεστοστερόνης λαμβάνεται από τα κύτταρα Sertoli στα σπερματικά σωληνάρια και χρησιμοποιείται για την σπερματογένεση και την ροή του αυλού για τις ειδικές λειτουργίες του συστήματος αγωγών μέχρι το σώμα της επιδιδυμίδας. Περίπου το 10% της τεστοστερόνης παρέχεται στο αίμα και ασκεί συστηματικές ανδρογόνες επιδράσεις στον άνθρωπο, συμπεριλαμβανομένων των ανδρικών δευτερογενών χαρακτηριστικών του φύλου, όπως οι τρίχες του σώματος και του προσώπου, η βαθιά φωνή, η αυξημένη μυϊκή μάζα, το μειωμένο σωματικό λίπος, η αυξημένη αρσενική αιμοσφαιρίνη και τον ενισχυμένο σκελετό, καθώς και την λειτουργία του εγκεφάλου που έχει ως αποτέλεσμα την "αρσενική ιδιοσυγκρασία" (Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B., 2010).

Η χρωματίνη του σπέρματος, το DNA, οι πρωταμίνες και ο ψευδάργυρος

Το DNA των σπερματοζωαρίων είναι προσωρινά προστατευμένο σε μια ημικρυσταλλική δομή στην σταθεροποίηση της οποίας συμμετέχουν δακτύλιοι ψευδαργύρου (Εικ. 10). Αυτό το μοναδικό πυκνό πακετάρισμα χρωματίνης σπέρματος προσφέρει

προστασία και αντισταθμίζει την έλλειψη συστημάτων επιδιόρθωσης του DNA. Η χρωματίνη του σπέρματος είναι κυρίως διατεταγμένη σαν ένα «σχοινί» με τρία περιελισσόμενα νημάτια: τους δύο κλώνους DNA και τις πρωταμίνες. Υπάρχει ένα ιόν ψευδαργύρου για κάθε μόριο πρωταμίνης και κάθε στροφή της DNA έλικας, δηλαδή για κάθε 10 ζεύγη βάσεων του DNA. Η απομάκρυνση του ψευδαργύρου επιτρέπει το γρήγορο ξετύλιγμα της χρωματίνης σε ξεχωριστά νημάτια DNA (δίκλωνες έλικες).



[Εικόνα 10] Διαγραμματικό μοντέλο σταθεροποίησης χρωματίνης του ανθρώπινου σπέρματος. Χρωματίνη διατεταγμένη σε τρία νημάτια: δύο κλώνοι DNA και σειρά πρωταμινών που αποτελείται από μονομερή πρωταμίνης. Ένας ψευδάργυρος υπάρχει για κάθε μονομερές πρωταμίνης σε κάθε στροφή DNA έλικας, δηλαδή για κάθε 10 ζεύγη βάσεων. Οι ίνες της χρωματίνης συμπυκνώνονται, δίπλα-δίπλα, όταν τα αρνητικά φορτία του DNA έχουν εξουδετερωθεί με θετικά φορτία των πρωταμινών (Björndahl L., Kvist U., 2010).

Αυτό το μοναδικό πυκνό πακετάρισμα γονιδιώματος του σπέρματος οφείλεται στην αντικατάσταση ιστονών που συνδέονται με το DNA στον πυρήνα. Κατά τις τελευταίες φάσεις της σπερματογένεσης οι σωματικές ιστόνες αντικαθίστανται πρώτα από προσωρινές πρωτεΐνες και στη συνέχεια από πρωταμίνες. Αυτό καθιστά το DNA μεταγραφικά αδρανές, αλλά ταυτόχρονος πολύ συμπαγές και σχεδόν κρυσταλλικό. Επίσης προστατεύει το DNA μειώνοντας τόσο την πρόσβαση των ελευθέρων ριζών όσο και των υδατοδιαλυτών ενώσεων που θα μπορούσαν να βλάψουν το DNA (Björndahl L., Kvist U., 2010). Συγχρόνως με την αντικατάσταση των ιστονών ο ψευδάργυρος ενσωματώνεται στον πυρήνα του σπέρματος. Εξάλλου η παρουσία ψευδαργύρου διευκολύνει τη σύνδεση του DNA με πρωταμίνη.

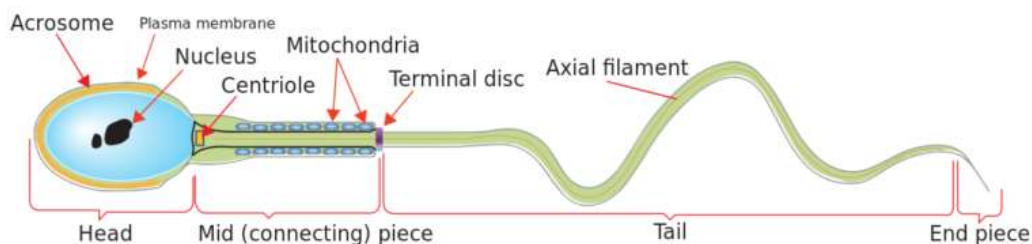
Στην κανονική εκσπερμάτωση τα περισσότερα σπερματοζωάρια βρίσκονται στο πρώτο τρίτο του εκκρίματος μαζί με την ελαφρώς όξινη, πλούσια σε ψευδάργυρο προστατική έκκριση. Το προστατικό υγρό έχει υψηλή βιολογική διαθεσιμότητα σε ψευδάργυρο η οποία αποτρέπει την απώλεια χρωματίνης σε ψευδάργυρο. Τα τελευταία δύο τρίτα του εκκρίματος περιέχουν κυρίως υγρό από σπερματοδόχους κύστες.

Σπέρμα

Το σπέρμα αποτελείται από τις εκκρίσεις των όρχεων, της επιδιδυμίδας, των βολβοουρηθρικών αδένων, των σπερματοδόχων κύστεων και του προστάτη. Οι σπερματοδόχες κύστεις παράγουν από το 40% έως 80% του συνολικού όγκου του σπέρματος, ενώ ο προστάτης συνεισφέρει μόνο στο 10% έως 30% της εκσπερμάτισης. Το υγρό της εκσπερμάτισης περιέχει φρουκτόζη - σε συγκεντρώσεις μέχρι και 450 mg/dl- (που είναι απαραίτητη για τη θρέψη του σπέρματος), προσταγλανδίνες, διττανθρακικά (για να ουδετεροποιείται το όξινο περιβάλλον του κόλπου), καθώς και ένζυμα και πρωτεάσες για την ρευστοποίηση του πηχτού σπέρματος. Άλλα συστατικά του υγρού είναι ο ψευδάργυρος, τα φωσφολιπίδια, η φωσφατάση και η σπερμίνη, που αποτελούν εκκρίσεις του προστάτη. Ο συνηθισμένος όγκος της εκσπερμάτισης είναι από 1,5 έως 5,0 ml και το pH της κυμαίνεται από 7,05 -7,80.

Χαρακτηριστικά του Σπερματοζωαρίου

Το σπερματοζώαριο, ο αρσενικός γαμέτης, είναι ένα απλοειδές κύτταρο που εμφανίζει τρεις καλά διαφοροποιημένες περιοχές: την κεφαλή, το μέσο τμήμα και την ουρά ή μαστίγιο (Εικ. 12). Το σπερματοζώαριο είναι περίπου 60μm σε μήκος, με ωοειδή κεφαλή 4,5x3μm. Η κεφαλή του περιέχει πυρηνικό DNA, πολύ λίγο κυτταρόπλασμα και μία μικρή προεξοχή που ονομάζεται ακρόσωμα που περιβάλλει το πρόσθιο τμήμα του πυρήνα και περιέχει τα ένζυμα που θα επιτρέψουν τη διείσδυση στο ωάριο. Το μέσο τμήμα αποτελείται από μιτοχόνδρια σε ελικοειδή διάταξη που παρέχουν την απαραίτητη ενέργεια για την κίνηση του σπερματοζωαρίου και τη χαρακτηριστική 9+2 διάταξη των μικροσωλινίσκων του σπερματικού μαστιγίου. Οι εξωτερικές ίνες του αξονήματος είναι πλούσιες σε δισουλφιδικούς δεσμούς, που επιτρέπουν την απαραίτητη δομική σταθερότητα για την ταχεία πρόσθια κίνηση. Τέλος, η ουρά ή μαστίγιο είναι σχεδιασμένη για την κυτταρική κινητικότητα.



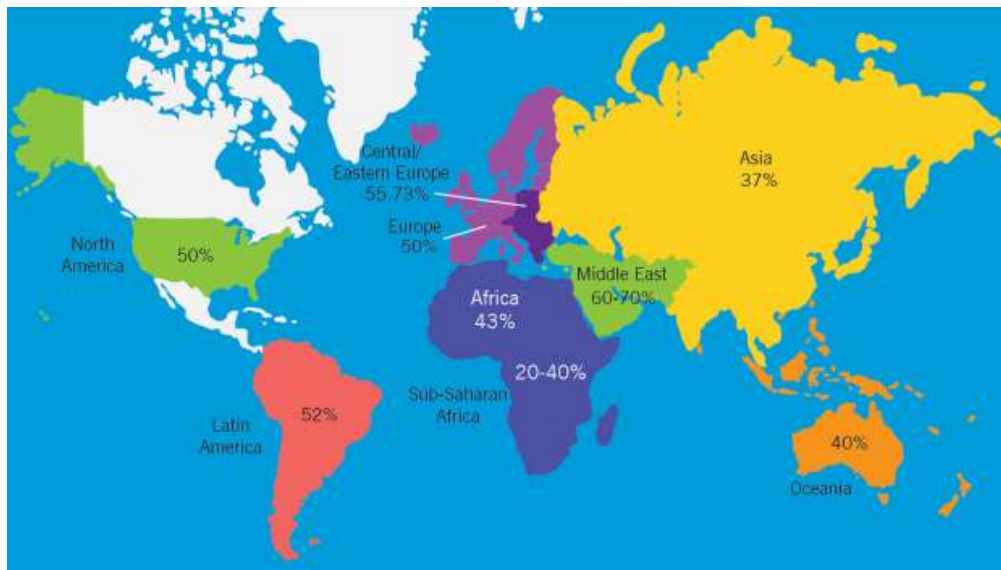
[Εικόνα 12] Ανατομία σπερματοζωαρίου (Lumen Learning, 2018).

Ανδρική υπογονιμότητα

Ορισμός της ανδρικής υπογονιμότητας

«Υπογονιμότητα είναι η ανικανότητα ενός σεξουαλικά ενεργού ζεύγους να επιτύχει εγκυμοσύνη στη διάρκεια ενός έτους ελεύθερων σεξουαλικών επαφών» (WHO, 2000). Στην περίοδο του ενός έτους το 90% των ζευγαριών επιτυγχάνουν εγκυμοσύνη. Τα ποσοστά επιτυχίας κυμαίνονται από 20-25% ανά μήνα, 75% σε 6 μήνες και 90% σε 1 έτος. Οι σεξουαλικές αυτές επαφές θα πρέπει να γίνονται με κάποια συχνότητα τουλάχιστον 2 με 3 φορές την εβδομάδα και με έμφαση στις ημέρες εκείνες που είναι διαθέσιμο το ωάριο για γονιμοποίηση (γόνιμες ημέρες). Περίπου το 15 % των ζευγαριών δεν επιτυγχάνουν εγκυμοσύνη σε ένα έτος και αναζητούν θεραπεία για την υπογονιμότητα. Λιγότερο από 5% παραμένουν άτεκνα (Jungwirth A., Diemer T., Giwercman A., Kopa Z., Krausz C., 2010). Υπάρχουν περίπου 48,5 εκατομμύρια ζευγάρια με υπογονιμότητα σε όλον τον κόσμο (Agarwa A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R., 2015).

Η υπογονιμότητα είναι ένα σημαντικό πολυπαραγοντικής αιτιολογίας πρόβλημα υγείας. Σε ένα ποσοστό της τάξης του 40-50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας το πρόβλημα εντοπίζεται στον άνδρα (Εικ. 13), ενώ σε ποσοστό 10% περίπου υπάρχει πρόβλημα γονιμότητας και στα δύο μέλη του ζεύγους. Ένα στα έξι ζευγάρια στην Ευρώπη παρουσιάζει διαταραχή της γονιμότητας. Επιπροσθέτως, το 25% των υπογόνιμων ζευγαριών παρουσιάζεται στον ειδικό με διαταραχή του σπέρματος, που είναι η πρώτη παρατήρηση στις περιπτώσεις της ανδρικής υπογονιμότητας. Αξιοσημείωτο είναι ότι στο ένα τρίτο των περιπτώσεων της ανδρικής υπογονιμότητας δεν ανευρίσκεται κάποιο αίτιο χωρίς αυτό να σημαίνει ότι δεν υπάρχει (Παρανυχιανακης Γ., 2018). Η ανδρική υπογονιμότητα αποτελεί παγκόσμια ανησυχία για την υγεία του πληθυσμού.



[Εικόνα 13] Παγκόσμιος χάρτης που περιέχει ποσοστά περιπτώσεων υπογονιμότητας ανά περιοχή που οφείλονται στον ανδρικό παράγοντα (Agarwa A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R., 2015).

Στη Βόρεια Αμερική, το 4,5% -6% των ανδρών είναι υπογόνιμοι. Αυτός ο αριθμός είναι παρόμοιος με αυτόν της Αυστραλίας, όπου το 8% των ανδρών είναι άγονοι και το 9% των ανδρών ηλικίας άνω των 40 ετών επισκέφθηκαν κάποια κλινική υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, ενώ στην Ευρώπη το 7,5% είναι υπογόνιμο. Στην Βόρεια και την υποσαχάρια Αφρική καθώς και στην Ανατολική Ευρώπη παρατηρούνται μερικά από τα υψηλότερα ποσοστά της ανδρικής υπογονιμότητας που υπολογίζονται παγκοσμίως. Αν και κατά έναν παράδοξο τρόπο ο πληθυσμός της υποσαχάριας Αφρικής αυξάνεται ετησίως, εντούτοις αυτό δεν σημαίνει ότι τα ποσοστά της ανδρικής υπογονιμότητας είναι χαμηλά, αλλά μάλλον ότι ο πληθυσμός ενδέχεται να αυξάνεται με άλλους τρόπους. Συνήθως, στις τοπικές κοινωνίες των περιοχών της Αφρικής, το αρσενικό θεωρείται ως το κυρίαρχο άτομο τόσο στην κοινότητα όσο και στην οικογενειακή δομή. Ως εκ τούτου, οι άνδρες, ειδικά στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή δεν αναφέρουν την υπογονιμότητα τους. Ως αποτέλεσμα αυτού, οι άντρες σε αυτές τις κοινωνίες τείνουν ιδιαίτερα να κατηγορούν τις γυναίκες για την έλλειψη παιδιού και δεν λαμβάνουν βοήθεια (Agarwa A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R., 2015).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματά επιστημονικών ερευνών, τουλάχιστον 30 εκατομμύρια άντρες παγκοσμίως υποφέρουν από υπογονιμότητα με τα υψηλότερα ποσοστά να εμφανίζονται στην Αφρική και την Ανατολική Ευρώπη. Αυτός ο αριθμός δεν περιλαμβάνει εκτιμήσεις από τη Λατινική Αμερική ή την Ασία (την πιο πυκνοκατοικημένη ήπειρο στον πλανήτη), λόγω ανεπαρκούς αναφοράς. Με βάση τα στοιχεία των ερευνών προκύπτει ότι πάνω από 30 εκατομμύρια άντρες μπορούν να

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

επωφεληθούν από την τεχνολογία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART) και τη θεραπεία της υπογονιμότητας (Agarwa A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R., 2015).

Η ανδρική υπογονιμότητα διακρίνεται σε πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Ως πρωτοπαθής υπογονιμότητα ορίζεται η μη επίτευξη σύλληψης στο παρελθόν, ενώ στη δευτεροπαθή υπογονιμότητα έχει προηγηθεί σύλληψη, ανεξάρτητα από την έκβαση της εγκυμοσύνης. Η διάρκεια της υπογονιμότητας αποτελεί σημαντικό προγνωστικό παράγοντα. Ζευγάρια με ιστορικό πρωτοπαθούς υπογονιμότητας μεγαλύτερης από 3 χρόνια έχουν μικρή πιθανότητα αυτόματης σύλληψης (Βενάκη Ε., 2005).

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την πρόγνωση της υπογονιμότητας είναι:

- Η διάρκεια
- Το είδος αυτής(πρωτοπαθής ή δευτεροπαθής)
- Τα αποτελέσματα της εξέτασης του σπέρματος
- Η ηλικία και γονιμότητα της γυναίκας

Ο ουρολόγος ως ειδικός, οφείλει να διερευνήσει κάθε άνδρα με πρόβλημα γονιμότητας για την παρουσία ανωμαλιών του ουροποιογεννητικού συστήματος, ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη θεραπεία.

[Πίνακας 4] Κατηγορίες αιτιών υπογονιμότητας με βάση τη σπερματική ανάλυση (Παρανυχιανακης Γ., 2018)

Χαμηλός όγκος σπέρματος

Φάρμακα
Απόφραξη του εκσπερματιστικού πόρου
Σακχαρώδης διαβήτης
Οπισθοπεριτοναϊκή ή χειρουργική επέμβαση
Κάκωση νωτιαίου μυελού
Ψυχολογικοί παράγοντες
Ελλιπής συλλογή δείγματος
Ιδιοπαθής

Ολίγο- ασθενοσπερμία

Κιρσοκήλη
Κρυπορχία
Ιδιοπαθής
Ενδοκρινοπάθεια
Τοξίνες
Φάρμακα
Ζεστό περιβάλλον
Λοίμωξη

Φυσιολογικές παράμετροι χωρίς γονιμότητα

Γυναικολογική παθολογία
Προβλήματα συνουσίας
Αντισπερματικά αντισώματα
Διαταραχή του ακροσώματος

Αζωοσπερμία

Υπογοναδοτροπικός υπογοναδισμός
Χρωμοσωμικές ανωμαλίες
Χρωμόσωμα Y
Κιρσοκήλη
Συστροφή
Ορχίτιδα
Ιδιοπαθής
Απόφραξη του σπερματικού πόρου

Ασθενοσπερμία

Δομικές διαταραχές του σπερματοζωαρίου
Παρατεταμένη αποχή
Ιδιοπαθής
Λοίμωξη ουροποιογεννητικού
Κιρσοκήλη
Αντισπερματικά αντισώματα

Η σπερματογένεση είναι μια εξαιρετικά περίπλοκη διαδικασία διαφοροποίησης κυττάρων που περιλαμβάνει 2.300 γονίδια που ρυθμίζουν την ανάπτυξη και την ωρίμανση των γαμετικών κυττάρων. Η εξάπλωση των αριθμητικών και δομικών χρωμοσωματικών ανωμαλιών στον υπογόνιμο πληθυσμό κυμαίνεται από 2% έως 10%, το 4,5 με 8% εξ αυτών αναφέρονται με σοβαρή олиγοσπερμία (SOS), αντιστοίχως έως και το 20% εξ αυτών με μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA), άλλα πολλές άλλες γενετικές ανωμαλίες που προκαλούν στειρότητα παραμένουν άγνωστες (Xie C., Chen X., Liu Y., Wu Z., Ping P., 2018).

Τα υπογόνιμα αρσενικά με SOS και NOA μπορούν να αποκτήσουν απογόνους με τη βοήθεια των τεχνικών της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (ART), ιδιαίτερα της

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI). Ωστόσο, αυξάνονται οι κίνδυνοι μετάδοσης των γενετικών τους ανωμαλιών στους απογόνους τους.

Αιτιολογία της ανδρικής υπογονιμότητας

Ο ανδρικός παράγοντας θεωρείται υπεύθυνος σε ποσοστό 50% των περιπτώσεων υπογονιμότητας. Τα αίτια της ανδρικής υπογονιμότητας παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5)

[Πίνακας 5] Κύριες αιτίες ανδρικής υπογονιμότητας

- Συγγενείς παράγοντες (κρυπορχία και δυσγενεσία των όρχεων, συγγενής απουσία σπερματικού πόρου)
 - Επίκτητες ουρογεννητικές ανωμαλίες (αποφράξεις, συστροφή, καρκίνος όρχεως, ορχίτιδα)
 - Λοιμώξεις ουροποιητικού
 - Αύξηση της θερμοκρασίας του οσχέου (π.χ σαν συνέπεια κίρσοκλής)
 - Ενδοκρινικές διαταραχές
 - Γενετικές ανωμαλίες
 - Ανοσολογικοί παράγοντες
 - Συστηματικά νοσήματα
 - Εξωγενείς παράγοντες (φάρμακα, τοξίνες, ακτινοβολία, παράγοντες τρόπου ζωής)
 - Ιδιοπαθής (40-50% των περιπτώσεων)
-

Διάγνωση

Η διάγνωση της ανδρικής υπογονιμότητας πρέπει να εστιασθεί στην παρουσία κύριων διαταραχών (Πίνακας 5). Ταυτόχρονα συνιστάται και ο έλεγχος της συντρόφου ακόμη κι αν ανευρίσκονται διαταραχές στον άνδρα, διότι τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας αποδεικνύουν ότι, σε ένα στα τέσσερα ζευγάρια με πρόβλημα υπογονιμότητας ανευρίσκονται ανωμαλίες και στους δύο συντρόφους. Η διαγνωστική προσέγγιση του υπογόνιμου άνδρα περιλαμβάνει την λήψη του ιστορικού, την κλινική εξέταση και την εργαστηριακή διερεύνηση.

Ανάλυση σπέρματος

Η εξέταση του σπέρματος αποτελεί την βάση για την λήψη σημαντικών αποφάσεων για την κατάλληλη θεραπεία. Πρέπει να διενεργείται σε εργαστήριο που πληρεί τα διεθνή κριτήρια ποιότητας (Πίνακας 6).

[Πίνακας 6] Κατώτερες τιμές αναφοράς (5th centiles and their 95% confidence intervals) για τα χαρακτηριστικά του σπέρματος (WHO Manual for Semen Analysis (World Health Organization, 2010))

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

Εάν οι τιμές είναι εντός των ορίων της WHO, μία ανάλυση είναι επαρκής. Μόνο αν τα αποτελέσματα είναι παθολογικά πρέπει να επαναλαμβάνεται η ανάλυση. Είναι σημαντικός ο διαχωρισμός μεταξύ της олиγοσπερμίας (<15. 000.000 σπερματοζωάρια/ml), της ασθενοσπερμίας (<40% των σπερματοζωαρίων κινητά) και της τερατοσπερμίας (<4% των σπερματοζωαρίων με φυσιολογική μορφή). Αρκετά συχνά οι 3 αυτές διαταραχές συμβαίνουν ταυτόχρονα ως σύνδρομο олиγο-ασθενο-τερατοσπερμίας (OAT). Σε ακραίες περιπτώσεις του συνδρόμου OAT (<1.000.000 σπερματοζωάρια/ml), όπως και στην ασθενοσπερμία, υπάρχει αυξημένη συχνότητα απόφραξης του ανδρικού γεννητικού συστήματος και/ή γενετικών ανωμαλιών. Η κατάσταση αυτή ονομάζεται αζωσπερμία και έχει ως συνέπεια την απουσία σπέρματος στην εκσπερμάτιση. Υπάρχουν δύο είδη αζωσπερμίας η μη αποφρακτική αζωσπερμία (Non-obstructive Azoospermia-NOA), η οποία οφείλεται σε σοβαρή μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων λόγω παθολογικής σπερματογένεσης και η αποφρακτική αζωσπερμία όπου οι όρχεις παράγουν κανονικά σπερματοζωάρια αλλά τα τελευταία δεν μπορούν να εξέλθουν με το σπέρμα λόγω απόφραξης σε κάποιο σημείο της εκφορητικής οδού του σπέρματος.

Ορμονικός έλεγχος

Η δυσλειτουργία των ενδοκρινών αδένων είναι πιο συχνή σε υπογόνιμους άνδρες από ό,τι στο γενικό πληθυσμό, αν και παραμένει σπάνια. Ο ορμονικός έλεγχος περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της FSH, LH και της τεστοστερόνης. Σε ασθενείς με αζωσπερμία ή ακραία OAT, είναι σημαντικός ο διαχωρισμός μεταξύ απόφραξης ή μη. Ένα κριτήριο με προγνωστική αξία για την απόφραξη είναι η παρουσία φυσιολογικής FSH με φυσιολογικό όγκο όρχεων σε αμφοτέρη πλευρά. Παρόλα αυτά, ένα ποσοστό 29% των ανδρών με φυσιολογική FSH εμφανίζει διαταραχές σπερματογένεσης.

Γενετική εκτίμηση

Ένας σημαντικός αριθμός διαταραχών της ανδρικής γονιμότητας, η οποία περιγράφεται και ως ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα, έχει στην ουσία γενετική προέλευση. Η λήψη του οικογενειακού ιστορικού και η ανάλυση του καρυότυπου αποκαλύπτουν μερικές από τις διαταραχές αυτές. Αυτό όχι μόνο μπορεί να δώσει κάποια διάγνωση αλλά επιτρέπει και την κατάλληλη γενετική καθοδήγηση του ατόμου. Είναι επίσης πολύ σημαντικό αργότερα στη διαδικασία της ενδοκυτταροπλασματικής έγχυσης σπέρματος (ICSI), διότι οι διαταραχές της γονιμότητας και οι πιθανές γενετικές ανωμαλίες μπορούν να μεταφερθούν και στους απογόνους.

Τα μοριακά ελαττώματα και οι γενετικές μεταβολές που σχετίζονται με τη στειρότητα έχουν αρνητικές επιδράσεις στην ορμονική ομοιόσταση, τη σπερματογένεση και την ποιότητα των σπερματοζωαρίων. Μεταξύ των διαφόρων χρωμοσωμικών ελαττωμάτων που ανιχνεύθηκαν σε σοβαρά στείρα αρσενικά, οι δομικές εκτροπές των αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων, όπως είναι η Robertsonian μετατόπιση, και αναστροφές, συναντώνται σε μερικές περιπτώσεις των SOS, ενώ οι μικροδιαγραφές σε AZF περιοχές του χρωμοσώματος Y και ανευπλοειδίες των φυλλετικών χρωμοσωμάτων όπως το 47, XXY (δηλαδή το σύνδρομο Klinefelter, KS) αντιπροσωπεύουν το 1% έως 3% των περιπτώσεις NOA (Xie C., Chen X., Liu Y., Wu Z., Ping P., 2018).

Οι χρωμοσωμικές ανωμαλίες είναι πιο συχνές σε άνδρες με ακραία OAT και με αζωσπερμία. Η πιο κοινή διαταραχή των φυλλετικών χρωμοσωμάτων είναι το σύνδρομο Klinefelter (47 XXY), το οποίο προσβάλλει περίπου το 10 % των ανδρών διαγνωσμένων με αζωσπερμία. Το σύνδρομο Klinefelter χαρακτηρίζεται από υπεργοναδοτροφικό υπογοναδισμό. Μερικές φορές ανευρίσκεται σε ευνουχοειδής φαινότυπος όπου υπάρχει

γυναικομαστία. Και οι δυο όρχεις είναι πολύ μικροί και με παρουσία σωληναριακής ίνωσης. Το 60% των ασθενών έχει μειωμένα επίπεδα τεστοστερόνης με την ηλικία και χρειάζεται ορμονική υποκατάσταση. Η ανάλυση του καρυότυπου συνιστάται σε όλους τους άνδρες κατάλληλους για ICSI λόγω OAT.

Σε άνδρες με εξαιρετικά φτωχή ποιότητα σπέρματος μπορεί να βρεθεί μετάθεση και αποκοπή χρωμοσωμάτων, οι οποίες μπορεί να είναι κληρονομικές και να αποτελούν αιτίες συχνών αποβολών και συγγενών ανωμαλιών των απογόνων.

Σε περιπτώσεις αζωσπερμίας ή σοβαρής OAT, η αποκοπή τμημάτων του αζωσπερμικού παράγοντα (AZF) στο χρωμόσωμα Y μπορεί να συμβεί και χρειάζεται έλεγχος. Η συχνότητα αποκοπής τμημάτων του χρωμοσώματος Y (είναι περίπου 5%) στην ομάδα αυτή των ασθενών. Πιστοποιώντας την αποκοπή τμήματος του χρωμοσώματος Y σημαίνει ότι η διαταραχή θα μεταδοθεί στους άρρενες απογόνους οι οποίοι θα είναι στείροι.

Όταν πραγματοποιείται ICSI με χειρουργική αναρρόφηση σπέρματος, βασισμένη στη διάγνωση της συγγενούς αμφοτερόπλευρης απουσίας σπερματικών πόρων (CBAVD), το ζεύγος πρέπει να ελέγχεται για μετάλλαξη του γονιδίου διαμεμβρανικής ρύθμισης της κυστικής ίνωσης (CFTR). Εκτός από την κυστική ίνωση το γονίδιο αυτό συνδυάζεται με CBAVD. Το 85 % των ανδρών με CBAVD είναι θετικοί στον έλεγχο για μια ή δυο μεταλλάξεις του γονιδίου CFTR. Σε περιπτώσεις όπου ο σύντροφος είναι φορέας μετάλλαξης του γονιδίου CFTR, ανάλογα με το είδος της μετάλλαξης, υπάρχει 25 % πιθανότητα τέκνων με CF ή CBAVD και συνεπώς η ενημέρωση του ζεύγους είναι απαραίτητη (Jungwirth A., Diemer T., Giwercman A., Kopa Z., Krausz C., 2010).

Τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται έρευνες που στοχεύουν στην διερεύνηση των γενετικών ανωμαλιών που είναι υπεύθυνες για την ανδρική υπογονιμότητα. Σε αυτές τις μελέτες παρουσιάζονται οι γονιδιακές μεταλλάξεις που τροποποιούν την φυσιολογική λειτουργία της σπερματογένεσης. Στη συνέχεια του κεφάλαιο θα γίνει σχολιαστική ανάλυση της φυσιολογικής λειτουργίας των γονιδίων που θεωρούνται σημαντικές για την φυσιολογική ανδρική γονιμότητα, και θα παρατεθούν όλες οι μεταλλάξεις που έχουν βρεθεί για τα αντίστοιχα γονίδια. Τα γονίδια έχουν ομαδοποιηθεί στην συγκεκριμένη μελέτη με βάση τον ελαττωματικό φαινότυπο που προκαλούν όταν τροποποιείται η αλληλουχία τους. Δηλαδή εξετάζονται οι γονιδιακές μεταλλάξεις που προκαλούν την

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

ολιγοσπερμία, την ασθενοσπερμία, την τερατοσπερμία (μακροζωοσπερμία), την ολιγο-ασθενο-τερατοσπερμία και την μη αποφρακτική αζωσπεμία.

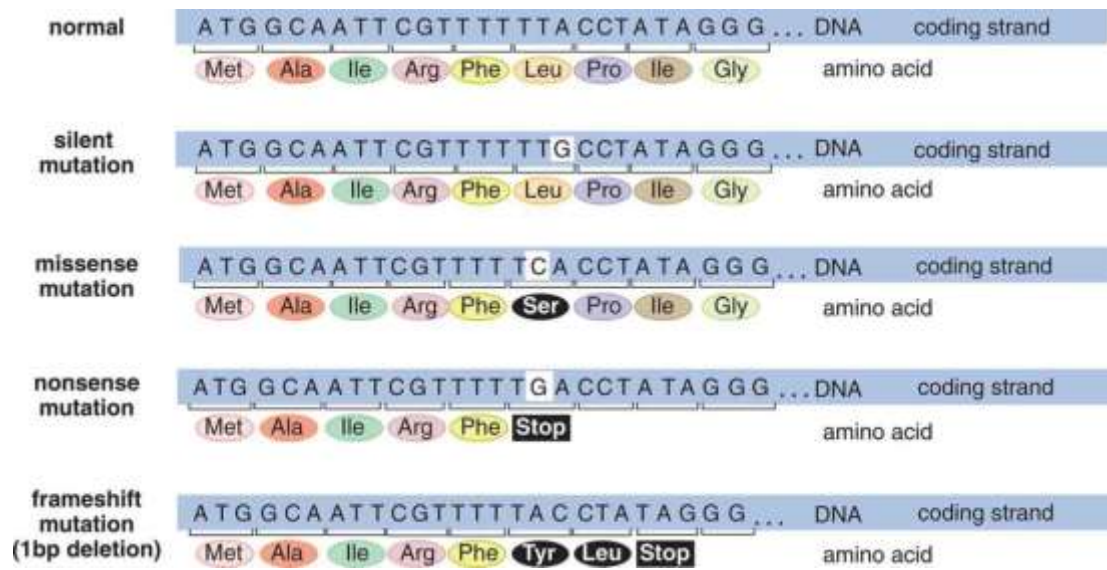
Τύποι μεταλλάξεων

Η αλληλουχία DNA ενός γονιδίου μπορεί να τροποποιηθεί με διάφορους τρόπους. Οι τύποι των μεταλλάξεων που μπορούν να παρατηρηθούν αναφέρονται επιγραμματικά στο Πίνακα 7 (Εικ. 14)

[Πίνακας 7] Τύποι μεταλλάξεων (Genetics Home Reference, 2018)

Τύπος μετάλλαξης	Αποτέλεσμα μετάλλαξης
<i>Silent</i>	Αλλαγή ζεύγους βάσεων DNA που δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στο αμινοξύ και η πρωτεΐνη παραμένη λειτουργική
<i>Missense</i>	Αλλαγή ζεύγους βάσεων DNA που οδηγεί στην αντικατάσταση ενός αμινοξέος
<i>Nonsense</i>	Αλλαγή ζεύγους βάσεων DNA που οδηγεί στην δημιουργία ενός κωδικονίου λήξης και παράγεται περικομμένη πρωτεΐνη με εσφαλμένη ή καθόλου λειτουργικότητα
<i>Μετάλλαξη εισαγωγής</i>	Εισαγωγή ενός ζεύγους βάσεων μεταβάλλει τον αριθμό των βάσεων DNA σε ένα γονίδιο προσθέτοντας ένα κομμάτι DNA. Ως αποτέλεσμα, η πρωτεΐνη που παράγεται από το γονίδιο μπορεί να μην λειτουργεί σωστά
<i>Μετάλλαξη διαγραφής</i>	Αφαίρεση ενός ή λίγων ζεύγων βάσεων εντός ενός γονιδίου, είτε μεγαλύτερες διαγραφές που απομακρύνουν ένα ολόκληρο γονίδιο ή αρκετά γειτονικά γονίδια. Το διαγραφμένο DNA μπορεί να μεταβάλλει τη λειτουργία της προκύπτουσας πρωτεΐνης.
<i>Μετάλλαξη διπλασιασμού</i>	Ένα κομμάτι DNA αντιγράφεται αφύσικα μία ή περισσότερες φορές
<i>Μετατόπιση πλαισίου</i>	Προσθήκη ή απώλεια βάσεων DNA αλλάζει το πλαίσιο ανάγνωσης γονιδίου και προκύπτουσα πρωτεΐνη είναι συνήθως μη λειτουργική. Οι παρεμβολές, οι διαγραφές και οι επικαλύψεις μπορούν όλες να είναι μεταλλάξεις μετατόπισης πλαισίου
<i>Επανάληψη</i>	Σύντομες ακολουθίες DNA που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στη σειρά και προκαλούν εσφαλμένη λειτουργικότητα πρωτεΐνης

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.



[Εικόνα 14] Τύποι μεταλλάξεων (schoolbag, 2018)

Κεφάλαιο 2

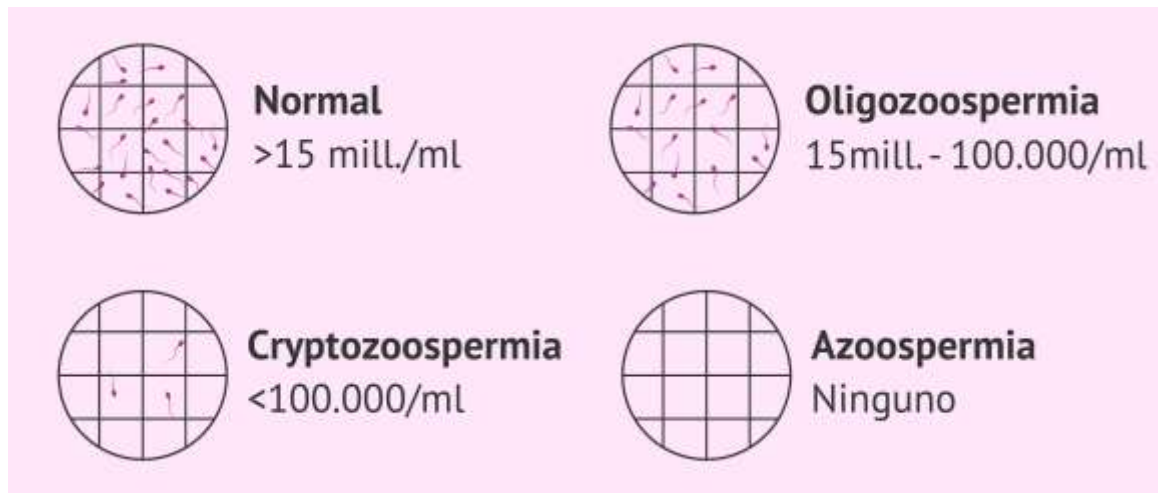
ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ ΑΝΔΡΙΚΗ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑ

Μεταλλάξεις που σχετίζονται με αζωσπερμία

Αζωσπερμία

Αζωσπερμία είναι η απουσία σπέρματος κατά την εκσπερμάτιση (Εικ. 15). Σε 40% των περιπτώσεων η αζωσπερμία προκαλείται από φυσική παρεμπόδιση του αρσενικού οδού εκσπερμάτισης (αποφρακτική αζωσπερμία, obstructive azoospermia-OA) και εδώ η αιτιολογία είναι κυρίως γνωστή. Οι υπόλοιπες περιπτώσεις κατατάσσονται σε μη αποφρακτική αζωσπερμία (non-obstructive azoospermia NOA) και συσχετίζονται συχνά με ελαττώματα των όρχεων, που χαρακτηρίζεται από μικρότερο όγκο όρχεων και αυξημένες συγκεντρώσεις LH και FSH. Ωστόσο, συχνά η αιτία της NOA παραμένει άγνωστη και μπορεί να οφείλεται σε γενετικές ανωμαλίες. Αυτά τα γενετικά ελαττώματα μπορεί να οδηγήσουν σε πλήρη απώλεια σπερματογένεσης (που ονομάζεται επίσης σύνδρομο Sertoli Cell Only (SCO)) ή σε καθήλωση της ωρίμανσης της σπερματογένεσης (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018). Η μη αποφρακτική αζωσπερμία (Non-obstructive Azoospermia-NOA) οφείλεται σε σοβαρή μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων λόγω παθολογικής σπερματογένεσης από τους όρχεις (δηλαδή δεν παράγουν οι όρχεις σπερματοζωάρια). Η αζωσπερμία αποτελεί μια από τις σοβαρότερες μορφές ανδρικής υπογονιμότητας και απαντάται περίπου στο 1% των ανδρών του γενικού πληθυσμού και στο 11% των ανδρών που μπαίνουν σε διαδικασία διερεύνησης της γονιμότητας τους.

Η αζωσπερμία μπορεί να διαπιστωθεί με την εξέταση του σπέρματος. Αυτή η πρώτη αξιολόγηση είναι πολύ σημαντική και απαιτεί ειδική προσέγγιση. Συγκεκριμένα, δεν είναι σπάνιο σε δείγματα τα οποία αρχικά είναι αρνητικά για την παρουσία σπερματοζωαρίων, τελικά να υπάρχουν σπερματοζωάρια τα οποία εντοπίζονται μετά από φυγοκέντρηση (κρυπτοσπερμία). Για τον λόγο αυτό η φυγοκέντρηση σε υψηλές στροφές των δειγμάτων, που είναι αρνητικά για την παρουσία σπερματοζωαρίων στην αρχική παρατήρηση και η προσεκτική παρατήρηση σε υψηλή ανάλυση του ιζήματος στο σύνολό του, πρέπει να είναι αναπόσπαστο μέρος της αξιολόγησης. Μόνον εάν και μετά την παρατήρηση του ιζήματος δεν βρεθούν σπερματοζωάρια μπορεί ένα δείγμα να χαρακτηριστεί ως αζωσπερμικό. Σε περίπτωση αζωσπερμίας συστήνεται ο επανέλεγχος του σπέρματος στο τρίμηνο προκειμένου να επιβεβαιωθεί η πρώτη παρατήρηση.



[Εικόνα 15] Χαρακτηριστικά αζωοσπερμίας (Reproduccion Asistida, 2018)

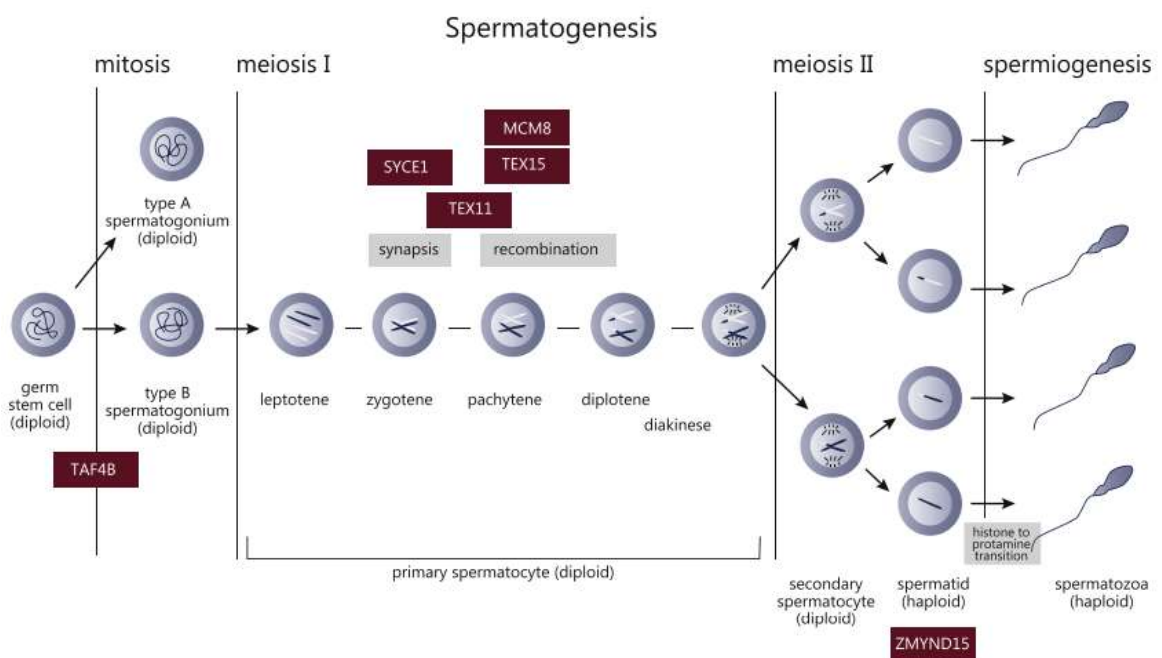
Ένα ιστορικό κρυπτορχιδισμού παρουσία μικρών ή μαλακών όρχεων υποδηλώνει μη αποφρακτική αζωοσπερμία (NOA), ειδικά αν σχετίζεται με αυξημένο επίπεδο FSH στον ορό. Οι άνδρες με αζωοσπερμία NOA συχνά έχουν αυξημένη συχνότητα διαφορετικών γενετικών ανωμαλιών που προκαλούν την έλλειψη σπέρματος. Αυτά μπορεί να αφορούν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, μικροελλείψεις του χρωμοσώματος Y, μεταλλάξεις του γονιδίου κυστικής ίνωσης. Οι καρυοτυπικές ανωμαλίες συναντώνται σε συχνότητα 1% σε νορμοσπερμικούς άνδρες, με τη συχνότητα να αυξάνεται στο 5% σε περιπτώσεις oligozoospermίας, ενώ σε περιπτώσεις αζωοσπερμίας η συχνότητα αυτή φτάνει στο 10-15%. Οι ανευπλοειδίες των φυλλετικών χρωμοσωμάτων είναι ο πιο συχνός τύπος καρυοτυπικών ανωμαλιών, που παρατηρούνται σε αζωοσπερμικούς άνδρες. Επίσης, συχνά παρατηρείται η αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αναστροφών ή μεταθέσεων, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα των αποβολών ή της απόκτησης παιδιών με χρωμοσωμικές ανωμαλίες. Όσον αφορά στις μικροελλείψεις στο χρωμόσωμα Y, αυτές συναντώνται σε συχνότητα περίπου 15% των αζωοσπερμικών ανδρών. Οι αρσενικοί απόγονοι των ανδρών που είναι φορείς μικροελλείψεων θα τις κληρονομήσουν και συνεπώς, θα είναι πιθανόν και οι ίδιοι υπογόνιμοι. Τέλος, όσον αφορά στις μεταλλάξεις του γονιδίου της κυστικής ίνωσης, περίπου το 25% των αζωοσπερμικών ανδρών με απλασία του σπερματικού πόρου είναι φορείς του γονιδίου. Κατ'επέκταση, είναι σημαντικό οι άνδρες αυτοί να υποβάλλονται σε ειδική γενετική εξέταση, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν είναι φορείς του γονιδίου, ενώ σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος συνιστάται να ακολουθήσει έλεγχος και της συντρόφου, προκειμένου να αποκλειστεί η πιθανότητα απόκτησης παιδιού με κυστική ίνωση. Επομένως, η πολύτιμη γνώση που έχει συγκεντρωθεί όλα αυτά τα χρόνια συστηματικής μελέτης και προσπάθειας, οδηγεί στο

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

συμπέρασμα πως η αζωοσπερμία σήμερα αντιμετωπίζεται πια αποτελεσματικά σχεδόν στο σύνολό της, είναι όμως αναγκαίο να συνοδεύεται από πολύ προσεκτικά βήματα τόσο σε επίπεδο αξιολόγησης και διερεύνησης όσο και σε επίπεδο γενετικής ανάλυσης, πριν το ζευγάρι προχωρήσει σε διαδικασία υποβοηθούμενης αναπαραγωγής.

Οι άνδρες που πάσχουν από αζωοσπερμία έχουν πλέον τη δυνατότητα να αποκτήσουν τον δικό τους βιολογικό απόγονο μέσα από τη διαδικασία της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και, ειδικότερα, με την διαδικασία της μικρογονιμοποίησης.

Στη συνέχεια του κεφαλαίου αναλύονται οι γονιδιακές μεταλλάξεις που προκαλούν το φαινότυπο της αζωοσπερμίας (Εικ. 16).



[Εικόνα 16] Σχηματική αναπαράσταση της ανθρώπινης σπερματογένεσης. Έχουν περιγραφεί έξι γονιδιακές μεταλλάξεις υπεύθυνες για την αζωοσπερμία/ολιγοζωοσπερμία: *TEX11*, *TEX15*, *MCM8*, *SYCE1*, *ZMYND15* και *TAF4B*. Αυτά τα γονίδια τοποθετούνται στο σχήμα ανάλογα με την λειτουργία τους στη διαδικασία της σπερματογένεσης (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018)

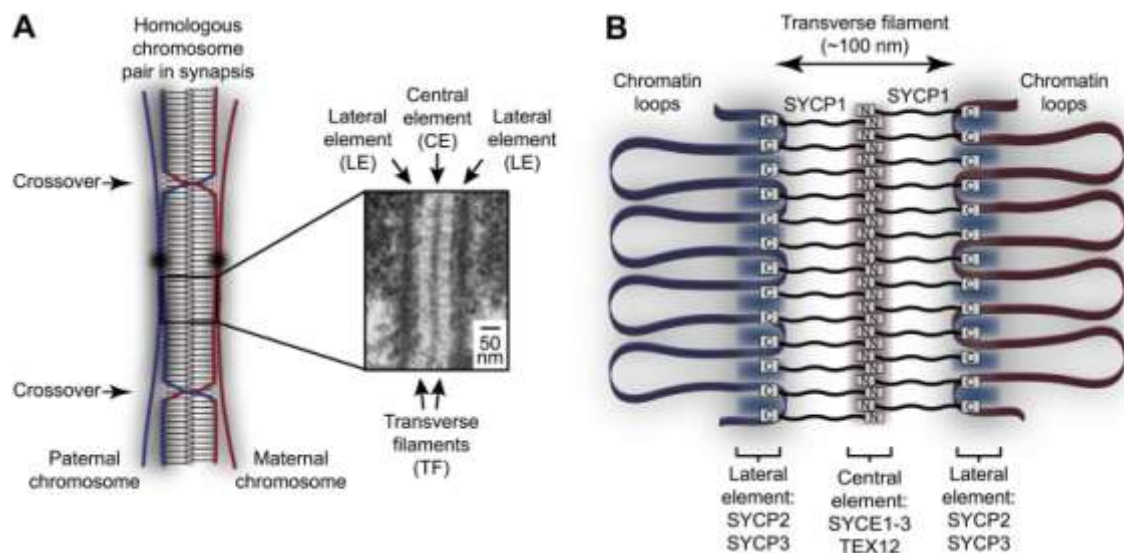
Μεταλλάξεις *SYCP3* και *SYCE1* με φαινότυπο αζωοσπερμίας

Λειτουργίες *SYCP3* και *SYCE1* πρωτεϊνών του συναπτομερούς

Το συναπτομερές (Synaptonemal complex - SC) είναι μια πρωτεϊνική δομή τύπου "σκάλας" των διπλοειδών χρωμοσωμάτων που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης της πρόφασης I σε σεξουαλικά αναπαραγωγικούς οργανισμούς και της οποίας η σύνθεση είναι απαραίτητη για την επιτυχή ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης. Μεσολαβεί στην ευθυγράμμιση και αντιστοίχιση των ομόλογων

χρωμοσωμάτων (σύναψη) και ενεργεί σαν ικρίωμα για τον μειωτικό ανασυνδυασμό (επιχiasμό). Εκτός αυτού, οι συνάψεις και ο ανασυνδυασμός είναι τα βασικά γεγονότα για να διασφαλιστεί ο σωστός χρωμοσωμικός διαχωρισμός κατά την αναπάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης.

Το SC αποτελείται από 2 πλευρικά στοιχεία (LEs), ένα κεντρικό (CE) και εγκάρσια νημάτια (TFs) ανάμεσα στα στοιχεία LEs και CE (Εικ. 17). Μαζί, τα CE και TFs αποτελούν την κεντρική περιοχή (CR) του συναπτομερούς. Η συναρμολόγηση του SC ξεκινά στην αρχή της μείωσης στην πρόφαση, κατά τη διάρκεια της λεπτотαινίας, με τον σχηματισμό των πρωτεϊνικών αξόνων, τα αξονικά στοιχεία (AE), κατά μήκος κάθε χρωμοσώματος. Κατά τη διάρκεια του επόμενου σταδίου της ζυγοταινίας, τα AE των ομόλογων χρωμοσωμάτων, που από αυτό το σημείο ονομάζονται πια LEs, ευθυγραμμίζονται και συνδέονται μέσω της CR. Στη συνέχεια, κατά το στάδιο της παχυταινίας, το SC είναι πλήρως συναρμολογημένο και πραγματοποιείται ανασυνδυασμός (Bolcun-Filas E., Schimenti JC., 2012) (Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., Benavente R., 2012). Η αποσυναρμολόγηση του SC ξεκινά κατά τη διάρκεια της φάσης της διπλωταινίας όταν τα συστατικά της CR διαχωρίζονται από τα χρωμοσώματα, όπου παραμένουν μόνο τα τελομερή και τα χιάσματα. Η παρουσία των χιασμάτων απαιτείται για τον σωστό διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων.



[Εικόνα 17] Μορφολογία και συστατικά του SC. (Α) Το συναπτομερές (SC) είναι ένα μοριακό φερμουάρ που συγκρατεί τα ομόλογα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μειωτικής πρόφασης Ι, επιτρέποντας τον ανασυνδυασμό και τον επιχiasμό. Το SC έχει μια τριμερή υπερδομή στην οποία τα εγκάρσια νημάτια γεφυρώνουν μεταξύ ενός κεντρικού στοιχείου (μέση γραμμή) και των πλευρικών στοιχείων που συνδέονται με τους χρωμοσωμικούς άξονες. Η ενσωματωμένη ηλεκτρονική μικρογραφία γράφεται από τους Kouznetsova et al. (2011) (Β) Πλευρικά στοιχεία (LEs), κεντρικό στοιχείο (CE), εγκάρσια νημάτια (TF) και χρωματίνη. Η θέση καθενός από τα 7 πρωτεϊνικά συστατικά υποδεικνύεται. Η SYCP1 πρωτεΐνη σχηματίζει τα εγκάρσια νημάτια, με τα N- και C-τελικά άκρα του να βρίσκονται στο κεντρικό και πλευρικό

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

στοιχείο αντίστοιχα. Το κεντρικό στοιχείο περιέχει επίσης τις SYCE1, SYCE2, SYCE3 και TEX12, ενώ το πλευρικό στοιχείο περιέχει τις SYCP2 και SYCP3 (Syrjänen JL., Pellegrini L., Davies OR., 2014).

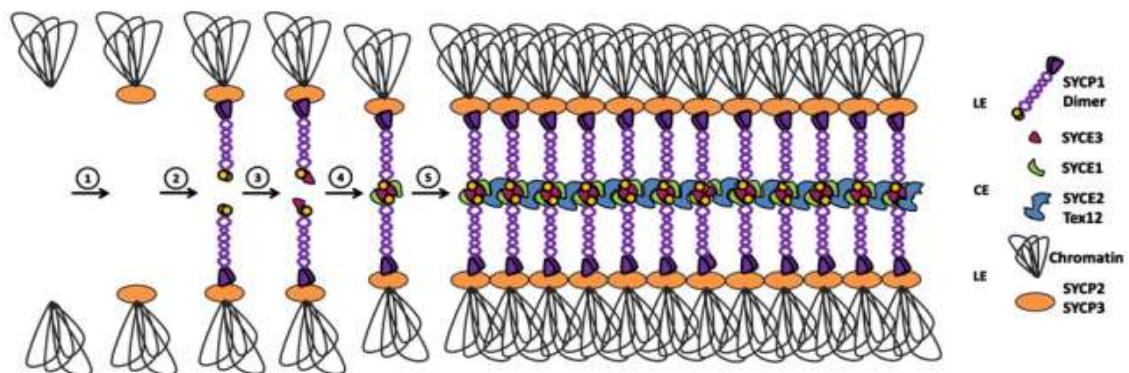
Στα θηλαστικά έχουν περιγραφεί επτά πρωτεΐνες του SC και όλες είναι μείωση-ειδικές. Επίσης περιέχουν α-ελικοειδή πεδία τα οποία σχηματίζουν περιελιγμένα σπειράματα και είναι ικανά για ομότυπη και ετερότυπη πρωτεϊνική αλληλεπίδραση.

Το κύριο συστατικό των LEs είναι η SYCP3 που είναι μια 30/33kDa πρωτεΐνη της οποίας οι δομές σπειροειδούς πηνίου βρίσκονται στο C-τελικό άκρο της (Syrjänen JL., Pellegrini L., Davies OR., 2014). Η δομή του σπειροειδούς πηνίου, μαζί με μικρή περιοχή του C-τελικού άκρου είναι απαραίτητα στοιχεία για το σχηματισμό του κατάλληλου πολυμερούς. Συγκεκριμένα, η ανθρώπινη SYCP3 είναι μια πρωτεΐνη 236 αμινοξέων και περιέχει δυο τομείς σπειροειδούς πηνίου που καλύπτουν τις υποπεριοχές 109-144 και 172-218, αντίστοιχα (Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro MR., Ishikawa M., Westphal H., Lamb DJ., 2003). Έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι η ανθρώπινη SYCP3 σχηματίζει τετραμερή με 66-230 αμινοξέα, κάνοντας έναν ελικοειδή πυρήνα που μεσολαβεί στην συναρμολόγηση του τετραμερούς και τα N-τελικά άκρα εκτείνονται από το τετραμερές του πυρήνα και είναι ικανά να δεσμεύουν το DNA (Syrjänen JL., Pellegrini L., Davies OR., 2014).

Το δεύτερο συστατικό του LE είναι η SYCP2, μια μεγάλη πρωτεΐνη που φαίνεται να εμπλέκεται στην συναρμολόγηση του LE καθώς και στην σύνδεση των LEs και TFs. Η SYCP2 έχει ένα σύντομο πεδίο σπειροειδούς πηνίου στο C-τελικό του άκρο που μπορεί να αλληλεπιδρά με τις SYCP3 και SYCP1. Η SYCP1 που είναι το κύριο συστατικό των TFs, περιέχει ένα μακρύ κεντρικό σπειροειδές πηνίο, το οποίο πλαισιώνεται από σφαιρικά N- και C-άκρα. Τα σπειροειδή πηνία θα διαμεσολαβούν σε SYCP1 ομοτυπικές αλληλεπιδράσεις, έτσι ώστε τα TF να αποτελούνται από διμερή ή τετραμερή με τα N- και C-άκρα τους να βρίσκονται στο CE και στο εσωτερικό άκρο των LEs, αντίστοιχα. Στο CE έχουν εντοπιστεί οι τέσσερις πρωτεΐνες: η SYCE1, η SYCE2, η SYCE3 και η TEX12 οι οποίες προβλέπεται να περιέχουν μοτίβα περιτυλιγμένου πηνίου. Οι πρωτεΐνες SYCP1, SYCE1 και SYCE3 είναι απαραίτητες για την αλληλεπίδραση των συνάψεων, ενώ οι SYCE2 και TEX12 είναι απαραίτητες για την διάδοση συνάψεων.

Η τρέχουσα εικόνα της δυναμικής του SC είναι ότι το χρωμόσωμα συνδέεται με την πρωτεΐνη SYCP3 και την πρωτεΐνη SYCP2 κατά την πρώιμη μειωτική πρόφαση ως αποτέλεσμα οδηγεί σε συναρμολόγηση AE. Στη συνέχεια, οι SYCP1 συνεργάζονται με τα AEs. Αργότερα, οι πρωτεΐνες SYCE3 και SYCE1 θα στρατολογηθούν. Η SYCE1 θα

προσδεθεί μέσω μιας αλληλεπίδρασης της C-τελικής έλικας της με την N-τελική έλικα της SYCE3 πρωτεΐνης. Η SYCE1 αλληλεπιδρά επίσης με το N-τελικό άκρο της SYCP1, προφανώς σταθεροποιώντας την. Τέλος, θα στρατολογηθούν οι πρωτεΐνες SYCE2 και TEX12, πιθανότατα με τη μορφή ετερο-οκταμερικού σύνθετου. Το SYCE2-TEX12 σύνθετο θα αλληλεπιδράσει με το SC μέσω της SYCE2, που θα συνδέσει τις SYCE1/3 καθώς και το N-τελικό άκρο της SYCP1 (Εικ. 18).



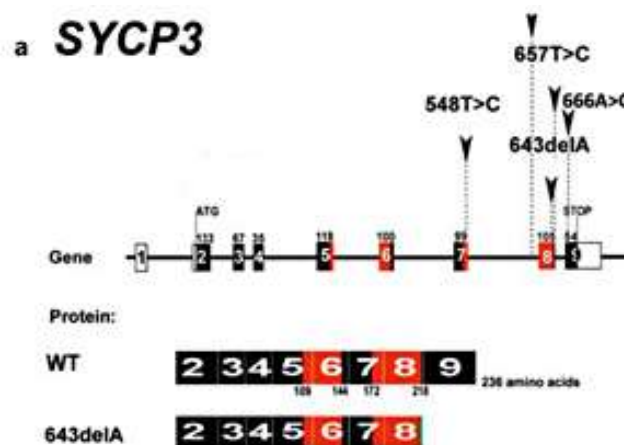
[Εικόνα 18] Στάδια συναρμολόγησης του SC (Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., Benavente R., 2012)

Μεταλλάξεις του γονιδίου *SYCP3*

Η SYCP3 (synaptonemal complex protein 3) είναι μια πρωτεΐνη δέσμησης-DNA σχετιζόμενη με τις συνάψεις, οι οποίες εμπλέκονται σε μειωτικές διαδικασίες των αρχέγονων γαμετικών κυττάρων (germ cell). Το γονίδιο *SYCP3* βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 (12q23) και κωδικοποιεί εννέα εξόνια που εκτείνονται σε 10-8Kb και εκφράζεται ειδικά στον όρχι. Κωδικοποιεί την πρωτεΐνη η οποία αποτελείται από 236 αμινοξέα που δημιουργούν δύο ελικοειδείς περιοχές (Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H., Sengoku K., 2017).

Τα ομόζυγα *Sycp3* knockout αρσενικά ποντίκια δεν έχουν αναπαραγωγική δυνατότητα ενώ τα θηλυκά είναι υπογόνιμα. Μια ανάλυση αυτών των knockout ποντικών έδειξε σημαντικά μειωμένο ορχικό όγκο και η ιστολογική εξέταση τους έδειξε διακοπή της μείωσης με ολοκληρωτική απουσία των στρογγυλών σπερματίδων, που τυπικά εμφανίζονται μετά την μείωση, καθώς και μαζικούς κυτταρικούς θανάτους κατά τη διάρκεια της μειωτικής πρόφασης. Ο αρσενικός ποντικός δεν είχε ώριμα σπερματοζώαρια. (Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H., Sengoku K., 2017). Τα μεταλλαγμένα σπερματοκύτταρα έχουν έλλειψη των AEs και LEs, καθώς και αποτυγχάνουν να κάνουν ανασυνδιασμούς. (Yuan L., Liu JG., Zhao J., Brundell E., Daneholt B., Höög C., 2000). Τα *Sycp3* +/- αρσενικά και τα θηλυκά ποντίκια είναι γόνιμα.

Το 2003, ο Miyamoto et al. εντόπισαν ετερόζυγη 1-bp μικροέλλειψη μιας αδεοσύνης στο 643-νουκλεοτίδιο (643delA) του γονιδίου της πρωτεΐνης SYCP3 σε 2 από 19 άνδρες με μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία. Η μικροέλλειψη αυτή εδράζεται στην ελικοειδή περιοχή της πρωτεΐνης SYCP3, η οποία καθορίζει την πρωτεϊνική δέσμευση. Η μετάλλαξη προκαλεί μετατόπιση στο πλαίσιο ανάγνωσης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός πρόωρου κωδικόνιου λήξης και περικοπής της C-τελικής ελικοειδούς περιοχής της πρωτεΐνης (Εικ. 19). Η συντιθέμενη πρωτεΐνη παρουσιάζει χαμηλή πρωτεϊνική λειτουργικότητα και αλληλεπίδραση. Η εξέταση της βιοψίας δειγμάτων από τους ασθενείς αυτούς παρουσίασε πλήρη μειωτική καθήλωση, χωρίς την παρουσία των μεταμειωτικών κυττάρων με τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα να είναι ο πιο ώριμος τύπος κυττάρων (Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro MR., Ishikawa M., Westphal H., Lamb DJ., 2003).



[Εικόνα 19] Διαγράμματα του SYCP3 γονιδίου και η δομή της ανθρώπινης SYCP3 πρωτεΐνης και οι παραλλαγές που εντοπίζονται σε υπογόνιμους ασθενείς (Geisinger A., Benavente R., 2016).

Με βιοχημικά και ex vivo έκφρασης πειράματα διερευνήθηκαν οι ιδιότητες της περικεκομμένης SYCP3 πρωτεΐνης. Σε σύγκριση με την αγρίου-τύπου SYCP3, η περικεκομμένη εκδοχή της έδειξε ελαττωματικές ιδιότητες πολυμερισμού. Ένα ακόμη πιο ενδιαφέρον στοιχείο είναι ότι σε πειράματα με συνέκφραση, η περικεκομμένη SYCP3 παρενέβαινε στον φυσιολογικό πολυμερισμό της αγρίου-τύπου SYCP3 πρωτεΐνης. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η περικεκομμένη πρωτεΐνη SYCP3 έχει μια κυρίαρχη-αρνητική επίδραση επί της πρωτεΐνης αγρίου-τύπου (Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro MR., Ishikawa M., Westphal H., Lamb DJ., 2003) (Baier A., Alsheimer M., Benavente R., 2007). Ως εκ τούτου, η υπογονιμότητα σε ετερόζυγους ασθενείς είναι συνέπεια της ελαττωματικής συναρμολόγησης του SC που προκαλείται από την περικεκομμένη SYCP3, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε μειωτική διακοπή και σε

μαζικούς θανάτους σπερματοκυττάρων. Στα *Sycp3* +/- ποντίκια ωστόσο, καμία κυρίαρχη-αρνητική επίδραση δεν παρατηρείται, επειδή η μόνη ανιχνεύσιμη SYCP3 πρωτεΐνη είναι αυτή που κωδικοποιείται από το αλληλόμορφο του αγρίου τύπου (Yuan L., Liu JG., Zhao J., Brundell .E, Daneholt B., Höög C., 2000).

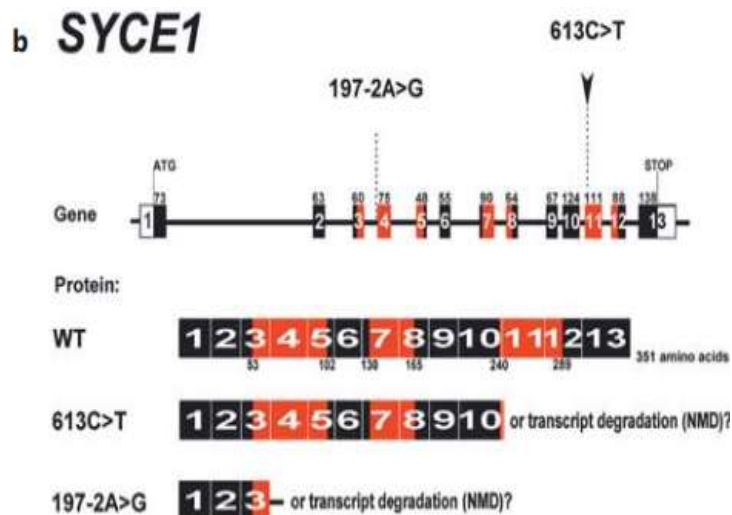
Οι αναφορές από Miyamoto et al. (2003) και Bolor et al. (2009) δείχνουν ότι, όπως στα ποντίκια, υπάρχει σεξουαλικός διμορφισμός το ίδιο και στους ανθρώπους, τα μεταλλαγμένα SYCP3 αρσενικά εμφανίζουν αζωοσπερμία ενώ τα μεταλλαγμένα θηλυκά παρουσιάζουν αποβολές. Ωστόσο, η αναγνώριση ετερόζυγης SYCP3 γονιδιακής μετάλλαξης (548T>C) στους άνδρες των ζευγαριών με καθ'έξιν αποβολές (Εικ. 19) (Stouffs K., Vandermaelen D., Tournaye H., Liebaers I., Lissens W., 2011) δείχνει ότι αυτός ο διμορφισμός μπορεί να μην είναι τόσο αυστηρός, και ότι τα προβλήματα κατά την μείωση στους αρένες μπορεί να προκαλούν δυσκολίες στη διατήρηση της εγκυμοσύνης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι, παρά το γεγονός ότι η μετάλλαξη που προσδιορίστηκε από Stouffs et al. εμπίπτει εντός της σπειροειδούς περιοχής και προβλέπεται να μεταβάλλει τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης, περιλαμβάνει αντικατάσταση ενός αμινοξέος (Ile183Thr), η οποία δεν οδηγεί σε μια C-τελική πρωτεϊνική περικοπή ή μια διευρυμένη πρωτεΐνη. Ως εκ τούτου, είναι κατανοητό ότι μια τέτοια αντικατάσταση αμινοξέος δεν είναι απαραίτητο να καταργεί την πλήρη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης SYCP3, έτσι ώστε κάποια ελαττωματικά σπερματοκύτταρα μπορεί να ξεφεύγουν το μειωτικό σημείο ελέγχου και συνεπώς να παράγεται ανευπλοειδικό σπέρμα. Αν και οι συγγραφείς δηλώνουν ότι απαιτείται περισσότερη διερεύνηση, η υπόθεση αυτή δείχνει ότι η σχέση μεταξύ των μεταλλάξεων των γονιδίων SYCP3 στους άνδρες και των επαναλαμβανόμενων αποβολών μπορεί επίσης να υπάρχει (Stouffs K., Vandermaelen D., Tournaye H., Liebaers I., Lissens W., 2011).

Δεδομένου ότι οι άνδρες με μη-αποφρακτική αζωοσπερμία είναι υποψήφιοι για τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής με τις οποίες η εγκυμοσύνη μπορεί τώρα να επιτευχθεί, τα ευρήματα αυτά έχουν επιπτώσεις σε απογόνους που συλλήφθησαν με TESE και μικρογονιμοποίηση ICSI (Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro MR., Ishikawa M., Westphal H., Lamb DJ., 2003).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *SYCE1*

Στα ποντίκια οι ελαττωματικές πρωτεΐνες της CR του SC (SYCP1, SYCE1, SYCE2, SYCE3, TEX12) προκαλούν υπογονιμότητα στους αρρένες και θηλυκούς ποντικούς. Σε σπερματοκύτταρα και ωάρια από knockout ζώα, φυσιολογικά AEs σχηματίζονται δείχνοντας ομόλογη ευθυγράμμιση, αλλά οι συνάψεις δεν σχηματίζονται. Σε *Sycp1*−/−, *Syce1*−/− και *Syce3*−/− μειωτικά κύτταρα δεν παρατηρείται ο σχηματισμός των CE (Hamer G., Wang H., Bolcun-Filas E., Cooke H.J., Benavente R., Höög C., 2008) (Bolcun-Filas E., Hall E., Speed R., Taggart M., Grey C., 2009) (Schramm S, Fraune J., Naumann R., HernandezHernandez A., Höög C., 2011). Τα *Tex12*−/− και *Syce2*−/− μειωτικά κύτταρα έδειξαν λιγότερο δραστικό φαινότυπο καθώς αυτά φτιάχνουν μικρά κομμάτια από ομοιάζοντες δομές των CE που αποτελούνται από τις SYCP1, SYCE1 και SYCE3 πρωτεΐνες, που υποτίθεται ότι είναι οι εναρκτήριες δομές του συναπτομερούς. Ωστόσο, δεν παρατηρείται μετάδοση του συναπτομερούς (Hamer G., Wang H., Bolcun-Filas E., Cooke H.J., Benavente R., Höög C., 2008). Το επακόλουθο των συναπτικών βλαβών είναι η διακοπή των διαδικασιών ανασυνδιασμού, η μειωτική καθήλωση και ο μαζικός κυτταρικός θάνατος των μειωτικών κυττάρων.

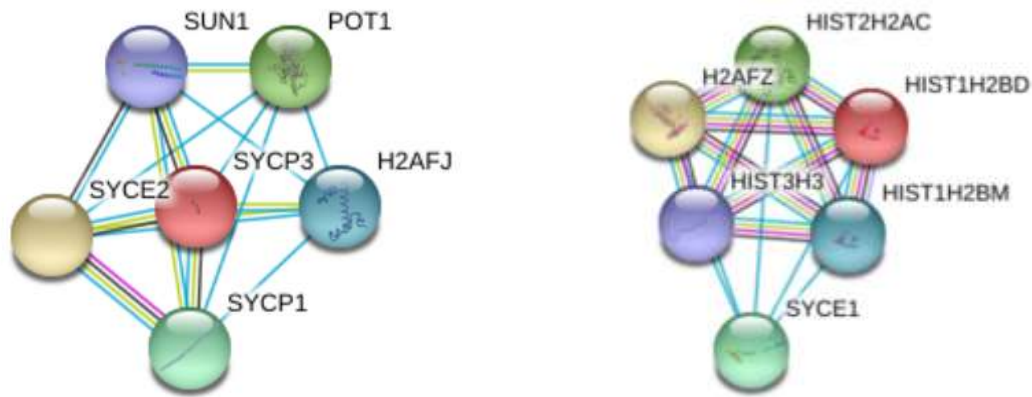
Πρόσφατα σε δύο οικογένειες περιγράφηκε μετάλλαξη σε CR-κωδική περιοχή, τα άτομα αυτά εμφάνιζαν ομόζυγη μετάλλαξη του γονιδίου *SYCE1*, ενώ οι γονείς αυτών των ασθενών ήταν ετερόζυγοι για αυτή την μετάλλαξη, το γεγονός αυτό υποδηλώνει υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Στην πρώτη οικογένεια που ερευνήθηκε βρέθηκε σε δύο κόρες μη νοηματική (*nonsense*) ομόζυγη μετάλλαξη του *SYCE1* γονιδίου (613C>T) στις υπογόνιμες αδελφές (Εικ. 20) (de Vries L., Behar D.M., Smirin-Yosef P., Lagovsky I., Tzur S., Basel-Vanagaite L., 2014). Ενώ στην άλλη οικογένεια ελέχθησαν δύο αζωοσπερμικά αδέλφια και ταυτοποιήθηκε μετάλλαξη στο *SYCE1* γονιδίου (197–2A>G), η οποία διαταράσσει την θέση υποδοχής του ιντρονιού 3 (Εικ. 20) (Maor-Sagie E., Cinnamon Y., Yaacov B., Shaag A., Goldsmidt H., 2015), δημιουργώντας κωδικόνιο λήξης. Η ιστολογική εξέταση των όρχεων τους έδειξε διακοπή της ωρίμανσης, με τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα να είναι η πιο ώριμη μορφή. Ο κυτταρικός θάνατος κατά την μείωση είναι συνέπεια σοβαρής συναπτικής βλάβης των ομόλογων χρωμοσωμάτων.



[Εικόνα 20] Διαγράμματα του *SYCE1* γονιδίου και η δομή της ανθρώπινης *SYCE1* πρωτεΐνης και οι παραλλαγές που εντοπίζονται σε υπογόνιμους ασθενείς (Geisinger A., Benavente R., 2016).

Μια πιθανή επίδραση των δύο αναφερόμενων μεταλλάξεων είναι η παραγωγή περικεκομμένων πρωτεϊνών με μειωμένα C-τελικά άκρα. Όπως έχει περιγραφεί, η C-τελική ελικοειδή περιοχή της πρωτεΐνης *SYCE1* παίρνει μέρος στη στρατολόγηση της στο συναπτομερές διάμεσο της *SYCE3* πρωτεΐνης. Έτσι, η μειωτική αποτυχία μπορεί να σχετίζεται με αδυναμία της μεταλλαγμένης *SYCE1* πρωτεΐνης να προσδεθεί στο SCs. Επιπλέον, ενώ οι περιοχές της *SYCE1* που απαιτούνται για την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με τις πρωτεΐνες *SYCP1* και *SYCE2* δεν έχουν καθοριστεί ακόμη, η περικεκομμένη πρωτεΐνη *SYCE1* ενδέχεται να μην είναι σε θέση να δεσμεύει αυτά τα CR συστατικά. Ακόμα μπορεί τα μεταλλαγμένα mRNA *SYCE1* μέσω των μη νοηματικών κωδικονίων να γίνονται στόχος της αποικοδόμησης, καθώς αυτά φέρουν πρόωρα κωδικόνια λήξης. Αν τελικά ισχύει κάτι τέτοιο τότε η υπογονιμότητα προκαλείται από την έλλειψη της *SYCE1* πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την γονιμότητα των ατόμων που φέρουν ετερόζυγη μετάλλαξη του γονιδίου *SYCE1*, καθώς η μη νοηματική μετάλλαξη που διαμεσολαβεί στην αποσύνθεση θα αποτρέψει την επικρατή-αρνητική δράση με την δημιουργία επαρκείας των απλοειδών.

Παρά το γεγονός ότι οι φορείς των ετερόζυγων *SYCE1* γονιδιακών μεταλλάξεων είναι γόνιμοι, αυτό δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί σε όλες τις περιπτώσεις. Καθώς οι πρωτεΐνες της CR δείχνουν την δυνατότητα να δημιουργούν ανώτερες δομές, δεν μπορεί όμως να αποκλειστεί η πιθανότητα ότι τουλάχιστον κάποια από τα γονίδια με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη επικρατούς-αρνητικής επίδρασης προκαλούνται από παρεμβολή στην κανονική δομή συναρμολόγησης που μπορεί να εντοπιστεί στο μέλλον (Geisinger A., Benavente R., 2016).



[Εικόνα 21] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της SYCP3(αριστερά) και της SYCE1 (δεξιά) (Gene Cards_a, 2018) (Gene Cards_b, 2018)

Μετάλλαξη *HSF2* με φαινότυπο αζωσπερμίας

Λειτουργία του παραγόντου θερμικού σοκ *HSF2*

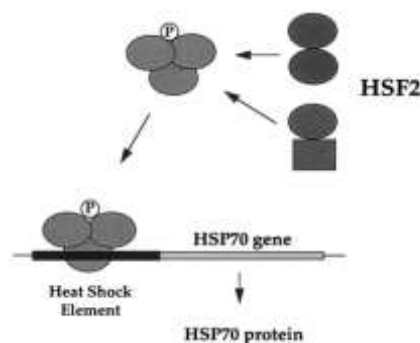
Η σπερματογένεση εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Η πιο κατάλληλη θερμοκρασία για την σπερματογένεση είναι σημαντικά χαμηλότερη (περίπου 4-5 ° C) από την κανονική θερμοκρασία του σώματος. Η αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων είναι επιβλαβής στην σπερματογένεση και μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα των σπερματοζωαρίων και να αυξήσει τον κίνδυνο της ανδρικής υπογονιμότητας. Η έκθεση των κυττάρων σε θανάσιμες θερμικές καταστάσεις προκαλεί μια κυτταροπροστατευτική αντίδραση που ονομάζεται αντίδραση θερμικού σοκ. Το θεμελιώδες συστατικό αυτής της αντίδρασης είναι η *de novo* σύνθεση πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs), η οποία ρυθμίζεται από παράγοντες μεταγραφής θερμικού σοκ (HSFs). Η συσσώρευση πρωτεϊνών θερμικού σοκ καθιστά τα κύτταρα θερμοανθεκτικά και τους επιτρέπει να επιβιώσουν σε ένα επακόλουθο θανάσιμο θερμικό στρες (Widlak W., Vydra N., 2017).

Η πρωτεΐνη *HSF2* ανήκει στην οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων θερμικού σοκ (heat-shock transcription factors - HSFs) και έχει σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση της σπερματογένεσης. Τουλάχιστον δύο ισομορφές *HSF2a* και *HSF2b* ταυτοποιήθηκαν για το γονίδιο *HSF2*. Σε απόκριση στα διαφορετικά ερεθίσματα κάτω από φυσιολογικές ή στρεσογόνες καταστάσεις, οι πρωτεΐνες HSFs ρυθμίζουν την δυναμική έκφραση διαφορετικών πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat-shock proteins – HSPs) που είναι υπεύθυνες για επακόλουθα κατασταλτικά αποτελέσματα, που σχετίζονται με κυτταροπροστατευτικές λειτουργίες αναδίπλωσης πολυπεπτιδίων και ενδοκυτταρικής μεταφοράς πρωτεϊνών (Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H., Sengoku K., 2017). Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τους ακριβείς ρόλους του γονιδίου *HSF2* που

συμβάλουν στην ανδρική υπογονιμότητα. Η γενική λειτουργία των HSPs πρωτεϊνών είναι η υποβοήθηση της αναδίπλωσης πρωτεϊνών είτε κατά τη διάρκεια της *de novo* σύνθεσης είτε υπό συνθήκες στρες που σχετίζονται με την εσφαλμένη αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Οι HSPs επιτυγχάνουν το στόχο αυτόν με τη δέσμευση σε υδρόφοβα αμινοξέα σε λανθασμένα αναδιπλώμενες πρωτεΐνες και έτσι αποτρέπουν το σχηματισμό πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Εκτός από τη ρύθμιση της προσαρμογής των κυττάρων στο στρες που προκαλείται από την επαγωγή έκφρασης HSPs, μέλη της οικογένειας *HSF* γονιδίων συμβάλλουν σε διαδικασίες που σχετίζονται με την ανάπτυξη και την αύξηση. Αυτή η λειτουργία συνδέεται πιθανότατα με τη ρύθμιση των γονιδίων που εμπλέκονται σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες που εκτείνονται πέρα από την αναδίπλωση πρωτεϊνών (που είναι ο γενικός ρόλος των HSPs).

Η *HSF* οικογένεια περιλαμβάνει αρκετά μέλη: *HSF1* έως *HSF5*, *HSFY* και *HSFX*, τα οποία ομαδοποιούνται σε μία οικογένεια λόγω της μεγάλης ομοιότητας της περιοχής δέσμευσης τους σε DNA. Η περιοχή αυτή επιτρέπει την σύνδεση σε συγκεκριμένες αλληλουχίες του γονιδιώματος που ονομάζονται Heat Shock Elements (*HSEs*). Η αλληλουχία *HSE* είναι μια συστοιχία παράλληλων τουλάχιστον τριών αντίθετα προσανατολισμένων μοτίβων "nGAAn" ή μιας εκφυλισμένης έκδοσής τους. Σε υποκινητές γονιδίων *HSP*, ένας αριθμός τέτοιων πεντανουκλεοτιδίων στο *HSE* μπορεί να κυμαίνεται από τρία έως οκτώ. Επίσης, ο αριθμός των λειτουργικών *HSE* ποικίλλει. Η αρχιτεκτονική *HSE* είναι ένας σημαντικός καθοριστής της ειδικής δέσμευσης των *HSF* κατά τη διάρκεια της γονιδιακής ρύθμισης σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Εικ. 22).

Η πρωτεΐνη *HSF2* υποτίθεται ότι σχηματίζει ανενεργά διμερή σε φυσιολογική θερμοκρασία και κάτω από διάφορες καταστάσεις στρες τριμερίζεται σε μια μεταγραφικά ενεργή μορφή. Το *HSF2* είναι μια πρωτεΐνη με μικρό χρόνο ημιζωής που ρυθμίζεται κυρίως στο επίπεδο έκφρασής της (Widlak W., Vydra N., 2017).

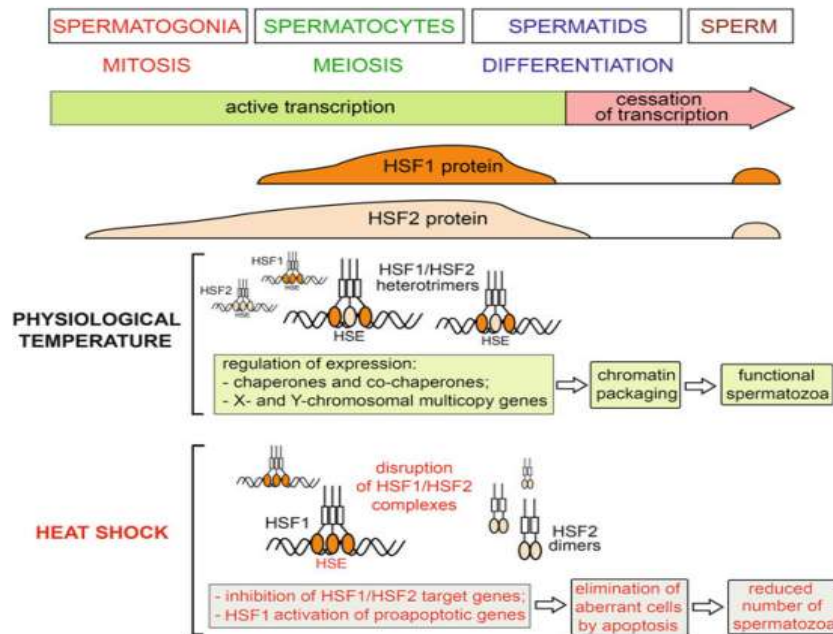


[Εικόνα 22] Απεικόνιση της μεταγραφικής ρυθμιστικής λειτουργίας του *HSF2* (Creagh EM., Sheehan D.,

Cotter TG., 2018).

Αν και οι HSF1 και HSF2 πρωτεΐνες είναι λειτουργικά διακριτές, μπορούν να συνεργάζονται είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε κάτω από στρες. Έχει παρατηρηθεί η δημιουργία συμπλόκων HSF1/HSF2 πιθανότατα με τη μορφή ετεροτριμερών. Τα ετεροτριμερή σύμπλοκα HSF1/HSF2 υπάρχουν επίσης σε σπερματοκύτταρα ποντικού. Τα γονίδια των οποίων οι υποκινητές έχουν καταλυθεί από HSF1/HSF2 κωδικοποιούν τις συνοδούς πρωτεΐνες (chaperones) και τις συν-συνοδούς που διευκολύνουν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών. Έτσι, και οι δύο παράγοντες συμμετέχουν στη ρύθμιση του βασικού επιπέδου της μεταγραφής αυτών των γονιδίων στη φυσιολογική θερμοκρασία (Εικ. 23).

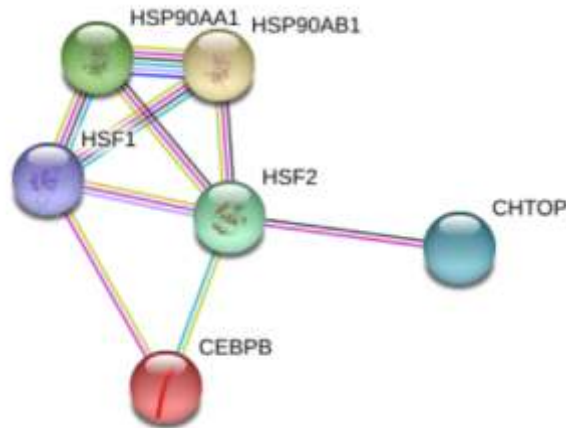
Ο ακριβής ρόλος των HSF1 και HSF2 στα γαμετικά κύτταρα είναι άγνωστος. Εντούτοις, έχει τεκμηριωθεί η συμμετοχή τους στη ρύθμιση της μετα-μειωτικής έκφρασης ορισμένων X- και Y-χρωμοσωμικών γονιδίων (π.χ. *Sly*, *Slx*, *Ssty1 / 2*) που απαιτούνται για το σωστό πακετάρισμα της χρωματίνης στο σπέρμα (Εικ. 23). Τα χρωμοσώματα X και Y είναι σε μεγάλο βαθμό μη ομόλογα. Συνεπώς, οι συνάψεις δημιουργούνται κατά τη διάρκεια της μείωσης μόνο στις μικρές ομόλογες περιοχές τους, ενώ οι περιοχές χωρίς συνάψεις αποσιωπούνται και ενσωματώνονται σε μια ξεχωριστή περιοχή χρωματίνης στην κυτταρική περιφέρεια που ονομάζεται sex body. Η δέσμευση HSF1 και HSF2 επιτρέπει στα γονίδια αυτά να ξεφύγουν από την μετα-μειωτική καταστολή των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Ως εκ τούτου, αυτά τα γονίδια μπορούν να είναι ενεργά σε στρογγυλές σπερματίδες. Συνεπώς, η έλλειψη HSF1 ή HSF2 οδηγεί σε απορύθμιση της έκφρασης των γονιδίων αυτών και σε παραμόρφωση της μορφολογίας κεφαλής σπέρματος αντίστοιχα με το φαινότυπο μεταλλαγμένων αρσενικών με μερική διαγραφή του μακρύ βραχίονα MSY (Widlak W., Vydra N., 2017).



[Εικόνα 23] Η αλληλεπίδραση μεταξύ των HSF1 και HSF2 σε σπερματογένεση σε φυσιολογικές και αυξημένες θερμοκρασίες. Η παρατηρούμενη συνεργασία των HSF1 και HSF2 σε σπερματοκύτταρα και σε στρογγυλές σπερματίδες είναι κρίσιμη για την φυσιολογική σπερματογένεση. Η προκαλούμενη από το θερμικό σοκ διαταραχή των αλληλεπιδράσεων HSF1/HSF2 συνδέεται με την απελευθέρωση της HSF2 από την χρωματίνη και την αυξημένη δέσμευση της HSF1. Προαποπτωτικά γονίδια θα ενεργοποιηθούν από την HSF1 οδηγώντας στην εξάλειψη των ελλατωματικών γεννητικών κυττάρων. HSE, στοιχείο θερμικού σοκ (Widlak W., Vydra N., 2017)

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ HSF1 και HSF2 οι οποίες είναι κρίσιμες για την σωστή σπερματογένεση, διαταράσσονται κατά τη διάρκεια θερμικού σοκ όταν η ενεργοποίηση της HSF1 και η αυξημένη προσδετική της ικανότητα στη χρωματίνη συσχετίζεται με αποσταθεροποίηση και μειωμένη δέσμευση της HSF2. Κατά συνέπεια, η μεταγραφή πολλών γονιδίων που είναι απαραίτητα για τη σπερματογένεση αναστέλλεται κατά τη διάρκεια του στρες (Εικ. 23).

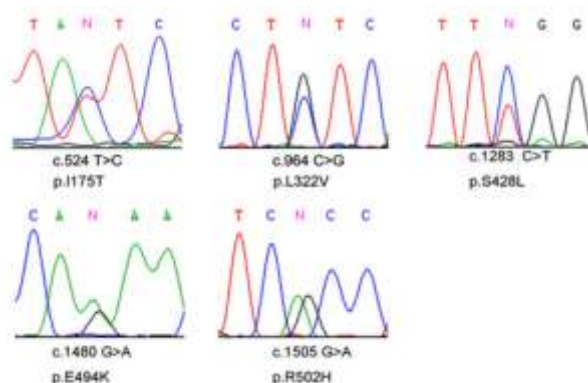
Επίσης βρέθηκε σε σπερματοκύτταρα ποντικού μηχανισμός διατήρησης μεταγραφικής ικανότητας του γονιδίου *Hsp70* (HSPA1) σε συμπυκνωμένη χρωματίνη. Η πρωτεΐνη HSF2 συνδέεται με τον υποκινητή του γονιδίου *Hspa1b* στις σπερματίδες εμποδίζοντας την πλήρη συμπύκνωσή του γονιδίου και καθιστά δυνατή την επακόλουθη σύνδεση της HSF1 καθώς και του παράγοντα μεταγραφής SP1 σε ώριμο σπέρμα. Η διατήρηση του υποκινητή σε ανοικτή διαμόρφωση καθιστά το γονίδιο *Hspa1b* έτοιμο για έγκαιρη ενεργοποίηση που συμβαίνει λίγο μετά τη γονιμοποίηση στο στάδιο ενός κυττάρου του εμβρύου.



[Εικόνα 24] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της HSF2 (Gene Cards_e, 2018).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *HSF2*

Ορισμένες αλλαγές αλληλουχίας του γονιδίου *HSF2* μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα την μη φυσιολογική έκφραση των HSPs και να επηρεάζουν τις λειτουργίες τους. Για να ελεγχθεί εάν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *HSF2* συμβάλλουν στην ευαισθησία της ανδρικής υπογονιμότητας αναλύθηκαν τα εξώνια του *HSF2* σε ασθενείς με ιδιοπαθής αζωσπερμία. Εντοπίστηκαν εννέα συνώνυμες μεταλλάξεις και πέντε μη νοηματικές μεταλλάξεις (*missense*) στο γονίδιο *HSF2* (Εικ. 25). Παρατηρήθηκε ότι η μια από τις μεταλλάξεις *R502H* σε πολύ συντηρητική θέση επηρεάζει τη μεταγραφική ρυθμιστική λειτουργία του γονιδίου *HSF2* καθώς τα δεδομένα μέτρησης επιπέδων έκφρασης του γονιδίου στόχου-*HSPA2* ήταν μειωμένα. Έτσι, προτάθηκε ότι η μετάλλαξη του γονιδίου *HSF2* οδηγεί σε ανώμαλη έκφραση της *HSPA2* και συμβάλλει ενδεχομένως στην εμφάνιση της ανδρικής υπογονιμότητας. Στη βιοψία ασθενή με μετάλλαξη *R502H* διαγνώστηκε μη αποφρακτική αζωοσπερμία και περαιτέρω αποδείχθηκε ότι η διαδικασία της σπερματογένεσης μπλοκάρεται κυρίως στο στάδιο των σπερματοκυττάρων.



[Εικόνα 25] Οι πέντε *missense* μεταλλάξεις που ταυτοποιήθηκαν στο γονίδιο *HSF2* και προκαλούν ιδιοπαθής ανδρική υπογονιμότητα (Mou L., Wang Y., Li H., Huang Y., Jiang T., Huang W., Li Z., Chen J.,

Xie J., Liu Y., Jiang Z., Li X., Ye J., Cai Z., Gui Y., 2013)

Το γονίδιο *HSF2* ρυθμίζει την έκφραση πολλών *HSP* γονιδίων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων *HSPA2*, *HSPH*, *HSPC*, *DNAJ*, *HSPB*, *HSP90* και *HSP27*. Τα HSPs λειτουργούν ως μοριακοί συνοδοί για το μοναδικό σύνολο πρωτεϊνών που συντίθενται κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Τα ευρήματα των μεταλλάξεων υποδεικνύουν τη σημασία του γονιδίου *HSF2* στη σπερματογένεση. Αποδείχθηκε ότι το μεταλλαγμένο *R502H* επηρεάζει τη μεταγραφική ρυθμιστική λειτουργία της *HSF2* σε *HSPA2*. Επιπλέον, φάνηκε ότι η μετάλλαξη *R502H* όχι μόνο οδηγεί σε μη λειτουργικό παράγοντα μεταγραφής αλλά επίσης είχε κυρίαρχη αρνητική επίδραση στο αλληλόμορφο άγριου τύπου-WT, το οποίο επιβεβαιώνεται με το φαινοτυπικό αποτέλεσμα στους ετερόζυγους ασθενείς με ιδιοπαθείς άζωσπερμία (IA).

Έχει αναφερθεί ότι το γονίδιο *HSPA2* που είναι στόχος της πρωτεΐνης *HSF2*, εκφράζεται με υψηλό βαθμό στους όρχεις και φαίνεται να έχει έναν ουσιώδη ρόλο κατά τη διάρκεια της μειωτικής φάσης της σπερματογένεσης. Η στοχευμένη γονιδιακή απορύθμιση του *Hspa2* είχε ως αποτέλεσμα την αποτυχία της μείωσης, την απόπτωση των γεννητικών κυττάρων και την ανδρική υπογονιμότητα. Συνεπώς, η μεταγραφική ρυθμιστική λειτουργία της πρωτεΐνης *HSF2* μπορεί να είναι ουσιώδης για να εξασφαλιστεί η κατάλληλη έκφραση του *HSPA2* για προστασία από την IA, ενώ η μειωμένη μεταγραφική ρυθμιστική λειτουργία με μετάλλαξη *R502H* μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο για IA (Mou L., Wang Y., Li H., Huang Y., Jiang T., Huang W., Li Z., Chen J., Xie J., Liu Y., Jiang Z., Li X., Ye J., Cai Z., Gui Y., 2013).

Ωστόσο, μια τέτοια ανασταλτική μετάλλαξη ανιχνεύθηκε μόνο σε έναν από τους 766 ασθενείς με IA όποτε δεν μπορούν να αποκλειστούν συνυπάρχουσες αλλοιώσεις σε άλλα σημαντικά γονίδια.

Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι τα *hsf1*^{-/-} *hsf2*^{-/-} ποντίκια εμφανίζουν μειωμένο αριθμό διαιρούμενων βλαστικών κυττάρων και πλήρη καθήλωση της σπερματογένεσης στο πρώτο μειωτικό στάδιο. Η μειωμένη ή απουσία έκφρασης διαφόρων ουσιωδών μειωτικών και μεταμειωτικών γονιδίων στους όρχεις των ποντικών *hsf1*^{-/-} *hsf2*^{-/-} αντανάκλα την εξαρτώμενη από *hsf1* και *hsf2* μεταγραφική δραστηριότητα (Wang G., Ying Z., Jin X., Tu N, Zhang Y., Phillips M., 2004).

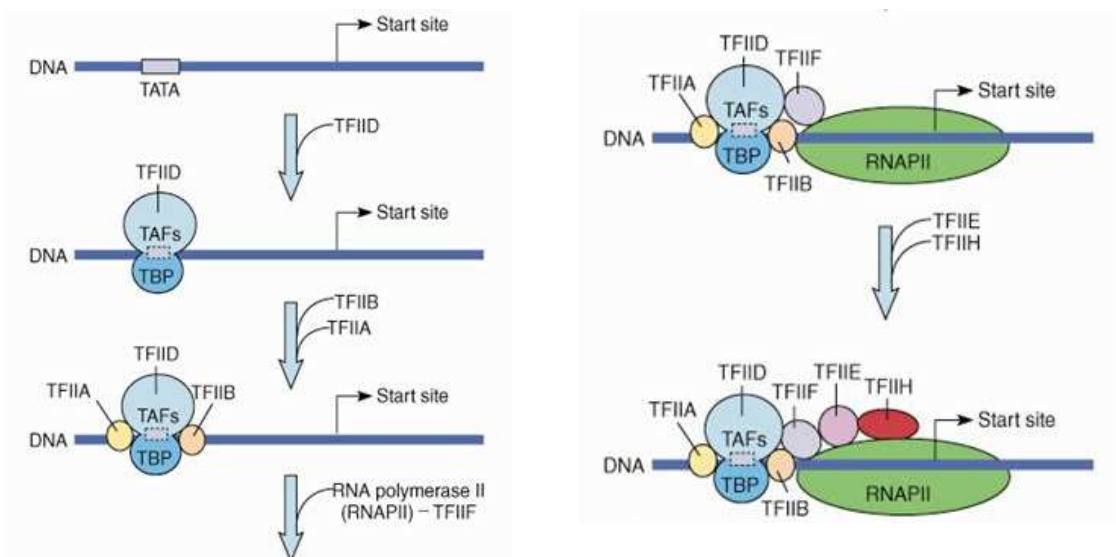
Μεταλλάξεις *TAF4B* και *ZMYND15* που σχετίζονται με αζωσπερμία

Λειτουργία της πρωτεΐνης TAF4B

Η σπερματογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί την εξειδικευμένη λειτουργία πολλαπλών τύπων κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των σωματικών και των γεννητικών κυττάρων, που συλλογικά οδηγούν στη συνεχή παραγωγή λειτουργικού σπέρματος σε ενήλικα αρσενικά. Η απεριόριστη παραγωγή αρσενικών γαμετών επιτυγχάνεται σε μεγάλο βαθμό μέσω της ικανότητας αυτοανανέωσης των βλαστικών κυττάρων στους ενήλικους όρχεις. Αυτά τα σύνθετα και πολύπλοκα συμβάντα εξαρτώνται από την κατάλληλη έκφραση και δράση συγκεκριμένων γονιδίων σε πολλαπλά στάδια ανάπτυξης των βλαστικών κυττάρων. Η ακριβής χρονοχωρική έκφραση ειδικών μεταγραφικών παραγόντων είναι επίσης απαραίτητη για την ορθή εκτέλεση της σπερματογένεσης. Επιπλέον των ειδικών για τη γονάδα μεταγραφικών παραγόντων, εξειδικευμένα συστατικά του βασικού μηχανισμού της RNA Polymerase II είναι επίσης κρίσιμα για την εκτέλεση προγραμματών γονιδιακής έκφρασης ειδικά στις γονάδες (Falender AE., Freiman RN., Geles KG., Lo KC., Hwang K., Lamb DJ., Morris PL., Tjian R., Richards JS., 2005).

Ο μηχανισμός της μεταγραφής των γονιδίων από την RNA Polymerase II είναι μια αρκετά περίπλοκη διαδικασία που θα εξετασθεί στη συνέχεια του κεφαλαίου. Το πρώτο στάδιο στην έναρξη της μεταγραφής από την Pol II είναι η συγκρότηση στον υποκινητή του συμπλόκου προέναρξης της μεταγραφής από τους γενετικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Οι γενετικοί μεταγραφικοί παράγοντες προσελκύουν την RNA πολυμεράση II στο υποκινητή, βοηθούν στο ξετύλιγμα του DNA, στην απομάκρυνση της πολυμεράσης από τον υποκινητή με την ολοκλήρωση της έναρξης και μετάβαση στο στάδιο της επιμήκυνσης της μεταγραφής. Το πρώτο βήμα στη συγκρότηση του συμπλόκου είναι η πρόσδεση του παράγοντα TFIID (transcription factor IID) στην αλληλουχία *TATA*. Ο TFIID αποτελεί ένα μεγάλο σύμπλοκο πρωτεϊνών (Εικ. 27). Η ειδικότητα του για την αλληλουχία *TATA* οφείλεται σε μια πρωτεΐνη του συμπλόκου που ονομάζεται πρωτεΐνη που συνδέεται στο *TATA box* (TATA-box binding protein, TBP). Η TBP συνδέεται ισχυρά με έναν αριθμό πολυπεπτιδίων που είναι υπομονάδες του TFIID και ονομάζονται TAFs (TATA binding protein associated factors). Στο παραπάνω σύμπλοκο προστίθεται στη συνέχεια ο παράγοντας TFIIA που φαίνεται να παρεμποδίζει την πρόσδεση καταστολέων, επιτρέποντας τον παραπέρα σχηματισμό του συμπλόκου. Ο

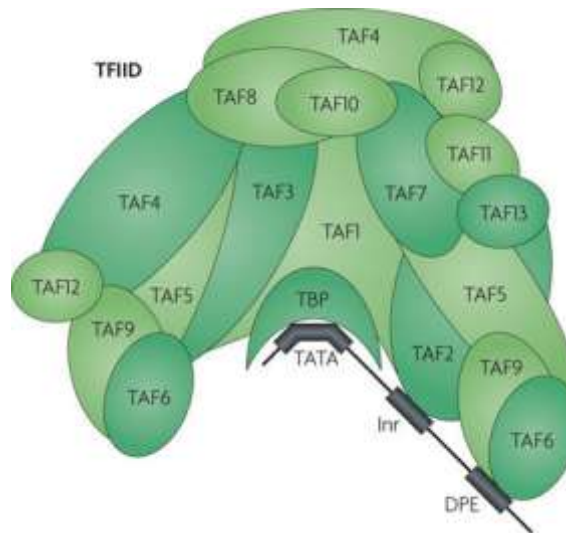
παράγοντας TFIIB προστίθεται αμέσως μετά, αλληλεπιδρώντας με την περιοχή του σημείου έναρξης. Ακολουθεί η πρόσδεση της RNA πολυμεράσης η οποία προσελκύεται στην περιοχή του σημείου έναρξης της μεταγραφής από τον παράγοντα TFIIF με τον οποίο αυτή συνδέεται προηγουμένως. Η μεταγραφή δεν μπορεί να αρχίσει αν δεν συνδεθούν στο σύμπλοκο και δύο άλλοι παράγοντες, οι TFIIE και TFIIH (Εικ. 26). Ο TFIIH αποτελείται από δύο υπομονάδες που έχουν λειτουργικότητα ΑΤΡάσης, μιας πρωτεϊνικής κινάσης και μιας ελικάσης. Η έναρξη από την πολυμεράση II απαιτεί την υδρόλυση του ΑΤΡ και σε αυτή τη διαδικασία παίρνουν ενεργό μέρος οι ενεργότητες ΑΤΡάσης και ελικάσης του TFIIH που χρησιμοποιεί την ενέργεια του ΑΤΡ για να διαχωρίσει τις αλυσίδες του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα (Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ.Κ., 2007).



[Εικόνα 26] Μοντέλο συγκρότησης του συμπλόκου έναρξης της μεταγραφής από την RNA πολυμεράση II σε έναν υποκινητή με αλληλουχία TATA (slideplayer., 2018).

Το σύμπλοκο TFIID αποτελεί πυρήνα του συμπλόκου της RNA πολυμεράσης II, το οποίο περιέχει την πρωτεΐνη δέσμευσης σε *TATA box* (TBP) και τις 14 υπομονάδες τους σχετιζόμενους με TBP παράγοντες (TAFs) που λειτουργούν αναγνωρίζοντας τον υποκινητή και στρατολογώντας τον ενεργοποιητή-εξαρτώμενο από την RNA πολυμεράση II (Εικ. 27) Υπάρχουν ειδικές υπομονάδες TFIID που προφανώς εξελίχθηκαν για να λειτουργούν ειδικά για τη γονιδιακή έκφραση στις γονάδες. Στα ποντίκια η πρωτεΐνη TAF4b είναι ένα συστατικό του TFIID που εκφράζεται κυρίως σε ιστούς της γονάδας και απαιτείται για την ανάπτυξη των ωοθυλακίων. Η πρωτεΐνη TAF4b είναι παρόμοια σε δομή με το ευρέως εκφραζόμενο TAF4 (TAFII130) συστατικό του συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων του TFIID (Εικ. 27). Ενώ τα γονίδια *TAF4*

και *TAF4b* εμφανίζουν αλληλοεπικαλυπτόμενα μοτίβα έκφρασης σε ορισμένους κυτταρικούς τύπους, το γονίδιο *TAF4b* είναι απαραίτητο για τη ρύθμιση της εκλεκτικής έκφρασης ειδικών για την ωοθήκη γονιδίων που απαιτούνται για τη θηλυκή γονιμότητα.



[Εικόνα 27] Οι πολλαπλές υπομονάδες του μεταγραφικού παράγοντα TFIID που είναι ένα σύμπλοκο πρόσδεσης στο πυρήνα του υποκινητή για την επακόλουθη στατολόγηση της RNApol II που θα οδηγήσει σε γονιδιακή έκφραση. Η πρωτεΐνη δέσμευσης στο TATA-box (TBP) δεσμεύεται στις αλληλουχές TATA που βρίσκονται πριν τον υποκινητή. Ο σχετιζόμενος με TBP παράγοντας 1 (TAF1) και TAF2 δεσμεύουν το στοιχείο εκκινήτη (Inr) (Goodrich JA., Tjian R., 2010).

Αρκετά άλλα μέλη του βασικού μηχανισμού μεταγραφής εμφανίζουν επίσης κυτταρο-ειδική έκφραση και ρύθμιση των γονιδίων στους όρχεις. Η απαίτηση για εξειδικευμένα συστήματα μεταγραφής στη σπερματογένεση είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο φαινόμενο μεταξύ των ειδών και πιθανόν να περιλαμβάνει αρκετούς παράγοντες που πρέπει ακόμη να χαρακτηριστούν.

Με πειράματα σε *Taf4b-null* αρσενικά ποντίκια προσδιορίστηκε η λειτουργικότητα του γονιδίου *TAF4b*, δηλαδή ότι είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της σπερματογένεσης σε ενήλικους ποντικούς. Τα ποντίκια null για το γονίδιο *Taf4b* αρχικά εμφανίζονται κανονικά και γόνιμα. Ωστόσο, μετά τον πρώτο γύρο της σπερματογένεσης, τα σπερματικά σωληνάρια εκφυλίζονται, καταλήγοντας τελικά να στερούνται των γαμετικών κυττάρων (germ cells). Οι φαινοτυπικές ανωμαλίες εμφανίζονται για πρώτη φορά στη μετα-γεννητική (μετα την γένεση) ημέρα 2, όταν διαταράσσεται η διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμός των γαμετικών κυττάρων και απορρυθμίζονται μερικά γονίδια που εμπλέκονται στη λειτουργία των γαμετικών κυττάρων της σπερματογένεσης (όπως τα *Stra8* και *c-Ret*). Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η πρωίμη έκφραση του *TAF4b* γονιδίου σε σπερματογόνα γαμετικά κύτταρα στον

μεταγεννητικό όρχι είναι απαραίτητη για τη σωστή διατήρηση της σπερματογένεσης στον ενήλικα.

Ο φαινότυπος *Taf4b-null* χαρακτηρίζεται από μειωμένο αριθμό γαμετικών κυττάρων (germ cell) ήδη από τη δεύτερη ημέρα, έλλειψη πολλαπλασιασμού σπερματογονίων που οδηγεί σε προοδευτική μείωση στο μέγεθος των όρχεων, σε τελική εξάντληση των σπερματογονίων και σε ελαττώματα της σπερματογένεσης που είναι εμφανής από την όγδοη εβδομάδα.

Η επιτυχής διατήρηση της σπερματογένεσης απαιτεί την ίδρυση ενός συνόλου σπερματογονίων βλαστοκυττάρων που ανανεώνονται και διαφοροποιούνται σε ώριμα σπερματοζωάρια. Στους νεογέννητους όρχεις, τα γαμετικά κύτταρα βρίσκονται στο κέντρο του σπερματικού σωληναρίου. Ο αρχικός αποικισμός της γονάδας από τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα φαίνεται να είναι φυσιολογικός, καθώς κατά τη γέννηση τα αρσενικά *Taf4b-null* έχουν συγκρίσιμο αριθμό γαμετικών κυττάρων ανά σπερματικό σωληνάριο σε σχέση με του άγριου τύπου. Έτσι, οι παράγοντες που ρυθμίζουν τη μετανάστευση των γαμετικών κυττάρων και τα πρώιμα στάδια του πολλαπλασιασμού εμφανίζονται ανέπαφα. Λίγο μετά τη γέννηση τα γαμετικά κύτταρα μεταναστεύουν στη βασική μεμβράνη, διαφοροποιούνται σε σπερματογόνια και πολλαπλασιάζονται, μια διαδικασία που οδηγεί στην εμφάνιση λειτουργικών σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων στην μετέπειτα ημέρα 3-4. Τα σπερματογόνια αυτά πολλαπλασιάζονται ταχέως πριν από την εφηβεία με αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των γαμετικών κυττάρων κατά 39 φορές μεταξύ της γέννησης και της ενηλικίωσης. Η παρατηρούμενη ανεπάρκεια στα γαμετικά κύτταρα στους άρνες *Taf4b-null* που ξεκινά την 2-3η ημέρα αντιστοιχεί σε αυτό το κρίσιμο στάδιο της ανάπτυξης και της επέκτασης των γαμετικών κυττάρων, υποδηλώνοντας ότι η αδυναμία των ενήλικων αρσενικών *Taf4b-null* να διατηρήσουν τη σπερματογένεση μπορεί να οφείλεται σε ελαττώματα στη λειτουργία των σπερματογόνιων βλαστοκυττάρων τους. Αυτή η υπόθεση τεκμηριώνεται περαιτέρω από την ικανότητα των μεταμοσχευμένων άγριου τύπου γαμετικών κυττάρων να αποικούν τα σπερματικά σωληνάρια *Taf4b-null* ποντικών στα οποία έχουν εξαντληθεί τα γαμετικά κύτταρα.

Δεδομένου ότι τα ποντίκια *Taf4b-null* μπορούν να ολοκληρώσουν τη σπερματογένεση και τη σπερμιογένεση που οδηγούν στην παραγωγή λειτουργικού σπέρματος και στους υγιείς απογόνους, τα γονίδια που μεσολαβούν σε αυτά τα γεγονότα φαίνεται να είναι σε

μεγάλο βαθμό ανεπηρέαστα τουλάχιστον στους νέους άρρενες. Η αυξημένη απόπτωση επίσης δεν φαίνεται να υπόκειται του *Taf4b-null* φαινότυπου. Το ενδοκρινές σύστημα φαίνεται επίσης να είναι σε μεγάλο βαθμό άθικτο καθώς τα επίπεδα ορού των γοναδοτροπινών της υπόφυσης και της τεστοστερόνης είναι φυσιολογικά στα νεαρά *Taf4b-null* ποντίκια. Αν και τα επίπεδα της πρωτεΐνης FSH αυξάνονται στα γηραιότερα ποντίκια, το γεγονός αυτό μπορεί να είναι συνέπεια της τροποποιημένης λειτουργίας των σπερματικών σωληναρίων στα οποία λείπουν τα γαμετικά κυττάρα και όχι του ανώμαλου φαινότυπου. Τα ελαττώματα της σπερματογένεσης έχουν παρατηρηθεί σε ηλικία δώδεκα εβδομάδων, αλλά όχι και στην ηλικία οκτώ εβδομάδων, είναι πιθανότερο να οφείλονται σε δευτερογενή εκφυλισμό των όρχεων που χαρακτηρίζεται από απώλεια των γαμετικών κυττάρων και αυξημένα επίπεδα της πρωτεΐνης FSH.

Οι διαγονιδιακοί ποντικοί που εκφράζουν κυρίαρχη-αρνητική μεταλλαγμένη *c-Ret* πρωτεΐνη έχουν κανονικούς όρχεις την ημέρα της γέννησης τους. Ωστόσο, μετά την δέκατη μεταγεννητική ημέρα, τα μεταλλαγμένα *c-Ret* ποντίκια έχουν λιγότερα γαμετικά κύτταρα που είναι ένας φαινότυπος παρόμοιος με αυτόν που παρατηρήθηκε στους άρρενες *Taf4b-null*. Με δεδομένη την ελατωμένη έκφραση της *c-Ret* πρωτεΐνης σε *Taf4b-null* όρχεις ήδη από την ημέρα της γέννησης, δηλαδή όταν τα *Taf4b-null* αρσενικά έχουν συγκρίσιμο αριθμό γαμετικών κυττάρων με του άγριου τύπου αρσενικά της ίδιας ηλικίας, οπότε το γονίδιο *c-Ret* μπορεί να είναι άμεσος στόχος του TAF4b.

Το γονίδιο *Stra8* είναι το πιο δραματικά μειωμένης έκφρασης γονίδιο σε *Taf4b-null* όρχεις. Το *Stra8* είναι ελατωμένο ήδη από την ημέρα της γέννησης, όταν οι *Taf4b-null* όρχεις έχουν συγκρίσιμο αριθμό γαμετικών κυττάρων με άγριου τύπου. Αν και η λειτουργία της πρωτεΐνης STRA8 δεν είναι ακόμη γνωστή, έχει αποδειχθεί ότι η STRA8 εκφράζεται σε προμειωτικά σπερματογονία και σε εμβρυονικά ωοκύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η στειρότητα στα ποντίκια *Taf4b-null* θα μπορούσε επίσης να προκληθεί εν μέρει από την ελάτωση του γονιδίου *Stra8*. Εάν το TAF4b στοχεύει ή όχι στο γονίδιο *Stra8* μένει να αποδειχθεί.

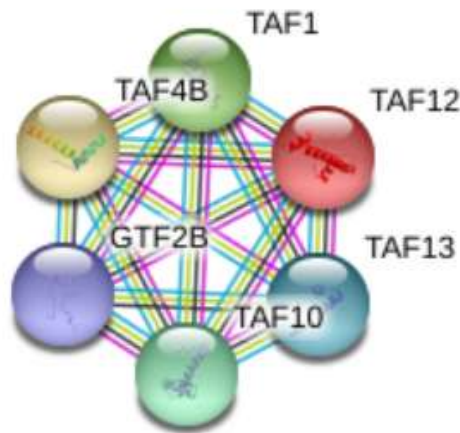
Συνοπτικά, τα ποντίκια *Taf4b-null* παρουσιάζουν έναν μοναδικό φαινότυπο όρχεων που περιλαμβάνει φυσιολογική γονιμότητα σε πρώιμη ηλικία ακολουθούμενη από πλήρη απώλεια γονιμότητας κατά ηλικία των δώδεκα εβδομάδων, χαρακτηρίζονται από ελαττώματα στην σπερματογένεση, την απώλεια γαμετικών κυττάρων και τον εκφυλισμό των όρχεων. Αν και άλλα συστατικά της RNA Polymerase II της βασικής μεταγραφικής

συσκευής επηρεάζουν τη μείωση, η TAF4b απαιτείται για τη μίτωση κυρίως σε γονοκύτταρα και σπερματογόνια. Η TAF4b πρωτεΐνη φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των γαμετικών κυττάρων, τα οποία απαιτούνται για τη διατήρηση της γονιμότητας σε ενήλικες άρρενες. Έτσι, η πρωτεΐνη TAF4b που αποτελεί συστατικό του συμπλέγματος TFIIID του μηχανισμού βασικής μεταγραφής της RNA πολυμεράσης II, είναι ουσιώδης για τη διατήρηση της σπερματογένεσης, ειδικότερα του πολλαπλασιασμού των σπερματογόνιων βλαστικών κυττάρων (Falender AE., Freiman RN., Geles KG., Lo KC., Hwang K., Lamb DJ., Morris PL., Tjian R., Richards JS., 2005).

Τα *Taf4b*^{-/-} ποντίκια έχουν σημαντικά λιγότερα γαμετοκύτταρα κατά την καθυστερημένη εμβρυογένεση, τα οποία στη συνέχεια αποτυγχάνουν να διαφοροποιηθούν έγκαιρα σε σπερματογόνια κατά την έναρξη της σπερματογένεσης. Οι ποντικοί αυτοί παρουσιάζουν σημαντική καθυστέρηση στο σχηματισμό σπερματοκυττάρων και στην επακόλουθη μειωτική εκκίνηση. Μία πιθανή αιτία της καθυστέρησης στην εμφάνιση των σπερματοκυττάρων είναι οι μειωμένοι αριθμοί νεογνικών γαμετοκυττάρων σε ποντίκια *Taf4b*^{-/-}. Τα ποντίκια μπορεί να απαιτούν έναν ελάχιστο αριθμό γαμετοκυττάρων στον νεογνικό όρχι πριν να σχηματίσουν διαφοροποιημένες μορφές σπερματογόνιων και οι όρχεις των *Taf4b*^{-/-} μπορεί να μην περιέχουν τον επαρκή αριθμό γαμετοκυττάρων για τη διαδικασία αυτή. Ο ανεπαρκής αριθμός γαμετοκυττάρων στους νεογνικούς *Taf4b*^{-/-} όρχεις μπορεί να αλλάξει την ισορροπία των σπερματογόνιων βλαστικών κυττάρων (spermatogonial stem cells-SSC) και να τα οδηγήσει προς τη διαφοροποίηση σε βάρος της αυτοανανέωσης, έτσι ώστε να μην αποκατασταθεί η συγκέντρωση των SSC κατά τη διάρκεια του κρίσιμου παράθυρου της ανάπτυξης των SSC. Εναλλακτικά, η πρωτεΐνη TAF4b μπορεί να έχει επιπρόσθετες μοναδικές λειτουργίες στα SSC βλαστικά κύτταρα που προωθούν την εγκατάσταση και/ή τη διατήρηση τους, ανεξάρτητα από την ποσότητα των νεογνικών γαμετοκυττάρων. Το τελευταίο φαίνεται να είναι και το πιο πιθανό μοντέλο. Γενικά, τα βλαστοκύτταρα θα αυξήσουν τον ρυθμό της αυτοανανέωσης τους ως απάντηση στον χαμηλό αριθμό των διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζουν την ύπαρξη μιας λειτουργικής απαίτησης για TAF4b πρωτεΐνη στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των γαμετοκυττάρων, καθώς και στη σωστή εγκατάσταση του πληθυσμού των SSC βλαστικών κυττάρων που απαιτείται για τη μακροχρόνια σπερματογένεση στον ποντικό. Συμπερασματικά, η πρωτεΐνη TAF4b

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

μπορεί να διαδραματίσει παρόμοιο ρόλο και στην ανθρώπινη σπερματογένεση (Lovasco LA., Gustafson EA., Seymour KA., de Rooij DG., Freiman RN., 2015).



[Εικόνα 28] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της TAF4B (Gene Cards_f, 2018).

Μετάλλαξη του γονιδίου *TAF4B*

Η πρωτεΐνη TAF4B (4p16.2) γνωστή επίσης και ως "TAFII105" (είναι μεταγραφικός παράγοντας σχετιζόμενος με την πρωτεΐνη δέσμευσης στο *TATA box*-TBP της RNA πολυμεράση II) έχει 15 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 862 αμινοξέων.

Μελετήθηκαν δύο μη συγγενικές οικογένειες με ιδιοπαθή αζωοσπερμία. Στην πρώτη οικογένεια υπήρχαν τρία αζωοσπερμικά αδέρφια και ένας ολιγοζωοσπερμικός αδελφός. Στην οικογένεια αυτή βρέθηκε μια ομόζυγη μη νοηματική (nonsense) μετάλλαξη του γονιδίου *TAF4B* (p.R611X) η οποία δημιουργεί κωδικόνιο λήξης στο εξώνιο εννέα, οδηγώντας σε ένα πρωτεϊνικό προϊόν χωρίς τα 252 υπολείμματα (ενώ η φυσική ισομορφή έχει 862 αμινοξέα). Η περικεκομμένη πρωτεΐνη στερείται της περιοχής αναδίπλωσης της ιστόνης (που βρίσκεται στα υπολείμματα 653-702) η οποία αυξάνει τη δραστηριότητα δέσμευσης στο DNA των TAFs, καθώς και την αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με την TAF12, η οποία είναι απαραίτητη για την πρόσδεση στους υποκινητές αρκετών γονιδίων. Παρά τη σοβαρότητα της ομόζυγης μετάλλαξης του γονιδίου *TAF4B* στους τέσσερις αδελφούς που εξετάστηκαν σε αυτήν την μελέτη παρουσιάστηκε φαινοτυπική μεταβλητότητα, καθώς ο ένας αδελφός ήταν ολιγοσπερμικός και οι άλλοι τρεις ήταν αζωοσπερμικοί.

Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής έδειξαν ότι η TAF4B πρωτεΐνη έχει μια κυρίαρχη έκφραση στους όρχεις αλλά πολύ ασθενή έκφραση στα άλλα όργανα και οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι η πρωτεΐνη υπερεκφράζεται στις γονάδες του ποντικού.

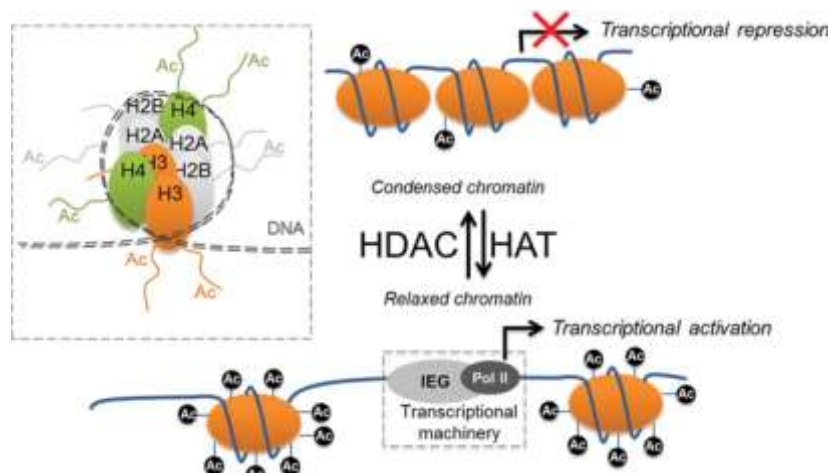
Αποδείχθηκε συνεπώς ότι τα νεαρά ποντίκια *Taf4b-null* ήταν μεν αρχικά γόνιμα αλλά κατέληγαν άγονα στους τρεις μήνες, με διαταραχή του πολλαπλασιασμού των γαμετικών τους κυττάρων και μειωμένη έκφραση των δεικτών των βλαστικών κυττάρων τους, υποδεικνύοντας έτσι ότι η πρωτεΐνη TAF4B απαιτείται για τη φυσιολογική διατήρηση της γονιμότητας στους ενήλικες. Το γονίδιο *Taf4b* έχει ένα πρόσθετο χαρακτηριστικό στο ότι τα θηλυκά knockout ποντίκια είναι επίσης στείρα εξαιτίας της αποτυχίας της ωοθυλακιογένεσης. Τα αρσενικά ποντίκια με ελλατωματικά γονίδια *Taf4b* παρουσιάζουν λανθασμένη ρυθμιστική έκφραση αρκετών γονιδίων που απαιτούνται για την κανονική σπερματογένεση (Ayhan Ö., Balkan M., Guven A., Hazan R., Atar M., Tok A., Tolun A., 2014). Τα ευρήματα είναι συμβατά με το μοντέλο των ελαττωματικών SSCs και την προοδευτική απώλεια βλαστικών κυττάρων στα άτομα αυτά.

Λειτουργίες της πρωτεΐνης ZMYND15

Η μείωση είναι μοναδική στα γαμετικά κύτταρα και η σπερμογένεση είναι μοναδική στην ανάπτυξη των αρσενικών γαμετικών κυττάρων. Οι μοναδικές διαδικασίες συχνά απαιτούν μοναδικά γονίδια και γονιδιακά προϊόντα για την εκτέλεση των λειτουργιών. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί το 10% όλων των πρωτεϊνών είναι αφιερωμένο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης και μόνο η σπερματογένεση περιλαμβάνει τουλάχιστον 500 όρχι-ειδικά γονίδια. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι κρίσιμοι ρυθμιστές της γονιδιακής έκφρασης και χρησιμεύουν ως διακόπτες που ελέγχουν τη φυσιολογική χωροχρονική γονιδιακή έκφραση κατά τη διάρκεια των συγκεκριμένων κυτταρικών διεργασιών. Δεδομένου ότι τόσα πολλά όρχι-ειδικά γονίδια εμπλέκονται στην παραγωγή σπέρματος, η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στη σπερματογένεση από όρχι-ειδικούς μεταγραφικούς παράγοντες είναι αναμενόμενη. Τα τελευταία 15 χρόνια έχει εντοπιστεί ένας σημαντικός αριθμός μεταγραφικών παραγόντων που εκφράζονται κατά προτίμηση ή αποκλειστικά στους όρχεις και απαιτείται για τις διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης αρσενικών γαμετικών κυττάρων.

Το γονίδιο *Zmynd15* κωδικοποιεί πρωτεΐνη δέσμευσης του ψευδαργύρου της μορφής MYND (MYND-containing zinc-binding protein) και εκφράζεται αποκλειστικά σε απλοειδή γαμετικά κύτταρα κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Η πρωτεΐνη ZMYND15 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας μέσω της στρατολόγησης των ενζύμων αποακετυλάσης της ιστόνης (histone deacetylase enzymes-HDACs) (Εικ. 29). Η απενεργοποίηση του γονιδίου *Zmynd15* σε ποντίκια έχει ως αποτέλεσμα την

αποδιοργάνωση της σπερματογένεσης, προκαλώντας αζωοσπερμία και πλήρη ανδρική υπογονιμότητα. Το γονίδιο *Zmynd15* κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 703 αμινοξέων σε ποντίκια που περιέχει ένα μοτίβο MYND δακτύλου ψευδαργύρου και μια αλληλουχία πυρηνικού εντοπισμού. Η ZMYND15 πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά συντηρημένη μεταξύ των ποντικών, των αρουραίων και των ανθρώπων το οποίο αποδεικνύεται από 85% ομολογία στις αλληλουχίες των αμινοξέων τους. Το mRNA του *Zymnd15* και η πρωτεΐνη του εκφράζονται σε σπερματοκύτταρα του σταδίου πατυταινίας και σε όλες τις αναπτυσσόμενες σπερματίδες.



[Εικόνα 29] Ακετυλίωση ιστόνης: ένας μηχανισμός ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης.

Η ακετυλίωση ιστόνων καταλύεται από τη δράση των ακετυλάσων HAT και αντιστρέφεται με τη δράση των αποακετυλάσων HDACs. Η ακετυλίωση μπορεί να προάγει τη γονιδιακή μεταγραφή προκαλώντας άμεσες δομικές αλλαγές στη χρωματίνη ώστε να καταλήξει σε μια πιο χαλαρή διαμόρφωση. Αυτή η κατάσταση χαλαρωμένης χρωματίνης μπορεί να εκθέσει το DNA σε μεταγραφικούς μηχανισμούς. Εισαγωγή: η βασική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεοσώμα. Το νουκλεόσωμα είναι ένα οκταμερές αποτελούμενο από δύο μόρια σε κάθε πυρήνα ιστόνης H2A, H2B, H3 και H4, τυλιγμένο γύρω από 147 bp DNA. Ac, υπολείμματα ακετυλιωμένης λυσίνης σε πρωτεΐνες ουράς ιστόνης (Whittle N., Singewald N., 2014).

Τα κύρια ελαττώματα σε *Zmynd15*^{-/-} αρσενικά ποντίκια περιορίζονται σε σπερματίδες, γεγονός που συμπίπτει με τη θέση έκφρασης της πρωτεΐνης ZMYND15. Η μη φυσιολογική χωροχρονική μεταγραφή των πολυάριθμων απλοειδών γονιδίων είναι συνέπεια του ρόλου της πρωτεΐνης ZMYND15 στη μεταγραφική ρύθμιση, επειδή αυτή η πρωτεΐνη λειτουργεί ως καταστολέας της μεταγραφής καθώς αλληλεπιδρά με τις HDACs (αποακετυλίωση μπορεί να καταστήσει τη γονιδιακή μεταγραφή προκαλώντας άμεσες δομικές αλλαγές στη χρωματίνη ώστε να καταλήξει σε μια πιο συμπαγή διαμόρφωση με αποτέλεσμα η χρωματίνη δεν μπορεί να εκθέσει το DNA σε μεταγραφικούς μηχανισμούς). Επομένως, πιστεύεται ότι η έλλειψη του γονιδίου *Zmynd15* προκαλεί την αποδιοργάνωση της έκφρασης των απλοειδών γονιδίων και οδηγεί στην εξάντληση των σπερματίδων και την ανδρική υπογονιμότητα.

Η πρωτεΐνη ZMYND15 δεσμεύεται εκλεκτικώς σε HDAC κατηγορίας I και II και μπορεί να καταστείλει τη μεταγραφή κατά τρόπο εξαρτώμενο από τις HDAC (Εικ. 29). Υπό την απουσία της πρωτεΐνης ZMYND15 έχει παρατηρηθεί υπερέκφραση πολυάριθμων μεταγράφων. Επιπλέον, ο αριθμός των μεταγραφημάτων που υπερεκφράστηκαν είναι πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των μεταγραφών που καταστάλθηκαν (241 υπερεκφρασμένων έναντι 18 κατασταλμένων). Αυτά τα δεδομένα υποστηρίζουν ένα μεταγραφικό κατασταλτικό ρόλο της ZMYND15 πρωτεΐνης. Εν τούτοις, τα υπερεκφραζόμενα αυτά μετάγραφα δεν είναι απαραίτητα γονίδια-στόχοι της ZMYND15, επειδή η απορύθμιση πολλών τέτοιων μεταγραφών μπορεί να συμβαίνει λόγω των δευτερογενών επιδράσεων που προκαλούνται από την απουσία της πρωτεΐνης ZMYND15. Συνοψίζοντας λοιπόν αποδείχθηκε ότι η πρωτεΐνη ZMYND15 αλληλεπιδρά με τις αποακετυλάσες των ιστονών και δρα ως ειδικός μεταγραφικός καταστολέας που διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της χωροχρονικής έκφρασης πολλών απλοειδών γονιδίων (Yan W., 2010).

Μετάλλαξη του γονιδίου ZMYND15

Κατά την περεταίρω μελέτη των δύο μη συγγενικών οικογένειων με ιδιοπαθή αζωοσπερμία, ερευνήθηκε η δεύτερη οικογένεια όπου υπήρχαν τρία αζωοσπερμικά αδέρφια στα οποία βρέθηκε η μετάλλαξη του γονιδίου ZMYND15. Η ομόζυγη μετάλλαξη του γονιδίου ZMYND15 (p.K507Sfs * 3) δημιουργεί μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης στο εξώνιο εννεά που οδηγεί στην παρουσίαση πρόωρου κωδικονίου λήξης μετά τη σύνθεση δύο μη φυσιολογικών αμινοξέων. Έχουν παρατηρηθεί τρεις μεταλλαγμένες ισομορφές της πρωτεΐνης οι οποίες στερούνται 236 ή 244 φυσιολογικών υπολειμμάτων (ενώ οι φυσιολογικές ισομορφές έχουν 742, 703 ή 750 αμινοξέα). Οι περικεκομμένες πρωτεΐνες στερούνται την πλούσια σε Pro περιοχή που είναι απαραίτητη για τη δέσμευση ορισμένων πρωτεϊνών μεταγωγής σήματος και κυτταροσκελετού. Συντίθεται μη λειτουργική πρωτεΐνη.

Από την έρευνα προέκυψε ότι το γονίδιο *Zmynd15* στα ποντίκια εκφράζεται αποκλειστικά στα απλοειδή γαμετικά κύτταρα. Επίσης διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *Zmynd15* εκφράζεται κατά τη διάρκεια της τελειώμενης σπερματογένεσης και ότι το πρωτεϊνικό προϊόν ήταν ένας μεταγραφικός καταστολέας που είναι απαραίτητος για τη σπερματογένεση (Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H., Sengoku K., 2017). Τα ποντίκια με ελαττωματική *Zmynd15* εμφανίζουν καθυστερημένη

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

σπερματογένεση. Έτσι, ο φαινότυπος των αδελφών με ομόζυγη μετάλλαξη γονιδίου *ZMYND15* στην μελέτη αυτή είναι συμβατός με το φαινότυπο της ελαττωματικής *ZMYND15*. Η ελαττωματική *ZMYND15* προκαλεί την αποδιοργάνωση της έκφρασης των απλοειδών γονιδίων και οδηγεί στην εξάντληση των σπερματιδίων και την ανδρική υπογονιμότητα.

Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις αζωσπερμίας

[Πίνακας 8] Μεταλλάξεις που σχετίζονται με αζωσπερμία

Φαινότυπος	Γονίδιο	Λειτουργία	Έκφραση-Δράση	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Τύπος Μετάλλαξης
Αζωσπερμία	<i>SYCP3</i>	Συστατικό συμπλόκου συναπτομερούς	Στάδιο μείωσης I - σπερματοκύτταρα	Δεν συναρμολογείται συναπτομερές, καθήλωση σπερματογένεσης στο στάδιο σπερματοκυττάρων	Ετερόζυγη (643delA)
	<i>SYCE1</i>	Συστατικό συμπλόκου συναπτομερούς	Στάδιο μείωσης I - σπερματοκύτταρα	Δεν συναρμολογείται συναπτομερές, καθήλωση σπερματογένεσης στο στάδιο σπερματοκυττάρων	Ομόζυγη (613C>T), (197–2A>G)
	<i>HSF2</i>	Μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ	Στρογγυλές σπερματίδες	Απορύθμιση έκφρασης γονιδίων θερμικού σοκ, βλάβες σπερματογένεσης	Ετερόζυγη (R502H)
	<i>TAF4B</i>	Μεταγραφικός παράγοντας	Στάδιο μίτωση – πολλαπλασιασμού -σπερματογόνια	Απορύθμιση έκφρασης γονιδίων απαραίτητων για μίτωση και αυτοανανέωση, εξάντληση σπερματογονίων	Ομόζυγη (p.R611X)
	<i>ZMYND15</i>	Μεταγραφικός καταστολέας	Στάδιο σπερμίας-σπερματίδες	Υπερέκφραση γονιδίων, εξάντληση σπερματιδίων	Ομόζυγη (p.K507Sfs*3)

Οι μεταλλάξεις αυτού του είδους θεωρούνται οι πιο σημαντικές καθώς η αζωσπερμία που παρατηρείται στα άτομα που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις είναι μη αποφρακτικού τύπου αζωσπερμία κάτι που σημαίνει πως στο δείγμα εκσπερμάτισης και στην βιοψία αυτών των ατόμων δεν ανιχνεύεται κανένα ώριμο σπερματοζώριο καθώς η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι ελαττωματική εξαιτίας των γονιδιακών αυτών μεταλλάξεων που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες διαφόρων σταδίων της σπερματογένεσης. Συνεπώς οι φορείς των μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είναι στείροι. Η μόνη θεραπευτική προσέγγιση σε τέτοια άτομα θα είναι συμβουλευτική για τη χρήση δότη σπέρματος, καθώς με το δικό τους βιολογικό υλικό δεν μπορεί να επιτευχθεί καμία σύγχρονη τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ανίχνευση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στα άτομα με αζωσπερμία θα βοηθήσει στην αποφυγή αναποτελεσματικών κύκλων βιοψίας. Όποτε μελλοντικές μελέτες που θα στοχεύουν σε

ανάλυση μεταλλάξεων των γονιδίων που προκαλούν αζωοσπερμία κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικές.

Η συχνότητα της μετάλλαξης 643delA του γονιδίου *SYCP3* είναι πολύ χαμηλή, καθώς παρατηρείται σε δυο από τα δεκαεννιά αζωοσπερμικά άτομα. Παρόμοια χαμηλή συχνότητα εμφάνισης παρατηρείται στις μεταλλάξεις 613C>T και 197–2A>G του γονιδίου *SYCE1*, καθώς ανιχνεύτηκαν μόνο σε δυο αδελφές και δυο αζωοσπερμικούς αδελφούς διαφορετικών οικογενειών αντίστοιχα. Συνεπώς θα μπορούσαν να γίνουν πειράματα με μεγαλύτερο όγκο δείγματος για την ανεύρεση των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στα άτομα που φέρουν το φαινότυπο της αζωοσπερμίας. Επειδή οι πρωτεΐνες του συμπλόκου συναπτομερούς είναι βασικές για την ολοκλήρωση της σπερματογένεσης και η έλλειψη κάποιας από αυτές μπορεί να επιφέρει σοβαρά προβλήματα υπογονιμότητας (όπως έχει αποδειχθεί προκαλεί φαινότυπο αζωοσπερμίας), οι προοπτικές προς διερεύνηση στο μέλλον θα πρέπει να αφορούν την ανίχνευση των μεταλλάξεων των γονιδίων *SYCP1*, *SYCP2*, *SYCE2*, *SYCE3* και *TEX12* που αποτελούν τα υπόλοιπα συστατικά του συμπλόκου συναπτομερούς. Καθώς δε για κάποια από αυτά τα γονίδια έχουν ήδη γίνει πειράματα με knockout ποντικούς και έχει επιβεβαιωθεί ότι προκαλείται ο αντίστοιχος φαινότυπος καθήλωσης της μειωτικής διαίρεσης και η διακόπη της σπερματογένεσης στο στάδιο των πρωτογενών σπερματοκυττάρων, εκκρεμεί να ταυτοποιήθουν οι μεταλλάξεις στα γονίδια αυτά και στους ανθρώπους.

Έπειτα εξαιτίας της τόσο χαμηλής συχνότητας εμφάνισης 1/766 της μετάλλαξης R502H του γονιδίου *HSF2* δεν μπορούν να αποκλειστούν συνυπάρχουσες αλλοιώσεις σε άλλα σημαντικά γονίδια. Όποτε περαιτέρω μελέτη στο σημείο αυτό δεν συνίσταται.

Επίσης αναφέρθηκε ότι οι φορείς των ομόζυγων μεταλλάξεων p.R611X του γονιδίου *TAF4B* έχουν διμορφικό φαινότυπο καθώς παρατηρείται αζωοσπερμία και ολιγοσπερία σε κάποιες περιπτώσεις. Ακόμα η συχνότητα της μετάλλαξης φαίνεται πως είναι χαμηλή καθώς η μετάλλαξη έχει ταυτοποιηθεί σε τέσσερα μόλις άτομα της ίδιας οικογένειας. Συνεπώς θα ήταν ενδιαφέρον να γίνει πιο σχολαστική διερεύνηση σχετικά με αυτή την μετάλλαξη σε μεγαλύτερο όγκο δείγματος για να διαπιστωθεί η συχνότητα εμφάνισης της στον πληθυσμό.

Τέλος η συχνότητα της μετάλλαξης p.K507Sfs * 3 του γονιδίου *ZMYND15* είναι επίσης χαμηλή, καθώς η μετάλλαξη έχει ταυτοποιηθεί σε τρία άτομα της ίδιας

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

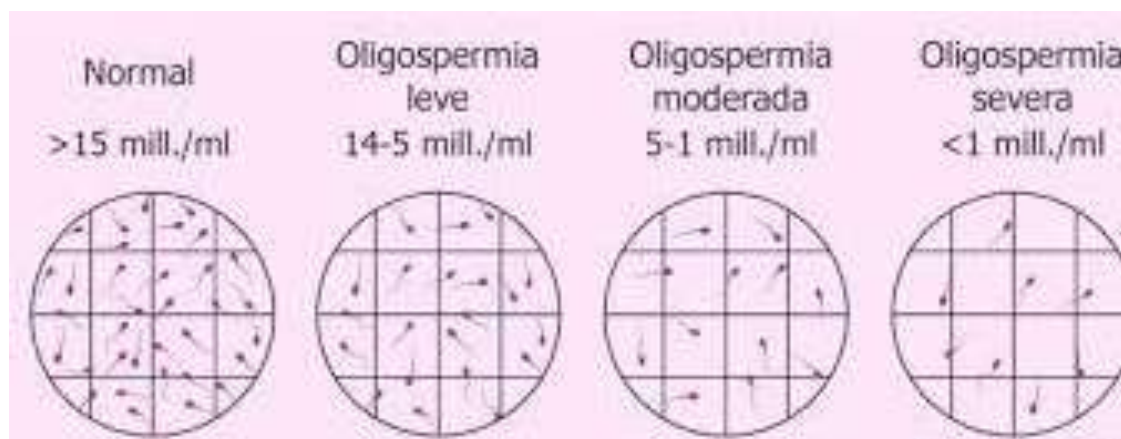
οικογένειας. Απαραίτητη κρίνεται λοιπόν η περαιτέρω μελέτη για την ανίχνευση της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον πληθυσμό σε μεγαλύτερο όγκο δείγματος.

Ολοκληρώνοντας τις εκτεταμένες μελέτες σχετικά με τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αζωοσπερμία και καθορίζοντας όλες τις υπεύθυνες μεταλλάξεις που την προκαλούν, η ομάδα αυτή των μεταλλάξεων θα μπορούσε μελλοντικά να χρησιμοποιείται για τη διαλογή των ατόμων που έχουν μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία. Συνεπώς με τη χρήση των μεταλλάξεων αυτών ως μοριακών δεικτών θα μπορούσαν να ανιχνεύονται οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις στους αζωοσπερμικούς ασθενείς και τότε αυτοί να αποκλείονται από αναποτελεσματικούς κύκλους βιοψιών και να κατευθύνονταν σε χρήση δότη σπέρματος.

Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ολιγοσπερμία

Ολιγοσπερμία

Η ολιγοσπερμία ορίζεται ως συνολικός αριθμός σπερματοζωαρίων <15 εκ./ml σπέρματος (Εικ. 30) (Παρανυχιανακης Γ., 2018).



[Εικόνα 30] Χαρακτηριστικά ολιγοσπερμίας (Reproduccion Asistida, 2018)

Μετάλλαξη *KLHL10* με φαινότυπο ολιγοσπερμίας

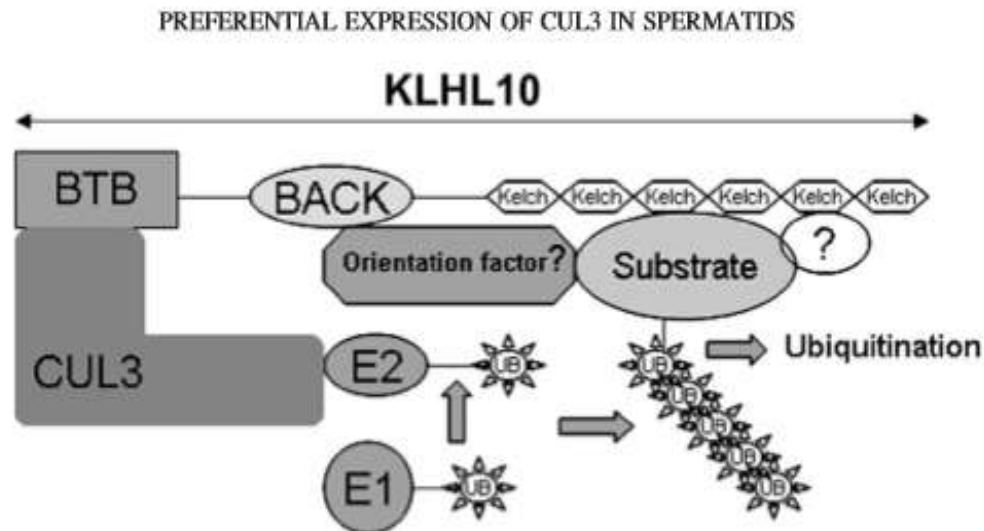
Λειτουργία της πρωτεΐνης *KLHL10*

Η Kelch-Like 10 (*KLHL10*) πρωτεΐνη είναι ένας ειδικός για το υπόστρωμα προσαρμογέας του συμπλόκου ουμπικιτινικής-πρωτεϊνικής λιγκάσης E3 με βάση CUL3, το οποίο με την σειρά του μεσολαβεί στην ουμπικιτινίωση και στην επακόλουθη πρωτεασωματική αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης.

Το ορθόλογο γονίδιο *KLHL10* στα ποντίκια είναι ουσιαστικό γονίδιο κατά την σπερματογένεση που ενεργεί με δόσοεξαρτώμενο τρόπο. Έχει βρεθεί ότι η ετερόζυγη μετάλλαξη *Klhl10* χαρακτηρίζεται από την απώλεια των γαμετικών κυττάρων (germ cells) και την ελαττωματική μορφολογία των σπερματίδων. Η μετάλλαξη *Klhl10* στα ποντίκια προκαλεί υπογονιμότητα λόγω της σοβαρής μείωσης των επιμηκών σπερματίδων και των σπερματοζωαρίων της επιδιδυμίδας. Η ελαττωματική *Klhl10* αντιπροσωπεύει ένα από τα λίγα μοντέλα της επικρατής αυτοσωμικής ανδρικής υπογονιμότητας (Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., Matzuk, M.M., 2004).

Η ανθρώπινη KLHL10 πρωτεΐνη είναι εξαιρετικά συντηρητική στα θηλαστικά και παρουσιάζει 97,8% ομολογία με το ορθόλογο του στα ποντίκια που εκφράζεται στις μετα-μειωτικές σπερματίδες. Η πρωτεΐνη αποτελείται από 614 αμινοξέα και έχει μια N-τελική περιοχή BTB (bric-a-brac, tramtrack) και έξι διαδοχικές C-τελικές επαναλήψεις kelch με μία παρεμβαλλόμενη περιοχή BACK (μεταξύ της BTB και της C-τελικής kelch) (Εικ. 31). Πρόσφατες ενδείξεις υποδεικνύουν ότι η περιοχή BTB της πρωτεΐνης KLHL10 αλληλεπιδρά με την cullin 3 (CUL3) για να σχηματίσει το σύμπλεγμα της CUL3-KLHL10 ουμπικιτινικής λιγάσης E3 που ενεργεί για να μεσολαβήσει στην πρωτεϊνική ουμπικιτινίωση κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης.

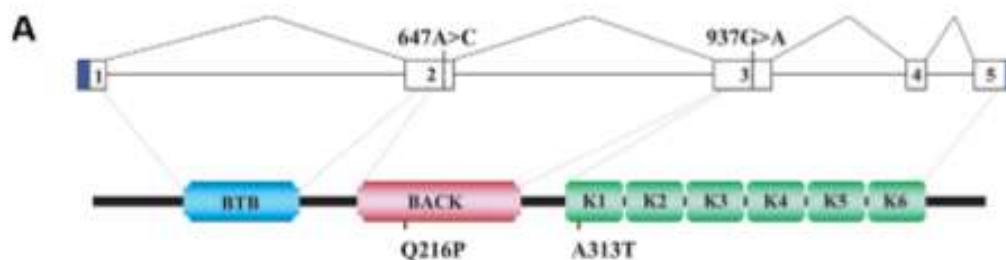
Στην σπερματογένεση, η διακοπή της μεταγραφής και οι οδοί ουμπικιτινίωσης πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην ρύθμιση των πρωτεϊνών. Αναφέρεται ότι η πρωτεΐνη KLHL10 αλληλεπιδρά μέσω της περιοχής BTB με την CUL3. Οπότε δημιουργείται η λιγάση E3 με βάση την Cullin, η οποία οδηγεί στην πρωτεϊνική αποικοδόμηση εξαρτώμενη από την ουμπικιτινίωση. Καθώς επίσης οι επαναληψιμές kelch δομές της πρωτεΐνης KLHL10 υποτίθεται ότι δρουν ως στοιχεία αναγνώρισης του υποστρώματος-στόχος της ουμπικιτίνης (Εικ. 31). Η ουμπικιτινίωση των πρωτεϊνών-υποστρώμα απαιτεί τρία διαφορετικά στάδια: ενεργοποίηση της ουμπικιτίνης από την E1, μετάδοση της ουμπικιτίνης στην E2 και τελικά την σύνδεση της ουμπικιτίνης σε ένα στοχευμένο υπόστρωμα (Wang S., Zheng H., Esaki Y., Kelly F., Yan W., 2006).

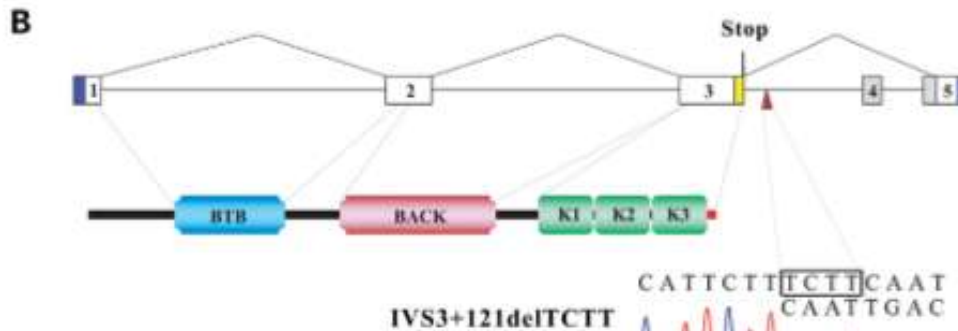


[Εικόνα 31] Ένα προτεινόμενο σχήμα συμπλόκου CUL3-KLHL10 που δρα ειδικά στον όρχι ως συμπικτινική λιγάση E3. Η περιοχή BTB της KLHL10 δεσμεύεται απευθείας με την CUL3 για να σχηματίσει τον πυρήνα της E3 λιγάσης. Οι πρωτεΐνες που θα είναι υπόστρωμα για της δράση της λιγάσης E3 συνδέονται με τις επαναλήψεις kelch της KLHL10. Η περιοχή BACK της KLHL10 μπορεί να αλληλεπιδράσει με μια άλλη πρωτεΐνη για να βοηθήσει στο προσανατολισμό της πρωτεΐνης-υπόστρωμα. Το E2 δεσμεύεται στο C-τελικό άκρο της CUL3 για να μεταφέρει τις συμπικτινικές στην πρωτεΐνη-υπόστρωμα (Wang S., Zheng H., Esaki Y., Kelly F., Yan W., 2006).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *KLHL10*

Σε ερευνά με 556 ολιγοσπερμικούς άνδρες βρέθηκαν 7 άτομα που φέρουν την ετερόζυγη μετάλλαξη στα εξώνια 2 και 3 του γονιδίου *KLHL10*. Οι τέσσερις αυτοί ασθενείς είχαν την *missense* μετάλλαξη 647A>C (Q216P) που υποκαθιστά μια πολύ συντηρημένη γλουταμίνη με μια προλίνη στην περιοχή BACK της πρωτεΐνης (Εικ. 32Α). Ενώ οι άλλοι τρεις ασθενείς με σοβαρή ολιγοαζωσπερμία είχαν διαφορετική *missense* μετάλλαξη 937G>A (A313T) που οδηγεί στην αντικατάσταση της πολύ συντηρητικής αλανίνης σε θρεονίνη στο πρώτο επαναλαμβανόμενο μοτίβο kelch της πρωτεΐνης (Εικ. 32Α). Οι 394 γόνιμοι άνδρες αποτέλεσαν την ομάδα ελέγχου (control group). Οι άνδρες αυτοί δεν παρουσίαζαν την μετάλλαξη 937G>A, ενώ μόνο ένας είχε την μετάλλαξη 647A>C.





[Εικόνα 32] Οι KLHL10 μεταλλάξεις που εντοπίστηκαν σε oligoζωοσπερμικούς ασθενείς. (Α) Η θέση των missense μεταλλάξεων στο γονίδιο *KLHL10* των Q216P και A313T (Β) η μετάλλαξη IVS3_121delTCTT (Yatsenko AN., Roy A., Chen R., Ma L., Murthy LJ., Yan W., Lamb DJ., Matzuk MM., 2006)

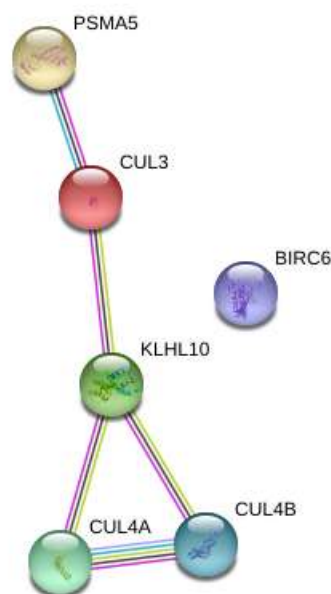
Η ανθρώπινη KLHL10 πρωτεΐνη άγριου τύπου (WT) βρέθηκε να αλληλεπιδρά έντονα με τον εαυτό της σχηματίζοντας ομοδιμερή και με την CUL3 πρωτεΐνη. Οι μεταλλαγμένες KLHL10 πρωτεΐνες παρουσιάζουν μειωμένη αλληλεπίδραση με την πρωτεΐνη WT, υποδηλώνοντας ότι οι μεταλλάξεις A313T και Q216P βλάπτουν το σχηματισμό ομοδιμερών KLHL10. (Yatsenko AN., Roy A., Chen R., Ma L., Murthy LJ., Yan W., Lamb DJ., Matzuk MM., 2006)

Η μετάλλαξη A313T επηρεάζει την περιοχή kelch της πρωτεΐνης που πιστεύεται ότι αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες που προορίζονται για την πρωτεασωματική αποικοδόμηση. Η μετάλλαξη Q216P επηρεάζει την περιοχή BACK που πιστεύεται ότι προσανατολίζει το υπόστρωμα προς το σύμπλεγμα. Εφόσον και τα δυο αλληλόμορφα καταστρέφουν τον ομοδιμερισμό της πρωτεΐνης KLHL10 και προφανώς προκαλούν την αστάθεια του διμερούς, η έλλειψη της πρωτεϊνικής λειτουργίας μπορεί να οφείλεται είτε σε μια κυρίαρχη αρνητική επίδραση είτε σε μειωμένα επίπεδα λειτουργικών διμερών. Απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο φυσιολογικός ρόλος αυτών των ομοδιμερών, αλλά είναι πιθανό ότι επιπλέον του υποτιθέμενου ρόλου τους σε ένα σύμπλοκο CUL3-KLHL10, η πρωτεΐνη KLHL10 θα μπορούσε να εκτελεί ανεξάρτητες τις CUL3 λειτουργίες κατά τη διάρκεια της σπερμογένεσης.

Μελετήθηκε έπειτα ένας σοβαρά oligoζωοσπερμικός ασθενής είχε ένα ελάττωμα ματίσματος στο τμήμα cDNA που αντιπροσωπεύει τα εξώνια 3-5, που οδηγεί στην μετατόπιση πλαισίου αναγνώσης. Αν και τα cDNA που συμπεριλαμβάνουν τα εξώνια 1-3 μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν κανονικά από αυτόν τον ασθενή, το τμήμα cDNA που αντιπροσωπεύει τα εξώνια 3-5 είχε ανώμαλο μάτισμα εξαιτίας μίας κρυπτικής θέσης ματίσματος στο ιντρόνιο 3 που ενεργοποιήθηκε. Το γεγονός αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη μερική συγκράτηση του ιντρονίου 3 στο ώριμο mRNA, αλλά την αποκοπή του εξωνίου 4

και μέρους του εξωνίου 5. Το μεταλλαγμένο mRNA παρουσιάζει ένα κωδικόνιο λήξης αμέσως μετά το εξόνιο 3, το οποίο θεωρητικά οδηγεί σε περικοπή της πρωτεΐνης KLHL10 στο τέλος της kelch 3 επαναλήψης (Εικ. 32B). Για τον εντοπισμό μίας πιθανής μετάλλαξης στην θέση ματίσματος σε αυτόν τον ασθενή, προσδιορίστηκε η αλληλουχία ολόκληρου του ιντρονίου 3 και των εξωνίων 3-5 αυτού του ασθενούς. Εντοπίστηκε μια 4 bp ετερόζυγη διαγραφή στο ιντρόνιο 3 (IVS3_121delTCTT), που οδηγεί σε αποκοπή 121 bp (Εικ. 32B) σε γονιδιωματικό DNA. Κανένας από τους 394 ασθενείς που εξετάστηκαν δεν είχε αυτήν την μετάλλαξη διαγραφής ιντρονίων. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η 4 bp διαγραφή ιντρονίου (TCTT) είναι στη μέση ενός τμήματος υπολειμμάτων πολυπυριμιδίνης, το οποίο συνδέει την πανταχού παρούσα ευκαρυωτική πρωτεΐνη δέσμευσης πολυπυριμιδίνης (PTB) που είναι ρυθμιστής του ματίσματος. Το PTB ενεργεί μέσω της δέσμευσης σε στοιχεία αποσιώπισης στο σημείο ματίσματος του ιντρονίου για να ρυθμίσει αρνητικά το μάτισμα και τον ορισμό εξωνίων. Συνεπώς, η συγκεκριμένη έρευνα απέδειξε ότι η διαγραφή ιντρονίου οδηγεί σε απώλεια δεσμεύσης του PTB και σε αποδυνάμωση μίας κρυπτικής θέσεως ματίσματος στο ιντρόνιο 3, καταλήγοντας στο παρεκκλίνων μοτίβο ματίσματος στον συγκεκριμένο ασθενή (Yatsenko AN., Roy A., Chen R., Ma L., Murthy LJ., Yan W., Lamb DJ., Matzuk MM., 2006).

Ο μηχανισμός με τον οποίο η διακοπή της λειτουργίας KLHL10 οδηγεί σε ολιγοζωοσπερμία στους άνδρες βρίσκεται υπό περαιτέρω διερεύνηση.



[Εικόνα 33] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων του *KLHL10* (Gene Cards_c, 2018)

Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις ολιγοσπερμίας

[Πίνακας 9] Μεταλλάξεις που σχετίζονται με ολιγοσπερμία

Φαινότυπος	Γονίδιο	Λειτουργία	Έκφραση-Δράση	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Τύπος Μετάλλαξης
Ολιγοσπερμία	<i>KLHL10</i>	Ειδικός για το υπόστρωμα προσαρμογής του συμπλόκου ουμπικουϊνικής-πρωτεϊνικής λιγκάσης E3 με βάση CUL3, το οποίο μεσολαβεί στην ουβικιτινίωση και στην πρωτεασωματική ή αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων	Στρογγυλές σπερματίδες	Μειωμένα επίπεδα λειτουργικών διμερών KLH10 και μεταλλάξεις στο σημείο πρόσδεσης υποστρώματος-πρωτεΐνης οπότε δεν ρυθμίζονται σωστά οι πρωτεΐνες-στόχοι	Ετερόζυγη (647A>C), (937G>A), (IVS3_121delTC TT)

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *KLHL10* που προκαλούν το φαινόμενο ολιγοσπερμίας θεωρούνται από τις λιγότερο επιβλαβείς, καθώς με τις σύγχρονες θεραπευτικές προσέγγισης οι φορείς των μεταλλάξεων μπορούν να αποκτήσουν δικό τους παιδί. Με τις σύγχρονες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως η απλή σπερματέγχυση IUI, η κλασσική IVF και η ICSI μπορεί να επιτευχθεί η γονιμοποίηση και σε ασθενείς με πολύ χαμηλό δείγμα σπέρματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι για τη διαδικασία της ICSI είναι απαραίτητο μόνο ένα καλής μορφολογίας και κινητικότητας σπερματοζωάριο για να γίνει η μικρογονιμοποίηση του ωαρίου. Επομένως οι μεταλλάξεις *KLH10* έχουν επίπτωση στη φυσιολογική γονιμότητα, καθώς το άτομο που τις φέρει είναι ολιγοσπερμικό και θα αντιμετωπίζει δυσκολίες φυσιολογικής γονιμότητας. Ωστόσο οι μεταλλάξεις αυτές δεν έχουν σοβαρή επίπτωση καθώς με τις σύγχρονες τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οι ασθενείς που τις φέρουν μπορούν να δεχθούν την κατάλληλη θεραπεία γονιμότητας ώστε να αποκτήσουν δικό τους παιδί.

Οι μεταλλάξεις *KLH10* έχουν χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, μιας και βρέθηκαν σε μόλις οκτώ άτομα μεταξύ 556 ασθενών. Άρα η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων αυτών και η καλής πρόγνωσης υπογονιμότητα που προκαλούν οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν προκύπτει ανάγκη για περαιτέρω διερεύνηση, επειδή τέτοιου είδους μεταλλάξεις μπορούν σήμερα να αντιμετωπιστούν με την κατάλληλη θεραπεία. Το μοναδικό επίφοβο σημείο είναι ότι οι μεταλλάξεις έχουν επικρατή χαρακτήρα και

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

μπορούν να κληρονομηθούν στους αρσενικούς απογόνους οι οποίοι θα φέρουν επίσης το φαινότυπο της олиγοσπερμίας και θα χρειαστούν με την σειρά τους βοήθεια.

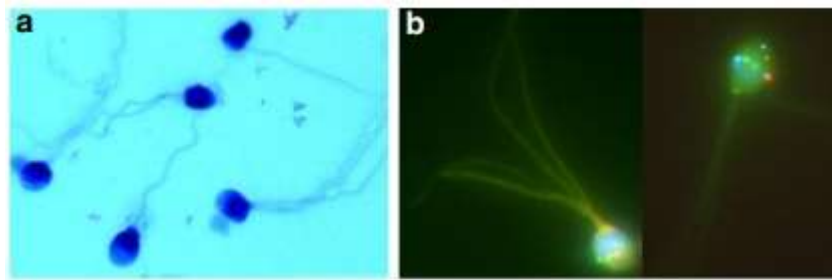
Μεταλλάξεις που σχετίζονται με τερατοσπερμία

Τερατοσπερμία

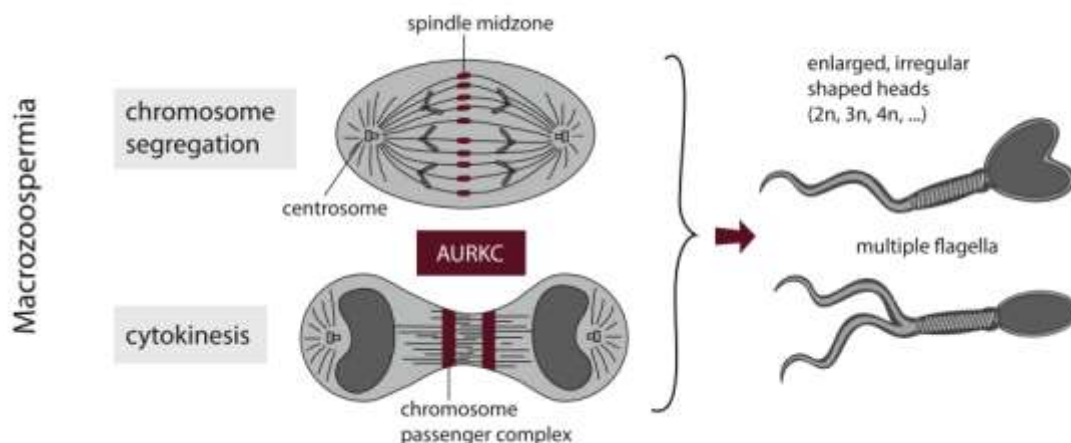
Η τερατοζωοσπερμία είναι μια κατάσταση όπου περισσότερο από το 96% των σπερματοζωαρίων στο δείγμα σπέρματος έχει μη φυσιολογική μορφολογία (WHO, 2010). Δύο σοβαροί και σπάνιοι φαινότυποι τερατοζωοσπερμίας αναγνωρίζονται ως μακροζωοσπερμία και σφαιροζωοσπερμία.

Μακροζωοσπερμία (Macrozoospermia)

Η μακροζωοσπερμία (macrozoospermia) είναι μια πολύ σπάνια μορφολογική διαταραχή των σπερματοζωαρίων που παρατηρείται σε λιγότερο από το 1% των στείρων ανδρών. Το σπέρμα από άνδρες με σπερματοζωάρια που έχουν μεγάλη κεφαλή και πολλά μαστίγια έδειξε σταθερά σε ποσοστό που πλησιάζει το 100% μορφολογικά ανώμαλα σπερματοζωάρια με χαμηλή κινητικότητα, υπερμεγέθεις ακανόνιστες κεφαλές, ανώμαλο αυχένα και ακρόσωμα και μέχρι έξι μαστίγια (Εικ. 34). Ειδικότερα, οι περισσότεροι γαμέτες ήταν πολυπλοειδικοί με αρκετά μαστίγια, που υποδηλώνουν ατελές διαχωρισμό χρωμοσωμάτων και χρωματίδων κατά τη διάρκεια της μείωσης I και II αντιστοίχως, που συνδέεται με την αποτυχία της κυττοκίνησης που είναι φυσιολογικό γεγονός της σπερματογένεσης (Dieterich K., Soto Rifo R., Faure AK., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M., 2007). Το μακροκεφαλικό με πολλαπλά μαστίγια σύνδρομο των σπερματοζωαρίων είναι αυτοσωματικός υπολειπόμενος τύπος απόλυτης τερατοζωοσπερμίας που οδηγεί στην υπογονιμότητα ή μάλλον σε στειρότητα και σχετίζεται με αρνητική αναπαραγωγική πρόγνωση και πολύ κακή έκβαση της θεραπείας της υπογονιμότητας (Ghédier H., Gribaa M., Mamaï O., Ben Charfeddine I., Braham A., Amara A., Mehdi M., Saad A., Ibala-Romdhane S., 2015). Η πρόγνωση δεν είναι τόσο φτωχή για ασθενείς χωρίς μεταλλάξεις *AURKC* και/ή με μερικό φαινότυπο μακροζωοσπερμίας.



[Εικόνα 34] Μακροζωοσπερμία. α) χρώση May Grünwald-Giemsa που δείχνει σπερματοζώαρια με μεγάλο κεφάλι και πολλαπλά μαστίγια. β) FISH που δείχνει τριπλοειδές σπέρμα (ανιχνευτές: 13q14 σε πράσινο χρώμα, 21q22 σε κόκκινο χρώμα) και τετραπλοειδές σπέρμα (ανιχνευτές: CEPX σε πράσινο, CEPY σε κόκκινο, 18q11.1-2 σε aqua) (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015).



[Εικόνα 35] Αναπαράσταση των γονιδίων που συνδέονται με μακροζωοσπερμία = σπερματοζώαρια με διευρυμένες και ακανόνιστες κεφαλές και πολλαπλά μαστίγια (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018).

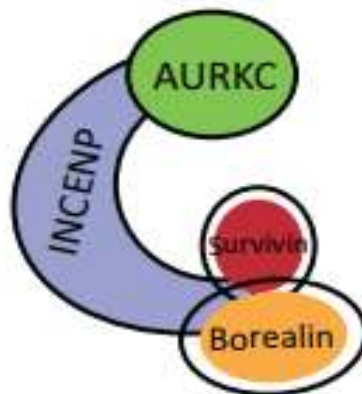
Μεταλλάξεις *AURKC* με φαινότυπο μακροζωοσπερμίας

Λειτουργία πρωτεϊνικής κινάσης Aurora- *AURKC*

Το γονίδιο *AURKC*, που βρίσκεται στο 19q13.43, έχει 7 εξώνια και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 309 αμινοξέων που είναι μέλος της υποοικογένειας σερίνης/θρεονίνης της πρωτεϊνικής κινάσης Aurora. Είναι ένα συστατικό του χρωμοσωμικού επιβατικού συμπλέγματος (chromosomal passenger complex-CPC) το οποίο λειτουργεί ως βασικός ρυθμιστής της μίτωσης. Το CPC σύμπλεγμα έχει βασικές λειτουργίες στο κεντρομερές στην εξασφάλιση της σωστής ευθυγράμμισης και στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων ενώ απαιτείται για τη σταθεροποίηση των χρωμοσωμικών μικροσωληνίσκων και τη συναρμολόγηση της ατράκτου. Παίζει επίσης σπουδαίο ρόλο στη μείωση και κυρίως στη σπερματογένεση (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015).

Το CPC είναι ένα σύμπλεγμα πρωτεϊνών που δεσμεύεται στα κεντρομερή για να ρυθμίζει τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων. Εκτός από την υπομονάδα κινάσης

AURKC, το CPC περιέχει εσωτερική πρωτεΐνη κεντρομερούς (inner centromere protein - INCENP) και δύο πρωτεΐνες προσδέτες ιστόνης, το Survivin και το Borealin (Εικ. 36). Για να διασφαλιστεί ότι τα θυγατρικά κύτταρα λαμβάνουν το κατάλληλο συμπληρωματικό χρωμόσωμα, το CPC εμποδίζει την έναρξη της ανάφασης και την κυτταρική διαίρεση μέχρι να ευθυγραμμιστούν σωστά τα χρωμοσώματα και να συνδεθούν με τη άτρακτο. Το CPC παρεμποδίζει την αναφάση με τουλάχιστον δύο τρόπους: 1) αποσταθεροποιώντας τους ακατάλληλους μικροσωληνίσκους που συνδέονται σε κινητοχώρους, και 2) σηματοδοτώντας την στρατολόγηση του πρωτεϊνικού συγκροτήματος της ατράκτου (spindle assembly checkpoint - SAC) προς τον κινητόχωρο. Οι μεταλλάξεις απώλειας λειτουργίας σε οποιοδήποτε από τα στοιχεία CPC οδηγούν σε εσφαλμένο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων, μεταφασικές μεταθέσεις, μειωτική διακοπή, ανεπάρκεια κυτοκίνησης και μορφολογικά ελαττώματα της άτρακτου. Επομένως, δεν προκαλεί έκπληξη ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *AURKC* θα μπορούσαν να προκαλέσουν μακροζωοσπερμία σε άνδρες (Fellmeth JE., Ghanaim EM., Schindler K., 2016).

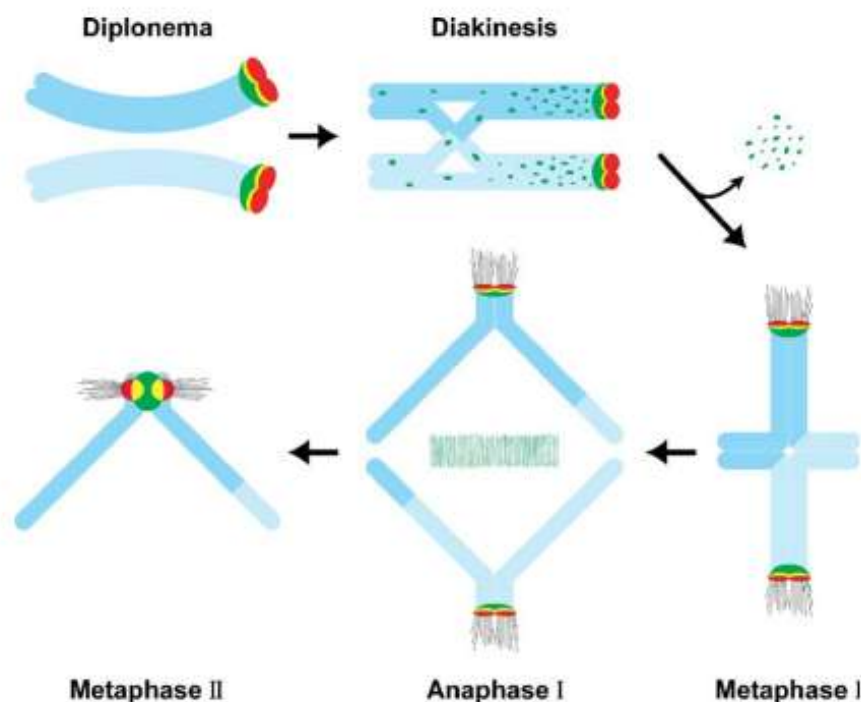


[Εικόνα 36] Σχηματική απεικόνιση του χρωμοσωμικού επιβατικού συμπλέγματος AURKC-CPC (Nguyen AL., Schindler K., 2017)

Το γονίδιο *AURKC* (στα ποντίκια *AIE1*/ στον άνθρωπο *AIE2*) εκφράζεται στον όρχι και κυρίως περιορίζεται σε μειωτικά ενεργά γαμετικά κύτταρα, με τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης να συλλαμβάνονται στο στάδιο της πρόφασης I της διπλοταινίας των πρωτογενών σπερματοκυττάρων. Πρόσφατα, έχει αναφερθεί ότι η Aurora-C (*AURKC*) είναι καινούρια πρωτεΐνη χρωμοσωμικός επιβάτης που δεσμεύεται με το INCENP και μπορεί να συμπληρώσει την λειτουργία της κινάσης Aurora-B σε μιτωτικά κύτταρα. Υποστηρίζεται ότι η Aurora-C παίζει παρόμοιο ρόλο με το Aurora-B στη μείωση.

Η Aurora-C ανιχνεύθηκε αρχικά σε περιοχές κεντρομερούς στο πρώιμο στάδιο της διπλοταινίας στα σπερματοκύτταρα και στη συνέχεια σταδιακά αυξήθηκε η συγκέντρωση

της στο κεντρομερές κατά την ολοκλήρωση του σταδίου της διπλοταινίας. Στη διακίνηση, η Aurora-C εντοπίζεται κατά μήκος των χρωμοσωμικών αξόνων μεταξύ των αδελφών χρωματίδων, συμπεριλαμβανομένων των κεντρομερών και των περιοχών του βραχίονα. Κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη διακίνηση σε μετάφαση I (MI), η Aurora-C διαχωρίζεται βαθμιαία από τους βραχίονες του χρωμοσώματος και συγκεντρώνεται στα κεντρομερή κοντά στο κινετόχωρο. Στη συνέχεια μεταφέρεται στη μεσαία ζώνη της ατράκτου και το μεσαίο σώμα στην αναφάση I και τελοφάση I, αντίστοιχα (Εικ. 37).

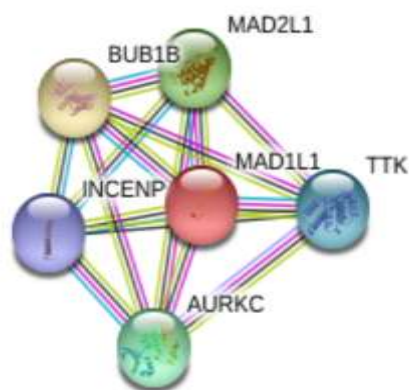


[Εικόνα 37] Σχηματική αναπαράσταση της κατανομής της Aurora-C κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης. Το Aurora-C έχει πράσινο χρώμα και τα κεντρομερή/κινετόχωροι επισημαίνονται με κόκκινο χρώμα. Τα χρωμοσώματα είναι επισημασμένα με μπλε χρώμα. Οι περιοχές αλληλεπικάλυσης είναι κίτρινες. Τα σήματα Aurora-C χάνονται βαθμιαία από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων και συσσωρεύονται στα κεντρομερή κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την διακίνηση σε MI (Chieh-Ju C. Tang, Chun-Yi Lin, Tang K. Tang, 2006).

Ανακαλύφθηκε ότι η κινάση Aurora-C συνευρίσκεται με την Aurora-B και το INCENP κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης. Το INCENP εμφανίζεται σε μειωτικά κύτταρα πριν από την Aurora-B και -C. Το INCENP ανιχνεύεται αρχικά στο κεντρικό στοιχείο (CE) του SC από το στάδιο της ζυγοταινίας μέχρι το στάδιο της καθυστερημένης παχυταινίας. Στη συνέχεια μεταφέρεται στα κεντρομερή κατά τη διάρκεια της διπλοταινίας. Αμφότερες οι Aurora-B και -C ανιχνεύονται αρχικά στο πρώιμο στάδιο διπλοταινίας στα χρωμοσωμικά κεντρομερή όπου είχε ήδη προσδεθεί το INCENP. Μετά το στάδιο της διπλοταινίας, το INCENP φαίνεται να συνεργάζεται με την κινάση Aurora-B και -C σε όλη τη μειωτική διαίρεση. Έτσι, είναι πιθανό ότι το INCENP

μπορεί να στρατολογεί τις κινάσες Aurora-B και -C στις κατάλληλες θέσεις εντός των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης. Εναλλακτικά, κάποια άλλη πρωτεΐνη μπορεί να στρατολογεί τόσο το INCENP όσο και την κινάση Aurora-C σε μειωτικά χρωμοσώματα για να εκτελέσουν τις λειτουργίες τους κατά τη διάρκεια της μείωσης.

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι το σύμπλοκο INCENP είναι υπόστρωμα και θετικός ρυθμιστής για την κινάση Aurora-B σε σωματικά κύτταρα. Το INCENP έχει συντηρητικό καρβοξυτελικό άκρο IN-box που δεσμεύεται στην κινάση Aurora-B και ένα μη συντηρημένο αμινοτελικό άκρο που είναι απαραίτητο για τη στόχευση της στο κεντρομερές. Η φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου του INCENP από την Aurora-B κινάση ενισχύει τη δράση της. Όπως στα σωματικά κύτταρα με παρόμοιο τρόπο μπορεί επίσης το γονίδιο INCENP να δεσμεύεται και να ενεργοποιεί την κινάση Aurora-C σε μειωτικά γαμετικά κύτταρα (Εικ. 38).



[Εικόνα 38] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της AURKC (Gene Cards_d, 2018).

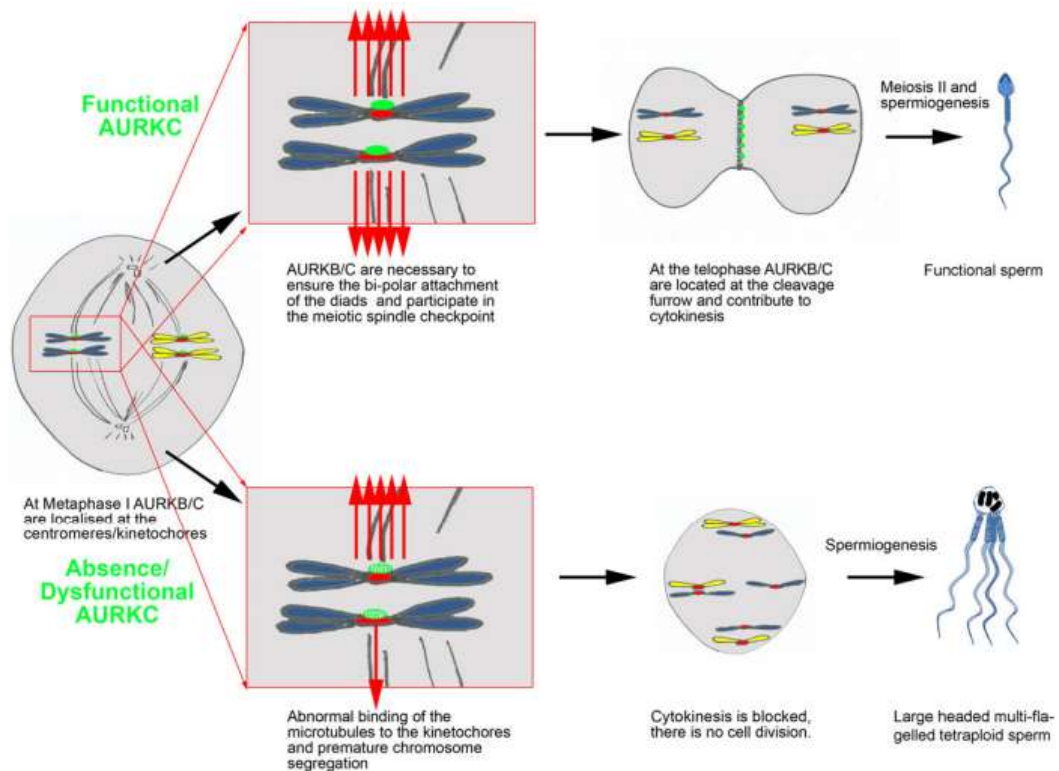
Η κινάση Aurora-C διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων και στην κυττοκίνηση κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης.

Διαπιστώθηκε ότι τα περισσότερα σύμπλοκα συνοχής-κοχυσίνης (cohesion complexes) διαχωρίζονται από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μιτωτικής πρόφασης λόγω της φωσφορυλίωσης τους. Η Aurora-B και οι κινάσες τύπου Polo (Polo-like kinases) συμμετέχουν σε αυτό το μιτωτικό γεγονός. Είναι αξιοσημείωτο ότι στη μείωση απελευθερώνονται σταδιακά από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων ορισμένα συστατικά SC (π.χ. SCP2 και SCP3) και υπομονάδες κοχυσίνης (π.χ. SMC1b και SMC3 αλλά όχι REC8) και συσσωρεύονται γύρω από τα κεντρομερή κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την πρόφαση I στο στάδιο MI. Το γεγονός ότι ένα σημαντικό μέρος της

κινάσης Aurora-C διαχωρίστηκε από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων και συγκεντρώθηκε στα κεντρομερή κατά τη διάρκεια της μετάβασης από τη διακίνηση-MI αυξάνει την πιθανότητα ότι η Aurora-C μπορεί να ρυθμίζει την απελευθέρωση της κοχεσίνης και των συστατικών SC από τους βραχίονες των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης I.

Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι στην μίτωση η Aurora-B προάγει την πρόσδεση του κινητόχωρου σε μικροσωληνίσκους αποσταθεροποιώντας τις συνθετικές συνδέσεις των αδελφών χρωματίδων. Εντούτοις, εφαρμόζεται διαφορετικός μηχανισμός στη μείωση I. Αξίζει να σημειωθεί ότι η κινάση Aurora-C μοιράζεται μια υψηλή ομοιότητα αλληλουχιών με την Aurora-B (77,6%) στην καταλυτική περιοχή της κινάσης και αμφότερες οι Aurora-B και -C συναρμολογούνται στα κεντρομερή των χρωμοσωμάτων MI, υποδηλώνοντας ότι η Aurora-C μπορεί να έχει παρόμοια αλλά διαφορετική λειτουργία με την Aurora-B. Μπορεί λοιπόν να θεωρηθεί ότι η κινάση Aurora-C λειτουργεί από μόνη της ή συντονίζεται με τη λειτουργία της Aurora-B, ιδιαίτερα στη ρύθμιση των αλληλεπιδράσεων κινητόχωρων-μικροσωληνίσκων κατά τον διαχωρισμό των μειωτικών χρωμοσωμάτων.

Αποδείχθηκε επίσης ότι, κατά τη διάρκεια της μίτωσης, η Aurora-B έχει κρίσιμο ρόλο στην κυτταροκίνηση. Η υπερέκφραση μιας καταλυτικώς ανενεργής Aurora-B διαταράσσει τον σχηματισμό αύλακας διαχωρισμού και αποτρέπει την κυτοκίνηση. Οι μελέτες ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι ένα μείζον τμήμα της Aurora-C διαχωρίζεται από τα κεντρομερή και μεταφέρεται στη μεσαία ζώνη της ατράκτου και στο μεσαίο σώμα κατά τη διάρκεια της μετάβασης από την αναφάση I στην τελοφάση I υποδηλώνοντας έναν ουσιαστικό ρόλο της κινάσης Aurora-C στη μειωτική ενδοκίνησια-διαδικασία παρόμοια με την κυτοκίνηση στη μίτωση (Chieh-Ju C. Tang, Chun-Yi Lin, Tang K. Tang, 2006).



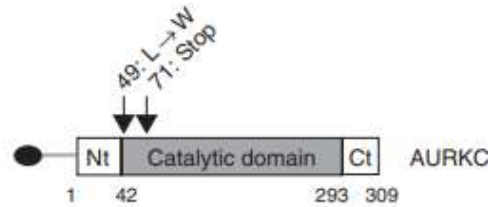
[Εικόνα 39] Το AURKC ελέγχει τη μείωση και την κυτταροκίνηση των σπερματοκυττάρων (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC*

Εξετάστηκαν άνδρες με φαινότυπο μακροζωοσπερμίας για την ανίχνευση των μεταλλάξεων που μπορεί να το προκαλούν.

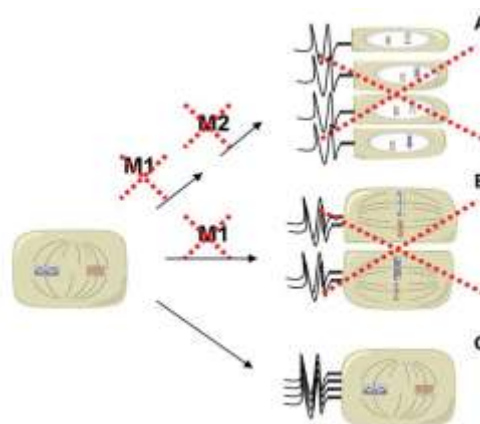
Ο Dieterich et al. (2007) διεξήγαγε μια μικροσυστοιχιακή σάρωση σε δέκα υπογόνιμους άνδρες (4 γαλλικοί πολίτες βορειοαφρικανικής καταγωγής και 6 από την περιφέρεια Ραμπάτ στο Μαρόκο) με φαινότυπο σπερματοζωαρίων μεγάλης κεφαλής. Στη συνέχεια, πρόσθεσαν ακόμα 4 αρσενικά από το Ραμπάτ. Προσδιόρισαν μια μικρή περιοχή ομοζυγοτίας στο 19qter. Καθώς το γονίδιο της *aurora* κινάσης C (*AURKC*) βρίσκεται κοντά στην περιοχή αυτή, αλληλούχησαν την κωδικεύουσα αλληλουχία και ανίχνευσαν μια ομόζυγη διαγραφή κυτοσίνης στο εξώνιο 3 (c.144delC) και στα 14 άτομα (Εικ. 40, 42). Στο επίπεδο της πρωτεΐνης η *nonsense* μετάλλαξη εισάγει μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, προκαλώντας εσφαλμένη μετάφραση από το αμινοξύ 49 έως την πρόωρη πρωτεϊνική διακοπή στο σημείο όπου παρουσιάζεται ένα νέο κωδικόνιο λήξης στη θέση 71. Επειδή η συντηρημένη καταλυτική περιοχή της πρωτεΐνης αρχίζει στη θέση 42, επτά υπολείμματα πριν από το πρώτο τροποποιημένο αμινοξύ, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη είναι απίθανο να διατηρήσει οποιαδήποτε λειτουργικότητα κινάσης (Εικ. 40). Αυτή η μετάλλαξη οδηγεί στην πρόωρη εισαγωγή ενός κωδικονίου λήξης, που επάγει την

παραγωγή μιας μη λειτουργικής και περικεκομμένης πρωτεΐνης που στερείται της περιοχής-κινάσης. Επομένως η c.144delC είναι μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (loss-of-function).



[Εικόνα 40] Σχηματική αναπαράσταση της μετάλλαξης c.144delC της AURKC πρωτεΐνης. Η θέση της διαγραφής και το προκύπτον κωδικόνιο λήξης υποδεικνύονται από τα βέλη (Dieterich K., Soto Rifo R., Faure AK., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M., 2007)

Η Aurkc εμπλέκεται στο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων και στην κυτταροκίνηση. Μη-ή λανθασμένα-διαχωριζόμενα ομόλογα χρωμοσώματα ή χρωματιδές αναμένεται να παραμείνουν κοντά μεταξύ τους εντός του πυρήνα των σπερματοζωαρίων. Το 92% των σπερματοζωαρίων που αναλύθηκαν έδειξε ότι μια πολύ μεγάλη πλειοψηφία των σπερματοζωαρίων έχει ελαττωματική διαίρεση της μείωσης I. Είναι πιθανό ότι η διαίρεση κατά την μείωση II είναι επίσης ελαττωματική σε αυτά τα κύτταρα, γεγονός που θα οδηγήσει σε σχηματισμό τετραπλοειδικών σπερματοζωαρίων ακατάλληλων για γονιμοποίηση (Εικ. 40). Επομένως τα περισσότερα σπερματοζωάρια είναι τετραπλοειδικά, υποδεικνύοντας πλήρη αποτυχία κυτοκίνησης, γεγονός που εξηγεί το μεγάλο μέγεθος των γαμετών (Dieterich K., Soto Rifo R., Faure AK., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M., 2007).



[Εικόνα 41] Σχηματική απεικόνιση της σπερματογένεσης στους (A) γόνιμους άνδρες (C) c.144delC +/+ ασθενείς. Σε γόνιμα αρσενικά, τα γεννητικά κύτταρα υφίστανται δύο μειωτικές διαιρέσεις (M1, M2) που οδηγούν στην παραγωγή απλοειδών κυττάρων με 1c (κλώνο) DNA (A). Ακολουθεί η σπερματογένεση, η απόκτηση των ειδικών χαρακτηριστικών του σπέρματος (A). Σε ασθενείς με c.144delC +/+, αποδείχθηκε ότι όλα τα σπερματοζωάρια έχουν περιεχόμενο 4c DNA που δείχνει ότι η πρώτη διαίρεση δεν πραγματοποιήθηκε (B). Τα γεννητικά κύτταρα από τους ασθενείς με c.144delC +/+ υποβάλλονται σε σύνθεση DNA και φτάνουν στο σπερματοκύτταρο I και παραμένουν μπλοκαρισμένα μεταξύ της πρόφασης I και της ανάφασης I με ποσότητα 4c DNA (C). Δεν πραγματοποιούνται διαιρέσεις, επομένως τα κύτταρα

διατηρούν μεγάλο μέγεθος. Η σπερματογένεση λαμβάνει χώρα με επιμήκυνση της κεφαλής, μείωση του κυττοπλασμικού όγκου και απόκτηση αρκετών μαστιγίων. Η απουσία της κυτταρικής διαίρεσης, η πιθανή απομόνωση των σπερματοζωαρίων στον όρχι και/ή ο θάνατος των κυττάρων μπορεί να εξηγήσει τον μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων των πιο προσβεβλημένων ανδρών (Dieterich K., Zouari R., Harbuz R., Vialard F., Martinez D., Bellayou H., 2009).

Ύστερα από αυτή την αρχική μελέτη, έχουν εντοπιστεί τέσσερις επιπλέον πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNP) (c.686G> A, c.744C> A, c.930 + 38G> A και c.436-2A> G) σε ασθενείς με φαινότυπο μακρζωοσπερμίας (Εικ. 42). Τρεις από τους SNRs *AURKC* βρίσκονται στην κωδικοποιούσα περιοχή του γονιδίου. Ο SNP c.930 + 38G> A εμφανίζεται στην 3'-UTR (3' αμετάφραστη περιοχή) του γονιδίου και ο SNP c.436-2A> G βρίσκεται στη θέση ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 4 και 5 (Fellmeth JE., Ghanaïm EM., Schindler K., 2016).

Ο Dieterich et al. (2009) ανέλυσαν ένα σύνθετο γονότυπο κατασκευασμένο από την μετάλλαξη c.144delC και μία νέα *missense* μετάλλαξη στο εξώνιο 6, την c.686G>A (p.C229Y). Η μετάλλαξη αυτή είναι μίας μόνης αντικατάστασης βάσης στη θέση 686 (G/A), αυτή η αντικατάσταση προκαλεί μεταβολή κυστεΐνης σε τυροσίνη στο αμινοξύ 229 (Εικ. 42). Ο φαινότυπος επίσης ήταν 100% τετραπλοειδές σπέρμα με πολλαπλά μαστίγια και δεν υπήρξε φαινοτυπική παραλλαγή σε σύγκριση με τους ασθενείς που ήταν ομόζυγοι για το c.144delC. Η κυστεΐνη στη θέση 229 βρίσκεται εντός της καταλυτικής περιοχής της κινάσης και είναι πολύ συντηρημένη σε πολλές κινάσες υποδεικνύοντας τη σημασία της στην καταλυτική λειτουργία της πρωτεΐνης. Επομένως η c.686G> A μετάλλαξη είναι επίσης μια μετάλλαξη απώλειας λειτουργίας (Dieterich K., Zouari R., Harbuz R., Vialard F., Martinez D., Bellayou H., 2009).

Ο Ben Khelifa et al. (2011) περιέγραψε μια νέα μετάλλαξη στο γονίδιο *AURKC* σε δύο αδέρφια με καταγωγή τη Τυνησία που είχαν σύνθετη ετεροζυγή μετάλλαξη αποτελούμενη από την c.144delC και τη μετάλλαξη c.436-2A>G (Εικ. 42). Αυτή η μεταγενέστερη μετάλλαξη εντοπίζεται στη θέση σύζευξης δέκτη ματίσματος του εξωνίου 5 και οδηγεί στην παράληψη του εξωνίου 5. Ως συνέπεια, η μεταλλαγμένη πρωτεΐνη στερείται 50 αμινοξέων που κωδικοποιούνται από το εξώνιο 5 (αμινοξέα 146-195). Τα αμινοξέα αυτά εντοπίζονται στη μέση της καταλυτικής περιοχής και επομένως η απουσία τους είναι πολύ πιθανό να παρεμποδίζει σοβαρά τη λειτουργικότητα της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης έρευνας υποδεικνύουν ότι η μοριακή ανάλυση του γονιδίου *AURKC* των ασθενών με σπερματοζωάρια μεγάλης κεφαλής δεν θα πρέπει να περιορίζεται σε ανίχνευση ομόζυγης μετάλλαξης στο εξώνιο 3, αλλά θα πρέπει να

πραγματοποιείται πλήρης ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδίου. Η συγκεκριμένη διάγνωση είναι σημαντική καθώς η αναγνώριση των μεταλλάξεων του γονιδίου *AURKC* σε ασθενείς δείχνει ότι όλα τα σπερματοζώαρια θα είναι χρωμοσωμικά ανώμαλα (ανευπλοειδικά) και ότι δεν θα επιχειρηθεί ICSI (Ben Khelifa M., Zouari R., Harbuz R., Halouani L., Arnoult C., Lunardi J., 2011).

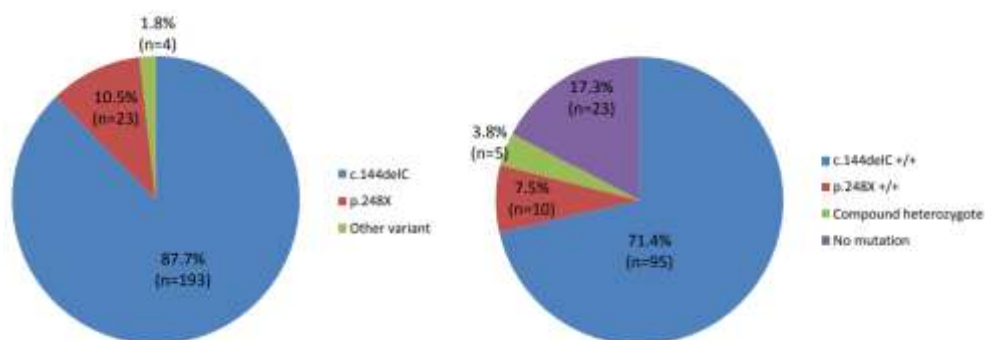
Ο Ben Khelifa et al. (2012) ανέλυσαν το γονότυπο από 44 μακροζωοσπερμικούς άνδρες ευρωπαϊκής και βορειοαφρικανικής προέλευσης. Προσδιόρισαν μια νέα επαναλαμβανόμενη *nonsense* μετάλλαξη (c.744C.G, p.Y248*) σε 11 αρσενικά (9 ομοζυγούς και 2 ετεροζυγούς). Αυτός ο SNP είναι μίας μόνης αντικατάστασης ζεύγους βάσεων στη θέση 744 (C/A). Η συγκεκριμένη αλλαγή οδηγεί στη δημιουργία κωδικονίου λήξης στη θέση της τυροσίνης στο κατάλοιπο 248. Το πρωτεϊνικό προϊόν του c.744C> A διατηρεί την πλειονότητα της καταλυτικής περιοχής, ωστόσο επειδή οι άνδρες αυτοί εμφανίζουν επίσης μακροζωοσπερμία και πολυπλοειδία, αποφασίστηκε ότι η συγκεκριμένη μετάλλαξη προκαλεί επίσης απώλεια λειτουργίας (Ben Khelifa M., Coutton C., Blum MG., Abada F., Harbuz R., Zouari R., 2012).



[Εικόνα 42] Σχηματικό διάγραμμα του γονιδίου *AURKC* και ο εντοπισμός των μεταλλάξεων που μέχρι τώρα εντοπίστηκαν. Τα κίτρινα κουτιά αντιπροσωπεύουν τις *missense* μεταλλάξεις. Τα μπλε κουτιά αντιπροσωπεύουν τις *nonsense* μεταλλάξεις. Τα κόκκινα πλαίσια υποδηλώνουν τις μεταλλάξεις θέσης ματίσματος (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015).

Εκτιμάται ότι η συχνότητα των *AUKRC* ετερόζυγων στον πληθυσμό της Βορείου Αφρικής είναι 1 στα 50. Αυτό δείχνει ότι η ανεπάρκεια της *AUKRC* μπορεί να συγκαταλέγεται στις συχνότερες αιτίες της ανδρικής υπογονιμότητας στους άνδρες του Μαγκρέμπ (Βόρειας Αφρικής). Τετοιου είδους μεταλλάξεις είναι σήμερα οι συχνότερες μεταλλάξεις που προκαλούν μακροζωοσπερμία και οφείλονται σε αδυναμία ολοκλήρωσης της μείωσης I (MI). Η μετάλλαξη c.144delC αντιπροσωπεύει σχεδόν το 90% των μεταλλάξεων *AURKC* και εκτιμάται ότι 1/50 έως 1/250 άτομα στο γενικό πληθυσμό είναι ετερόζυγες φορείς ανάλογα με τον σχετικό γεωγραφικό πληθυσμό. Σε υπογόνιμους άνδρες του Μαγκρέμπ, η επικράτηση των ομόζυγων μεταλλάξεων *AURKC* κυμαίνεται από 0,4% έως 2,7%. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC* είναι το πιο συχνό ελάττωμα σε στείρους Αλγερινούς άνδρες πριν από το σύνδρομο Klinefelter και τις Y-

μικροελλείψεις. Η επικράτηση της μετάλλαξης p.Y248 * είναι ασαφής επειδή η c.144delC είναι η πιο συχνά μελετημένη μετάλλαξη, αλλά φαίνεται να είναι η κύρια μετάλλαξη που εντοπίζεται σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης. Η συχνότερη μετάλλαξη είναι c.144delC, που αντιπροσωπεύει περίπου το 87,7% των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων στο σύνολο των μακροζωοσπερμικών ασθενών. Ο δεύτερος συχνότερος τύπος μετάλλαξης είναι μια επαναλαμβανόμενη *nonsense* μετάλλαξη p.Y248 * που αντιπροσωπεύει περίπου το 10,5% των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων. Οι σπανιότερες μεταλλάξεις είναι η μετάλλαξη *missense* στο εξώνιο 6 (p.C229Y), η μετάλλαξη στη θέση ματίσματος του εξωνίου 5 c436-2A> G και μετάλλαξη c.930 + 38G> A στην 3'-UTR (3' αμετάφραστη περιοχή) του γονιδίου *AURKC*. (Εικ. 43) (Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C., 2017). Επιδεικνύεται ότι δεν υπάρχει ελπίδα για αυτόλογη γονιμοποίηση για άνδρες με έλλειψη του γονιδίου *AURKC* οι οποίοι μπορούν να απευθύνονται μόνο σε δωρεά γαμετών ή υιοθεσία και θα πρέπει να αποφεύγονται αναποτελεσματικοί κύκλοι ICSI. Επομένως, είναι σημαντικό να πραγματοποιείται μοριακή διάγνωση για όλους τους μακροζωοσπερμικούς ασθενείς.



[Εικόνα 43] Συχνότητα των μεταλλάξεων *AURKC* (α) Πίνακες πίτων που δείχνουν τη συνολική συχνότητα των μεταλλάξεων *AURKC* μεταξύ των 133 μακροζωοσπερμικών μη σχετιζόμενων ασθενών (αριστερά) και η κατανομή μεταλλάξεων μεταξύ 220 μεταλλαγμένων αλληλόμορφων (δεξιά) (Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C., 2017).

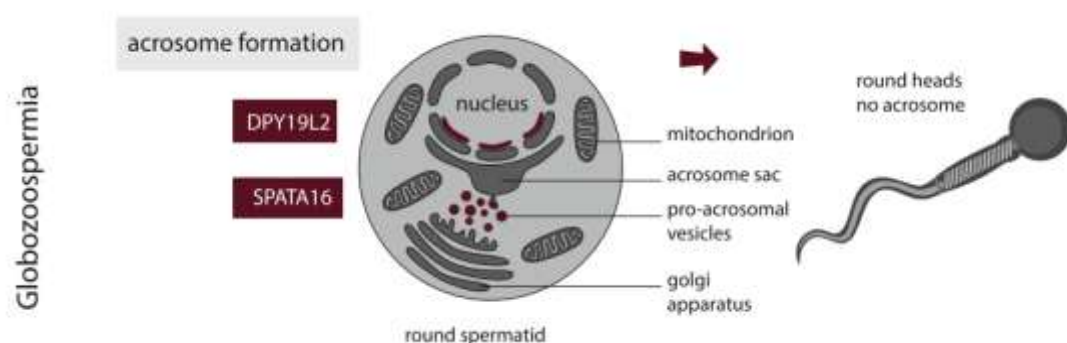
Σφαιροζωοσπερμία (Globozoospermia)

Η σφαιροζωοσπερμία (globozoospermia) είναι μια σπάνια (συχνότητα 0,1%) και σοβαρή μορφή τερατοζωοσπερμίας που χαρακτηρίζεται από την παρουσία στην εκσπερμάτιση μιας μεγάλης πλειοψηφίας στρογγυλών σπερματοζωαρίων που δεν έχουν ακρόσωμα (Εικ. 44). Τα σπερματοζωάρια δεν είναι ικανά να προσκολληθούν και να διεισδύσουν στη διαφανή ζώνη προκαλώντας πρωτογενή στειρότητα.



[Εικόνα 44] Ένα τυπικό σπερματοζώαριο από ασθενή με σφαιροζωοσπερμία, παρατηρείται το στρογγυλό σχήμα κεφαλής και η απουσία μιτοχονδρίων στο μεσαίο τμήμα του αυχένα (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015).

Ο αρχικός φαινότυπος χωρίστηκε σε δύο υποτύπους: την σφαιροζωοσπερμία τύπου I χαρακτηριζόμενη από την πλήρη έλλειψη του ακροσώματος και των ακροσωματικών ενζύμων και την σφαιροζωοσπερμία τύπου II που χαρακτηρίζεται από έναν φαινότυπο στρογγυλής κεφαλής λόγω ενός υπολειμματικού κυτταροπλασματικού σταγονιδίου που περιβάλλει την κεφαλή του σπέρματος και το ακρόσωμα. Η συγκεκριμένη ωστόσο, ονοματολογία προκαλεί σύγχυση και συχνά δεν χρησιμοποιείται στην βιβλιογραφία και αναφέρεται σε ασθενείς με 100% ομοιογενή φαινότυπο σφαιροζωοσπερμία (τύπου I) ή ασθενείς με μωσαϊκό σπέρμα κανονικού και στρογγυλού κεφαλίου (τύπου II). Οι όροι «ολική» ή «μερική» σφαιροζωοσπερμία έχουν προταθεί και θα πρέπει να προτιμούνται αναφερόμενοι στην ομοιογένεια του «αρχικού» φαινοτύπου τύπου I, ενώ ο φαινότυπος τύπου II θα πρέπει να αναφέρεται ως ψευδο-σφαιροζωοσπερμία (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015). Το σπερματοζώαριο χωρίς ακρόσωμα δεν είναι σε θέση να περάσει από τη διαφανή ζώνη (pellucida) και να συγχωνευθεί με την ωλέμη των ωοκυττάρων και οι αποτυχίες της γονιμοποίησης αποδίδονται σε ανεπάρκεια της ικανότητας ενεργοποίησης των ωαρίων, ακόμη και όταν επιχειρείται η τεχνική ICSI (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015).



[Εικόνα 45] Αναπαράσταση των γονιδίων που συνδέονται με σφαιροζωοσπερμία = στρογγυλά

σπερματοζωάρια χωρίς το ακρόσωμα (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018).

Στην σφαιροζωοσπερμία παρατηρείται ελαφρώς αυξημένη πιθανότητα ανευπλοειδισμού στα σπερματοζωάρια, που όμως είναι συγκρίσιμη με αυτήν που απαντάται συνήθως σε άλλους τύπους υπογονιμότητας και επομένως δεν αντικρούει τη θεραπεία των ασθενών με την τεχνική ICSI. Παρόλα αυτά, πολλές μελέτες που χρησιμοποιούν την τεχνική ICSI για ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία ανέφεραν χαμηλά ποσοστά γονιμοποίησης, εγκυμοσύνης και ζωντανών γεννήσεων, εκτιμώντας τα στα 38%, 20% και 14%, αντιστοίχως. Μια πρώτη καλά εδραιωμένη εξήγηση για τη χαμηλή αποτελεσματικότητα της τεχνικής ICSI όταν χρησιμοποιείται σπερματοζωάριο από ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία είναι η μείωση ή η απουσία του παράγοντα σπέρματος, μιας ορχί-ειδικής φωσφολιπάσης (φωσφολιπάση C zeta-PLCz) που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των ωοκυττάρων. Η φωσφολιπάση PLCz εντοπίζεται στην εσωτερική ακροσωματική μεμβράνη και την πυρηνική θήκη της μετα-ακροσωματικής περιοχής του ανθρώπινου σπέρματος, η οποία και εξαφανίζεται σε σφαιροζωοσπερμικό σπέρμα *Dpy19l2* *-/-*. Η αποτυχία ενεργοποίησης των ωοκυττάρων μπορεί να ξεπεραστεί με τεχνητή ενεργοποίηση ωοκυττάρων (AOA) χρησιμοποιώντας ιονοφόρο Ca^{2+} . Στην περίπτωση της σφαιροζωοσπερμίας, η AOA σε συνδυασμό με την τεχνική ICSI βελτίωσε την αποτελεσματικότητα της γονιμοποίησης, της εγκυμοσύνης και των ποσοστών ζωντανών γεννήσεων σε σύγκριση με την κλασσική ICSI και αυτό ανεξάρτητα από τον γονότυπο (*DPY19L2* *-/-* ή όχι) των ασθενών. Ωστόσο, ο ρυθμός ζωντανών γεννήσεως ανά μεταφορά παραμένει μικρότερος σε ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία σε σύγκριση με άλλους υπογόνιμους ασθενείς της ίδιας ηλικίας. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται στη βλάβη του DNA του σπέρματος που σχετίζεται με την ελαττωματική συμπίκνωση της χρωματίνης και στον κατακερματισμό του DNA που περιγράφεται στα σφαιροζωοσπερμικά σπερματοζωάρια. Η μη φυσιολογική συμπίκνωση της χρωματίνης στη σφαιροζωοσπερμία μπορεί να συνδεθεί με μια αλλοιωμένη αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. Επιπλέον, η απουσία της πρωταμίνης αυξάνει δραματικά την ευαισθησία του DNA σε θραύσματα. Συνολικά, οι επιγενετικές ανωμαλίες και ο κατακερματισμός του DNA σε πυρήνες σφαιροειδούς σπερματοζωαρίων βλάπτουν το αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρύων που προέρχονται από χρήση τεχνικής ICSI χρησιμοποιώντας σπερματοζωάρια *Dpy19l2* *-/-*. Συνοπτικά, οι σφαιροζωοσπερμικοί ασθενείς με μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2* συνδυάζουν χαμηλό ποσοστό ενεργοποίησης των ωοκυττάρων και κακή ανάπτυξη των εμβρύων που παράγονται από

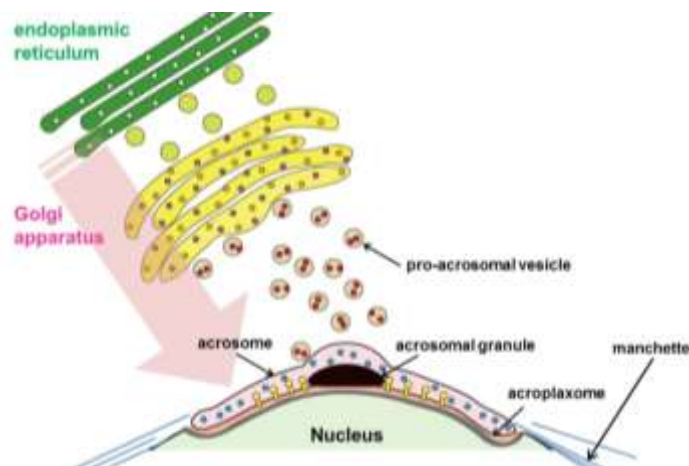
την τεχνική ICSI, εξηγώντας έτσι το σταθερά απογοητευτικό χαμηλό ποσοστό εγκυμοσύνης που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς.

Λίγες μελέτες ανέφεραν επιτυχή γονιμοποίηση ή εγκυμοσύνη σε ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία με καλά τεκμηριωμένες μεταλλάξεις των γονιδίων *DPY19L2* ή *SPATA16*. Λόγω του μικρού αριθμού περιπτώσεων δεν έχει αποδειχθεί επί του παρόντος καμία διαφορά στο ποσοστό επιτυχίας της εγκυμοσύνης σχετικά με την κατάσταση μετάλλαξης των σφαιροζωοσπερμικών ασθενών. Περαιτέρω μελέτες που λαμβάνουν υπόψη τις γενετικές μεταλλάξεις μπορεί να επηρεάσουν τη θεραπευτική στρατηγική και να διευκολύνουν τη βελτίωση της διαχείρισης των ασθενών που έχουν διαγνωστεί με σφαιροζωοσπερμία. Μέχρι σήμερα, μόνο ο τύπος της μερικής σφαιροζωοσπερμίας είναι γνωστό ότι έχει αντίκτυπο στη θεραπευτική προσέγγιση καθώς η ενδοκυτταροπλασματική μορφολογικά επιλεγμένη τεχνική έγχυσης σπέρματος (IMSI) έχει αποδειχθεί αποτελεσματική μόνο σε ασθενείς με μερική σφαιροζωοσπερμία (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015).

Μεταλλάξεις *DPY19L2* με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμία

Λειτουργία της πρωτεΐνης *DPY19L2*

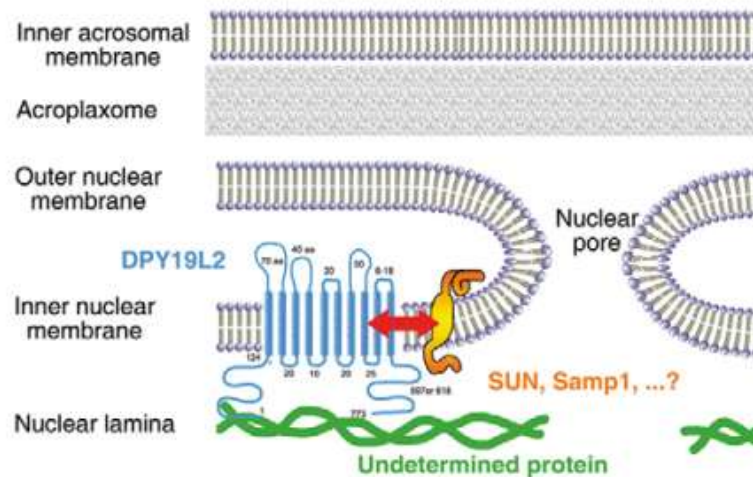
Το γονίδιο *DPY19L2* έχει 22 εξόνια και το προκύπτον πρωτεϊνικό προϊόν αποτελείται από 758 αμινοξέα. Μπορεί να εμπλέκεται στην δημιουργία του πρόσθιου πόλου των σπερματοζωαρίων και στην τοποθέτηση του ακροπλαξώματος, μια υποακροσωματική κυτταροσκελετική πλάκα στην οποία διασυνδέονται τα κυστίδια που προέρχονται από το σύστημα Golgi (Εικ. 46).



[Εικόνα 46] Σχεδιάγραμμα του εμπρόσιου τμήματος της κεφαλής του σπερματοζωαρίου. Το ακρόσωμα βρίσκεται πάνω από το ακροπλαξώμα (Fujihara Y., Satouh Y., Inoue N., Isotani A., Ikawa M., Okabe M.,

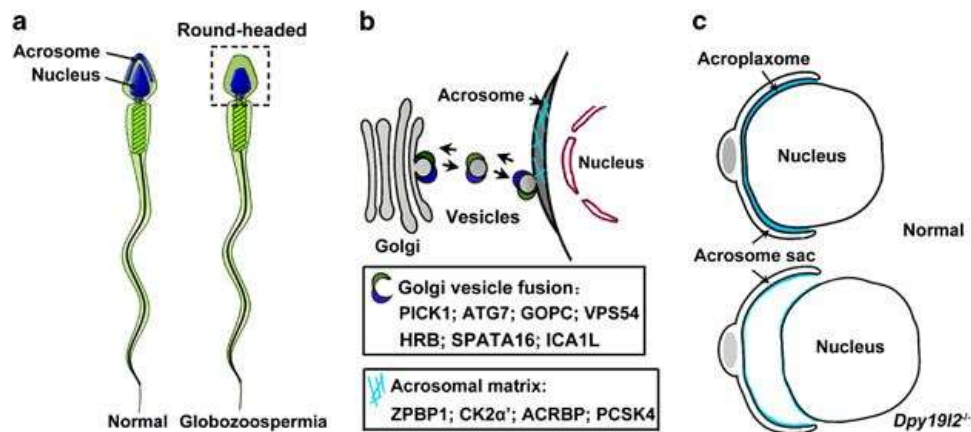
2012).

Η πρωτεΐνη DPY19L2 πιστεύεται ότι είναι μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη με 10 διαμεμβρανικά τμήματα και με τις N-τελικές και C-τελικές περιοχές να βρίσκονται στο νουκλεοπλάσμα. Εκφράζεται συγκεκριμένα σε σπερματοζωάρια και εντοπίζεται μόνο στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη του πυρήνα που αντικρίζει το ακρόσωμα (Εικ. 46).



[Εικόνα 47] Η πρωτεΐνη Dpy19l2 έχει 10 διαμεμβρανικά πεδία και βρίσκεται στη εσωτερική πυρηνική μεμβράνη (Pierre V., Martinez G., Coutton C., Delaroche J., Yassine S., Novella C., Pernet-Gallay K., Hennebicq S., Ray PF., Arnoult C., 2012).

Η πρωτεΐνη Dpy19l2 συμμετέχει στην αγκυροβόληση του ακροσώματος στον πυρήνα, γεφυρώνοντας τον πυρηνικό φάκελο τόσο στο πυρηνικό πυκνό στρώμα όσο και στο ακρόπλαξο (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015). Κατά την απουσία του γονιδίου *Dpy19l2* το σχηματιζόμενο ακρόσωμα διαχωρίζεται σιγά σιγά από τον πυρήνα και στην συνέχεια απομακρύνεται από το σπέρμα με το κυτταρόπλασμα (Εικ. 48). Εκτός από τη δομική λειτουργία της κατά τη διάρκεια της βιογένεσης του ακροσώματος, η λειτουργία της C-μαννοζυλοτρανσφεράσης της προγονικής πρωτεΐνης DPY-19 έθεσε την υπόθεση ότι η DPY19L2 μπορεί να συμμετέχει στην γλυκοσυλίωση των πρωτεϊνών του σπέρματος. Πολλές πιθανές πρωτεΐνες έχουν προταθεί να αλληλεπιδρούν με την πρωτεΐνη DPY19L2 κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης, ιδιαίτερα οι πρωτεΐνες SUN που ανήκουν στο σύμπλοκο LINC (συνδέτης νουκλεοσκελετών και κυτταροσκελετού - linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) σε συνδυασμό με πρωτεΐνες KASH. Οι πρωτεΐνες SUN εμφανίστηκαν ως οι καλύτεροι υποψήφιοι λόγω της αφθονίας τους κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης και του ρόλου τους στην πυρηνική διαμόρφωση κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των κεφαλών των σπερματοζωαρίων. Η υπόθεση αυτή όμως δεν έχει επιβεβαιωθεί και οι μοριακοί συνοδοί της πρωτεΐνης DPY19L2 παραμένουν να χαρακτηριστούν.

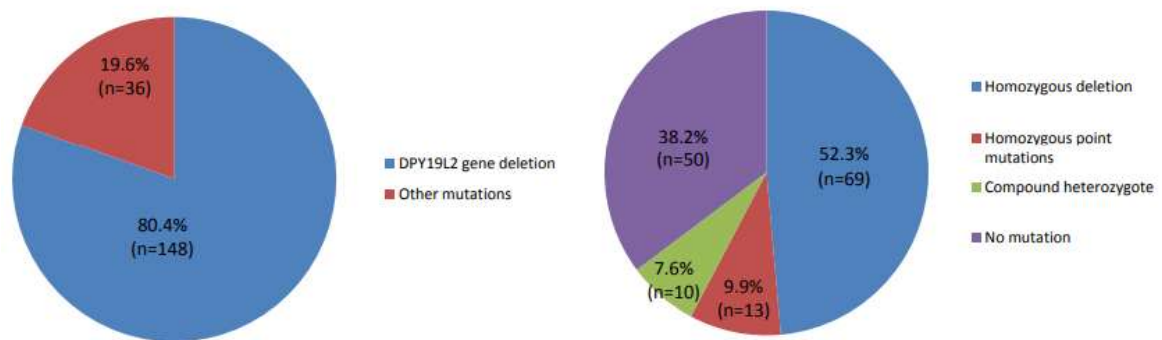


[Εικόνα 48] (α) Η σφαιροζωοσπερμία χαρακτηρίζεται από σπερματοζώαρια με στρογγυλή κεφαλή που δεν έχουν ακρόσωμα. (γ) Η απουσία του γονιδίου *Dpy192*^{-/-} οδηγεί στην αποσταθεροποίηση της σύνδεσης μεταξύ του ακροπλαζώματος και του πυρηνικού περιβλήματος (Chen SR., Batool A., Wang YQ., Hao XX., Chang CS., Cheng CY., Liu YX., 2016).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *DPY19L2*

Το 2011 μια πανγενωμική προσέγγιση εφαρμόστηκε σε μια ομάδα 20 Τυνήσιων ασθενών με 100% σφαιροζωοσπερμία και ταυτοποιήθηκε μια ομόζυγη διαγραφή 200 kb του γονιδίου *DPY19L2* σε 15 από τους 20 (75%) ασθενείς που διερευνήθηκαν. Το *Dpy19L2* αποδείχθηκε ότι εκφράζεται κυρίως στις σπερματίδες και στον ποντικό η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην εσωτερική πυρηνική μεμβράνη που βλέπει προς το ακροσωμικό κυστίδιο, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι απαραίτητη για την πρόσδεση του ακροσώματος στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της σπερμιογένεσης. Η ίδια διαγραφή εντοπίστηκε επίσης σε μια δεύτερη μελέτη στο 19% (4 από τα 21) των προσληφθέντων ασθενών. Τέσσερις επιπρόσθετες μελέτες επιβεβαίωσαν την υψηλή επικράτηση των γονιδιακών μεταλλάξεων του *DPY19L2*, που κυμαίνονταν από 60% έως 83,3% μεταξύ των αναλυθέντων ασθενών σε ομάδες ασθενών με σφαιροζωοσπερμία διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. Οι ομόζυγες διαγραφές αντιπροσωπεύουν το κύριο μεταλλακτικό συμβάν με ποσοστό 26,7% έως 73,3% των αναφερόμενων μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2* σε αυτές τις τέσσερις μελέτες. Δύο άλλες μελέτες σε μικρότερες ομάδες δύο Σκοπιανών και πέντε Αλγερινών ασθενών ενίσχυσαν αυτό το συμπέρασμα με την παρουσία ομόζυγης διαγραφής του γονιδίου *DPY19L2* σε όλους τους ασθενείς που αναλύθηκαν. Μόνο το πρόσφατο έργο των Chianese et al. (2015) αναφέρει χαμηλότερο ποσοστό μεταλλάξεων *DPY19L2* με 33% μεταλλάξεις σε μια ομάδα 9 ευρωπαϊκών ασθενών με σφαιροζωοσπερμία μεταξύ των οποίων μόνο δύο ασθενείς (22,2%) είχαν μια ομόζυγη διαγραφή. Λαμβάνοντας υπόψη όλες τις μελέτες με πλήρη εξέταση του γονιδίου *DPY19L2*, οι μεταβολές του γονιδίου *DPY19L2* βρίσκονται στο 70,2% των 131 ασθενών

με σφαιροζωοσπερμία χωρίς σχέσεις συγγένειας, με την ομόζυγη εξάλειψη να διαπιστώνεται στο 52,3%. Συνολικά, η επαναλαμβανόμενη γονιδιωματική διαγραφή του γονιδίου *DPY19L2* αντιπροσωπεύει το 80,4% των παθολογικών αλληλόμορφων (148 από 184) (Εικ. 49) (Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C., 2017).



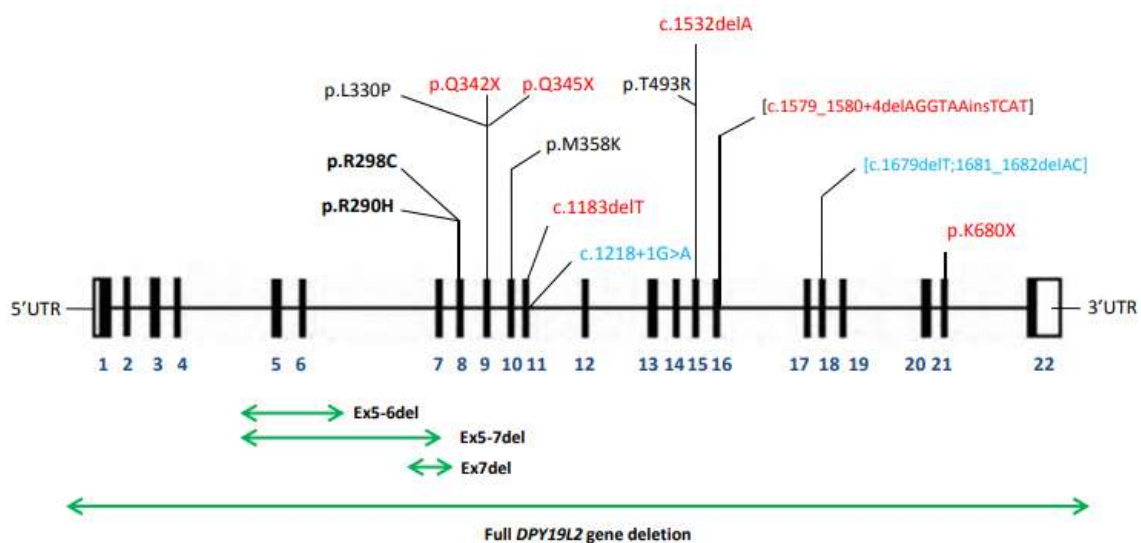
[Εικόνα 49] Συχνότητα μεταλλάξεων του *DPY19L2*. Διαγράμματα πίτας που δείχνουν τη συνολική συχνότητα των μεταλλάξεων γονιδίου *DPY19L2* μεταξύ 131 σφαιροζωοσπερμικών μη σχετιζόμενων ασθενών (αριστερή πλευρά) και η κατανομή μεταλλάξεων μεταξύ 184 μεταλλαγμένων αλληλομόρφων (δεξιά πλευρά) (Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C., 2017).

Το 2011, ο Kosciński et al. ταυτοποίησαν μια ομόλογη διαγραφή του γονιδίου *DPY19L2* (*dpy-19-like 2*) που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12q14.2 στους 4 σφαιροζωοσπερμικούς αδελφούς μιας οικογένειας από την Ιορδανία και σε τρεις επιπλέον μη σχετιζόμενους ασθενείς. Στη συνέχεια, μια σάρωση SNP πλήρους γονιδιώματος σε 20 ασθενείς που παρουσίαζαν ολική σφαιροζωοσπερμία επέτρεψε την αναγνώριση μιας ομόζυγης διαγραφής των 200 kb του γονιδίου *DPY19L2* σε 15 ασθενείς διαφορετικού εθνικού υποβάθρου. Έχουν αναφερθεί περισσότεροι ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία που σχετίζεται με ομόζυγη διαγραφή ολόκληρου του γονιδίου *DPY19L2*. Ο μηχανισμός που αποτελεί τη βάση αυτής της διαγραφής οφείλεται σε έναν μη αλληλόμορφο ομόλογο ανασυνδυασμό (NAHR) μεταξύ δύο επαναλήψεων χαμηλού αριθμού αντιγράφων που μοιράζονται 96,5% ομοιότητα και βρίσκονται δίπλα στον τόπο του γονιδίου *DPY19L2*.

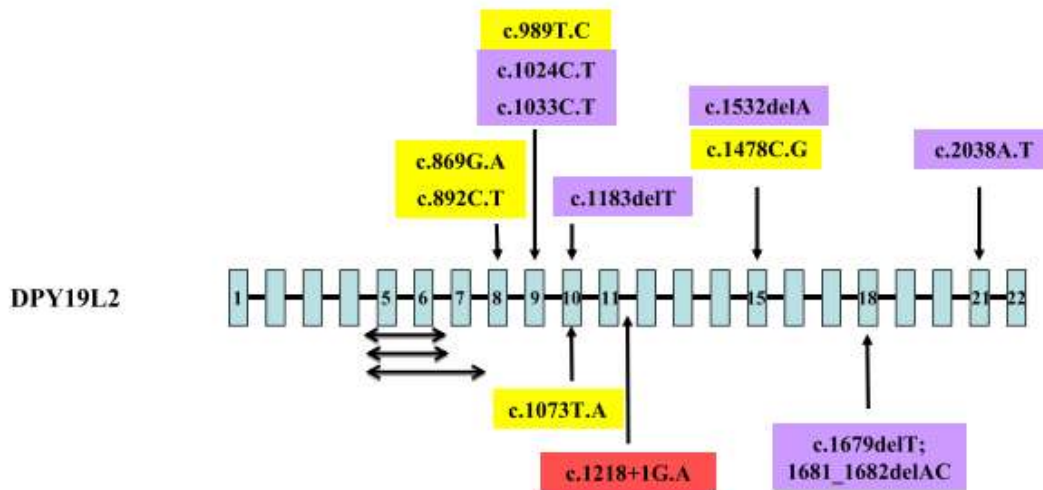
Ωστόσο, φαίνεται ότι και άλλες γενετικές ανωμαλίες στο γονίδιο *DPY19L2* μπορούν να είναι υπεύθυνες για τη σφαιροζωοσπερμία. Προς το παρόν, έχουν περιγραφεί τρεις ενδογενείς διαγραφές. Ένας ασθενής είχε εξάλειψη των εξονίων 5, 6 και 7 (Εικ. 50) γεγονός που προκάλεσε μια παρεκκλίνουσα συρραφή μεταξύ των εξονίων 4 και 8 που οδηγούσε σε μία πρωτεΐνη με διαγραφή 91 αμινοξέων. Δύο άλλοι ασθενείς είχαν εξάλειψη των εξονίων 5 και 6 (Εικ. 50) που προκάλεσε μια παρεκκλίνουσα συρραφή

μεταξύ των εξωνίων 4 και 7 που προκαλούσε μετατόπιση πλαισίου ανάγνωσης, εισάγοντας ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης μεταγραφής, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η θέση των σημειακών μεταλλάξεων σε αυτούς τους δύο ασθενείς ήταν διαφορετική.

Επίσης έχει αναλυθεί μια μετάλλαξη στην θέσης ματίσματος στο ιντρόνιο 11 (c.1218+1G>A) που ταυτοποιήθηκε σε έναν ασθενή. Έξι μεταλλάξεις *nonsense*, που βρίσκονται στα εξώνια 9 (p.Q342X και p.Q345X), 11 (c.1183delT), 15 (c.1532delA), 18 (c.1679delT;1682_1682delAC) και 21 (p.K680X) είχαν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή ενός πρόωρου κωδικονίου λήξης, δύο από αυτές τις μεταλλάξεις (c.1183delT και c.1532delA) ταυτοποιήθηκαν σε δύο μη σχετιζόμενους ασθενείς. Πέντε σημειακές *missense* μεταλλάξεις οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέος και βρίσκονται στα εξώνια 8 (p.R298C και p.R290H), 9 (p.L330P), 10 (p.M358K) και 15 (p.T493R) (Εικ. 50). Συνολικά, εντοπίστηκαν 13 μεταλλάξεις μεταξύ εξωνίων 8 και 21 (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015).



[Εικόνα 50] Απεικόνιση σε φάσμα των μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2*. Τα εξώνια υποδεικνύονται ως μαύρο κουτί, η μη μεταφρασμένη περιοχή ως διαυγές κουτί, τα ιντρόνια ως γραμμή, ο εντοπισμός των εντοπισμένων σημειακών μεταλλάξεων υποδεικνύεται με μία γραμμή και η έκταση των αναγνωρισμένων γονιδιωματικών διαγραφών υποδεικνύεται με μία πράσινη γραμμή με δύο βέλη στο τέλος. Οι αριθμοί κάτω από τα κουτιά απεικονίζουν τα εξώνια. Οι μεταλλάξεις *missense* υποδεικνύονται με μαύρο χρώμα, με τις δύο επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις p.R290H και p.R298C να είναι με έντονο μαύρο, οι μεταλλάξεις *nonsense* και μετατόπισης πλαισίου ανάγνωσης με κόκκινο χρώμα, οι μεταλλάξεις ματίσματος με μπλε και οι μικρές διαγραφές με πράσινο χρώμα (Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C., 2017).



[Εικόνα 51] Σχηματικό διάγραμμα του γονιδίου DPY19L2 και εντοπισμός των μεταλλάξεων που μέχρι τώρα εντοπίστηκαν. Τα διπλά βέλη αντιπροσωπεύουν ενδογενείς διαγραφές. Τα κίτρινα κουτιά αντιπροσωπεύουν μεταλλάξεις τύπου *missense*, τα μπλε κουτιά αντιπροσωπεύουν *nonsense* μεταλλάξεις, τα κόκκινα κουτιά υποδηλώνουν μεταλλάξεις θέσης ματίσματος (De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A., 2015)

Ταυτοποιήθηκαν σε αρκετούς μη σχετιζόμενους ασθενείς δύο επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις στο εξώνιο 8, οι p.Arg290His (p.R290H) και p.Arg298Cys (p.R298C). Η μετάλλαξη p.Arg290His αλλάζει μια εξαιρετικά συντηρημένη αργινίνη σε μια ιστιδίνη. Επιπλέον σε μια πρόσφατη μελέτη καταδεικνύεται ότι η πρωτεΐνη DPY-19, ορθόλογη πρωτεΐνη της DPY19L2 στο *Caenorhabditis elegans*, κωδικοποιεί μια C-μαννοζυλοτρανσφεράση η οποία είναι ικανή να γλυκοζυλιώνει αρκετές πρωτεΐνες στόχους χρησιμοποιώντας τη συνδεδεμένη με λιπίδια γλυκοζίτη δολιόλη-φωσφορική-μαννόζη (lipid-linked glycoside dolichol-phosphate-mannose - Dol-P-Man) ως υπόστρωμα δότης. Είναι ενδιαφέρον ότι το αμινοξύ που αντιστοιχεί στο Arg290 στο *C. elegans* εμπλέκεται στη δέσμευση του Dol-P. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η αργινίνη στη θέση 290 μπορεί να διαδραματίσει βασικό ρόλο στη λειτουργία της πρωτεΐνης DPY19L2. Σε γενικές γραμμές, το γεγονός ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις τύπου *missense* βρίσκονται μεταξύ των εξωνίων 8 και 11 υποδηλώνει ότι αυτή είναι η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης DPY19L2 που υποστηρίζει κάποιες κρίσιμες λειτουργίες της (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015).

Μετάλλαξη SPATA16 με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας

Λειτουργία της πρωτεΐνης SPATA16

Η πρωτεΐνη SPATA16 εντοπίζεται στο σύστημα Golgi και εμπλέκεται στη μεταφορά προ-ακροσωμικών κοκκίων στο ακρόσωμα σε στρογγυλά και επιμήκη σπερματοζωάρια

και ως εκ τούτου παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στο σχηματισμό του ακροσώματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Εικ. 52) (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018).

Στο σπέρμα υπάρχει μεγάλη ποσότητα ενζύμων στο ακρόσωμα. Αυτά τα ένζυμα είναι συνήθως θωρακισμένα πρωτού εναποτεθούν στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό. Μόλις φτάσουν στη γυναικεία αναπαραγωγική οδό, τα ακροσωματικά ένζυμα εκκρίνονται και είναι σε θέση να διασπάσουν την ακτινωτή κορώνα (corona radiata) και τη διαφανή ζώνη (zona pellucida) ενός ωοκυττάρου για να διευκολύνουν τη διείσδυση του σπέρματος στο ωάριο. Η συσκευή Golgi μπορεί να διαδραματίσει κρίσιμο ρόλο στο σχηματισμό των ακροσωμάτων. Σε πρώιμα στάδια της σπερματογένεσης (φάση Golgi και cap) η συσκευή Golgi εμπλέκεται ενεργά στο σχηματισμό του ακροσώματος, παράγοντας και μεταφέροντας τις πρωτεΐνες και τις μεμβράνες που απαιτούνται για τη διεύρυνση και τη διαφοροποίησή του. Η πρωτεΐνη SPATA16 μπορεί να εμπλέκεται στην ταξινόμηση και τροποποίηση των ακροσωματικών ενζύμων στη συσκευή Golgi (Xu M., Xiao J., Chen J., Li J., Yin L., Zhu H., Zhou Z., Sha J., 2003).

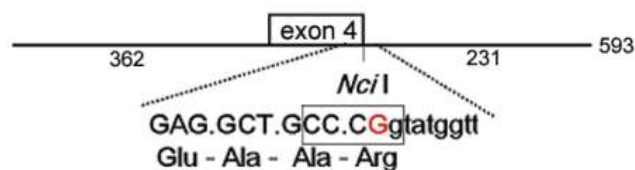
Το γονίδιο *SPATA16* αποτελείται από 11 εξόνια που κωδικοποιούν μια εξαιρετικά συντηρημένη πρωτεΐνη 65 kDa (569 αμινοξέων), η οποία περιέχει περιοχή επανάληψης τετρατρικοπεπτιδίου (tetratricopeptide repeat - TPR). Η υψηλή συντηρητικότητα είναι ακόμη υψηλότερη (92% και 98% στον ποντικό και στον χιμπαντζή, αντίστοιχα) για την περιοχή TPR, μια περιοχή αλληλεπίδρασης πρωτεΐνης-πρωτεΐνης που φαίνεται να είναι κρίσιμη για την λειτουργία της πρωτεΐνης.

Η περιοχή TPR είναι γνωστό ότι προκαλεί αλληλεπιδράσεις πρωτεΐνης-πρωτεΐνης και συναρμολόγηση πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων. Αποκαλύφθηκε ότι η περιοχή TPR υιοθετεί μια διάταξη έλικας-στροφής-έλικας, με την ικανότητα να συνδέεται με άλλες α-ελικοειδείς δομές. Μια πιθανή αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης μπορεί να είναι με την GOPC (Golgi-associated protein containing coiled-coil motif) που είναι μια πρωτεΐνη σχετιζόμενη με το σύστημα Golgi και περιέχει μοτίβα σπειροειδούς πηνίου α-έλικας, ή με την HIV1rev που είναι μια πρωτεΐνη σύνδεσης (HIV1rev binding protein gene-HRB) η οποία επίσης εντοπίζεται στο σύστημα Golgi. Και τα δύο αυτά γονίδια εμπλέκονται στην παθογένεση της σφαιροζωοσπερμίας σε μοντέλα ποντικών. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *SPATA16* περιέχει έξι θέσεις φωσφορυλίωσης της κινάσης καζεΐνης II και ότι η κινάση καζεΐνης IIa είναι η πιο άφθονη κινάση καζεΐνης στους όρχεις, για την οποία

το μοντέλο νοκ-άουτ δείχνει ακροσωμικά και άλλα μορφολογικά ελαττώματα. Τα ελαττώματα του γονιδίου *SPATA16* επηρεάζουν τη σπερματογένεση, ενώ η μείωση δεν διαταράσσεται (Dam AH., Koscinski I., Kremer JA., Moutou C., Jaeger AS., Oudakker AR., Tournaye H., Charlet N., Lagier-Tourenne C., van Bokhoven H., Viville S., 2007).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *SPATA16*

Μελετήθηκε μια συγγενής εβραϊκή οικογένεια Ashkenazi στην οποία αναγνωρίστηκε μια ομόζυγη μετάλλαξη (c.848G>A) στο γονίδιο *SPATA16* (πρωτεΐνη σχετιζόμενη με τη σπερμογένεση 16, προηγουμένως ονομαζόμενη NYD-SP12). Βρέθηκε μια ομόζυγη μετάλλαξη στο εξώνιο 4 (c.848G>A) που διαταράσσει την θέση αναγνώρισης NciI ή HpaII (Εικ. 52). Απο την έρευνα προέκυψε ότι οι τρεις υπογόνιμοι αδελφοί με σφαιροσπερμία είναι ομόζυγοι και ότι οι δύο γονείς τους και δύο υγιείς αδελφοί είναι ετερόζυγοι για τη μετάλλαξη. Ο τρίτος αδερφός φάνηκε να είναι ομόζυγος για την αλληλουχία άγριου τύπου. Η μετάλλαξη οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος που είναι εξαιρετικά συντηρημένο υπόλειμμα (p.R283Q) και βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της εξαιρετικά συντηρημένης περιοχής TPR. Επιπρόσθετα, η μετάλλαξη c.848G>A επηρεάζει το τελευταίο νουκλεοτίδιο του εξωνίου 4 και συνεπώς μπορεί να διαταράξει την 5' θέση ματίσματος του ιντρονίου 4 (Εικ. 52). Η μετάλλαξη c.848G>A οδηγεί σε ακατάλληλη συρραφή του εξωνίου 4 και κατά συνέπεια στην αποδιοργάνωση της περιοχής TPR. Η μετάλλαξη αυτή μεταδίδεται με έναν αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο (Dam AH., Koscinski I., Kremer JA., Moutou C., Jaeger AS., Oudakker AR., Tournaye H., Charlet N., Lagier-Tourenne C., van Bokhoven H., Viville S., 2007).



[Εικόνα 52] Η θέση αναγνώρισης NciI (5'-CCCGG-3') του γονιδίου *SPATA16* χάνεται εξαιτίας της μετάλλαξης GrA στο τελευταίο νουκλεοτίδιο του εξωνίου 4. (Η θέση αναγνώρισης HpaII δεν φαίνεται αλλά επικαλύπτεται σε 5'-CCCGG-3'). Αυτή η μετάλλαξη προβλέπει αντικατάσταση αμινοξέος R283Q, καθώς και αποκοπή της 5'- θέσης ματίσματος του ιντρονίου 4 (Dam AH., Koscinski I., Kremer JA., Moutou C., Jaeger AS., Oudakker AR., Tournaye H., Charlet N., Lagier-Tourenne C., van Bokhoven H., Viville S., 2007).

Καμία μετάλλαξη δε βρέθηκε σε 30 ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία που προέρχονταν από την Ευρώπη ή τη Βόρεια Αφρική υποδηλώνοντας ότι η *SPATA16* δεν είναι η κύρια

αιτία της σφαιροζωοσπερμίας, η οποία είναι πιθανώς γενετικά ετερογενής (Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF., 2015).

Σε πρόσφατη μελέτη αναγνωρίστηκε νέα μετάλλαξη του γονιδίου *SPATA16* με διαγραφή 22,6 Kb που περιλαμβάνει το εξώνιο 2. Η εξάλειψη του εξωνίου 2 εντοπίστηκε σε δύο άσχετους Τυνήσιους ασθενείς από τους 19 μη μεταλλαγμένους για το γονίδιο *DPY19L2*. Η απουσία του εξωνίου 2, το οποίο είναι το πρώτο εξώνιο κωδικοποίησης και περιέχει το κωδικόνιο έναρξης της μετάφρασης ATG, οδηγεί στην απώλεια παραγωγής της πρωτεΐνης ή στην παραγωγή μίας περικομμένης πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, μια ενδεχόμενη σύνδεση μεταξύ του εξωνίου 1 και 3 οδηγεί στην παραγωγή ενός mRNA που περιέχει τρία ATG κωδικόνια στο εξώνιο 3. Κανένα από τα κωδικόνια αυτά δεν είναι πιθανόν να χρησιμοποιηθεί για μετάφραση (παραγωγή πρωτεΐνης από mRNA) επειδή δεν παρουσιάζουν αλληλουχία Kozac (που περικλείει το κωδικόνιο ATG και είναι απαραίτητη για την εκκίνηση της μετάφρασης). Επιπλέον, το πρώτο και το τρίτο κωδικόνιο ATG δεν βρίσκονται στο πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης *SPATA16* δηλαδή αν χρησιμοποιηθούν θα αλλάξει το πλαίσιο ανάγνωσης όλων των αμινοξέων της πρωτεΐνης *SPATA16*. Σε μια τέτοια περίπτωση, είναι πιθανό το mRNA του μεταλλαγμένου γονιδίου *SPATA16* με διαγραμμένο το εξώνιο 2 να αποσυντίθεται χωρίς να μεταφράζεται. Το δεύτερο ATG βρίσκεται εντός του πλαισίου ανάγνωσης της *SPATA16* και εάν χρησιμοποιηθεί, θα παράγει μια περικομμένη πρωτεΐνη της οποίας λείπουν 36 από τα 116 αμινοξέα στην εξαιρετικά συντηρημένη περιοχή TPP (το οποίο αντιπροσωπεύει το 31% της περιοχής) και έτσι παράγεται πιθανώς μη λειτουργική πρωτεΐνη (ElInati E., Fossard C., Okutman O., Ghédir H., Ibala-Romdhane S., Ray PF., Saad A., Hennebicq S., Viville S., 2016).

Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* είναι πιο σπάνιες σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2*, καθώς εντοπίστηκαν μόνο σε δύο οικογένειες (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018).

Μετάλλαξη *PICK1* με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας

Λειτουργία της πρωτεΐνης *PICK1*

Το ανθρώπινο γονίδιο *PICK1* (protein interacting with C kinase 1) περιέχει 13 εξώνια που κωδικοποιούν μια πρωτεΐνη 415 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη *PICK1* είναι μια κυτοσολική πρωτεΐνη που αλληλεπιδρά με πολλές πρωτεΐνες μεμβράνης μέσω της

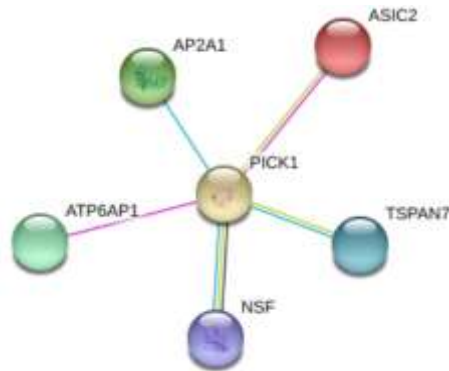
περιοχής PDZ. Η δέσμευση των λιπιδίων στην περιοχή BAR της PICK1 ρυθμίζεται θετικά από την PDZ και αρνητικά από το C-τελικό άκρο της ίδιας πρωτεΐνης PICK1 (Εικ. 53) (Liu G., Shi QW., Lu GX., 2010). Η πρωτεΐνη PICK1 εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό σε στρογγυλά σπερματοζώαρια. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη (PICK1) εντοπίζεται στα προακροσωμικά κυστίδια προερχόμενα από το σύστημα Golgi (Εικ. 48) και ο φαινοτύπος της σφαιροζωοσπερμίας των ποντικών *Pick1-knockout* είναι πιθανώς συνέπεια της μη φυσιολογικής διακίνησης των προακροσωματικών κυστιδίων που οδηγεί σε ανώμαλο σχηματισμό των ακροσωμάτων. Φαίνεται ότι η πρωτεΐνη PICK1 εμπλέκεται στη διακίνηση των κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακρόσωμα και συνεργάζεται με άλλες πρωτεΐνες όπως GOPC και CK2a' σε βιογένεση ακροσώματος. Το γεγονός ότι το γονίδιο *PICK1* δεν υπάρχει σε ώριμα ακροσώματα υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη PICK1 απομακρύνεται από προακροσωματικά κυστίδια σε κάποιο στάδιο για να ανακυκλωθεί στους επόμενους κύκλους διακίνησης κυστιδίων.



[Εικόνα 53] Σχηματική αναπαράσταση της δομής του γονιδίου PICK1 (He J., Xia M., Tsang WH., Chow KL., Xia J., 2015)

Η πρωτεΐνη PICK1 είναι απίθανο να εμπλέκεται άμεσα στη σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων. Οι 2 κύριες περιοχές του γονιδίου *PICK1*, η περιοχή PDZ και η περιοχή BAR, δεν εμπλέκονται στη σύντηξη των μεμβρανών των κυστιδίων. Στην πραγματικότητα, η περιοχή BAR πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην εκβλάστηση των προακροσωμικών κυστιδίων με την ενεργή κάμψη των λιπιδικών μεμβρανών. Αυτό υποδηλώνει ότι η πρωτεΐνη PICK1 μπορεί να εμπλέκεται στην εκβλάστηση των προακροσωμικών κυστιδίων από το σύστημα Golgi. Η αποτυχία της εκβλάστησης προακροσωματικών κυστιδίων μπορεί να μεταφέρει τις πρωτεΐνες ακροσωματικής μήτρας σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, και αυτό μπορεί με τη σειρά του να οδηγήσει στον κατακερματισμό των ακροσωμάτων. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι η έλλειψη PICK1 μπορεί έμμεσα να οδηγήσει σε ανεπάρκεια σύντηξης προακροσωμικών κυστιδίων. Η σύντηξη κυστιδίων απαιτεί τη σωστή συναρμολόγηση της μηχανής σύντηξης τόσο στα κυστίδια όσο και στις μεμβράνες στόχους. Η περιοχή PDZ της πρωτεΐνης PICK1 είναι γνωστό ότι δεσμεύεται με μεμβρανικές πρωτεΐνες για τη ρύθμιση της μετακίνησής τους. Η έλλειψη της πρωτεΐνης PICK1 μπορεί να οδηγεί σε εσφαλμένη ταξινόμηση των

μεμβρανικών πρωτεϊνών σε προακροσωμικά κυστίδια. Μερικές από αυτές τις μεμβρανικές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελούν μέρος της μηχανής σύντηξης. Η έλλειψη των συγκεκριμένων συστατικών σύντηξης οδηγεί τελικά σε μια μη φυσιολογική σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων και σε κατακερματισμένα ακροσώματα (Xiao N., Kam C., Shen C., Jin W., Wang J., Lee KM., Jiang L., Xia J., 2009).



[Εικόνα 54] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της PICK1 (Gene Cards_g, 2018).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *PICK1*

Σε μια κινέζικη οικογένεια βρέθηκε ομόζυγη *missense* μετάλλαξη (G198A) στο εξώνιο 13 του γονιδίου *PICK1*. Η μετάλλαξη αυτή έφερε ομόζυγη αντικατάσταση G→A στο νουκλεοτίδιο 1567 που οδηγεί σε αντικατάσταση ενός αμινοξέος στο C-τελικό άκρο της συντηθέμενης πρωτεΐνης. Το τροποποιημένο αμινοξύ G393R στο C-τελικό άκρο μπορεί να επηρεάζει την αρνητική ρύθμιση της περιοχής BAR (που επιτελείται από αυτό το C-τελικό άκρο) επηρεάζοντας έτσι το σχηματισμό του ακροσώματος εξαιτίας της διατάραξης της δέσμευσης των λιπιδίων σε BAR περιοχή. Ο φορέας της ομόζυγης μετάλλαξης εμφάνισε πλήρη έλλειψη του ακροσώματος. Βρέθηκε επίσης μια ετερόζυγη μετάλλαξη στην ίδια θέση στους γονείς του φορέα, στην αδελφή και στην ανιψιά του. Τα ευρήματα της μελέτης έδειξαν ότι η μετάλλαξη αυτή μεταδίδεται με αυτοσωμικό υπολειπόμενο τρόπο κληρονομικότητας. Η συγκεκριμένη μελέτη είναι η πρώτη που αναγνωρίζει μια μετάλλαξη στο *PICK1* που είναι υπεύθυνη για τη σφαιροζωοσπερμία στους ανθρώπους (Liu G., Shi QW., Lu GX., 2010).

Πρόσφατα, ο Xiao et al. (2009) ανέφεραν ότι αρσενικά ποντίκια με έλλειψη *PICK1* ήταν άγονα και είχαν φαινότυπο που μοιάζει με την ανθρώπινη σφαιροζωοσπερμία. Το κύριο ελάττωμα στους όρχεις των *Pick1-knockout* ποντικών ήταν ο κατακερματισμός των ακροσωμάτων στα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης. Αυτός ο κατακερματισμός ακολουθήθηκε από ελαττώματα στην πυρηνική επιμήκυνση και στο σχηματισμό

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

μιτοχονδρίων θήκης, γεγονός που οδήγησε σε σπέρμα σφαιρικής κεφαλής, μειωμένο αριθμό σπερματοζωαρίων και σοβαρή εξασθένιση της κινητικότητας του σπέρματος.

Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις τερατοσπερμίας

[Πίνακας 10] Μεταλλάξεις που σχετίζονται με τερατοσπερμία

Φαινότυπος	Γονίδιο	Λειτουργία	Έκφραση-Δράση	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Τύπος Μετάλλαξης
Μακροζωοσπερμία	<i>AURKC</i>	Συστατικό χρωμοσωμικού επιβατικού συμπλέγματος (CPC)	Στάδιο μείωσης I - σπερματοκύτταρα	Εσφαλμένο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων, μεταφασικές μεταθέσεις, μειωτική διακοπή, ανεπάρκεια κυτοκίνησης και μορφολογικά ελαττώματα της ατράκτου, σύνθεση ανευπλοειδή σπερματοζωαρίων	Ομόζυγη (c.144delC), (c.686G>), (c.744C> A), (c.930+38G> A), (c.436-2A>G)
	<i>DPY19L2</i>	Δομική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης σπερματοζωαρίου απαραίτητη για αγκυροβόληση του ακροσώματος	Σπερματίδες	Αποσταθεροποίηση των πυρηνικών πλακών που αντικρίζουν το ακρόσωμα, απομάκρυνση ακροσώματος	Ομόζυγη διαγραφή <i>DPY19L2</i> , Ομόζυγη διαγραφή εξονίων 5-6, 5-7, 7 και Ομόζυγες (c.1218+1G>A), (p.Q342X) (p.Q345X), (c.1183delT), (c.1532delA), (c.1679delT;1682_1682delAC), (p.K680X), (p.R298C), (p.R290H), (p.L330P), (p.M358K), (p.T493R)
Σφαιροζωοσπερμία	<i>SPATA16</i>	Εντοπίζεται στο σύστημα Golgi και στα προ-ακροσωματικά κυστίδια, ουσιαστική στο σχηματισμό ακροσώματος.	Στρογγυλές και επίμηκες σπερματίδες	Δεν σχηματίζεται ακρόσωμα	Ομόζυγη (c.848G>A), Μετάλλαξη διαγραφής 22,6 Kb εξονίου 2
	<i>PICK1</i>	Εμπλέκεται στη διακίνηση κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακρόσωμα.	Στρογγυλές σπερματίδες	Αποτυχία εκβλάστησης προακροσωμικών κυστιδίων είτε μη φυσιολογική σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων που οδηγεί σε κατακερματισμένα ακροσώματα	Ομόζυγη (G198A)

Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *AUKC* προκαλούν απώλεια λειτουργίας της κινάσης και συνεπώς δεν πραγματοποιείται σωστός χρωμοσωμικός διαχωρισμός και τα ομόλογα χρωμοσώματα παραμένουν κοντά μεταξύ τους εντός του πυρήνα των σπερματοζωαρίων. Επομένως τα περισσότερα σπερματοζωάρια είναι τετραπλοειδικά, υποδεικνύοντας πλήρη αποτυχία κυτοκίνησης, γεγονός που εξηγεί το φαινότυπο με μεγάλο μέγεθος των γαμετών. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι δεν υπάρχει καμία ελπίδα για αυτόλογη γονιμοποίηση για άνδρες με έλλειψη του γονιδίου *AURKC*, οι οποίοι μπορούν να απευθύνονται μόνο σε δωρεά γαμετών ή υιοθεσία και θα πρέπει να αποφεύγονται αναποτελεσματικοί κύκλοι ICSI. Επομένως, είναι σημαντικό να πραγματοποιείται μοριακή διάγνωση για όλους τους μακροζωοσπερικούς ασθενείς.

Εκτιμάται ότι 1/50 έως 1/250 άτομα στο γενικό πληθυσμό είναι ετερόζυγες φορείς μεταλλάξεων του γονιδίου *AURKC* ανάλογα με το σχετικό γεωγραφικό πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC* αποτελούν το πιο συχνό αίτιο της ανδρικής υπογονιμότητας, πριν από το σύνδρομο Klinefelter και τις Y-μικροελλείψεις, στους Αλγερινούς άνδρες και στους άνδρες της Βόρειας Αφρικής. Ιδιαίτερα σημαντικό κρίνεται τα άτομα της Βορείου Αθρικής με φαινότυπο μακροζωοσπερμίας να ελέγχονται για τις μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC*, ώστε να καθορίζεται αν είναι απόλυτα στείροι. Η μετάλλαξη p.Y248 * φαίνεται να είναι η κύρια μετάλλαξη που εντοπίζεται σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης. Η πιο συχνά εμφανιζόμενη μετάλλαξη στον πληθυσμό των μακροζωοσπερμικών ασθενών είναι η μετάλλαξη c.144delC που αντιπροσωπεύει περίπου το 87,7% των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων στο σύνολο των μακροζωοσπερμικών ασθενών. Ο δεύτερος συχνότερος τύπος μετάλλαξης είναι η *nonsense* μετάλλαξη p.Y248 * που αντιπροσωπεύει περίπου το 10,5% των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Οι σπανιότερες μεταλλάξεις είναι η μετάλλαξη *missense* στο εξώνιο 6 (p.C229Y), η μετάλλαξη στη θέση ματίσματος του εξωνίου 5 c436-2A> G και η μετάλλαξη c.930 + 38G> A στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *AURKC*. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι σήμερα οι συχνότερες μεταλλάξεις που προκαλούν μακροζωοσπερμία.

Σπουδαία προοπτική για μελλοντική έρευνα θα μπορούσε να αποτελέσει η ενασχόληση με την μετάλλαξη p.Y248 * που εντοπίζεται κυρίως στον ευρωπαϊκό πληθυσμό. Θα παρουσίαζε δε μεγάλο ενδιαφέρον να μελετηθεί η συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης μετάλλαξης στον ελληνικό πληθυσμό σε σύγκριση με την πιο διαδεδομένη μετάλλαξη c.144delC. Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να στοχεύει στον

καθορισμό της επικράτησης των συγκεκριμένων μεταλλάξεων στον ελληνικό πληθυσμό, ώστε να μπορεί μελλοντικά να γίνει η χρήση της επικρατούς μετάλλαξης ως μοριακού δείκτη για τον καθορισμό των ατόμων με μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC* από το σύνολο των ασθενών με μακροζωοσπερμία. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορεί να προσδιορίζεται αν ένα άτομο είναι απόλυτα στείρο και να αποφεύγονται αναποτελεσματικοί κύκλοι ICSI. Επίσης μπορεί τα άτομα με μακροζωοσπερμία του ελληνικού πληθυσμού να φέρουν κάποια δική τους ξεχωριστή μετάλλαξη όποτε θα ήταν ενδιαφέρον αν ανακαλυπτόταν κάποιος πολυμορφισμός. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ωστόσο ότι αυτές οι μελέτες παρουσιάζουν αυξημένο βαθμό δυσκολίας λόγω της σπανιότητας της διαταραχής, καθώς η μακροζωοσπερμία παρατηρείται σε λιγότερο από το 1% των υπογόνιμων ανδρών.

Η πρωτεΐνη *DPY19L2* είναι δομική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και είναι απαραίτητη για την αγκυροβόληση του ακροσώματος στον πυρήνα. Κατά την απουσία του γονιδίου *Dpy19l2* το σχηματιζόμενο ακρόσωμα διαχωρίζεται σιγά σιγά από τον πυρήνα και στη συνέχεια απομακρύνεται από το σπέρμα με το κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να έχουμε εμφανή φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *DPY19L2* είναι το πιο συχνό αίτιο που προκαλεί φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας με συχνότητα 70,2%. Έχουν περιγραφεί πολλοί τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2*, όμως η ομόζυγη διαγραφή ολόκληρου του γονιδίου *DPY19L2* είναι η πιο συχνή μεταξύ των μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2* σε ποσοστό 52,3%. Οι ομόζυγες σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *DPY19L2* εμφανίζονται με συχνότητα 9,9%. Συνολικά, εντοπίστηκαν 13 σημειακές μεταλλάξεις τύπου *missense*, *nonsense* και θέσης ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 8 και 21. Σε γενικές γραμμές, το γεγονός ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις τύπου *missense* βρίσκονται μεταξύ του εξωνίου 8 και 11 υποδηλώνει ότι αυτή είναι η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης *DPY19L2* που υποστηρίζει κάποιες κρίσιμες λειτουργίες της και συνεπώς με τις μεταλλάξεις χάνεται η συγκεκριμένη λειτουργία. Επομένως το γεγονός ότι παρατηρούνται πολλές μεταλλάξεις που συσσωρεύονται στο γονίδιο *DPY19L2* και η υψηλή συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων αυτών στο σύνολο των σφαιροζωοσπερμικών ασθενών, υποδηλώνει ότι το γονίδιο *DPY19L2* είναι πολύ σημαντικό για περαιτέρω διερεύνηση. Λόγω αυτής της ιδιαίτερης σημασίας του γονιδίου *DPY19L2* θα ήταν πολύ ενδιαφέρον να σχεδιαστεί μια μελέτη που θα καθορίσει τους πολυμορφισμούς που εντοπίζονται στον ελληνικό πληθυσμό.

Η πρωτεΐνη SPATA16 εντοπίζεται στο σύστημα Golgi και εμπλέκεται στη μεταφορά προ-ακροσωμικών κοκκίων στο ακρόσωμα σε στρογγυλά και επιμήκη σπερματοζωάρια και ως εκ τούτου παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στο σχηματισμό του ακροσώματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* προκαλούν φαινότυπο σφαιροσπερμίας. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* είναι πιο σπάνιες σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2*, καθώς εντοπίστηκαν μόνο σε δύο οικογένειες.

Τέλος η πρωτεΐνη PICK1 εμπλέκεται στη διακίνηση των κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακρόσωμα. Η πρωτεΐνη PICK1 μπορεί να εμπλέκεται στην εκβλάστηση των προακροσωμικών κυστιδίων από το σύστημα Golgi. Η αποτυχία της εκβλάστησης προακροσωματικών κυστιδίων μπορεί να μεταφέρει τις πρωτεΐνες ακροσωματικής μήτρας σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, και αυτό μπορεί με τη σειρά του να οδηγήσει στον κατακερματισμό των ακροσωμάτων. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι η έλλειψη πρωτεΐνης PICK1 μπορεί έμμεσα να οδηγήσει σε ανεπάρκεια σύντηξης προακροσωμικών κυστιδίων. Η πρωτεΐνη PICK1 δεσμεύεται με μεμβρανικές πρωτεΐνες και ρυθμίζει τη μετακίνηση τους. Η έλλειψη της πρωτεΐνης PICK1 μπορεί να οδηγεί σε εσφαλμένη ταξινόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε προακροσωμικά κυστίδια. Μερικές από αυτές τις μεμβρανικές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελούν μέρος της μηχανής σύντηξης. Η έλλειψη των συγκεκριμένων συστατικών σύντηξης οδηγεί τελικά σε μια μη φυσιολογική σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων και σε κατακερματισμένα ακροσώματα. Έχει περιγραφεί μια ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο *PICK1* που προκαλεί φαινότυπο σφαιροσπερμίας, όμως υπάρχει μόνο αυτή η αναφορά στη μετάλλαξη, όποτε είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση.

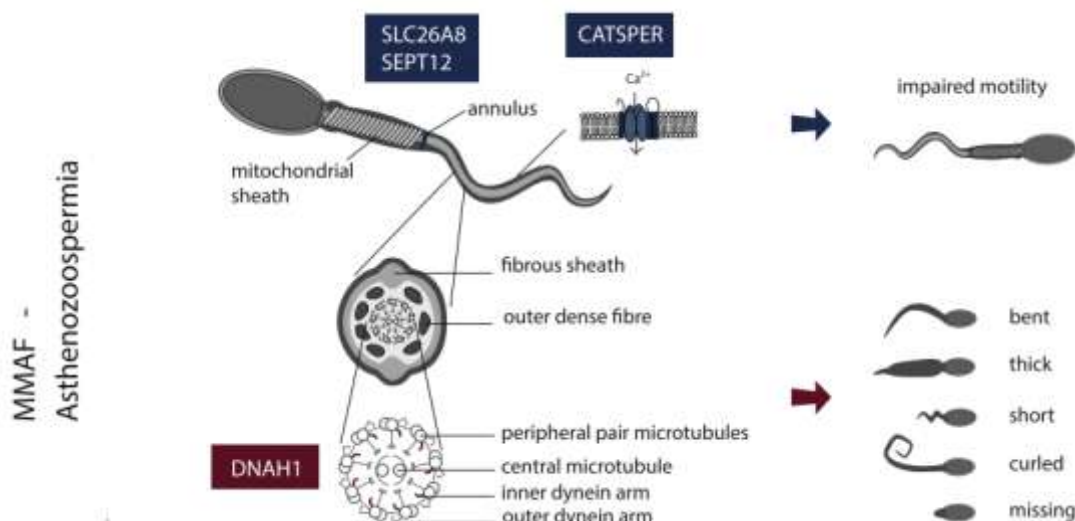
Συνεπώς οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* και *PICK1* είναι πιο σπάνιες σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2*, οπότε και λιγότερο σημαντικές για έρευνα.

Μεταλλάξεις που σχετίζονται με την ασθενοζωοσπερμία

Ασθενοζωοσπερμία

Τα κριτήρια της WHO οριοθετούν το φυσιολογικό ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων να είναι στο 40%. Ένα χαμηλότερο ποσοστό κινητών σπερματοζωαρίων αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως ασθενοζωοσπερμία (WHO, 2010). Η

ασθενοζωοσπερμία αντιπροσωπεύει μια κοινή αιτία της ανδρικής υπογονιμότητας και παρατηρείται σε ποσοστό έως και 81% όλων των ανώμαλων αναλύσεων σπέρματος, που συχνά συνδυάζονται με oligo- ή/και τερατοζωοσπερμία. Μόνο το 18% των περιπτώσεων είναι απομονωμένα ασθενοζωοσπερμικά (ακίνητα σπερματοζωάρια με φυσιολογική μορφολογία και αριθμό). Πιθανές αιτίες μειωμένης κινητικότητας του σπέρματος περιλαμβάνουν την παρατεταμένη διάρκεια σεξουαλικής αποχής, τον ανθυγιεινό τρόπο ζωής, την κίρσοκήλη ή/και τη λοίμωξη. Ωστόσο, η κυρίως αιτιολογία της ασθενοζωοσπερμίας παραμένει άγνωστη και μπορεί να οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018). Παρακάτω θα αναλυθούν οι μεταλλάξεις που αποδείχθηκε ότι σχετίζονται με φαινότυπο της ασθενοζωοσπερμίας (Εικ. 55).



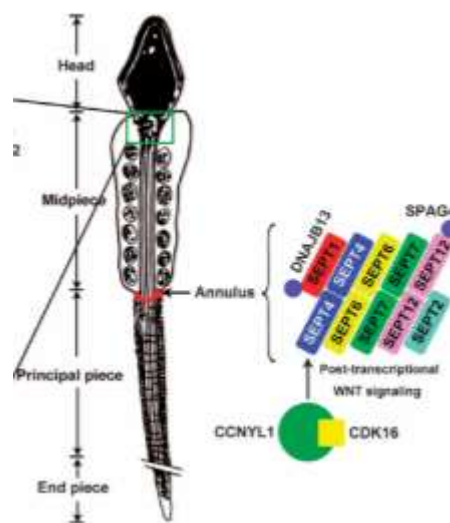
[Εικόνα 55] Αναπαράσταση των γονιδίων που συνδέονται με ασθενοζωοσπερμία = σπέρμα με μειωμένη κινητικότητα που μπορεί να είχε φαινότυπο MMAF = πολλαπλές μορφολογικές ανωμαλίες του μαστιγίου, δηλαδή σπερματοζωάρια με απόντα, βραχύ, λυγισμένα και περιτυλιγμένα μαστίγια και μαστίγια με ακανόνιστο πλάτος (Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S., 2018)

Μεταλλάξεις *SEPT12* με φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας

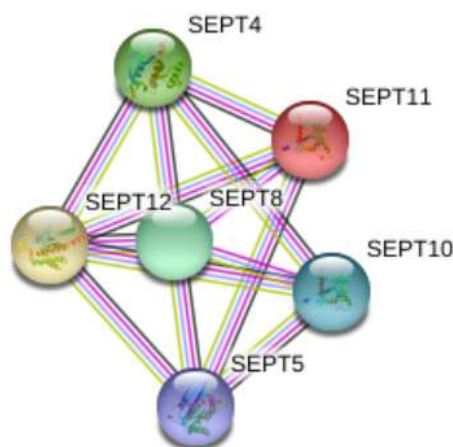
Λειτουργία της πρωτεΐνης *SEPT12*

Οι σεπτίνες (Septins) ανήκουν σε μια οικογένεια πρωτεϊνών πολυμερισμού GTPάσων (GTPase). Οι Septins 1, 4, 6, 7 και 12 εμφανίζονται να είναι συστατικά του δακτυλίου (annulus είναι μια δομή δακτυλίου που οριοθετεί το μεσαίο τμήμα και το κύριο κομμάτι της ουράς του σπέρματος) (Εικ. 56) των σπερματοζωαρίων. Έχει αποδειχθεί η σταθεροποίηση του συμπλέγματος των σεπτινών στο δακτύλιο είναι απαραίτητη για τη μορφολογική διαφοροποίηση της ουράς του σπέρματος. Η Septin12 είναι κρίσιμη για τη

σπερμογένεση. Το γονίδιο *SEPT12* κωδικοποιεί ένα εξαιρετικά συντηρημένο κεντρικό πεδίο σύνδεσης GTP / υδρόλάσης το οποίο είναι πολύ κρίσιμο για την λειτουργία της GTPase, καθώς και τον ολιγομερισμό μεταξύ των σεπτινών και το σχηματισμό νηματίων σεπτίνης στο δακτύλιο του σπερματοζωαρίου. Τα *Sept12*^{-/-} χιμαιρικά αρσενικά ποντίκια παρατηρήθηκε ότι είναι στείρα. Η στειρότητα των *Sept12*^{-/-} ποντικών οφειλόταν σε διακοπή της ωρίμανσης των γαμετικών κυττάρων στο στάδιο της σπερματίδας και αυξημένη απόπτωση των γαμετικών κυττάρων. Επιπλέον, τα λίγα σπερματοζωάρια που ολοκλήρωναν τη σπερματογένεση εμφάνιζαν λυγισμένες ουρές με αποδιοργανωμένα μιτοχόνδρια και μη φυσιολογικά ακροσώματα.



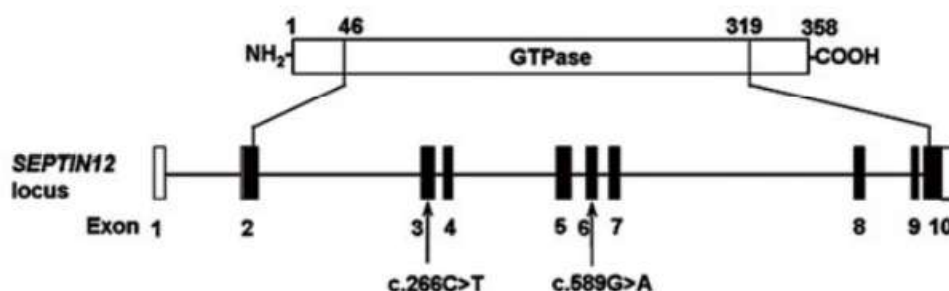
[Εικόνα 56] Σχηματικό διάγραμμα του δακτυλίου (annulus) με βάση τη σεπτίνη. Ο δακτύλιος (κόκκινη δομή) συνδέει το μεσαίο τμήμα και το κύριο κομμάτι του μαστιγίου σπέρματος. Ο δακτύλιος είναι ένα σύμπλεγμα από σεπτίνες (SEPT) 1, 2, 4, 6, 7 και 12 (Chen SR., Batool A., Wang YQ., Hao XX., Chang CS., Cheng CY., Liu YX., 2016).



[Εικόνα 57] Ο χάρτης αλληλεπιδράσεων της SEPT12 (Gene Cards_h, 2018).

Μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12*

Μελετήθηκαν 160 υπογόνιμοι άντρες και ανιχνεύθηκαν 2 νέες ετερόζυγες μεταλλάξεις στο γονίδιο *SEPT12* στο εξώνιο 3 (c.266C> T) και στο εξώνιο 6 (c.589G> A) σε 2 μη σχετιζόμενους μεταξύ τους ασθενείς. Και οι δύο μεταλλάξεις εντοπίζονταν στην περιοχή GTPase που μπορεί να μεταβάλει τη δομή της πρωτεΐνης. Οι μεταλλάξεις αυτές οδηγούν σε αντικατάσταση της θρεονίνης με μεθειονίνη (T89M) και του ασπαρτικού οξέος με ασπαραγίνη (D197N), αντίστοιχα (Εικ. 58). Οι αναλύσεις σπέρματος έδειξαν ότι ο άνδρας που έφερε την T89M μετάλλαξη είχε ασθενοτερατοοζοσπερμία, ενώ ο ασθενής που έφερε την D197N μετάλλαξη είχε ολιγοασθενοζωοσπερμία. Η λειτουργική περιοχή GTPase της πρωτεΐνης SEPT12 αποτελείται από τα ακόλουθα έξι συντηρημένα μοτίβα: P-loop, διακόπτης I (switch I), διακόπτης II (switch II), θέση αναγνώρισης της γουανίνης, trans loop I και trans loop II. Οι μεταλλάξεις T89M και D197N βρίσκονται στο μοτίβο του διακόπτη I και στη θέση αναγνώρισης της γουανίνης, αντίστοιχα. Τόσο η θρεονίνη όσο και το ασπαρτικό οξύ είναι εξαιρετικά συντηρημένα αμινοξέα. Η μετάλλαξη p.Thr89Met μείωσε σημαντικά την υδρολυτική δραστηριότητα της GTPase και η μετάλλαξη p.Asp197Asn παρεμποδίζει την δέσμευση του GTP στην πρωτεΐνη. Η ενσωμάτωση του GTP και του GDP σε σεπτίνες είναι κρίσιμη για τη συναρμολόγηση των νημάτων της σεπτίνης. Η παθολογία του σπέρματος ασθενούς με μετάλλαξη D197N οδηγούσε σε σχηματισμό ελλατωματικού δακτυλίου με καμπυλωτή ουρά. Συνεπώς οι μεταλλάξεις αυτού του είδους αποτελούν μεταλλάξεις απώλειας-λειτουργίας της πρωτεΐνης SEPT12 που οδηγούν σε διαταραχή του σχηματισμού των νηματίων σεπτίνης στο δακτύλιο των σπερματοζωαρίων.



[Εικόνα 58] Οι σχηματική αναπαράσταση της πρωτεΐνης SEPT12 (πάνω) και του γονιδίου SEPT12 (κάτω), παρουσιάζονται δύο μεταλλάξεις (c.266C> T και c.589G> A που βρίσκονται στο εξώνιο 3 και το εξώνιο 6, αντίστοιχα) . Τα εξώνια είναι αριθμημένα και οι περιοχές κωδικοποίησης υποδεικνύονται με μαύρα κουτιά (Kuo YC., Lin YH., Chen HI., Wang YY., Chiou YW., Lin HH., Pan HA., Wu CM., Su SM., Hsu CC., Kuo PL., 2012).

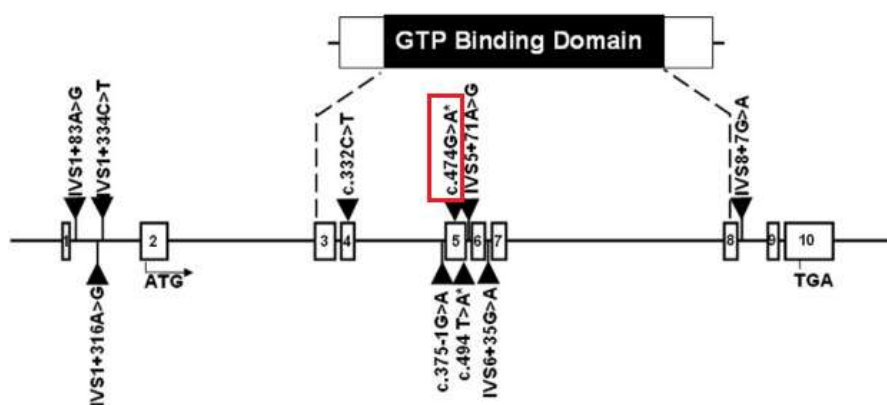
Φαίνεται ότι το γονίδιο *SEPT12* άγριου τύπου (WT) δεσμεύει το GDP μέσω του συντηρημένου αμινοξέος Thr89 στο μοτίβο διακόπτη I, το οποίο δρα ως GTP υδρολάση. Οι σεπτίνες σχηματίζουν ομο- και ετεροολιγομερή με άλλες σεπτίνες διασυνδεδεμένα μεταξύ των περιοχών GTPase και των N-, C-τελικών άκρων. Όμως οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *SEPT12* μπορεί να μην σχηματίζουν λειτουργική περιοχή GTPase απαραίτητη για τη διασύνδεση με άλλες σεπτίνες, με αποτέλεσμα την αποτυχία της ολιγομερούς συναρμολόγησης και του σχηματισμού νημάτων. Αξίζει στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι και οι δύο μεταλλαγμένες πρωτεΐνες χειροτέρευαν τον σχηματισμό των νηματίων της πρωτεΐνης *SEPT12* άγριου τύπου κατά τρόπο δόσοεξαρτώμενο, ενεργώντας ως επικρατείς αρνητικές πρωτεΐνες.

Τα σπερματοζωάρια με ελλατωματικό δακτύλιο είναι επιρρεπή σε κάμψη ενώ κινούνται. Το ελάττωμα της λυγισμένης ουράς βρέθηκε στο 17,36% των σπερματοζωαρίων του ασθενή με μετάλλαξη D197N, σημαντικά υψηλότερο από αυτό που παρατηρήθηκε στους γόνιμους μάρτυρες.

Όπως έχει αποδειχθεί από προηγούμενες έρευνες η πρωτεΐνη *SEPT12* αποτελεί ένα από τα συστατικά του συμπλέγματος της σεπτίνης στο δακτύλιο του σπερματοζωαρίου. Θεωρείται πιθανό ότι η *SEPT12* αλληλεπιδρά με το σύμπλεγμα *SEPT1/4/6/7* για να σχηματίσει το δακτύλιο. Δεδομένου ότι οι ετερόζυγες μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12* είναι επαρκείς για να προκαλέσουν παθολογικό φαινότυπο, η *SEPT12* μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό του συμπλέγματος της σεπτίνης στο δακτύλιο του ανθρώπινου σπέρματος. Πράγματι, παρατηρήθηκε ελαττωματικός δακτύλιος στον ασθενή D197N. Βρέθηκε επίσης ότι το μετάγραφο *SEPT12* ήταν εξίσου άφθονο για τους ασθενείς D197N και τα άτομα ελέγχου, υποδηλώνοντας ότι το μεταλλαγμένο γονίδιο μπορεί να παράγει μια καλή ποσότητα μεταγράφων και πρωτεΐνης. Θεωρούμε ότι οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *SEPT12* διαταράσσουν το σύμπλεγμα της σεπτίνης μέσω κυρίαρχης αρνητικής επίδρασης, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση της *SEPT12* (και των άλλων συστατικών της σεπτίνης) από το δακτύλιο του σπέρματος (Kuo YC., Lin YH., Chen HI., Wang YY., Chiou YW., Lin HH., Pan HA., Wu CM., Su SM., Hsu CC., Kuo PL., 2012).

Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε υπογόνιμους άντρες με μη φυσιολογικές παραμέτρους σπέρματος προσδιορίστηκαν δέκα SNPs, τα οποία είναι IVS1+83A>G, IVS1+316A>G, IVS1+334C>T, c.332C>T, c.375-1G>A, c.474G>A, c.494T>A*,

IVS5+71A>G, IVS6+35G>A και IVS8+7G>A. Ο c.474G>A, είναι πιο διαδεδομένος στους υπογόνιμους άντρες από τα άτομα ελέγχου. Ο συγκεκριμένος SNP, c.474G>A, ο οποίος εντοπίζεται στο εξώνιο 5 εντός της περιοχής δέσμευσης GTP, μπορεί να δημιουργήσει μια εναλλακτική θέση ματίσματος με την ενεργοποίηση ενός κρυπτικού σημείου ματίσματος. Το γεγονός αυτό είχε σαν αποτέλεσμα την παράλειψη τμήματος του εξωνίου 5 (απώλεια 41 bp) και την μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης με ένα πρόωρο κωδικόνιο τερματισμού να εμφανίζεται στο εξώνιο 6. Το νέο μετάγραφο κωδικοποιεί μια περικεκομμένη πρωτεΐνη που στερείται μερικώς του εξωνίου 5 και των εξωνίων 6-10, συμπεριλαμβανομένου του τμήματος της περιοχής δέσμευσης GTP (Εικ. 59). Όπως περιγράφηκε προηγουμένως η περιοχή δέσμευσης GTP είναι απαραίτητη για το σχηματισμό του συμπλόκου νηματίων σεπτινών στο δακτύλιο. Συνεπώς έλλειψη αυτής της περιοχής προκαλεί απώλεια λειτουργίας της SEPT12 και επακόλουθη αδυναμία πολυμερισμού νηματίων σεπτίνης στο σημείο του δακτυλίου του σπερματοζωαρίου. Η περικεκομμένη πρωτεΐνη SEPT12 μπορεί να διαταράξει τον σχηματισμό νηματίων της άγριου τύπου SEPT12. Άνθρωποι που φέρουν το συγκεκριμένο SNP παρουσιάζουν παθολογία σπέρματος, που σχετίζεται με αποσυμπυκνωμένο πυρήνα με αυξημένες βλάβες στο DNA, καμπυλωτή ουρά ή και ολοκληρωτική απώλεια ουράς, κεφαλή με ανώμαλο σχήμα και ανώριμες σπερματίδες. Οι 9 από τους 15 υπογόνιμους άντρες με c.474G>A παρουσιάστηκαν με τετατοζοοσπερμία (88%-99% μη φυσιολογικού σπέρματος) (Lin YH., Wang YY., Chen HI., Kuo YC., Chiou YW., Lin HH., Wu CM., Hsu CC., Chiang HS., Kuo PL., 2012).



[Εικόνα 59] Ταυτοποίηση νέων παραλλαγών στο γονίδιο *SEPTIN12*. Η γονιδιοματική δομή του γονιδίου *SEPTIN12* και οι θέσεις των δέκα SNP. Τα ανοιχτά κουτιά απεικονίζουν εξώνια. Η θέση έναρξης ATG βρίσκεται στο εξώνιο 2. Τα εξώνια 3 έως το εξώνιο 8 κωδικοποιεί την περιοχή δέσμευσης GTP της *SEPTIN12* (Lin YH., Wang YY., Chen HI., Kuo YC., Chiou YW., Lin HH., Wu CM., Hsu CC., Chiang HS., Kuo PL., 2012).

Σε μια πρόσφατη έρευνα με 67 υπογόνιμους άνδρες Ιρανικής καταγωγής βρέθηκε ένας νέος πολυμορφισμός G5508A στο γονίδιο *SEPT12*. Πιστεύεται ότι ο πολυμορφισμός G5508A μπορεί να επηρεάζει τη σπερματογένεση στους άνδρες, κάτι που όμως χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση (Shahhoseini M., Azad M., Sabbaghian M., Shafipour M., Akhoond MR., Salman-Yazdi R., Sadighi Gilani MA., Gourabi H., 2015).

Επομένως με βάση τα παραπάνω ευρήματα αποδεικνύεται ότι οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SEPT12* εξασθενίζουν τη δομική ακεραιότητα του σπέρματος διακόπτοντας το σχηματισμό των νηματίων σεπτίνης στο δακτύλιο.

Συμπεράσματα σχετικά με τις μεταλλάξεις ασθενοζωοσπερμίας

[Πίνακας 11] Μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθενοζωοσπερμία

Φαινότυπος	Γονίδιο	Λειτουργία	Έκφραση-Δράση	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Τύπος Μετάλλαξης
Ασθενοζωοσπερμία	<i>SEPT12</i>	Συστατικό του συμπλέγματος σεπτίνων στο δακτύλιο των σπερματοζωαρίων	Στρογγυλές σπερματίδες	Σχηματίζεται ελαττωματικός δακτύλιος με καμπυλωτή ουρά	Ετερόζυγη (c.266C> T), (c.589G> A) (9c.474 G>A), (G5508A), (IVS1+83A>G), (IVS1+316A>G), (IVS1+334C>T), (c.332C>T), (c.375-1G>A), (c.494T>A*), (IVS5+71A>G), (IVS6+35G>A), (IVS8+7G>A)

Οι μεταλλάξεις που προκαλούν φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας θεωρούνται από τις λιγότερο επιβλαβείς μεταλλάξεις, καθώς με τις σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις με χρήση της τεχνικής ICSI οι φορείς των μεταλλάξεων μπορούν να αποκτήσουν δικό τους παιδί. Με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης ICSI επιτυγχάνεται η γονιμοποίηση, καθώς το σπερματοζωάριο εγχύεται με μικροένεση στο ωάριο και συνεπώς η περιορισμένη κινητικότητα του δεν παρουσιάζεται εδώ ως εμπόδιο για τη γονιμοποίηση. Το μόνο που μπορεί να είναι επίφοβο σε αυτό το χειρισμό του περιστατικού είναι ότι οι επικρατείς μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12* μπορεί να μεταφερθούν στους αρσενικούς απογόνους και αυτοί θα είναι επίσης υπογόνιμοι με φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας.

Έχουν αναφερθεί 13 μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12* με πολύ χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, όμως ο αυξημένος αριθμός και η ποικιλία των μεταλλάξεων αυτών επισημαίνει ότι το συγκεκριμένο γονίδιο είναι πολύ σημαντικό για τη σωστή

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

διαμόρφωση και κινητικότητα του σπερματοζωαρίου. Επίσης ο αυξημένος αριθμός των μεταλλάξεων μπορεί να σημαίνει ότι το γονίδιο της *SEPT12* είναι επιρρεπές σε μεταλλάξεις. Όποτε κρίνεται σημαντική η επακόλουθη έρευνα στο σημείο αυτό.

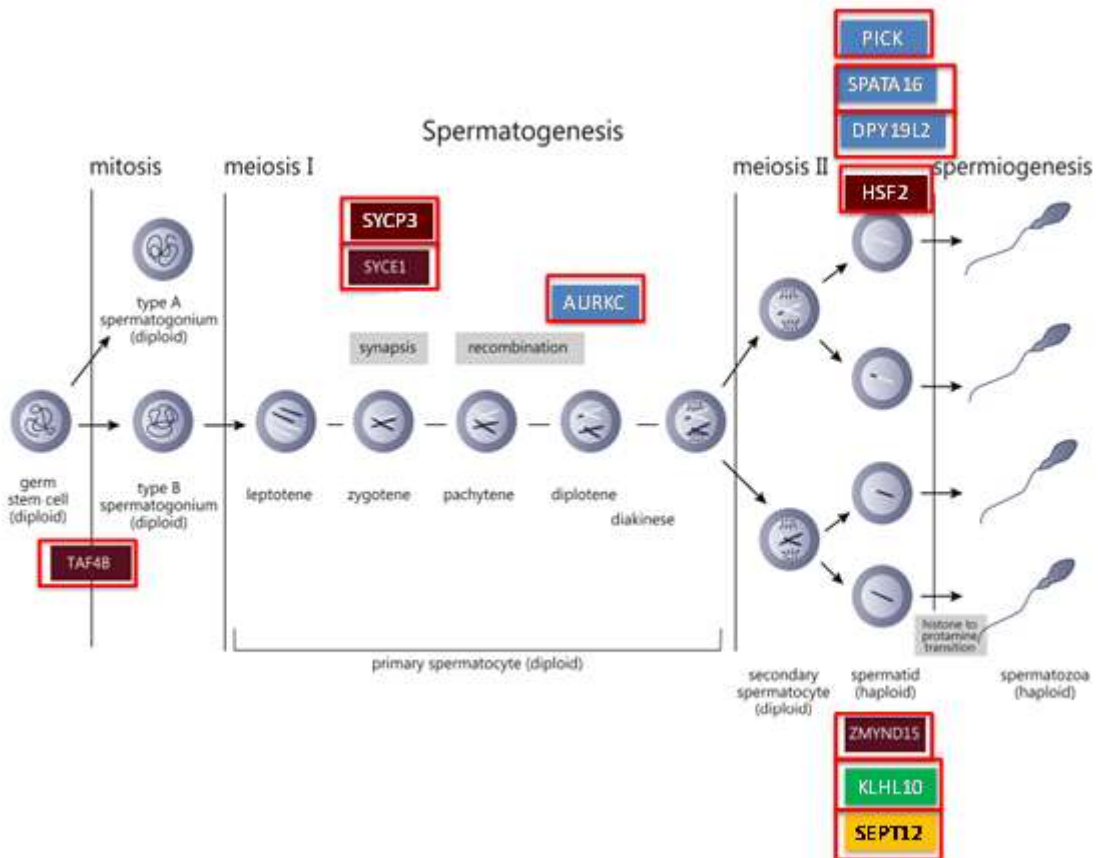
Κεφάλαιο 3

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων τριών δεκαετιών η ποιότητα του ανδρικού σπέρματος έχει μειωθεί σημαντικά με συνέπεια το ποσοστό της ανδρικής υπογονιμότητας να παρουσιάζει μεγάλη αύξηση. Σε αντίθεση με τις θεραπείες της γυναικείας υπογονιμότητας, όπου είναι δυνατοί οι ορμονικοί χειρισμοί για την διέγερση ή την ενίσχυση της παραγωγής των ωοκυττάρων, η σπερματογένεση και οι ανωμαλίες της ποιότητας των σπερματοζωαρίων αποτελούν πολύ πιο δύσκολες περιπτώσεις για θεραπεία.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ένας υγιής τρόπος ζωής μπορεί να βελτιώσει τη γονιμότητα των ανδρών. Ωστόσο, αν αυτό δεν είναι επιτυχές, οι τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, όπως η IVF είτε η ICSI, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επίτευξη εγκυμοσύνης. Όταν χρησιμοποιούνται οι τεχνικές αυτές, μια επαρκής γενετική διάγνωση έχει μεγάλη σημασία για να εκτιμηθεί εάν μια γενετική ανωμαλία θα μεταδοθεί στους απογόνους. Η πιο κοινή πρακτική για την αξιολόγηση της ανδρικής γονιμότητας είναι δύο χωριστές αναλύσεις σπέρματος, όπου μετρούνται παράμετροι όπως ο αριθμός των κυττάρων, η μορφολογία και η κινητικότητα αυτών. Ωστόσο, μια τέτοιου είδους ανάλυση σπέρματος παρέχει περιορισμένες πληροφορίες και δεν μπορεί να διακρίνει τους γόνιμους από τους στérους άνδρες. Συνεπώς, η κατάλληλη γενετική διάγνωση και η χρήση βελτιωμένων σπερματικών βιοδεικτών για την εκτίμηση της σοβαρότητας των αιτιών της υπογονιμότητας καθώς και η επακόλουθη στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση κρίνονται αναγκαίες.

Εκτιμάται ότι πάνω από 2.300 γονίδια παίζουν ρόλο στην ανθρώπινη σπερματογένεση και τα μοντέλα knockout ποντικών υποδεικνύουν ότι περίπου 400 γονίδια εμπλέκονται στη σπερματογένεση. Το 10% όλων των πρωτεϊνών είναι αφιερωμένο στη ρύθμιση της σπερματογένεσης και μόνο η σπερματογένεση περιλαμβάνει τουλάχιστον 500 όρχι-ειδικά γονίδια. Ο αριθμός των γνωστών γονιδίων που σχετίζονται με μονογονική κληρονομικότητα που οδηγεί σε αποτυχία σπερματογένεσης στους άνδρες είναι πολύ μικρότερος. Στη συγκεκριμένη μελέτη αναλύθηκαν τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για διάφορους παθολογικούς φαινότυπους λόγω των βλαβών που προκαλούν οι μεταλλάξεις των γονιδίων σε διάφορα στάδια της σπερματογένεσης (Εικ. 60).



[Εικόνα 60] Σύνολο των μεταλλάξεων που μελετήθηκαν στα αντίστοιχα στάδια της σπερματογένεσης που επηρεάζουν. Το Μπορντό χρώμα αντιχτοιχεί σε μεταλλάξεις που προκαλούν αζωοσπερμία, το μπλέ χρώμα σε μεταλλάξεις που σχετίζονται με τερατοσπερμία, το πράσινο χρώμα σε μεταλλάξεις ολιγοσπερμίας και το κίτρινο χρώμα σε μεταλλάξεις που σχετίζονται με ασθενοζωοσπερμία.

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *SYCP3*, *SYCE1*, *HSF2*, *TAF4B*, και *ZMYND15* είναι υπεύθυνες για το φαινότυπο αζωοσπερμίας. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις θεωρούνται οι πιο σημαντικές καθώς η αζωοσπερμία που παρατηρείται στα άτομα που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις είναι μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία κάτι που σημαίνει πως στο δείγμα εκσπερμάτισης και στην βιοψία αυτών των ατόμων δεν ανιχνεύεται κανένα ώριμο σπερματοζώριο καθώς η διαδικασία της σπερματογένεσης είναι ελαττωματική εξαιτίας των γονιδιακών αυτών μεταλλάξεων που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες διαφόρων σταδίων της σπερματογένεσης. Συνεπώς οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν στην συγκεκριμένη μελέτη είναι στείροι. Η μόνη θεραπευτική προσέγγιση στα άτομα αυτά θα είναι συμβουλευτική για τη χρήση δότη σπέρματος, καθώς με το δικό τους βιολογικό υλικό δεν μπορεί να επιτευχθεί καμία σύγχρονη τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Η ανίχνευση αυτών των μεταλλάξεων στα άτομα με αζωοσπερμία θα βοηθήσει στην αποφυγή αναποτελεσματικών κύκλων βιοψίας. Η αζωοσπερμία αποτελεί μια από τις σοβαρότερες μορφές ανδρικής υπογονιμότητας και

απαντάται περίπου στο 1% των ανδρών του γενικού πληθυσμού και στο 11% των ανδρών που μπαίνουν σε διαδικασία διερεύνησης της γονιμότητάς τους.

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν τα γονίδια *SYCP3* και *SYCE1* είναι συστατικά του συμπλόκου συναπτομερούς το οποίο ρυθμίζει την σπερματογένεση κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης της πρόφασης I. Σε αυτό το σημείο τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα διαφοροποιούνται προς δευτερογενή σπερματοκύτταρα. Το σύμπλοκο συναπτομερούς μεσολαβεί στην ευθυγράμμιση και αντιστοίχιση των ομόλογων χρωμοσωμάτων και ενεργεί σαν ικρίωμα για τον μειωτικό ανασυνδυασμό. Οι συνάψεις και ο ανασυνδυασμός είναι τα βασικά γεγονότα για να διασφαλιστεί ο σωστός χρωμοσωμικός διαχωρισμός κατά την αναφάση της πρώτης μειωτικής διαίρεσης. Οι μεταλλάξεις στα γονίδια *SYCP3* και *SYCE1* οδηγούν σε ελαττωματική συναρμολόγηση συναπτομερούς με αποτέλεσμα αδυναμία ολοκλήρωσης της μείωσης I και μη σωστό διαχωρισμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα την πλήρη μειωτική καθήλωση, χωρίς την παρουσία των μετά-μειωτικών κυττάρων με τα πρωτογενή σπερματοκύτταρα να είναι ο πιο ώριμος τύπος κυττάρων. Συνεπώς τα άτομα που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις δεν παράγουν ώριμα σπερματοκύτταρα που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την γονιμοποίηση.

Ο μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ HSF2 ρυθμίζει την έκφραση των πρωτεϊνών θερμικού σοκ HSPs, οι οποίες είναι απαραίτητες για τη σωστή αναδίπλωση πρωτεϊνών και την προστασία τους κατά την διάρκεια της σπερματογένεσης. Οι HSF2 πρωτεΐνες προσδένονται σε συγκεκριμένες αλληλουχίες των υποκινητών των γονιδίων HSPs και διατηρούν τα γονίδια αυτά σε ανοιχτή διαμόρφωση, ώστε να είναι προσιτά σε μεταγραφικούς παράγοντες για να παραχθούν οι αντίστοιχες πρωτεΐνες. Συνεπώς οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *HSF2* απορυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών HSPs και οδηγούν σε βλάβες κατά την σπερματογένεση. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι βλάβες που παρατηρούνται γίνονται στο στάδιο των σπερματοκυττάρων. Όμως, η συχνότητα της μετάλλαξης (*R502H*) που περιγράφηκε είναι πολύ χαμηλή (1/766) όποτε δεν μπορούν να αποκλειστούν συνυπάρχουσες αλλοιώσεις σε άλλα σημαντικά γονίδια. Επομένως είναι ιδιαίτερα σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *HSF2* που σχετίζονται με αζωοσπερμία.

Η πρωτεΐνη TAF4B εκφράζεται ειδικά στον ορχί και αποτελεί το συστατικό του συμπλόκου μεταγραφικών παραγόντων του TFIID που προσδένεται στον υποκινητή σε

αλληλουχία *TATA box* για την επακόλουθη στρατολόγηση της RNApol II που θα οδηγήσει σε γονιδιακή έκφραση. Η πρωτεΐνη TAF4B είναι απαραίτητη για τη γονιδιακή έκφραση στα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης και για τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των σπερματογόνιων γαμετικών κυττάρων. Η πρόωμη έκφραση του γονιδίου *TAF4b* σε σπερματογόνια γαμετικά κύτταρα στον μεταγεννητικό όρχι είναι απαραίτητη για τη σωστή διατήρηση της σπερματογένεσης στον ενήλικα. Αν και άλλα συστατικά της RNA Polymerase II της βασικής μεταγραφικής συσκευής επηρεάζουν τη μείωση, η TAF4b απαιτείται για τη μίτωση σε σπερματογόνια. Δηλαδή οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *TAF4B* δημιουργούν βλάβες στο σημείο της αυτοανανέωσης και του πολλαπλασιασμού των αρχέγονων βλαστικών κυττάρων (σπερματογόνιων). Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *TAF4B* απορυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων στόχων της που είναι απαραίτητα για τα αρχικά στάδια της σπερματογένεσης κατά την μίτωση των σπερματογόνιων που γίνεται ώστε να πολλαπλασιαστούν και να αυτοανανεωθούν τα αρχέγονα γαμετικά κύτταρα. Οι φορείς των ομόζυγων μεταλλάξεων του γονιδίου *TAF4B* έχουν διμορφικό φαινότυπο καθώς παρατηρείται αζωοσπερμία και ολιγοσπερία σε κάποιες περιπτώσεις. Η συχνότητα της μετάλλαξης είναι χαμηλή καθώς η μετάλλαξη έχει ταυτοποιηθεί σε τέσσερα άτομα της ίδιας οικογένειας, απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση.

Η πρωτεΐνη ZMYND15 δρα ως μεταγραφικός καταστολέας μέσω της στρατολόγησης των αποακετυλάσεων της ιστόνης (HDAC) που καταστέλλουν τη γονιδιακή μεταγραφή συμπυκνώνοντας τη χρωματίνη, ώστε οι μεταγραφικοί παράγοντες να μην μπορούν να προσδεθούν σε αυτήν. Η ZMYND15 δρα και εκφράζεται σε σπερματοκύτταρα του σταδίου πατυταινίας και σε όλες τις αναπτυσσόμενες σπερματίδες. Συνεπώς οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *ZMYND15* οδηγούν σε απορύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με αποτέλεσμα να υπερεκφράζονται πολλές πρωτεΐνες και να πραγματοποιούνται βλάβες στη σπερματογένεση στο στάδιο της σπερματίδας. Το γεγονός αυτό έχει ως συνέπεια την επακόλουθη εξάντληση των σπερματίδων και την πρόκληση αζωοσπερμίας. Η συχνότητα της μετάλλαξης είναι χαμηλή καθώς η μετάλλαξη έχει ταυτοποιηθεί σε τρία άτομα της ίδιας οικογένειας, απαραίτητη η περαιτέρω μελέτη.

Ο φαινότυπος μακροζωοσπερμίας που προκαλείται από μετάλλαξη στο γονίδιο *AURKC* αποτελεί επίσης πολύ σημαντική μετάλλαξη, καθώς τα άτομα που φέρουν την συγκεκριμένη μετάλλαξη δεν μπορούν να επωφεληθούν από τις νέες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ώστε να τεκνοποιήσουν. Τα σπερματοζώαρια των

ατόμων αυτών είναι 100% ανευπλειδικά και φέρουν υψηλή συχνότητα χρωμοσωμικών ανωμαλιών, συνεπώς η επιτυχής γονιμοποίηση καθίσταται αδύνατη. Η διαχείριση των ασθενών με μακροζωοσπερμία πρέπει να ξεκινά με τη ανάλυση του γονιδίου *AURKC*. Η τεχνική ICSI αντενδείκνυται για όλους τους ομόζυγους μεταλλαγμένους ασθενείς, οι οποίοι μπορεί να προσφύγουν σε δότη σπέρματος ή υιοθεσία. Τα μακροζωοσπερμικά σπερματοζωάρια αποδείχθηκε ότι είναι ανευπλοειδικά, συνεπώς δεν θα πρέπει να επιχειρηθεί ICSI σε *AURKC*-μεταλλαγμένους ασθενείς ακόμη και μετά από μια πολύ εμπεριστατωμένη μορφολογική επιλογή των σπερματοζωαρίων τους. Η μακροζωοσπερμία είναι μια πολύ σπάνια μορφολογική διαταραχή των σπερματοζωαρίων που παρατηρείται σε λιγότερο από το 1% των υπογόνιμων ανδρών. Όμως παρά την χαμηλή συχνότητα εμφάνισης του φαινοτύπου μακροζωοσπερμίας και συνεπώς και των μεταλλάξεων *AURKC*, ο βαθμός υπογονιμότητας είναι πολύ υψηλός καθώς προκαλεί πλήρη στειρότητα. Παρά την σπανιότητα του φαινοτύπου της μακροζωοσπερμίας, οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *AURKC* θεωρείται ότι είναι το πιο συχνό αίτιο της ανδρικής υπογονιμότητας στους άνδρες της Βόρειας Αφρικής.

Το γονίδιο *AURKC* είναι μέλος της υποοικογένειας σερίνης/θρεονίνης της πρωτεϊνικής κινάσης Aurora που είναι ένα συστατικό του χρωμοσωμικού επιβατικού συμπλέγματος (CPC). Το CPC σύμπλεγμα έχει βασικές λειτουργίες στο κεντρομερές στην εξασφάλιση της σωστής ευθυγράμμισης και στον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων ενώ απαιτείται για τη σταθεροποίηση των χρωμοσωμικών μικροσωληνίσκων και τη συναρμολόγηση της ατράκτου. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC* προκαλούν απώλεια λειτουργίας της κινάσης και συνεπώς δεν πραγματοποιείται σωστός χρωμοσωμικός διαχωρισμός και τα ομόλογα χρωμοσώματα παραμένουν κοντά μεταξύ τους εντός του πυρήνα των σπερματοζωαρίων. Τα σπερματοζωάρια έχουν ελαττωματική διαίρεση της μείωσης I. Είναι πιθανό ότι η διαίρεση κατά την μείωση II είναι επίσης ελαττωματική, γεγονός που θα οδηγήσει σε σχηματισμό τετραπλοειδικών σπερματοζωαρίων ακατάλληλων για γονιμοποίηση. Επομένως τα περισσότερα σπερματοζωάρια είναι τετραπλοειδικά, υποδεικνύοντας πλήρη αποτυχία κυτοκίνησης, γεγονός που εξηγεί το φαινότυπο με μεγάλο μέγεθος των γαμετών. Αποδεικνύεται λοιπόν ότι δεν υπάρχει καμία ελπίδα για αυτόλογη γονιμοποίηση για άνδρες με έλλειψη του γονιδίου *AURKC*, οι οποίοι μπορούν να απευθύνονται μόνο σε δωρεά γαμετών ή υιοθεσία και θα πρέπει να αποφεύγονται αναποτελεσματικοί κύκλοι ICSI. Επομένως, είναι σημαντικό να πραγματοποιείται μοριακή διάγνωση για όλους τους μακροζωοσπερμικούς ασθενείς.

Η μετάλλαξη c.144delC αντιπροσωπεύει σχεδόν το 90% των μεταλλάξεων του γονιδίου *AURKC* και εκτιμάται ότι 1/50 έως 1/250 άτομα στο γενικό πληθυσμό είναι ετερόζυγείς φορείς ανάλογα με τον σχετικό γεωγραφικό πληθυσμό. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *AURKC* αποτελούν το πιο συχνό αίτιο της ανδρικής υπογονιμότητας, πριν από το σύνδρομο Klinefelter και τις Y-μικροελλείψεις, στους Αλγερινούς άνδρες και στους άνδρες της Βόρειας Αφρικής. Η μετάλλαξη p.Y248 * φαίνεται να είναι η κύρια μετάλλαξη που εντοπίζεται σε άτομα ευρωπαϊκής προέλευσης. Τέτοιου είδους μεταλλάξεις είναι σήμερα οι συχνότερες μεταλλάξεις που προκαλούν μακροζωοσπερμία. Η πιο συχνότερα εμφανιζόμενη μετάλλαξη στο πληθυσμό των μακροαζωοσπερμικών ασθενών είναι η μετάλλαξη c.144delC που αντιπροσωπεύει περίπου το 87,7% των μεταλλαγμένων αλληλόμορφων στο σύνολο των μακροαζωοσπερμικών ασθενών. Ο δεύτερος συχνότερος τύπος μετάλλαξης είναι *nonsense* μετάλλαξη p.Y248 * που αντιπροσωπεύει περίπου το 10,5% των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων. Οι σπανιότερες μεταλλάξεις είναι η μετάλλαξη *missense* στο εξώνιο 6 (p.C229Y), η μετάλλαξη στη θέση ματίσματος του εξωνίου 5 c436-2A> G και μετάλλαξη c.930 + 38G> A στην 3' αμετάφραστη περιοχή του γονιδίου *AURKC*.

Εξίσου σοβαρές είναι οι μεταλλάξεις στα γονίδια *DPY19L2*, *SPATA16* και *PICK1* που προκαλούν το φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας. Η σφαιροζωοσπερμία είναι ένας σπάνιος τύπος τερατοζωοσπερμίας με ακόμα πιο χαμηλή συχνότητα 0,1% που χαρακτηρίζεται από στρογγυλά σπερματοζωάρια χωρίς ακρόσωμα. Η έλλειψη ακροσώματος και συνεπώς των ακροσωματικών ενζύμων καθιστά τα σπερματοζωάρια ανίκανα να διεισδύσουν στη διαφανή ζώνη και να συγχωνευθούν με την ωλέμη των ωοκυττάρων. Οι αποτυχίες της γονιμοποίησης των ατόμων με φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας αποδίδονται σε ανεπάρκεια της ικανότητας ενεργοποίησης των ωαρίων, η οποία οφείλεται στην έλλειψη της φωσφολιπάσης (PLCz) ενός ορχί-ειδικού παράγοντα του σπέρματος. Η φωσφολιπάση εντοπίζεται στην εσωτερική ακροσωματική μεμβράνη και την πυρηνική μεμβράνη της μετά-ακροσωματικής περιοχής του ανθρώπινου σπέρματος. Λόγω αυτής της ανεπάρκειας ενεργοποίησης του ωαρίου η χρήση της τεχνική ICSI για ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία επιτυγχάνει χαμηλή αποτελεσματικότητα, καθώς τα ποσοστά γονιμοποίησης, εγκυμοσύνης και ζωντανών γεννήσεων είναι χαμηλά, εκτιμώνται στα 38%, 20% και 14% αντιστοίχως. Η αποτυχία ενεργοποίησης των ωοκυττάρων μπορεί να ξεπεραστεί με την τεχνητή ενεργοποίηση ωοκυττάρων (AOA) χρησιμοποιώντας το ιονοφόρο Ca^{2+} . Επομένως, η AOA σε συνδυασμό με την τεχνική ICSI βελτιώνει την

αποτελεσματικότητα της γονιμοποίησης, της εγκυμοσύνης και των ποσοστών ζωντανών γεννήσεων σε σύγκριση με την κλασσική ICSI. Ωστόσο, ο ρυθμός ζωντανών γεννήσεων ανά μεταφορά παραμένει μικρότερος σε ασθενείς με σφαιροζωοσπερμία σε σύγκριση με άλλους υπογόνιμους ασθενείς της ίδιας ηλικίας. Το γεγονός αυτό ενδέχεται να οφείλεται στη βλάβη του DNA του σπέρματος που σχετίζεται με την ελαττωματική συμπίκνωση της χρωματίνης και στον κατακερματισμό του DNA που περιγράφεται στα σφαιροζωοσπερμικά σπερματοζωάρια. Η μη φυσιολογική συμπίκνωση της χρωματίνης στη σφαιροζωοσπερμία μπορεί να συνδεθεί με μια αλλοιωμένη αντικατάσταση των ιστονών από τις πρωταμίνες. Επιπλέον, η απουσία της πρωταμίνης αυξάνει δραματικά την ευαισθησία του DNA σε θραύσματα. Συνολικά, οι επιγενετικές ανωμαλίες και ο κατακερματισμός του DNA σε πυρήνες σφαιροειδών σπερματοζωαρίων βλάπτουν το αναπτυξιακό δυναμικό των εμβρύων που προέρχονται από χρήση τεχνικής ICSI. Συνοπτικά, οι σφαιροζωοσπερμικοί ασθενείς συνδυάζουν χαμηλό ποσοστό ενεργοποίησης των ωοκυττάρων και κακή ανάπτυξη των εμβρύων που παράγονται από την τεχνική ICSI, εξηγώντας έτσι το σταθερά απογοητευτικό χαμηλό ποσοστό εγκυμοσύνης που παρατηρείται σε αυτούς τους ασθενείς.

Η πρωτεΐνη DPY19L2 είναι δομική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης του σπερματοζωαρίου και είναι απαραίτητη για την αγκυροβόληση του ακροσώματος στον πυρήνα. Κατά την απουσία του γονιδίου *Dpy19l2* το σχηματιζόμενο ακρόσωμα διαχωρίζεται σιγά σιγά από τον πυρήνα και στη συνέχεια απομακρύνεται από το σπέρμα με το κυτταρόπλασμα με αποτέλεσμα να έχουμε εμφανή φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *DPY19L2* είναι το πιο συχνό αίτιο που προκαλεί φαινότυπο σφαιροζωοσπερμίας με συχνότητα 80,5%. Έχουν περιγραφεί πολλοί τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2*, όμως η ομόζυγη διαγραφή ολόκληρου του γονιδίου *DPY19L2* είναι η πιο συχνή μετάλλαξη μεταξύ των μεταλλάξεων του γονιδίου *DPY19L2* με συχνότητα 52,3%. Οι ομόζυγες σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *DPY19L2* εμφανίζονται με συχνότητα 9,9%. Συνολικά, εντοπίστηκαν 13 σημειακές μεταλλάξεις τύπου *missense*, *nonsense* και θέσης ματίσματος μεταξύ των εξωνίων 5 και 21. Σε γενικές γραμμές, το γεγονός ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις τύπου *missense* βρίσκονται μεταξύ του εξωνίου 8 και 11 υποδηλώνει ότι αυτή είναι η κεντρική περιοχή της πρωτεΐνης *DPY19L2* που υποστηρίζει κάποιες κρίσιμες λειτουργίες της και συνεπώς με τις μεταλλάξεις χάνεται η συγκεκριμένη λειτουργία.

Η πρωτεΐνη SPATA16 εντοπίζεται στο σύστημα Golgi και εμπλέκεται στη μεταφορά προ-ακροσωμικών κοκκίων στο ακρόσωμα σε στρογγυλά και επιμήκη σπερματοζωάρια και ως εκ τούτου παίζει έναν ουσιαστικό ρόλο στο σχηματισμό του ακροσώματος κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* προκαλούν φαινότυπο σφαιροσπερμίας. Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* είναι πιο σπάνιες σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2*, καθώς εντοπίστηκαν μόνο σε δύο οικογένειες.

Τέλος η πρωτεΐνη PICK1 εμπλέκεται στη διακίνηση των κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακρόσωμα. Η πρωτεΐνη PICK1 μπορεί να εμπλέκεται στην εκβλάστηση των προακροσωμικών κυστιδίων από το σύστημα Golgi. Η αποτυχία της εκβλάστησης προακροσωματικών κυστιδίων μπορεί να μεταφέρει τις πρωτεΐνες ακροσωματικής μήτρας σε άλλα κυτταρικά διαμερίσματα, και αυτό μπορεί με τη σειρά του να οδηγήσει στον κατακερματισμό των ακροσωμάτων. Μια εναλλακτική εξήγηση είναι ότι η έλλειψη πρωτεΐνης PICK1 μπορεί έμμεσα να οδηγήσει σε ανεπάρκεια σύντηξης προακροσωμικών κυστιδίων. Η πρωτεΐνη PICK1 δεσμεύεται με μεμβρανικές πρωτεΐνες και ρυθμίζει τη μετακίνηση τους. Η έλλειψη της πρωτεΐνης PICK1 μπορεί να οδηγεί σε εσφαλμένη ταξινόμηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών σε προακροσωμικά κυστίδια. Μερικές από αυτές τις μεμβρανικές πρωτεΐνες θα μπορούσαν να αποτελούν μέρος της μηχανής σύντηξης. Η έλλειψη των συγκεκριμένων συστατικών σύντηξης οδηγεί τελικά σε μια μη φυσιολογική σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων και σε κατακερματισμένα ακροσώματα. Έχει περιγραφεί μια ομόζυγη μετάλλαξη στο γονίδιο *PICK1* που προκαλεί φαινότυπο σφαιροσπερμίας, όμως υπάρχει μόνο αυτή η αναφορά στη μετάλλαξη, όποτε είναι απαραίτητη η περαιτέρω διερεύνηση.

Οι λιγότερο επιβλαβείς μεταλλάξεις είναι αυτές που προκαλούν τους φαινοτύπους ασθενοζωοσπερμίας και ολιγοσπερμίας, καθώς με τις σύγχρονες θεραπευτικές προσέγγισης με χρήση της τεχνικής ICSI οι φορείς των μεταλλάξεων μπορούν να αποκτήσουν δικό τους παιδί.

Οι μεταλλάξεις *SEPT12* που είναι υπεύθυνες για το φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας προκαλούν ελαττωματική συναρμολόγηση του συμπλόκου των σεπτινών στο δακτύλιο του σπέρματος με αποτέλεσμα να μη σχηματίζεται φυσιολογικός δακτύλιος και είναι καμπυλωτή η ουρά του σπερματοζωαρίου. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε χαμηλή κινητικότητα σπέρματος και συνεπώς μειώνονται οι πιθανότητες το σπέρμα αυτό να

γονιμοποιήσει φυσιολογικά το ωάριο, καθώς η περιορισμένη κινητικότητα του παρεμποδίζει την μετακίνηση του σπέρματος στο σημείο της σάλπιγγας όπου συναντιούνται οι δύο γαμέτες. Όμως με την τεχνική της μικρογονιμοποίησης ICSI επιτυγχάνεται η γονιμοποίηση, καθώς το σπερματοζωάριο εγχύεται με μικροένεση στο ωάριο και συνεπώς η περιορισμένη κινητικότητα του δεν παρουσιάζεται εδώ ως εμπόδιο για την γονιμοποίηση. Το μόνο που μπορεί να είναι επίφοβο σε αυτό το χειρισμό του περιστατικού είναι ότι οι επικρατείς μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12* μπορεί να μεταφερθούν στους αρσενικούς απογόνους και αυτοί θα είναι επίσης υπογόνιμοι με φαινότυπο ασθενοζωοσπερμίας. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου *SEPT12* έχουν πολύ χαμηλή συχνότητα και όποτε είναι σημαντική η επακόλουθη έρευνα στο σημείο αυτό.

Οι μεταλλάξεις *KLHL10* είχε αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την εμφάνιση του φαινοτύπου oligospermίας, ο ακριβής ρόλος της αντίστοιχης φυσιολογικής πρωτεΐνης στην σπερματογένεση δεν έχει εξακριβωθεί. Η πρωτεΐνη *KLHL10* είναι ειδικός για το υπόστρωμα προσαρμογέας του συμπλόκου ουμπικουϊτινικής-πρωτεϊνικής λιγκάσης E3 με βάση CUL3, το οποίο με την σειρά του μεσολαβεί στην ουβικιτινίωση και στην επακόλουθη πρωτεασωματική αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων κατά τη διάρκεια της σπερματογένεσης. Συνεπώς είναι σημαντική για την ρύθμιση πρωτεϊνών-στόχων. Οι μεταλλάξεις που έχουν ταυτοποιηθεί βρίσκονται στις αλληλουχίες δέσμευσης με το υπόστρωμα-στόχος προς αποικοδόμηση. Άρα η μετάλλαξη μπορεί να παρεμποδίζει την πρόσδεση των πρωτεϊνών-στόχων προς αποικοδόμηση στην πρωτεΐνη *KLH10* και με αυτό τον τρόπο απορυθμίζονται οι πρωτεΐνες-στόχοι. Επίσης οι μεταλλαγμένες πρωτεΐνες *KLH10* δεν ομοδιμερίζονται όπως οι αγρίου τύπου πρωτεΐνες και συνεπώς η μειωμένη λειτουργικότητα της αποικοδόμησης μπορεί να οφείλεται σε μειωμένα επίπεδα των διμερών. Συνεπώς οι μεταλλάξεις είναι απώλειας λειτουργίας και επηρεάζουν την σπερματογένεση στο σημείο της μετά-μειωτικής σπερματίδας. Οι φορείς αυτών των μεταλλάξεων είναι oligospermικοί, όμως τα συγκεκριμένα άτομα μπορούν να αποκτήσουν δικά τους παιδιά. Καθώς με τις σύγχρονες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής όπως η απλή σπερματέγχυση IUI, η κλασσική IVF και η ICSI μπορεί να επιτευχθεί η γονιμοποίηση και σε ασθενείς με πολύ χαμηλό δείγμα σπέρματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι για την διαδικασία της ICSI είναι απαραίτητο μόνο ένα καλής μορφολογίας και κινητικότητας σπερματοζωάριο για να γίνει η μικρογονιμοποίηση του ωαρίου. Επομένως οι μεταλλάξεις *KLH10* έχουν επίπτωση στη φυσιολογική γονιμότητα, καθώς το άτομο που τις φέρει είναι oligospermικός και θα αντιμετωπίζει δυσκολίες

φυσιολογικής γονιμότητας. Όμως οι μεταλλάξεις αυτές δεν έχουν σοβαρή επίπτωση καθώς με τις σύγχρονες τεχνολογίες υποβοηθούμενης αναπαραγωγής οι ασθενείς που τις φέρουν μπορούν να δεχθούν την κατάλληλη θεραπεία γονιμότητας ώστε να αποκτήσουν δικό τους παιδί. Οι μεταλλάξεις *KLH10* έχουν χαμηλή συχνότητα, επειδή βρέθηκαν σε 8 άτομα μεταξύ 556 ασθενών. Άρα η χαμηλή συχνότητα εμφάνισης των μεταλλάξεων και η καλής πρόγνωσης υπογονιμότητα που προκαλούν αυτές οι μεταλλάξεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι δεν έχουν μεγάλη σημασία για τη διερεύνηση, επειδή θα αντιμετωπιστούν με την κατάλληλη θεραπεία. Το μοναδικό επίφοβο είναι ότι οι μεταλλάξεις έχουν επικρατή χαρακτήρα και θα μπορούν να κληρονομηθούν στους αρσενικούς απογόνους οι οποίοι θα φέρουν επίσης το φαινότυπο ολιγοσπερμίας και θα χρειαστούν με την σειρά τους βοήθεια.

Συνολικά, οι γνώσεις μας σχετικά με τις αιτίες που βρίσκονται πίσω από την ιδιοπαθή ανδρική υπογονιμότητα είναι περιορισμένες. Μόνο μερικές και σπάνιες γενετικές μεταλλάξεις έχουν συνδεθεί με την ανδρική υπογονιμότητα, κυρίως μέσω των γενετικών μελετών σε συγγενείς οικογένειες. Συμπερασματικά, κατά τη διάρκεια των επόμενων ετών αναμένεται ότι σε πολλούς άντρες που έχουν σήμερα διαγνωστεί με ανεξήγητη ανδρική υπογονιμότητα να δοθεί γενετικά, επιγενετικά ή περιβαλλοντικά αίτια. Άρα κρίνεται αναγκαία η περεταίρω μελέτη των μεταλλάξεων που προκαλούν την ανδρική υπογονιμότητα.

Περίληπτικά τα συμπεράσματα

Συμπεράσματα μεταλλάξεων που σχετίζονται με αζωοσπερμία

- Από τις σημαντικότερες μεταλλάξεις, καθώς προκαλούν μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία (απόλυτη στειρότητα)
- Θεραπεία -> χρήση δότη σπέρματος
- Λόγω χαμηλών συχνοτήτων εμφάνισης μεταλλάξεων -> ανάγκη για μελέτες με μεγαλύτερο όγκο δείγματος
- Μελλοντικές προοπτικές για διερεύνηση -> ανίχνευση μεταλλάξεων των γονιδίων *SYCP1*, *SYCP2*, *SYCE2*, *SYCE3* και *TEX12* που αποτελούν τα υπόλοιπα συστατικά συμπλόκου συναπτομερούς
- Καθορίζοντας την ομάδα όλων των μεταλλάξεων υπευθύνων για φαινότυπο αζωοσπερμίας -> χρήση τους ως μοριακοί δείκτες για την διαλογή των ατόμων με μη αποφρακτικού τύπου αζωοσπερμία, ώστε να αποφεύγονται αναποτελεσματικοί κύκλοι βιοψιών

Συμπεράσματα μεταλλάξεων που σχετίζονται με τερατοσπερμία

- Μακροζωοσπερμικοί φορείς των μεταλλάξεων *AURKC* είναι στείροι, μοναδική θεραπευτική προσέγγιση -> δωρεά γαμετών ή υιοθεσία
- Σημαντικό οι μακροζωοσπερμικοί ασθενείς φορείς μεταλλάξεων *AURKC* να μην καταβάλλονται σε αναποτελεσματικούς κύκλους ICSI (απαραίτητη η μοριακή διάγνωση για όλους τους μακροζωοσπερμικούς ασθενείς)
- Προοπτική για μελλοντική μελέτη -> η ενασχόληση με την μετάλλαξη p.Y248 * (κύρια στο ευρωπαϊκό πληθυσμό). Θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον να μελετηθεί η συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο ελληνικό πληθυσμό
- Έλεγχος του ελληνικού πληθυσμού για πολυμορφισμούς του γονιδίου *AURKC*
- Συσσωρεύονται πολλές μεταλλάξεις (13) στο γονίδιο *DPY19L2* και έχουν υψηλή συχνότητα εμφάνισης -> υποδηλώνει την μεγάλη σημασία για περεταίρω μελέτες

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

- Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο σχεδιασμός μελέτης που θα καθορίσει τους πολυμορφισμούς του γονιδίου *DPY19L2* στο ελληνικό πληθυσμό
- Οι μεταλλάξεις στο γονίδιο *SPATA16* και *PICK1* είναι πιο σπάνιες σε σύγκριση με τις μεταλλάξεις στο γονίδιο *DPY19L2* -> είναι λιγότερο σημαντικές για την έρευνα

Συμπεράσματα μεταλλάξεων που σχετίζονται με την олиγοσπερμία και την ασθενοζωοσπερμία

- Από τις λιγότερο επιβλαβείς -> με τις σύγχρονες τεχνικές υποβοηθούμενης αναπαραγωγής (σπερματέγχυση IUI, κλασσική IVF και ICSI) μπορεί να επιτευχθεί η γονιμοποίηση
- Μοναδικό επίφοβο -> επικρατής χαρακτήρας των μεταλλάξεων που μπορεί να κληρονομηθεί στους αρσενικούς απογόνους
- Χαμηλή συχνότητα μεταλλάξεων του γονιδίου *KLHL10* (8/556) + καλής πρόγνωσης υπογονιμότητα -> δεν έχουν μεγάλη σημασία για την έρευνα, επειδή θα αντιμετωπιστούν με την κατάλληλη θεραπεία
- Ο αυξημένος αριθμός των μεταλλάξεων του γονιδίου *SEPT12* (12) μπορεί να σημαίνει ότι είναι επιρρεπής σε μεταλλάξεις -> όποτε είναι σημαντική η επακόλουθη έρευνα

Κεφάλαιο 4

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΩΝ

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Φαινότυπος	Γονίδιο	Λειτουργία	Έκφραση-Δράση	Αποτέλεσμα Μετάλλαξης	Τύπος Μετάλλαξης
Αζωσπερμία	SYCP3	Συστατικό συμπλόκου συναπτομερούς	Στάδιο μείωσης Ι - σπερματοκύτταρα	Δεν συναρμολογείται συναπτομερές, καθήλωση σπερματογένεσης στο στάδιο σπερματοκυττάρων	Ετερόζυγη (643delA)
	SYCE1	Συστατικό συμπλόκου συναπτομερούς	Στάδιο μείωσης Ι - σπερματοκύτταρα	Δεν συναρμολογείται συναπτομερές, καθήλωση σπερματογένεσης στο στάδιο σπερματοκυττάρων	Ομόζυγη (613C>T), (197–2A>G)
	HSF2	Μεταγραφικός παράγοντας θερμικού σοκ	Στρογγυλές σπερματίδες	Απορύθμιση έκφρασης γονιδίων θερμικού σοκ, βλάβες σπερματογένεσης	Ετερόζυγη (R502H)
	TAF4B	Μεταγραφικός παράγοντας	Στάδιο μίτωση – πολλαπλασιασμού - σπερματογόνια	Απορύθμιση έκφρασης γονιδίων απαραίτητων για μίτωση και αυτοανανέωση, εξάντληση σπερματογόνιων	Ομόζυγη (p.R611X)
	ZMYND15	Μεταγραφικός καταστολέας	Στάδιο σπερμίας-σπερματίδες	Υπερέκφραση γονιδίων, εξάντληση σπερματίδων	Ομόζυγη (p.K507Sfs *3)
Μακροζωοσπερμία	AURKC	Συστατικό χρωμοσωμικού επιβατικού συμπλέγματος (CPC)	Στάδιο μείωσης Ι - σπερματοκύτταρα	Εσφαλμένο διαχωρισμό χρωμοσωμάτων, μεταφασικές μεταθέσεις, μειωτική διακοπή, ανεπάρκεια κυτοκίνησης και μορφολογικά ελαττώματα της ατράκτου, σύνθεση ανευπλοειδή σπερματοζωαρίων	Ομόζυγη (c.144delC), (c.686G>), (c.744C> A), (c.930+38G> A), (c.436-2A>G)
Σφαιροζωοσπερμία	DPY19L2	Δομική πρωτεΐνη της εσωτερικής πυρηνικής μεμβράνης σπερματοζωαρίου απαραίτητη για αγκυροβόληση του ακροσώματος	Σπερματίδες	Αποσταθεροποίηση των πυρηνικών πλακών που αντικρίζουν το ακρόσωμα, απομάκρυνση ακροσώματος	Ομόζυγη διαγραφή DPY19L2 , Ομόζυγη διαγραφή εξωνίων 5-6, 5-7, 7 και Ομόζυγες (c.1218+1G>A), (p.Q342X) (p.Q345X), (c.1183delT), (c.1532delA), (c.1679delT ;1682_1682delAC), (p.K680X), (p.R298C), (p.R290H), (p.L330P), (p.M358K), (p.T493R)
	SPATA16	Εντοπίζεται στο σύστημα Golgi και στα προ-ακροσωματικά κυστίδια, ουσιαστική στο σχηματισμό ακροσώματος.	Στρογγυλές και επίμηκες σπερματίδες	Δεν σχηματίζεται ακρόσωμα	Ομόζυγη (c.848G>A), Μετάλλαξη διαγραφής 22,6 Kb εξωνίου 2

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

	PICK1	Εμπλέκεται στη διακίνηση κυστιδίων από τη συσκευή Golgi στο ακρόσωμα.	Στρογγυλές σπερματίδες	Αποτυχία εκβλάστησης προακροσωμικών κυστιδίων είτε μη φυσιολογική σύντηξη των προακροσωμικών κυστιδίων που οδηγεί σε κατακερματισμένα ακροσώματα	Ομόζυγη (G198A)
Ολιγοσπερμία	KLHL10	Ειδικός για το υπόστρωμα προσαρμογέας του συμπλόκου ουμπικουϊνικής-πρωτεϊνικής λιγκάσης E3 με βάση CUL3, το οποίο μεσολαβεί στην ουβικιτινίωση και στην πρωτεασωματική αποικοδόμηση πρωτεϊνών-στόχων	Στρογγυλές σπερματίδες	Μειωμένα επίπεδα λειτουργικών διμερών KLHL10 και μεταλλάξεις στο σημείο πρόσδεσης υποστρώματος-πρωτεΐνης οπότε δεν ρυθμίζονται σωστά οι πρωτεΐνες-στόχοι	Ετερόζυγη (647A>C), (937G>A), (IVS3_121delTCTT)
Ασθενοζωοσπερμία	SEPT12	Συστατικό του συμπλέγματος σεπτίνων στο δακτύλιο των σπερματοζωαρίων	Στρογγυλές σπερματίδες	Σχηματίζεται ελαττωματικός δακτύλιος με καμπυλωτή ουρά	Ετερόζυγη (c.266C> T), (c.589G> A) (9c.474 G>A), (G5508A), (IVS1+83A>G), (IVS1+316A>G), (IVS1+334C>T), (c.332C>T), (c.375-1G>A), (c.494T>A*), (IVS5+71A>G), (IVS6+35G>A), (IVS8+7G>A)

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwa A., Mulgund A., Hamada A., Chyatte M.R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reprod Biol Endocrinol.*(13), 37. doi: 10.1186/s12958-015-0032-1
- Albertine K.H., Morton D.A., Peterson K.D. (2008). GRAY'S Ανατομία Οδηγός Ανατομής του Ανθρώπινου Σώματος. Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης .
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2006). *Βασικές Αρχές Κυτταρικής Βιολογίας, Τόμος II.* Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Ayhan Ö., Balkan M., Guven A., Hazan R., Atar M., Tok A., Tolun A. (2014). Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. *J Med Genet*, 51(4), 239-44. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102102
- Baier A., Alsheimer M., Benavente R. (2007). Synaptonemal complex protein SYCP3: conserved polymerization properties among vertebrates. *Biochim Biophys Acta*, 1774, 595–602.
- Ben Khelifa M., Coutton C., Blum MG., Abada F., Harbuz R., Zouari R. (2012). Identification of a new recurrent aurora kinase C mutation in both European and African men with macrozoospermia. *Hum Reprod.*, 27, 3337–46.
- Ben Khelifa M., Zouari R., Harbuz R., Halouani L., Arnoult C., Lunardi J. (2011). A new AURKC mutation causing macrozoospermia: implications for human spermatogenesis and clinical diagnosis. *Mol Hum Reprod.*, 17, 762–8.
- Björndahl L., Kvist U. (2010). Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Hum Reprod*, 1, 23-9.
- Björndahl L., Mortimer D., Barratt C.L.R., Castilla J.A., Menkveld R., Kvist U., Alvarez J. G., Haugen T.B. (2010). A Practical Guide to Basic laboratory andrology. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS.
- Bolcun-Filas E., Hall E., Speed R., Taggart M., Grey C. (2009). Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. *PLoS Genet*, 5, e1000393.

- Bolcun-Filas E., Schimenti JC. (2012). Genetics of meiosis and recombination in mice. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 298, 179-227.
- Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online*, 36(3), 327-339.
- Bracke A., Peeters K., Punjabi U., Hoogewijs D., Dewilde S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online*, 36(3), 327-339.
- Chen SR., Batool A., Wang YQ., Hao XX., Chang CS., Cheng CY., Liu YX. (2016). The control of male fertility by spermatid-specific factors: searching for contraceptive targets from spermatozoon's head to tail. *Cell Death Dis.*, 7(11), e2472.
- Chieh-Ju C. Tang, Chun-Yi Lin, Tang K. Tang. (2006). Dynamic localization and functional implications of Aurora-C kinase during male mouse meiosis. 290(2), 398-410.
- Coutton C., Escoffier J., Martinez G., Arnoult C., Ray PF. (2015). Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. *Hum Reprod Update.*, 21(4), 455-85.
- Creagh EM., Sheehan D., Cotter TG. (2018, Απρίλιος 17). *Leukemia*. Ανάκτηση από <https://www.nature.com/articles/2401841/figures/2>
- Dam AH., Kosciński I., Kremer JA., Moutou C., Jaeger AS., Oudakker AR., Tournaye H., Charlet N., Lagier-Tourenne C., van Bokhoven H., Viville S. (2007). Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. *Am J Hum Genet.*, 81(4), 813-20.
- De Braekeleer M., Nguyen MH., Morel F., Perrin A. (2015). Genetic aspects of monomorphic teratozoospermia: a review. *J Assist Reprod Genet.*, 32(4), 615-23. doi:10.1007/s10815-015-0433-2
- de Vries L., Behar D.M., Smirin-Yosef P., Lagovsky I., Tzur S., Basel-Vanagaite L. (2014). Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 99, E2129– E2132.
- Dieterich K., Soto Rifo R., Faure AK., Hennebicq S., Ben Amar B., Zahi M. (2007). Homozygous mutation of AURKC yields large-headed. *Nat Genet.*, 39, 661–5.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

- Dieterich K., Zouari R., Harbuz R., Vialard F., Martinez D., Bellayou H. (2009). The Aurora Kinase C c.144delC mutation causes meiosis I arrest in men and is frequent in the North African population. *Hum Mol Genet.*, 18(7), 1301-9.
- DOCPLAYER. (2018, April 12). Ανάκτηση από <http://docplayer.gr/113938-To-shediagrauuuapio-kato-paristanei-ton-aytodiplasiasuo-kai-to-diauoirasuo-ton-hrouatosouaton-sta-thygatrika-kyttara.html>
- Drake R.L., Vogl W., Mitchell A.W. (2007). GRAY'S Ανατομία. Αθήνα: εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης.
- Ehmcke J., Schlatt S. (2006). A revised model for spermatogonial expansion in man: lessons from non-human primates. *Reproduction*, 132, 673–680.
- El Inati E., Muller J., Viville S. (2012). Autosomal mutations and human spermatogenic failure. *Biochim Biophys Acta.*, 1822(12), 1873-9.
- El Kerch F., Lamzouri A., Laarabi FZ., Zahi M., Ben Amar B., Sefiani A. (2011). [Confirmation of the high prevalence in Morocco of the homozygous mutation c.144delC in the aurora kinase C gene (AURKC) in the teratozoospermia with large-headed spermatozoa]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod.*, 40, 329-33.
- ElInati E., Fossard C., Okutman O., Ghédir H., Ibala-Romdhane S., Ray PF., Saad A., Hennebicq S., Viville S. (2016). A new mutation identified in SPATA16 in two globozoospermic patients. *J Assist Reprod Genet.*, 33(6), 815-20.
- Eloulid A., Rouba H., Rhaissi H., Barakat A., Louanjli N., Bashamboo A. (2014). Prevalence of the Aurora kinase C c.144delC mutation in infertile Moroccan men. *Fertil Steril.*, 101, 1086–90.
- Falender AE., Freiman RN., Geles KG., Lo KC., Hwang K., Lamb DJ., Morris PL., Tjian R., Richards JS. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes Dev.*, 19(7), 794-803.
- Fellmeth JE., Ghanaim EM., Schindler K. (2016). Characterization of macrozoospermia-associated AURKC mutations in a mammalian meiotic system. *Hum Mol Genet.*, 25(13), 2698-2711.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., Benavente R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Exp Cell Res.*, 318(12), 1340-6.

Fraune J., Schramm S., Alsheimer M., Benavente R. (2012). The mammalian synaptonemal complex: protein components, assembly and role in meiotic recombination. *Experimental Cell Research*, 318, 1340-1346.

Fujihara Y., Satouh Y., Inoue N., Isotani A., Ikawa M., Okabe M. (2012). SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development*, 139(19), 3583-9.

Geisinger A., Benavente R. (2016). Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenetic and Genome Research*, 150, 77-85.

Gene Cards_a. (2018, March 14). Ανάκτηση από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYCP3&keywords=sycp3>

Gene Cards_b. (2018, March 14). Ανάκτηση από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYCE1&keywords=SYCE3>

Gene Cards_c. (2018, March 14). Ανάκτηση από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLHL10>

Gene Cards_d. (2018, April 4). Ανάκτηση από <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=AURKC>

Gene Cards_e. (2018, June 18). Ανάκτηση από <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HSF2>

Gene Cards_f. (2018, Ιούνιος 18). Ανάκτηση από <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAF4B>

Gene Cards_g. (2018, Ιούνιος 18). Ανάκτηση από <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PICK1>

Gene Cards_h. (2018, Ιούνιος 18). Ανάκτηση από <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SEPT12>

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Genetics Home Reference. (2018, Απρίλιος 30). Ανάκτηση από <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders/possiblemutations>

Ghédér H., Gribaa M., Mamaï O., Ben Charfeddine I., Braham A., Amara A., Mehdi M., Saad A., Ibala-Romdhane S. (2015). Macrozoospermia: screening for the homozygous c.144delC mutation in AURKC gene in infertile men and estimation of its heterozygosity frequency in the Tunisian population. *J Assist Reprod Genet.*, 32(11), 1651-8.

Goodrich JA., Tjian R. (2010). Unexpected roles for core promoter recognition factors in cell-type-specific transcription and gene regulation. *Nature Reviews Genetics*, 11, 549–558.

Hamer G., Wang H., Bolcun-Filas E., Cooke H.J., Benavente R., Höög C. (2008). Progression of meiotic recombination requires structural maturation of the central element of the synaptonemal complex. *J Cell Sci*, 121, 2445–2451.

Harbuz R., Zouari R., Dieterich K., Nikas Y., Lunardi J., Hennebicq S., Ray PF. (2009). [Function of aurora kinase C (AURKC) in human reproduction]. *Gynecol Obstet Fertil.*, 37, 546–51.

He J., Xia M., Tsang WH., Chow KL., Xia J. (2015). ICA1L forms BAR-domain complexes with PICK1 and is crucial for acrosome formation in spermiogenesis. *J Cell Sci.*, 128(20), 3822-36.

Jungwirth A., Diemer T., Giwercman A., Kopa Z., Krausz C. (2010). *ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΕΣ ΟΔΗΓΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΔΡΙΚΗΣ ΥΠΟΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ*. Ανάκτηση από [imop.gr: http://www.imop.gr/sites/default/files/Male%20Infertility%20pocket%202011%20edn..pdf](http://www.imop.gr/sites/default/files/Male%20Infertility%20pocket%202011%20edn..pdf)

Kahle W., Leonhardt H., Platzer W. (1985). Εγχειρίδιο ανατομικής του ανθρώπου με εγχρωμο άτλαντα. Αθήνα: Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας.

Kazantsev AG., Thompson LM. (2008). Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov.*, 7(10), 854-68.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

- Kuo YC., Lin YH., Chen HI., Wang YY., Chiou YW., Lin HH., Pan HA., Wu CM., Su SM., Hsu CC., Kuo PL. (2012). SEPT12 mutations cause male infertility with defective sperm annulus. *Hum Mutat.*, 33(4), 710-9.
- Lin YH., Wang YY., Chen HI., Kuo YC., Chiou YW., Lin HH., Wu CM., Hsu CC., Chiang HS., Kuo PL. (2012). SEPTIN12 genetic variants confer susceptibility to teratozoospermia. *PLoS One.*, 7(3), e34011.
- Liu G., Shi QW., Lu GX. (2010). A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. *Asian J Androl.*, 12(4), 556-60.
- Lovasco LA., Gustafson EA., Seymour KA., de Rooij DG., Freiman RN. (2015). TAF4b is required for mouse spermatogonial stem cell development. *Stem Cells*, 33(4), 1267-76.
- Lumen Learning.* (2018, Απρίλιος 27). Ανάκτηση από https://s3-us-west-2.amazonaws.com/courses-images/wp-content/uploads/sites/1940/2017/06/23190839/Complete_diagram_of_a_human_spermatozoa_en.svg_-768x700.png
- Maor-Sagie E., Cinnamon Y., Yaacov B., Shaag A., Goldsmidt H. (2015). Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet.*, 32, 887– 891.
- Miyamoto T., Hasuike S., Yogev L., Maduro MR., Ishikawa M., Westphal H., Lamb DJ. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *Lancet*, 362, 1714-1719.
- Miyamoto T., Minase G., Shin T., Ueda H., Okada H., Sengoku K. (2017). Human male infertility and its genetic causes. *Reproductive Medicine and Biology*, 16, 81-88.
- Mou L., Wang Y., Li H., Huang Y., Jiang T., Huang W., Li Z., Chen J., Xie J., Liu Y., Jiang Z., Li X., Ye J., Cai Z., Gui Y. (2013). A dominant-negative mutation of HSF2 associated with idiopathic. *Hum Genet.*, 132(2), 159-65.
- Nguyen AL., Schindler K. (2017). Specialize and Divide (Twice): Functions of Three Aurora Kinase Homologs in Mammalian Oocyte Meiotic Maturation. *Trends Genet.*, 33(5), :349-363.
- Nieschlag E., Behre H. M., Nieschlag S. (2010). *Andrology* (3rd Edition εκδ.). Springer. doi:10.1007/978-3-540-78355-8

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

Pierre V., Martinez G., Coutton C., Delaroche J., Yassine S., Novella C., Pernet-Gallay K., Hennebicq S., Ray PF., Arnoult C. (2012). Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. *Development.* , 139(16), 2955-65.

Ray PF., Toure A., Metzler-Guillemain C., Mitchell MJ., Arnoult C., Coutton C. (2017). Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. *Clin Genet.*, 91(2), 217-232.

Reproduccion Asistida. (2018, Απρίλιος 30). Ανάκτηση από <https://www.reproduccionasistida.org/esterilidad-masculina-debida-a-un-factor-espermatico/alteraciones-en-la-concentracion-seminal/>

Reproduccion Asistida. (2018, Απρίλιος 30). Ανάκτηση από <https://www.reproduccionasistida.org/oligozoospermia/diagnostico-de-oligospermia/>

schoolbag. (2018, Απρίλιος 30). Ανάκτηση από <http://schoolbag.info/biology/mcat/58.html>

Schramm S, Fraune J., Naumann R., HernandezHernandez A., Höög C. (2011). A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. *PLoS Genet*, 7, e1002088.

Shahhoseini M., Azad M., Sabbaghian M., Shafipour M., Akhoond MR., Salman-Yazdi R., Sadighi Gilani MA., Gourabi H. (2015). New single nucleotide polymorphism G5508A in the SEPT12 gene may be associated with idiopathic male infertility in Iranian men. *Iran J Reprod Med.*, 13(8), 503-6.

Sherwood L. (2016). *Εισαγωγή στη Φυσιολογία του Ανθρώπου. Από τα κύτταρα στον άνθρωπο.* (8η Έκδοση εκδ.). Εκδόσεις Μπάσδρα.

slideplayer., (2018, Απρίλιος 7). Ανάκτηση από <http://slideplayer.com/8382406/26/images/86/Initiation+of+transcription+by+Pol+II.jpg>

SOCRATIC. (2018, April 12). Ανάκτηση από <https://socratic.org/questions/in-meiosis-how-does-prophase-i-differ-from-prophase-ii-1>

Stouffs K., Vandermaelen D., Tournaye H., Liebaers I., Lissens W. (2011). Mutation analysis of three genes in patients with maturation arrest of spermatogenesis and couples with recurrent miscarriages. *Reprod Biomed Online*, 22, 65– 71.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

- Syrjänen JL., Pellegrini L., Davies OR. (2014). A molecular model for the role of SYCP3 in meiotic chromosome organisation. *eLife*, 3, e02963.
- Vander A., Sherman J., Luciano D., Tsakopoulos M. (2011). *Φυσιολογία του Ανθρώπου* (8th εκδ.). Αθήνα: Π.Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.
- Wang G., Ying Z., Jin X, Tu N, Zhang Y., Phillips M. (2004). Essential Requirement for Both hsf1 and hsf2 Transcriptional Activity in Spermatogenesis and Male Fertility. *Genesis*, 38(2), 66-80.
- Wang S., Zheng H., Esaki Y., Kelly F., Yan W. (2006). Cullin3 Is a KLHL10-Interacting Protein Preferentially Expressed During Late Spermiogenesis. *Biol Reprod.*, 74(1), 102-8.
- Whittle N., Singewald N. (2014). HDAC inhibitors as cognitive enhancers in fear, anxiety and trauma therapy: where do we stand? *Biochemical Society Transactions*, 42(2), 569-581.
- Widlak W., Vydra N. (2017). The Role of Heat Shock Factors in Mammalian Spermatogenesis. *Adv Anat Embryol Cell Biol.*, 222, 45-65.
- World Health Organization. (2010). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (FIFTH EDITION εκδ.). Department of Reproductive Health and Research.
- WriteOpinions.com. (2018, April 17). Ανάκτηση από <http://1.bp.blogspot.com/-z5ngVIJIEG0/TsqLNpfOJ9I/AAAAAAAAAw4/j6LiRwMWjQY/s1600/Gambar%252BSpermiogenesis.png>
- Xiao N., Kam C., Shen C., Jin W., Wang J., Lee KM., Jiang L., Xia J. (2009). PICK1 deficiency causes male infertility in mice by disrupting acrosome formation. *J Clin Invest.*, 119(4), 802-12.
- Xie C., Chen X., Liu Y., Wu Z., Ping P. (2018). Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia. *J Int Med Res.*, 46(1), 107-114.
- Xu M., Xiao J., Chen J., Li J., Yin L., Zhu H., Zhou Z., Sha J. (2003). Identification and characterization of a novel human testis-specific Golgi protein, NYD-SP12. *Mol Hum Reprod.*, 9(1), 9-17.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.

- Yan W., S. Y. (2010). Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. *J Biol Chem.* , 285(41), 31418-26.
- Yan, W., Ma, L., Burns, K.H., Matzuk, M.M. (2004). Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 101, 7793–7798.
- Yatsenko AN., Roy A., Chen R., Ma L., Murthy LJ., Yan W., Lamb DJ., Matzuk MM. (2006). Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Hum Mol Genet*, 23, 3411-9.
- Yuan L., Liu JG., Zhao J., Brundell .E, Daneholt B., Höög C. (2000). The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5, 73–83.
- Βενάκη Ε. (2005). Ανδρική υπογονιμότητα. *Ελληνική Εταιρεία Γυναικολογικής Ενδοκρινολογίας*, 17-21.
- Λεκανίδου Ρ., Τσιτήλου Σ., Ροδάκης Γ.Κ. (2007). *Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία*. Αθήνα: Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Μηντζιώρη Γ., Γουλής Δ.Γ. (n.d.). ΕΝΤΑΤΙΚΗ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΔΟΚΡΙΝΟΛΟΓΙΑ: 13ΟΣ ΚΥΚΛΟΣ - ΓΟΝΑΔΕΣ.
- Παρανυχιανακης Γ. (2018, Απρίλιος 27). *Ιδιοπαθής ολιγοασθενοσπερμία Πως αναγνωρίζεται και πως αντιμετωπίζεται*. Ανάκτηση από Iatriki Online: http://www.iatrikionline.gr/url_56/55.pdf
- Παρασκευάς Γ. (2008). Ανατομία του Αθρώπου. Θεσσαλονίκη: University Studio Press.

Μελέτη μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανδρική υπογονιμότητα.